



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Detección y análisis de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 y su participación
en el transporte de colesterol exógeno en *Entamoeba histolytica*: Su
relevancia en la virulencia”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. JENI BOLAÑOS REBOLLEDO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directoras de la Tesis:

DRA. MARÍA ESTHER OROZCO OROZCO

DRA. ABIGAIL BETANZOS FERNÁNDEZ

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 332248, en el Laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de las Dras. Ma. Esther Orozco Orozco y Abigail Betanzos Fernández.

Dedico este trabajo a mis padres y hermanas, que han estado físicamente lejos, pero emocionalmente cerca.

A Giovanhi, por complementarme y compartir este camino. Y a mis hijos Naomi y Gael que son mis pilares y mi fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, por estar siempre presente tanto física como emocionalmente y brindarme ese aliento en los momentos más difíciles, además de ser un ejemplo de que todo se puede lograr con esfuerzo y dedicación.

A la Dra. Abigail Betanzos Fernández, por enseñarme no sólo a trabajar duro, sino a sobrellevar y complementar todos los aspectos de la vida que nos rodean, me enseñó también que las situaciones pueden no ser las mejores pero debemos sobreponernos. Además de sus consejos y observaciones que enaltecieron este trabajo.

A mis asesores, Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, Dra. Patricia Talamás Rohana, Dra. Rosa Ma. del Ángel Núñez de Cáceres, Dr. Jesús Serrano Luna y Dr. Ricardo Mejía Zepeda, por sus consejos, acertadas observaciones y comentarios que ayudaron a comprender y mejorar este trabajo.

Al Dr. Arturo González Robles, la Dra. Mineko Shibayama Salas y el Dr. Michael Schnoor por brindarme su apoyo en el procesamiento de algunas muestras.

A las Doctoras Guillermina García, Miriam Huerta y Rosario Javier Reyna, gracias por su apoyo, amistad y sobre todo por su orientación y colaboración para realizar este trabajo.

A la Dra. Mineko Shibayama Salas, al Dr. Michael Schnoor y la Dra. María Eugenia Mendoza por su apoyo y contribución con el procesamiento y análisis de las muestras de los ratones C57BL/6.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por los buenos momentos, su orientación y amistad incondicional: Eli Hernández, Alfredo Toledo, Jonnatan Pais, Wendy Fonseca, Silvia Castellanos, Maricela Montaña, Patricia Cuellar, Yunúen Avalos, Ravi Narayanasamy, Ausencio Galindo, Mitzi Díaz, Tomas Sánchez, Alejandrina Reyes, Roció Guerrero, Claudia Díaz, Ricardo Ceja, Obed Méndez, Eloy Andrés Pérez y Octavio Galindo. Así como mis amigos

del Lab. 2: Martha Valle, Tania Fernández, Mariana Rodríguez, Javier Cazáres, Christian Medina, Marcos Muñiz, Jessica Borbolla, etc. Quienes de alguna forma han contribuido a la elaboración de este trabajo.

INDICE		Página
	ABSTRACT	1
1	RESUMEN	2
2	INTRODUCCIÓN	4
2.1	Epidemiología de la amibiasis	4
2.2	Formas de vida de <i>E. histolytica</i>	7
2.3	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	9
2.4	Patogénesis de <i>E. histolytica</i>	11
2.5	Factores de virulencia	12
2.6	Tráfico vesicular	15
2.7	Lípidos en <i>E. histolytica</i>	16
2.8	Colesterol	18
2.9	Transporte intracelular de colesterol	21
2.10	Proteína NPC1	25
2.11	Proteína NPC2	28
2.12	Enfermedad “Niemann-Pick Tipo C”	31
2.13	Acumulación de colesterol producida por la droga U1866A	33
3	JUSTIFICACIÓN	36
4	OBJETIVO GENERAL	37
5	OBJETIVOS PARTICULARES	38
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
7	MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1	Análisis <i>in silico</i> de las proteínas hipotéticas EhNPC1 y EhNPC2	40
7.2	Modelaje molecular	40
7.3	Cultivo de <i>E. histolytica</i>	41
7.4	Tratamiento con la droga U18666A	42
7.5	Extracción de DNA genómico	42
7.6	Extracción de RNA total	43
7.7	Tratamiento con DNasa	43
7.8	Síntesis de DNAc	43
7.9	Electroforesis en geles de agarosa	44

7.10	Diseño de oligonucleótidos y PCR	44
7.11	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
7.11.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida	47
7.12	Clonación de los genes <i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i>	47
7.12.1	Preparación de bacterias competentes	51
7.12.2	Transformación de bacterias	51
7.12.3	Purificación de los plásmidos y de los productos de interés	51
7.12.4	Ligación	52
7.12.5	Inducción de las proteínas recombinantes EhNPC2a y EhNPC2b	54
7.12.6	Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes GST-EhNPC2a y GST-EhNPC2b	54
7.12.7	Electroelución de las proteínas recombinantes	55
7.13	Síntesis del péptido de la proteína EhNPC1	55
7.14	Producción de anticuerpos	55
7.15	Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	56
7.15.1	Ensayos de Western blot (WB)	56
7.16	Cuantificación de colesterol	57
7.17	Tinción del colesterol (filipina)	57
7.18	Co-localización por inmunofluorescencia durante la fagocitosis	58
7.19	Microscopia electrónica de transmisión (MET)	58
7.20	Inmunoprecipitación	59
7.20.1	Dot blot	59
7.21	Ensayo de secreción	59
7.22	Obtención de eritrocitos	60
7.23	Adhesión	60
7.24	Eritrofagocitosis	60
7.25	Actividad citopática	61
7.26	Actividad citotóxica	61
7.27	Permeabilidad epitelial del intestino de ratones	62
7.28	Tinción con hematoxilina y eosina	62
7.29	Construcción de plásmidos para silenciamiento	63

7.30	Transfección de trofozoítos	63
7.31	Ensayo de migración	63
7.32	Análisis estadístico	63
7.33	Manejo ético de los animales	64
8	RESULTADOS	65
	<i>E. histolytica</i> posee un gen <i>npc1</i> (<i>ehnpc1</i>) y dos genes <i>npc2</i>	
8.1	(<i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i>) y las proteínas que codifican se unen a colesterol (<i>in silico</i>)	65
8.2	Los genes <i>Ehnpc1</i> , <i>Ehnpc2a</i> y <i>Ehnpc2b</i> se transcriben en los trofozoítos	78
8.3	Las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 se expresan en los trofozoítos	80
8.4	Localización de EhNPC1 y EhNPC2 en la membrana, en vesículas citoplásmicas y en el núcleo de los trofozoítos	86
8.5	EhNPC1 and EhNPC2 co-localizan con colesterol, después del estímulo con SBA	94
8.6	EhNPC1 y EhNPC2 co-localizan con el colesterol durante la eritrofagocitosis	100
8.7	EhNPC1 y EhNPC2 se localizan en el retículo endoplásmico	106
8.8	EhNPC1 y EhNPC2 se asocian con moléculas endosomales en vesículas ácidas	111
8.9	La baja concentración de colesterol intracelular disminuye la tasa de eritrofagocitosis y su capacidad de destruir la barrera epitelial intestinal en ratones	116
8.10	Trofozoítos mutantes en los genes <i>Ehnpc1</i> y <i>Ehnpc2s</i> presentan una disminución en la tasa de eritrofagocitosis y en la movilidad celular	126
9	DISCUSIÓN	132
10	CONCLUSIÓN	142
11	PERSPECTIVAS	143
12	REFERENCIAS	144
13	PUBLICACIÓN	151

INDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1	Número de casos de amibiasis reportados en México	6
Figura 2	Formas de vida de <i>E. histolytica</i>	8
Figura 3	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	10
Figura 4	Mecanismos de virulencia que presenta <i>E. histolytica</i>	14
Figura 5	Estructura del colesterol	19
Figura 6	Representación esquemática de la inserción del colesterol en una capa lipídica	20
Figura 7	Transporte de colesterol mediado por LDLR	24
Figura 8	Modelo topológico de la proteína NPC1	27
Figura 9	Estructura cristalográfica del complejo colesterol-NPC2 de bovino (PDB ID: 2HKA)	30
Figura 10	Fenotipo celular en la enfermedad de NPC	32
Figura 11	Representación de la estructura química de la droga U18666A	34
Figura 12	Estrategia experimental	39
Figura 13	Vector de clonación pJET 1.2/blunt	50
Figura 14	Vector de clonación pGEX-6P-1	53
Figura 15	Análisis de la estructura secundaria de NPC	68
Figura 16	Filogenia de NPC1 y NPC2	70
Figura 17	Modelaje estructural de las proteínas EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b	73
Figura 18	Ubicación de las proteínas EhNPC's en la membrana y su interacción con colesterol	76
Figura 19	Interacción entre EhNPC1 y EhNPC2a	77
Figura 20	Identificación de genes y transcritos de <i>ehnpc1</i> , <i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i> en trofozoítos	79
Figura 21	Clonación y secuenciación de los genes <i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i>	81
Figura 22	Generación de las proteínas recombinantes GST-	83

	rEhNPC2a y GST-rEhNPC2b	
Figura 23	<i>E. histolytica</i> expresa a las proteínas EhNPC1 y EhNPC2	85
Figura 24	Localización subcelular de EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos analizados mediante microscopía confocal	88
Figura 25	Localización subcelular de EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos analizados mediante MET	90
Figura 26	Co-localización de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos analizados mediante MET	92
Figura 27	Localización del colesterol y las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 durante el estímulo de SBA	97
Figura 28	Secreción de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2	99
Figura 29	Localización de EhNPC1, EhNPC2 y colesterol durante la fagocitosis	102
Figura 30	Localización subcelular de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos durante la eritrofagocitosis	104
Figura 31	Localización de EhNPC1 y EhNPC2 en el RE	107
Figura 32	EhNPC1 y EhNPC2 co-localizan con EhRab7A	109
Figura 33	Localización de EhNPC1 y EhNPC2 en vesículas ácidas.	112
Figura 34	Co-localización de EhNPC1 y EhNPC2 con moléculas endosomales	114
Figura 35	Interacción de EhNPC1 y EhNPC2 con moléculas endosomales y colesterol	115
Figura 36	Expresión de los genes <i>ehnpc1</i> , <i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i> , cuantificación y distribución de colesterol en trofozoítos cultivados en TYI-S, TYI y TYI más U18	118
Figura 37	Virulencia in vitro de trofozoítos cultivados en TYI-S, TYI y TYI más U18	121
Figura 38	Virulencia in vivo de trofozoítos cultivados en TYI-S, TYI y TYI más U18	124
Figura 39	Silenciamiento de los genes <i>Ehnpc1</i> y <i>Ehnpc2</i> en <i>E. histolytica</i>	128

Figura 40	Localización de EhNPC1 y EhNPC2, y concentración intracelular de colesterol en trofozoítos transfectados	129
Figura 41	Alteración en la tasa eritrofagocítica y movilidad en trofozoítos transfectados	131
Figura 42	Modelo de la participación de EhNPC1 y EhNPC2 en el tráfico de colesterol en <i>E. histolytica</i>	137

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Secuencias oligonucleótidos utilizados	45
Tabla 2	Condiciones para amplificar un fragmento de los genes <i>ehnpc1</i> , <i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i>	48
Tabla 3	Condiciones para amplificar los genes completos <i>ehnpc2a</i> y <i>ehnpc2b</i>	48
Tabla 4	Análisis de las secuencias ortólogas de NPC1 en diferentes organismos	66
Tabla 5	Análisis de las secuencias ortólogas de NPC2 en diferentes organismos	67

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADH	Adhesina
DNA	Acido desoxirribonucleico
AHA	Absceso hepático amibiano
RNA	Ácido ribonucleico
CDC	Centro de control de enfermedades (por sus siglas en inglés de “Center Diseases Control”)
DO	Densidad óptica
DAB	Diaminobencidina
ESCRT	Maquinaria de direccionamiento requerida para el transporte de vesículas (por sus siglas en inglés de “endosomal sorting complexes required for transport”)
Gal/GalNAc	Lectina de <i>E. histolytica</i> con afinidad a galactosa y a la N-acetil-D-galactosamina
HMG-CoA	Reductasa de hidroximetilglutaril-CoA
kDa	Kilodaltones
MDCK	Línea celular de riñón de perro (por sus siglas en inglés de “Madin-Darby canine kidney”)
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MLD	Dominio de reconocimiento de lípidos relacionado a MD-2 (por sus siglas en inglés de “MD-2-related lipid-recognition domain”)
MMPL	Proteína grande micobacterial (por sus siglas en inglés “Mycobacterial membrane protein large”)
MVB	Cuerpos multivesiculares (por sus siglas en inglés “Multivesicular bodies”)
LBPA	Ácido lisobis-fosfatídico (por sus siglas en inglés “Lysobisphosphatidic acid”)
NPC	Enfermedad de Niemann Pick tipo C

NTD	Dominio amino terminal (por sus siglas en ingles “N terminal domain”)
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés “Phosphate-buffered saline”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés “Polymerase chain reaction”)
PD	Dominio “patched” (por sus siglas en inglés “Patched domain”)
PFA	Paraformaldehído
RE	Retículo endoplásmico
RT-PCR	Retrotranscripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés “Retro transcriptase-polymerase chain reaction”)
SBA	Suero bovino adulto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés de “Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”)
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (por sus siglas en inglés “sarc/endoplasmic reticulum calcium ATPase”)
SSD	Dominio de detección de esteroides (por sus siglas en inglés “Sterol Sensing Domain”)
TA	Temperatura ambiente

ABSTRACT

Entamoeba histolytica, the highly phagocytic protozoan causative of human amoebiasis lacks the machinery to synthesize cholesterol. In this thesis, we investigated the presence of NPC1 and NPC2 proteins in this parasite, which are involved in cholesterol trafficking in mammals. Bioinformatics analysis revealed one *ehnpc1* and two *ehnpc2* genes. EhNPC1 appeared as a transmembrane protein and both EhNPC2 as peripheral membrane proteins. Molecular docking predicted that EhNPC1 and EhNPC2 bind cholesterol and interact with each other. Genes and proteins were identified in trophozoites. Serum pulse-chase and confocal microscopy assays unveiled that after trophozoites sensed the cholesterol source, EhNPC1 and EhNPC2 were organized around the plasma membrane in a punctuated pattern. Vesicles emerged and increased in number and size and some appeared full of cholesterol with EhNPC1 or EhNPC2 facing the extracellular space. Both proteins, but mostly EhNPC2, were found out of the cell associated with cholesterol. EhNPC1 and cholesterol formed networks from the plasma membrane to the nucleus. EhNPC2 appeared in erythrocytes that were being ingested by trophozoites, co-localizing with cholesterol of erythrocytes, whereas EhNPC1 surrounded the phagocytic cup. EhNPC1 and EhNPC2 co-localized with EhSERCA in the endoplasmic reticulum and with lysobisphosphatidic acid and EhADH (an Alix protein) in phagolysosomes. Immunoprecipitation assays confirmed the EhNPC1 and EhNPC2 association with cholesterol, EhRab7A and EhADH. Serum starved and blockage of cholesterol trafficking caused a low rate of phagocytosis and incapability of trophozoites to produce damage in the mouse colon. *Ehnpc1* and *Ehnpc2* knockdown provoked in trophozoites a lower intracellular cholesterol concentration and a diminished rate of phagocytosis; and *Ehnpc1* silencing also produced a decrease of trophozoites movement. Trafficking of EhNPC1 and EhNPC2 during cholesterol uptake and phagocytosis as well as their association with molecules involved in endocytosis strongly suggest that these proteins play a key role in cholesterol uptake.

1. RESUMEN

Entamoeba histolytica, el protozoo altamente fagocítico y causante de la amibiasis humana, carece de la maquinaria para sintetizar colesterol. En este trabajo, investigamos si este parásito posee las proteínas NPC1 y NPC2, las cuales están involucradas en el tráfico de colesterol, en mamíferos. El análisis bioinformático reveló: 1) un gen *ehnpc1* y dos genes *ehnpc2*; 2) EhNPC1 se predijo como una proteína transmembranal, en tanto que ambas EhNPC2 se describieron como proteínas periféricas de la membrana; y 3) el acoplamiento molecular sugirió que EhNPC1 y EhNPC2 se unen entre sí y al colesterol. En trofozoítos, se identificaron a estos genes y a sus proteínas. Ensayos de pulso y caza con suero y microscopía confocal revelaron que los trofozoítos censaron la fuente de colesterol, y ante su presencia, EhNPC1 y EhNPC2 se distribuyeron alrededor de la membrana plasmática, en un patrón punteado. Además, se observaron vesículas llenas de colesterol con EhNPC1 o EhNPC2 orientadas hacia el espacio extracelular que emergieron de la membrana y que incrementaron en número y tamaño. Ambas proteínas, pero mayoritariamente EhNPC2, se encontraron asociadas al colesterol fuera de las células. EhNPC1 y el colesterol formaron redes que van desde la membrana plasmática hacia el núcleo. EhNPC2 apareció en eritrocitos que estaban siendo ingeridos por los trofozoítos, co-localizando con el colesterol de los eritrocitos, mientras que EhNPC1 rodeó la copa fagocítica. EhNPC1 y EhNPC2 co-localizaron con EhSERCA en el retículo endoplásmico y en los fagolisosomas con el ácido lisobisfosfatítico y EhADH (una proteína ALIX). Ensayos de inmunoprecipitación confirmaron la asociación de EhNPC1 y EhNPC2 con el colesterol y con las proteínas EhRab7A y EhADH. La privación de suero y el bloqueo del tráfico de colesterol causaron una baja tasa de fagocitosis y la incapacidad de los trofozoítos para producir daño en el colon de ratones. En tanto que, el silenciamiento de los genes *ehnpc1* y *ehnpc2* provocó una baja concentración de colesterol intracelular en los trofozoítos y disminuyó la tasa de fagocitosis; así como una disminución del movimiento de los parásitos. El tráfico de EhNPC1 y EhNPC2 durante la

captura del colesterol y la fagocitosis, así como su asociación con moléculas involucradas en la endocitosis, sugieren fuertemente que estas proteínas juegan un papel clave en la captura del colesterol.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis se define como la infección causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* (Pritt *et al.*, 2008, Olivos-Garcia *et al.*, 2009). Esta enfermedad afecta principalmente a países en vías de desarrollo y puede encontrarse en viajeros que retornan de áreas endémicas (Mortimer *et al.*, 2010). Esta parasitosis es causada por el consumo de agua y alimentos contaminados con quistes de *E. histolytica*, además de una inadecuada sanidad (Pritt *et al.*, 2008). Cerca del 90% de las infecciones amibianas son asintomáticas y autolimitantes al epitelio intestinal, pero en alrededor del 1% de los casos, las amibas pueden invadir el tracto intestinal (produciendo colitis amibiana) y otros tejidos y órganos, siendo el hígado el principal sitio extraintestinal de amibiasis, originando el absceso hepático amibiano (AHA) (Sehgal *et al.*, 1996, Das *et al.*, 2002).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la amibiasis es la tercera causa de muerte debido a enfermedades parasitarias. En conjunto, a nivel mundial existen cerca de 100 millones de casos anuales de disentería amibiana, colitis y AHA, los cuales causan alrededor de 100,000 muertes (Mortimer *et al.*, 2010).

Los hombres adultos, entre 20 y 40 años de edad, son afectados con mayor frecuencia, aunque se tienen datos de que personas de todas las edades y de ambos sexos desarrollan AHA (Pritt *et al.*, 2008). Además, las poblaciones con riesgo de adquirir amibiasis dependen de la localización geográfica, la susceptibilidad del huésped y la variabilidad en la virulencia de las cepas del patógeno (Pritt *et al.*, 2008).

En México, para 1991, se consideraba que el 20% del total de la población era portadora, 5.9% seropositivos, 2% enferma y aproximadamente de 0.1 a 0.2% muertes fueron ocasionadas por *E. histolytica* (Pritt *et al.*, 2008). A pesar de que las enfermedades diarreicas han disminuido en cuanto a número de casos e incidencia, en los últimos años la amibiasis continúa

manteniéndose entre las primeras causas de morbilidad (Figura 1). Tan sólo en el 2011 se reportaron aproximadamente 400,000 casos de amibiasis intestinal. Además, las personas que habitan zonas endémicas, en ocasiones tienen infecciones sintomáticas recurrentes (Pritt *et al.*, 2008).

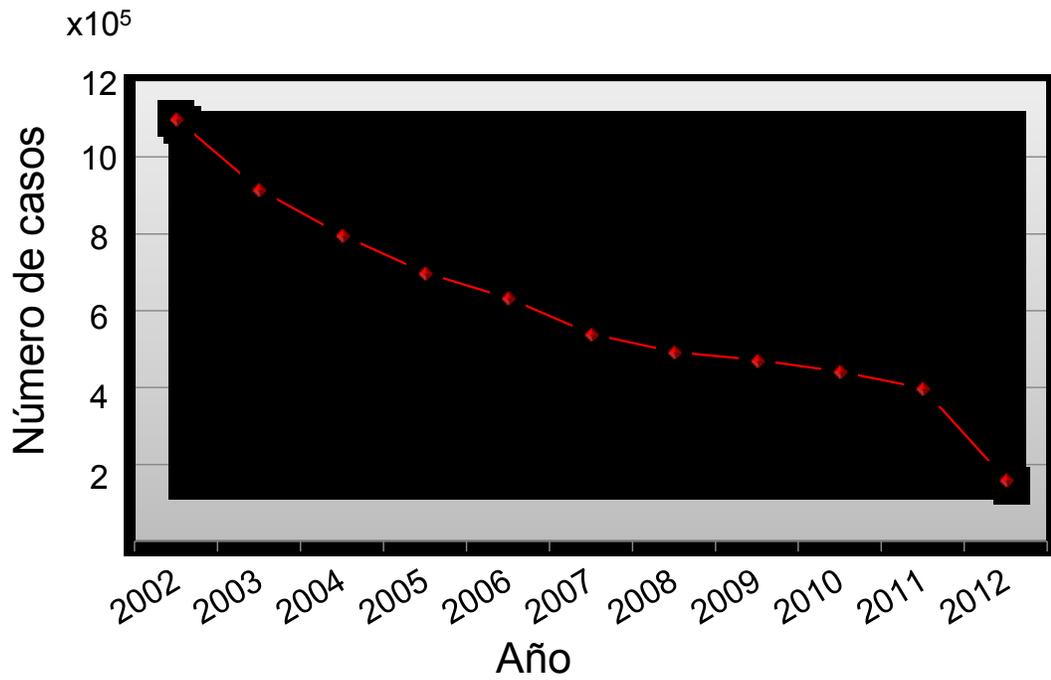


Figura 1. Número de casos de amebiasis reportados en México. Representación gráfica de los casos reportados cada año a nivel nacional en México (SINAVE, 2012).

2.2 Formas de vida de *E. histolytica*

El microorganismo *E. histolytica* presenta dos etapas morfológicas, el trofozoíto o forma de división y el quiste o forma de resistencia (Figura 2) (Das *et al.*, 2002). Los trofozoítos miden desde 10 hasta 60 μm ; son pleomórficos y poseen una gran variedad de enzimas hidrolíticas entre las que se incluyen a las glicosidasas, nucleasas, fosfatasas y cisteína proteasas, entre otras; estas últimas asociadas a la invasión de tejidos y a la patogénesis del parásito (Das *et al.*, 2002).

Los quistes de *E. histolytica* suelen tener de 8 a 20 μm de diámetro y se forman en el íleon terminal del humano. El quiste es esférico, no móvil, tetranucleado y está rodeado de una pared rígida y refringente (Das *et al.*, 1991, Lopez-Romero *et al.*, 1993). El enquistamiento es un proceso complejo, que involucra re-arreglos intracelulares y la formación de agregados ribosomales, cambios en la expresión y transcripción de genes, síntesis de proteínas, consumo de reservas de glucógeno y deposición de quitina en la pared quística (Chavez-Munguia *et al.*, 2007). Esta pared de quitina está formada por un homopolímero estructural de N-acetilglucosamina, que le confiere al quiste, resistencia al ambiente, lo que facilita la supervivencia del parásito y su diseminación (Lopez-Romero *et al.*, 1993, Chavez-Munguia *et al.*, 2007).

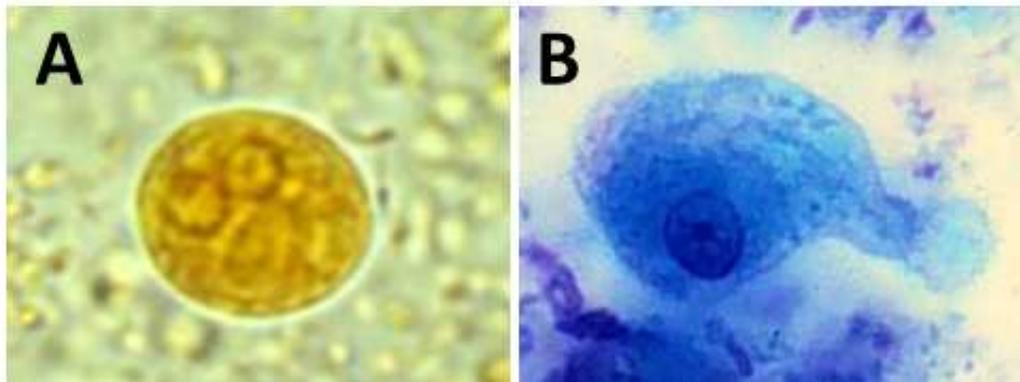


Figura 2. Formas de vida de *E. histolytica*. A) Fase quística o de resistencia, B) Fase de trofozoíto, también conocida como fase móvil (Berrueta, 2015).

2.3 Ciclo de vida de *E. histolytica*

La infección en humanos por *E. histolytica* comienza con la ingesta de quistes, los cuales están presentes en comida y agua contaminados con heces humanas infectadas (Figura 3) (Pritt *et al.*, 2008). Los quistes sobreviven al pH ácido del estómago y pasan al intestino. En la región ileocecal, el quiste comienza a desenquistarse y da origen a los trofozoítos, los cuales migran y se multiplican en el colon (Sehgal *et al.*, 1996). En la mayoría de los casos, los trofozoítos viven en el intestino como comensales y es aquí donde muchos de ellos se enquistan y producen quistes tetranucleados. Los trofozoítos y los quistes son excretados con las heces. Fuera del huésped, los quistes pueden sobrevivir por períodos prolongados de tiempo, mientras que los trofozoítos viven tan sólo unas horas (Pritt *et al.*, 2008). Los trofozoítos no juegan ningún papel en la transferencia de la enfermedad, pero son los responsables de producir la patología en los tejidos (Pritt *et al.*, 2008). Por otra parte, la diseminación de los quistes no es un mecanismo adaptativo para el parásito, porque su ciclo de vida no se puede completar fuera del intestino (Pritt *et al.*, 2008). Entonces, ambas fases del ciclo de vida son de vital importancia en distintas etapas de la transmisión de la enfermedad (Pritt *et al.*, 2008).

Ocasionalmente, los trofozoítos que se instalan en el epitelio intestinal, atacan e invaden la mucosa causando disentería amibiana, también pueden migrar por los vasos sanguíneos a sitios extraintestinales, como el cerebro, pulmones e hígado, donde pueden formar abscesos (Figura 3) (Sehgal *et al.*, 1996). Éste último es el sitio extraintestinal más común de la enfermedad, lo que da como resultado una marcada destrucción del tejido con reclutamiento de neutrófilos, necrosis celular y formación de microabscesos, que gradualmente se unen (Mortimer *et al.*, 2010). La mayoría de los pacientes presentan un absceso único; sin embargo también se pueden formar múltiples abscesos (Sehgal *et al.*, 1996). El absceso más común es el AHA, en tanto que los abscesos cerebrales son una invasión extraintestinal extremadamente rara y asociada con altas tasas de mortalidad (Pritt *et al.*, 2008).

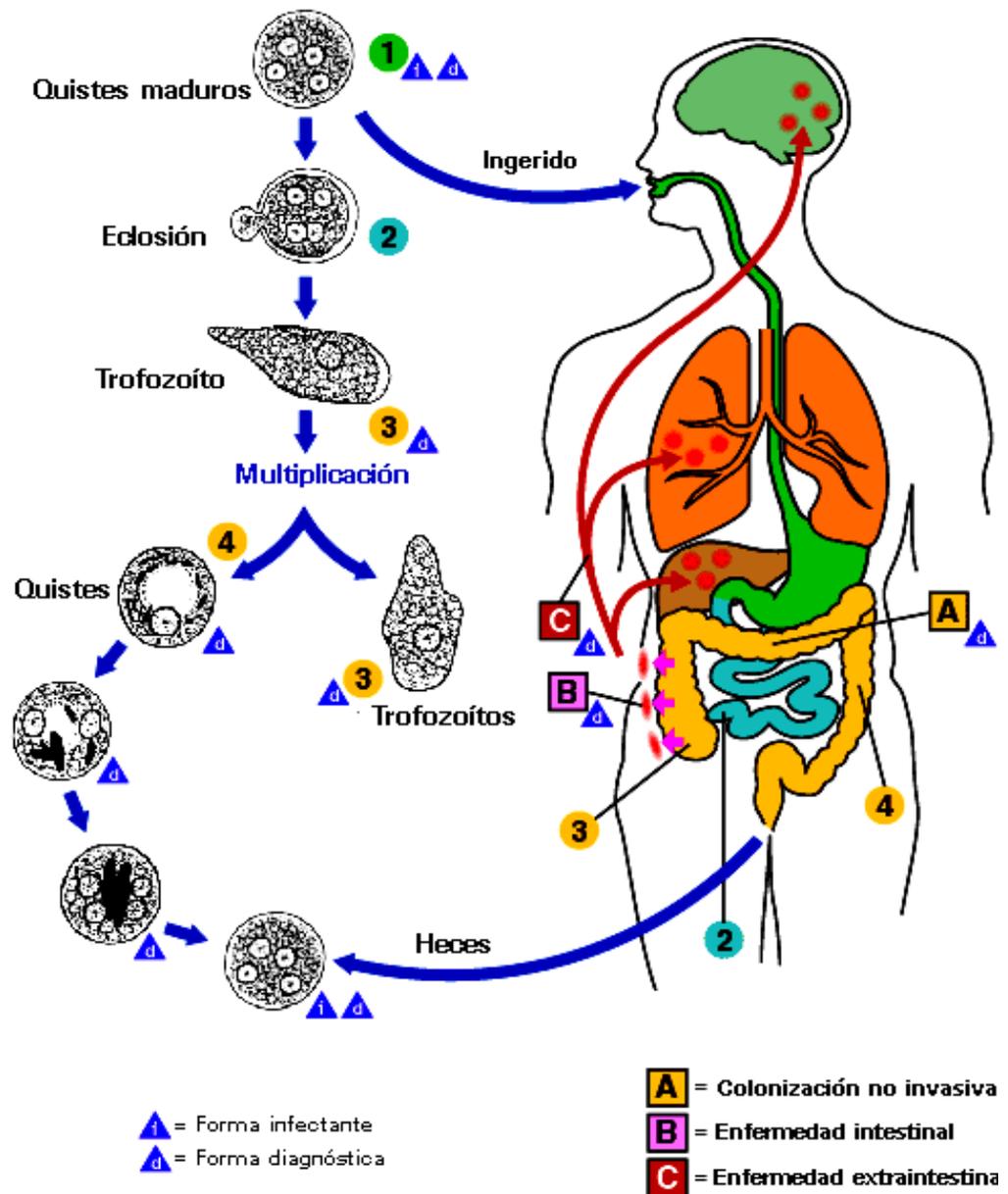


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza con la ingesta de comida contaminada con quistes, estos últimos se desenquistan en el intestino generando la forma invasiva conocida como trofozoíto. Los trofozoítos migran, se dividen y diferencian a quistes en el íleon. Posteriormente, estos quistes son excretados junto con las heces (CDC, 2015).

2.4 Patogénesis de *E. histolytica*

La capacidad de *E. histolytica* para invadir tejidos y evadir la respuesta inmune del huésped depende de su adaptación al medio y de la expresión de factores de virulencia. Inicialmente los trofozoítos se encuentran en el lumen y en la mucosa intestinal; posteriormente, invaden el epitelio interglandular, donde los trofozoítos producen microulceraciones de la mucosa (Mortimer *et al.*, 2010). Los síntomas en este estado de la amibiasis incluyen colitis no específica, mucosa edematosa y hemorragia intestinal. En esta etapa, hay desintegración considerable de las células de la capa epitelial, seguida por la invasión de la submucosa (Mortimer *et al.*, 2010). Con el paso del tiempo, las úlceras se extienden hacia la cara basal de las células intestinales y después hacia la *mucosa muscular* (mucosa externa), donde los procesos usualmente se detienen antes de la perforación del intestino (Sehgal *et al.*, 1996). Las úlceras se desarrollan con frecuencia en el ciego y colon ascendente. En el 20% de los casos de colitis aguda, las perforaciones terminan en peritonitis. Una ulceración aguda resulta en la formación de un ameboma en el lumen (Mortimer *et al.*, 2010).

La respuesta inflamatoria del humano a la invasión por amibas es pobre, pero en el borde de las úlceras pueden observarse células mononucleares y células gigantes, con pocos neutrófilos (Sehgal *et al.*, 1996). Esta baja respuesta inmune probablemente se debe a que el parásito puede lisar a las células inflamatorias y a que se presenta una deficiencia en la capacidad de respuesta por parte del hospedero (Sehgal *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando se presenta esta respuesta por el hospedero, también contribuye a la destrucción de su propio tejido local (Sehgal *et al.*, 1996).

Para estudiar la patología y respuesta inmune que se presenta durante el AHA, se toma como modelo animal al hámster dorado de Siria (*Mesocricetus auratus*), donde se ha visto reclutamiento de neutrófilos. Sin embargo, los neutrófilos son lisados cuando entran en contacto con los trofozoítos, ocasionando la destrucción de los hepatocitos distantes (Sehgal *et al.*, 1996).

2.5 Factores de virulencia

La patogenicidad de la amiba ha sido generalmente atribuida a su capacidad para destruir tejidos a través de su citotoxicidad y citopatogenicidad, lo que deriva en la proteólisis de células epiteliales, sanguíneas y de la matriz extracelular (Figura 4) (Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000). Esta hipótesis es sustentada por las siguientes observaciones:

- 1) *E. histolytica* es un parásito dotado de una alta capacidad citotóxica en determinadas condiciones *in vitro* (Olivos-Garcia *et al.*, 2009).
- 2) Las fosfolipasas amibianas y los amebaporos purificados, muestran actividad citotóxica en ensayos *in vitro* (Olivos-Garcia *et al.*, 2009).
- 3) Las cisteína proteasas que secreta el parásito digieren anticuerpos, componentes C3 del complemento, así como anafilotoxinas (Reed *et al.*, 1989). En ensayos *in vitro*, estas proteasas también destruyen algunos componentes de la matriz extracelular (Mortimer *et al.*, 2010). Por otra parte, la sobre-expresión de la cisteína proteasa 5 (EhCPA5) permite un aumento en la formación del AHA en modelos animales (Olivos-Garcia *et al.*, 2009). Además se ha observado que EhCPA5 es un factor importante para la virulencia de *E. histolytica*, porque al ser secretada provoca una respuesta inflamatoria y afecta específicamente la permeabilidad de las uniones estrechas, cortando a la mucina 2 en su extremo carboxilo terminal (Lidell *et al.*, 2006). De esta manera los polímeros de mucina son disgregados, comprometiendo la integridad de la barrera (Castellanos-Castro *et al.*, 2016b). Otra proteína importante durante el primer contacto con el huésped es la proteína EhCP112, la cual interactúa con proteínas de la unión estrecha, para su posterior degradación, este proceso incrementa la permeabilidad paracelular, permitiendo la entrada de otras moléculas que conllevan a la destrucción del tejido (Betanzos *et al.*, 2013).
- 4) La baja expresión de amebaporos del parásito, resulta en una disminución en la formación de AHA en el hámster (Olivos-Garcia *et al.*, 2009).

5) Las especies no patogénicas como *Entamoeba dispar* contienen pocas cantidades de amebaporos y cisteínas proteasas, por lo que son incapaces de causar AHA en el hámster (Olivos-Garcia *et al.*, 2009).

6) Las cisteína proteasas también participan en la invasión al intestino y en los eventos de inflamación (Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000). La mayor actividad proteolítica observada en *E. histolytica* está dada por las cisteínas proteasas ACP1 (EhCP3), ACP2 (EhCP2), ACP3 (EhCP1), EhCPA5 y EhCP112. Ésta última, unida a la adhesina EhADH, participa en eventos de virulencia y se ha localizado en estructuras parecidas a cuerpos multivesiculares en trofozoítos (Banuelos *et al.*, 2005, Olivos-Garcia *et al.*, 2009).

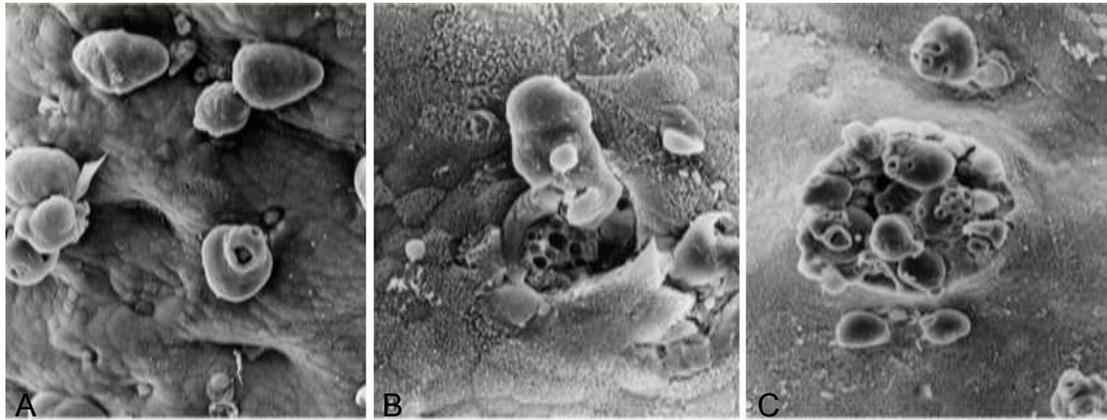


Figura 4. Mecanismos de virulencia que presenta *E. histolytica*. A) Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren mayormente al epitelio interglandular elevado del intestino. B) Una pequeña región de microinvasión se observa en la lesión temprana, con ulceración superficial. C) En estados más avanzados, se observan numerosos trofozoítos penetrando una úlcera de colon (Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000).

2.6 Tráfico vesicular

En eucariontes superiores se ha propuesto que el tráfico vesicular inicia con la formación de los endosomas tempranos que migran lentamente a lo largo de los microtúbulos hacia el interior de la célula (Aniento *et al.*, 1995, Gruenberg *et al.*, 1995). Posteriormente, los endosomas en migración forman invaginaciones membranales que dan origen a vesículas, por lo que son llamados cuerpos multivesiculares (MVBs) (Gruenberg *et al.*, 2004). Se desconoce si estos MVBs se fusionan entre sí formando los endosomas tardíos. Los MVBs pueden observarse por microscopía electrónica como estructuras rodeadas por membrana y con vesículas intraluminales (Piper *et al.*, 2007). Al final de la vía, los endosomas tardíos se fusionan con vesículas lisosomales que contienen hidrolasas, las cuáles se encargan de degradar el contenido vesicular (Gruenberg *et al.*, 1995, Gruenberg *et al.*, 2004).

La membrana plasmática, los endosomas y los lisosomas dependen completamente del transporte de lípidos provenientes de otros organelos, los cuales están comprometidos activamente en su síntesis (Van Meer *et al.*, 2008). El direccionamiento diferencial de lípidos y la formación de subdominios lipídicos juegan un papel importante en la biogénesis de los MVBs. Además la construcción y escisión de las vesículas intraluminales, son en gran parte controladas por la composición lipídica y la localización de los lípidos reordenados dentro de los MVBs (Piper *et al.*, 2007).

Varias proteínas clave que conforman la maquinaria de direccionamiento hacia los MVBs, se unen al fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) (Piper *et al.*, 2007). La presencia de lípidos y los dominios de unión a PI3P de la maquinaria de direccionamiento requerida para el transporte de vesículas (ESCRT, por sus siglas en inglés de “endosomal sorting complexes required for transport”), son críticos para la formación de los MVBs (Piper *et al.*, 2007). En células de eucariontes superiores, la densidad de PI3P en las vesículas intraluminales es más alta dentro de endosomas tempranos y es significativamente menor en los endosomas tardíos, sugiriendo que el PI3P que contienen las vesículas intraluminales, es rápidamente degradado o

susceptible a la actividad de fosfatasa (Piper *et al.*, 2007). Sin embargo, cada vesícula intraluminal puede poseer distinta composición de lípidos y proteínas cargo (Gruenberg *et al.*, 2004). Las proteínas integrales de membrana que no han sido recicladas, así como el material luminal soluble, son entonces liberados en los endosomas tardíos y posteriormente a los lisosomas para su degradación (Gruenberg *et al.*, 2004). La acumulación de lípidos en las membranas internas, como el ácido liso(bis)fosfatídico (LBPA), puede mediar la degradación de receptores de la superficie celular, así como de otras moléculas como el colesterol (Piper *et al.*, 2007).

El parásito *E. histolytica* es altamente fagocítico, por lo que la endocitosis de moléculas provenientes del medio y del hospedero, así como el reciclaje de receptores y moléculas de membrana, son eventos cruciales para su patogenicidad (Piper *et al.*, 2007). Para que se lleven a cabo estos mecanismos, se requiere de un complejo tráfico de vesículas (endosomas), que se encargan de clasificar moléculas cargo mediante proteínas como EhRab5, EhRab7 y EhRabB (Rodríguez *et al.*, 2000, Welter *et al.*, 2002, Saito-Nakano *et al.*, 2004). Por otra parte, EhADH (Alix) y EhVps4, que son proteínas accesorias; así como EhVps32, perteneciente al complejo ESCRT-III participan de manera activa en el proceso de eritrofagocitosis (Avalos-Padilla *et al.*, 2015). Recientemente se ha descrito la presencia del fosfolípido LBPA en trofozoítos, esta molécula se concentra principalmente en endosomas tardíos y/o MVB, lo que indica su participación en el proceso de degradación de moléculas endocitadas (Castellanos-Castro *et al.*, 2016a). En conjunto estas moléculas contribuyen a esclarecer el proceso endocítico de *E. histolytica*, mediante el tráfico de vesículas que llevan moléculas de distinta índole hasta su degradación o reciclamiento.

2.7 Lípidos en *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* son relativamente ricos en lípidos, de los cuales aproximadamente el 60% corresponde a fosfolípidos (Das *et al.*, 2002). La mayoría de los lípidos amibianos son tomados del medio; sin

embargo, la amiba tiene la capacidad de extender las cadenas de ácidos grasos existentes (Sawyer *et al.*, 1967). Además, las moléculas obtenidas de manera exógena podrían ser sometidas a remodelación, por reacciones de desacilación y reacilación, evitando así la síntesis de nuevas moléculas de fosfolípidos (Sawyer *et al.*, 1967). Sawyer y colaboradores en 1967, encontraron que en trofozoítos crecidos en presencia de glucosa radioactiva, sólo el 10% de los lípidos carbonados se derivaban de la glucosa exógena, mientras que el 77% de la marca radioactiva se encontró en los ácidos grasos (Sawyer *et al.*, 1967). La composición lipídica de membranas en la amiba es importante para prevenir la unión de moléculas citolíticas; además, los fosfolípidos y el alto contenido de colesterol contribuyen a la protección contra células productoras de toxinas (Das *et al.*, 2002).

Van Vliet y colaboradores en 1976, analizaron en varias especies de *Entamoeba* la composición de fosfolípidos y esfingolípidos en las membranas plasmática y en vesículas internas (Van Vliet *et al.*, 1976). En particular, *E. histolytica* posee 48% de fosfatidilcolina (55% en vesículas internas y 12% en la membrana plasmática), 5-7% de fosfatidiletanolamina (8-10% en vesículas internas y trazas en la membrana plasmática), 12-14% de fosfatidiletanolamina₂ (10-12% en vesículas internas y más de 30% en la membrana plasmática), 5-10% de fosfatidilserina (vesículas internas y membrana plasmática) y fosfatidilinositol (1-10% en toda la célula) (Van Vliet *et al.*, 1976). El colesterol es abundante en la membrana plasmática, la cual tiene un 46.5% de esta molécula por mol de fosfolípidos (Andra *et al.*, 2004).

Al igual que en la mayoría de las células eucariontes, *E. histolytica* necesita colesterol, además de fosfolípidos para llevar a cabo una gran cantidad de funciones celulares, incluyendo la biosíntesis de membranas internas y plasmática (Das *et al.*, 2002). Aunque el colesterol es el esteroide predominante en este parásito, la amiba es incapaz de sintetizarlo, así que lo toma del medio (Das *et al.*, 2002). Además, al destruir células e internalizarlas mediante fagocitosis, las utiliza como fuente de colesterol, entre otros nutrientes. La importancia de este lípido se demostró en estudios *in vitro*, en

los cuales los trofozoítos fueron cultivados en medios que contenían liposomas ricos en lípidos y en colesterol, resultando en un vigoroso incremento en la tasa de crecimiento, aún en las cepas que habían sido mantenidas en cultivo durante un largo periodo de tiempo (Biagi, 1962, Serrano-Luna *et al.*, 2010).

En particular, las balsas lipídicas, que son dominios de membrana ricos en colesterol, se ven alteradas por los agentes de unión al colesterol, como la filipina y β -metilciclodextrina (Bansal *et al.*, 2005). Utilizando estos dos compuestos, se han observado modificaciones importantes en la virulencia de los trofozoítos, por ejemplo: disminución de la pinocitosis en fase fluida y de la adhesión de trofozoítos a monocapas de células epiteliales (Bansal *et al.*, 2005).

2.8 Colesterol

El colesterol, denominado químicamente como colest-5-en-3 β -ol, posee un peso molecular de 386.64 g/mol. Esta molécula consta de cuatro anillos hidrocarbonados y una sola cadena alifática (Figura 5).

El principal determinante de la fluidez de las membranas es el colesterol. Dada su naturaleza hidrofóbica, esta molécula se encuentra insertada entre los fosfolípidos, lo que evita el movimiento azaroso de la cabeza polar de los ácidos grasos. Aunque por su grupo polar hidroxilo, el colesterol está en contacto con las soluciones acuosas (Figura 6) (Lodish *et al.*, 2000). Además, las moléculas de colesterol aumentan las propiedades de la bicapa lipídica, como la permeabilidad y la función de barrera para evitar el paso de algunas moléculas (Alberts *et al.*, 2002).

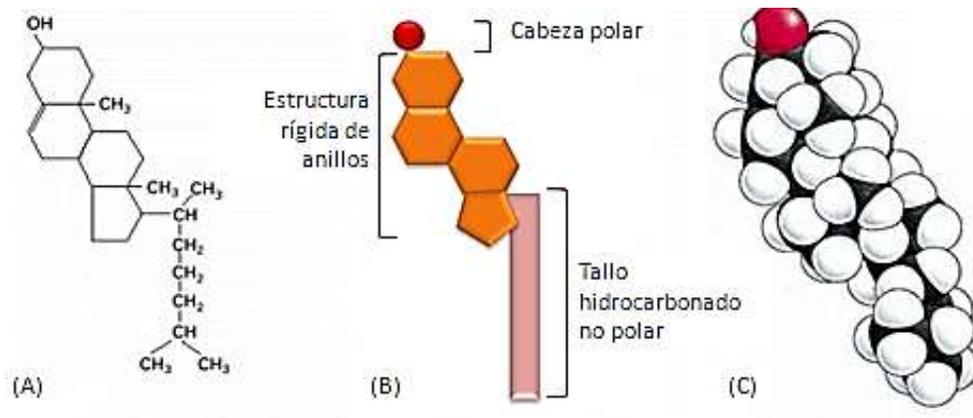


Figura 5. Estructura del colesterol. (A) Fórmula química del colesterol. (B) Representación esquemática de los dominios del colesterol. (C) Modelo con esferas interpenetradas de la estructura tridimensional del colesterol (Alberts *et al.*, 2002).

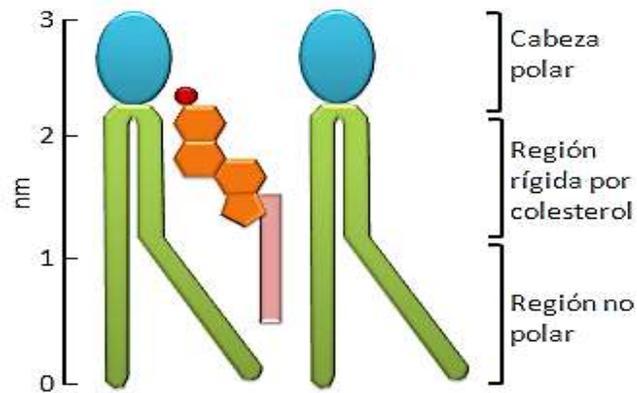


Figura 6. Representación esquemática de la inserción del colesterol en una capa lipídica. Se muestra una molécula de colesterol (molécula central de ciclopentanoperhidrofenantreno en naranja, destacando el grupo OH en rojo y la cadena alifática en rosa), interactuando con dos moléculas de fosfolípidos (cabeza polar con grupo fosfato en azul y en verde la región apolar formada por dos cadenas de ácidos grasos) (Alberts *et al.*, 2002).

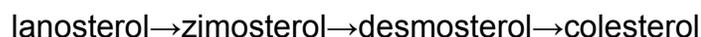
El colesterol es un constituyente importante de las membranas en las células eucariontes y posee un papel fundamental en la organización, dinámica, función y direccionamiento de la membrana celular (Schroeder *et al.*, 1990). En células de mamíferos, más del 85% de este lípido está en la membrana plasmática (Schroeder *et al.*, 1990). El colesterol se sintetiza en todos los tejidos humanos, predominantemente en el hígado (80-90%), que resulta ser el principal sitio extraintestinal infectado por *E. histolytica*; aunque también es sintetizado de manera importante en cerebro, médula espinal, piel y músculo (Lodish *et al.*, 2000, Bansal *et al.*, 2005, Dancygier, 2009).

Las células de mamíferos, además de producir su propio colesterol, lo captan de la dieta y lo transportan a través de lipoproteínas (Simons *et al.*, 2000). El encargado de sintetizar el colesterol en la célula es el retículo endoplásmico (RE), mientras que la mayoría de esfingolípidos reciben sus grupos polares en el complejo de Golgi (Simons *et al.*, 2000).

Se sabe que el colesterol ejerce cierta acción para mantener las balsas lipídicas en un estado funcional (Bansal *et al.*, 2005). Como ya se mencionó anteriormente, estos dominios membranales son ricos en colesterol y esfingolípidos y se cree que actúan como plataformas, mediante las cuales se coordinan los eventos de transducción de señales, además de permitir el ingreso y la infección de patógenos a las células del hospedero (Bansal *et al.*, 2005).

2.9 Transporte intracelular de colesterol

La homeostasis del colesterol es esencial para la integridad funcional de la célula (Delton-Vandenbroucke *et al.*, 2007). Esta homeostasis es regulada por un complejo grupo de mecanismos que implican la síntesis *de novo* del colesterol (Chang *et al.*, 2005b, Ikonen, 2008). La síntesis del colesterol intracelular se lleva a cabo en la mitocondria e inicia a partir de acetil coenzima A, esta molécula sufre de dimetilaciones y reacciones de reducción para dar lugar a moléculas como:



Existe una vía alterna de obtención de colesterol desde el medio, la cual implica el anclaje de lipoproteínas del medio extracelular, mediante un mecanismo mediado por receptores (Delton-Vandenbroucke *et al.*, 2007). El mecanismo alternativo comienza con la internalización de una lipoproteína de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés), que transporta el colesterol hacia el interior de la célula. LDL se une a su receptor, conocido como LDLR (Figura 7), localizado en la membrana plasmática de la mayoría de las células (Ikonen, 2008). El complejo formado por LDLR, junto con su ligando LDL y el colesterol, es endocitado por vesículas cubiertas por clatrina. Posteriormente, el LDLR se disocia del subcomplejo LDL-colesterol y es reciclado hacia la membrana plasmática (Ikonen, 2008). El subcomplejo LDL-colesterol continúa la vía endocítica hasta llegar a compartimentos endocíticos ácidos, donde los ésteres del colesterol son hidrolizados por la lipasa ácida, lo que permite la separación del colesterol de la LDL (Ikonen, 2008). Entonces, el colesterol es captado por la proteína soluble NPC2 (por sus siglas en inglés “Niemann–Pick type C1”), que lo transporta a la proteína de membrana endosomal NPC1 (por sus siglas en inglés “Niemann–Pick type C2”), la cual provee de colesterol no esterificado a otros organelos donde se requiere (Ikonen, 2008).

Una vez liberado del sistema endosomal, el colesterol es entregado a otras membranas, tal como la membrana plasmática, el RE, los endosomas de reciclaje y la mitocondria, que sirven como aceptoras para el colesterol que abandona los endosomas (Piper *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque el colesterol es requerido en todos estos organelos, las membranas lisosomales carecen de contenido de colesterol, lo cual favorece la digestión de los esfingolípidos. Esto sugiere que la mayor parte del colesterol sale de la membrana endosomal antes de entrar al lisosoma (Kolter *et al.*, 2005).

Por otra parte, las membranas intraendosomales de los endosomas tardíos multivesiculares, enriquecidas en el fosfolípido LBPA, sirven como un importante regulador en el transporte de colesterol (Kobayashi *et al.*, 1999). En estas membranas se localiza otra molécula importante en la regulación del colesterol, la proteína Alix (proteína que interactúa con el gen ligado a

apoptosis 2 y miembro de la familia ALIX) (Kobayashi *et al.*, 1999). Cuando Alix es silenciada experimentalmente mediante RNA de interferencia (siRNAs), se reduce el número de endosomas tardíos que contienen regiones multilamelares y también disminuye en un 50% el LBPA, comparado con las células control (Matsuo *et al.*, 2004). Además, en estas condiciones se reduce la acidez de los endosomas tardíos, mientras que las propiedades de acidificación de otros organelos, como endosomas tempranos o la red de trans-Golgi, no son afectadas (Matsuo *et al.*, 2004). Esto ha llevado a postular que los eventos de fusión o fisión de vesículas internas con la membrana limitante de los endosomas, son controlados parcialmente por interacciones transitorias entre LBPA y Alix, junto con otros factores que al igual que Alix pertenecen al ESCRT (Matsuo *et al.*, 2004).

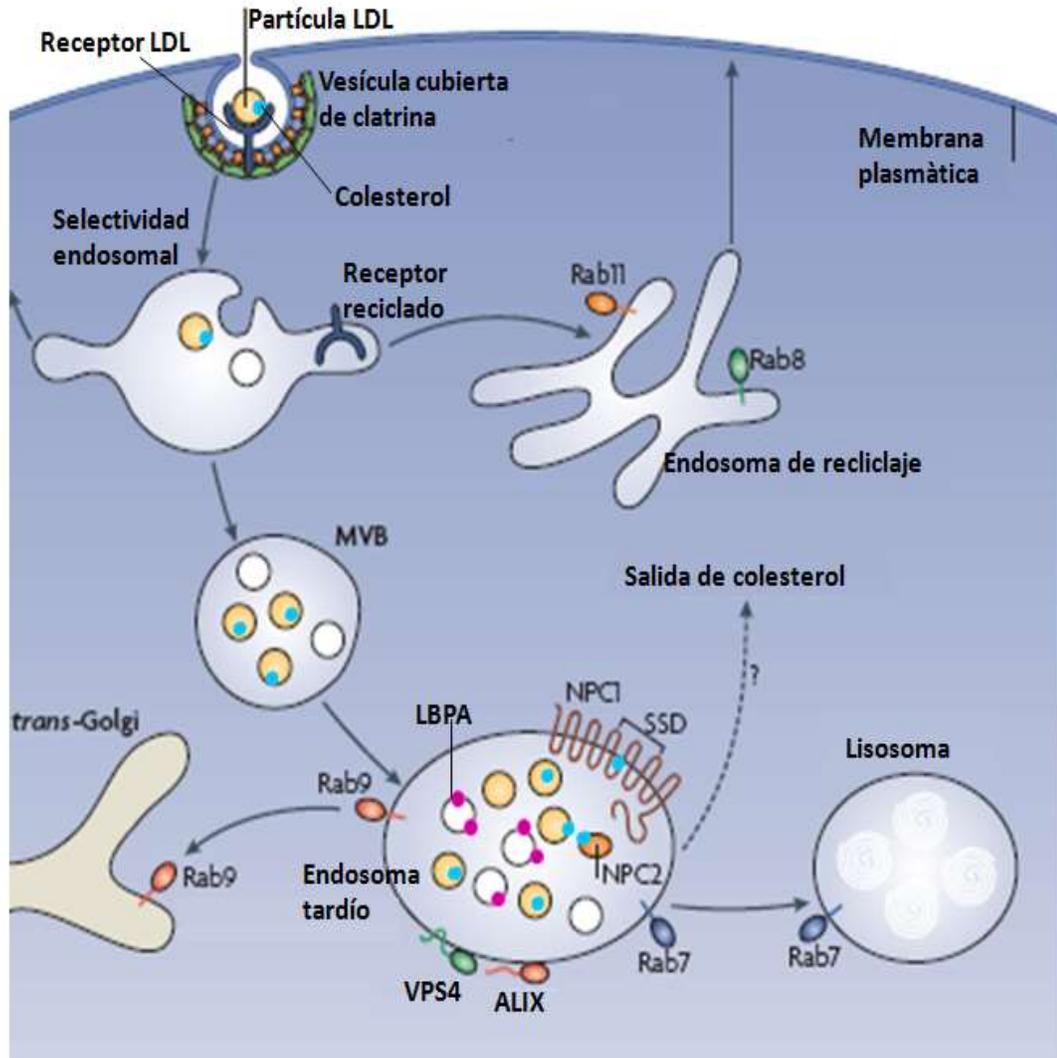


Figura 7. Transporte de colesterol mediado por LDLR. Se esquematizan las proteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia el interior celular, destacando algunas de las proteínas presentes a nivel de endosoma tardío. LDL: Low-density lipoprotein, MVB: multivesicular body, SSD: sterol sensing domain (Ikonen, 2008).

En *E. histolytica*, se ha propuesto a la proteína TMK39 como un posible receptor de lipoproteínas (Christy *et al.*, 2012). Además, se han caracterizado otras moléculas claves para la regulación del colesterol en los endosomas tardíos. Tal es el caso del fosfolípido LBPA y de las proteínas EhADH, EhVps32 y EhVps4, las cuales se localizan en endosomas tardíos (Lopez-Reyes *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que el transporte de colesterol en la ameba puede estar mediado por las mismas moléculas que en mamíferos.

2.10 Proteína NPC1

Los endosomas tardíos MVBs albergan a las proteínas NPC1 y NPC2, que son cruciales para el movimiento del colesterol hacia fuera del sistema endosomal (Davies *et al.*, 2000a). La importancia de estas proteínas se elucidó en experimentos donde la deficiencia de cualquiera de ellas conducía a la acumulación de colesterol no esterificado en organelos endocíticos (Davies *et al.*, 2000a). Ambas proteínas NPCs pueden unir esteroides, aunque también se han implicado en la unión o movilización de esfingolípidos (Davies *et al.*, 2000a).

El gen *npc1* en humano codifica para una gran glicoproteína de 1278 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 142 kDa (Figura 8) (Carstea *et al.*, 1997). Esta proteína posee 13 regiones transmembranales, de las cuales cinco de ellas constituyen el dominio SSD (de unión a esteroides), que presenta una alta homología con las proteínas SCAP (por sus siglas en inglés de “SREBP cleavage-activating protein”) y la reductasa HMG-CoA (hidroximetilglutaril-CoA) (Davies *et al.*, 2000b). En la porción media de la molécula (en los aminoácidos 615-797), se encuentra el dominio Patched, cuya secuencia posee similitud con otras proteínas transmembranales. El dominio Patched fue caracterizado por primera vez en la proteína que lleva el mismo nombre, la cual está involucrada en la señalización de la vía Hedgehog (Carstea *et al.*, 1997, Loftus *et al.*, 1997), que induce proliferación y diferenciación de células tumorales (Yu *et al.*,

2002). En el extremo amino terminal, la proteína NPC1 contiene cuatro sitios de N-glicosilación (Asn-70, Asn-122, Asn-185, Asn-222), altamente conservados en las proteínas de humano y ratón. Esta proteína también contiene motivos de zipper de leucina (en los aminoácidos 73-79), los cuales median interacciones proteína-proteína (Carstea *et al.*, 1997). En el extremo carboxilo terminal, la proteína contiene un motivo dileucina, que posiblemente sea importante para su direccionamiento a los lisosomas (Letourneur *et al.*, 1992)

La biosíntesis de NPC1 comienza por un péptido señal que lleva a la proteína hacia el RE, para ser enviado posteriormente a los compartimentos peri-lisosomales y por último hacia los lisosomas, mediante el motivo dileucina (Kwon *et al.*, 2009).

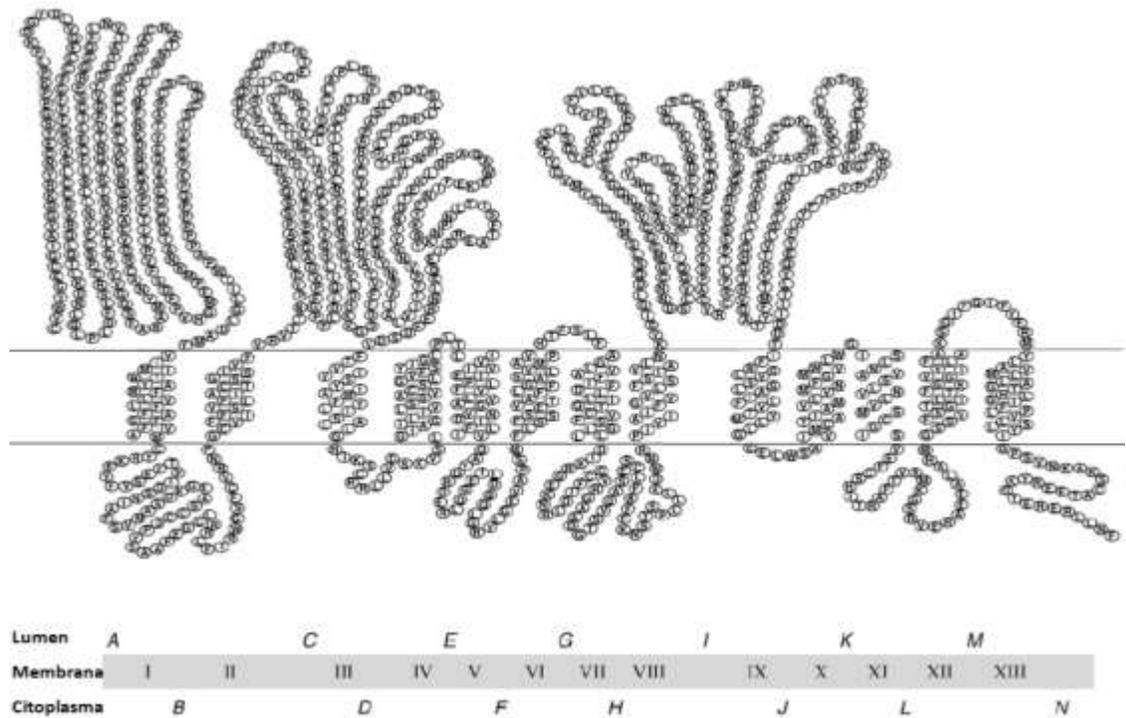


Figura 8. Modelo topológico de la proteína NPC1. Modelo topológico basado en datos experimentales (Davies *et al.*, 2000a). Los números romanos indican los dominios transmembranales; el dominio SSD abarca desde la región TMIII a la TMVII, formando una llave que se muestra en la parte inferior de la figura. Las asas hidrofílicas están marcados secuencialmente de A (amino terminal) a N (carboxilo terminal). Las asas de mayor tamaño A, C e I, corresponden a los residuos 25-264, 370-621 y 854-1098, respectivamente (Davies *et al.*, 2000a).

Durante mi trabajo experimental para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bolaños Rebolledo *et al.*, 2012), encontré que *E. histolytica* presenta una proteína NPC1 hipotética, EhNPC1 (Número de acceso: EHI_080220). Esta proteína posee una identidad del 31.7 % con la NPC1 de humano (Número de acceso: hsa:4864). La longitud de EhNPC1 es ligeramente mayor a la de humano, teniendo ésta última 1278 aa, en tanto que la de *E. histolytica* posee 1339 residuos. Además, se realizó un análisis *in silico* de los posibles sitios transmembranales presentes en la proteína EhNPC1, observando 16 posibles dominios. También se encontraron los dominios hipotéticos, Patched y SSD. Con respecto a su localización, el dominio Patched sólo se presenta en la región media de la EhNPC1, aunque en *D. discoideum* y en otras amibas, este motivo abarca desde la porción central hasta casi el final de la proteína. El dominio SSD, es de gran relevancia en mamíferos, ya que ayuda a la captación de colesterol y permite la inserción de este lípido en la membrana de los endosomas tardíos (Davies *et al.*, 2000a), en *E. histolytica* posee una longitud de 173 aa versus 166 aa, una identidad del 53% y una similitud del 70%, en comparación con la proteína de humano (Mittal *et al.*, 2008).

2.11 Proteína NPC2

NPC2 es una glicoproteína lisosomal soluble que transfiere el colesterol desde el citoplasma vacuolar a la proteína membranal NPC1 y que puede secretarse al medio extracelular (Figura 9). La transferencia del colesterol entre las proteínas NPCs es favorecida por el pH ácido y la presencia de LBPA en los endosomas tardíos (Kobayashi *et al.*, 1999, Davies *et al.*, 2000a, Xu *et al.*, 2008). NPC2 presenta una elevada afinidad por el colesterol, aunque también une otros ácidos grasos, pero con baja afinidad (Ko *et al.*, 2003). De hecho, se ha observado que NPC2 puede acelerar la tasa de transporte de colesterol desde y entre membranas celulares (Babalola *et al.*, 2007). La estructura cristalográfica de esta proteína muestra tres pequeñas cavidades hidrofóbicas que forman una “puerta”, donde probablemente se une

el colesterol, a través de la tirosina 100 y la fenilalanina 66 (Friedland *et al.*, 2003).

La proteína NPC2 de humano madura posee 132 aa, aunque se ha descrito que es sintetizada como una forma inmadura que incluye un péptido señal de 19 aa. Esta proteína contiene tres sitios potenciales de N-glicosilación en las posiciones 19, 39 y 116 (Liou 2006). Se cree que la modificación en el Asn-39 es necesaria para el correcto direccionamiento a los lisosomas (Chikh *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2005). La estructura de esta proteína es muy similar a otras proteínas que contienen dominios de unión a lípidos, por ejemplo: MD-2, que es un cofactor requerido para la señalización por lipopolisacaridos; los alérgenos Der F2 y Der P2 (derivado de *Dennatophagoides farinae* y *Dennatophagoides pteronyssinus* respectivamente) del acaro del polvo; y la proteína activadora del gangliosido GM2 (que transfiere glicolípidos hacia los lisosomas) (Ichikawa *et al.*, 1998, Wright *et al.*, 2000, Derewenda *et al.*, 2002, Vanier *et al.*, 2003, Chevallier *et al.*, 2008).

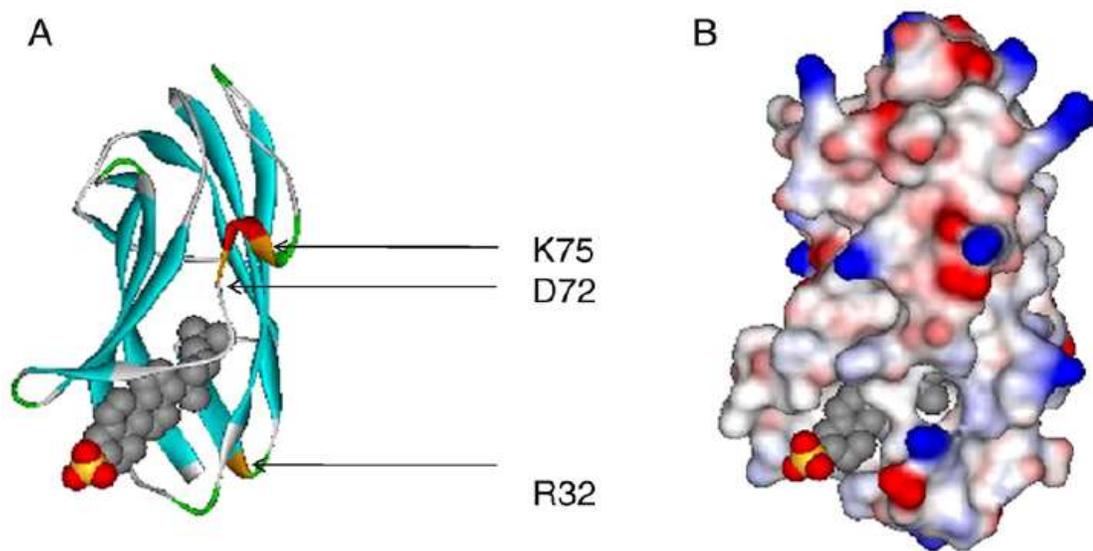


Figura 9. Estructura cristalográfica del complejo colesterol-NPC2 de bovino (PDB ID: 2HKA). A) Estructura estilo cintas sólidas, coloreada por el tipo de estructura secundaria. R32, D72 y K75 son los sitios de unión al colesterol. B) Estilo de esferas sólidas con un radio probable de 1.4 Å, coloreado por su potencial electrostático (en rojo se indica la carga positiva, en azul la carga negativa y en blanco los residuos neutrales). En ambas figuras se representa al colesterol en color gris y su extremo polar en rojo-amarillo (Storch *et al.*, 2009).

La vía biosintética de NPC2 comienza en el RE, después entra al aparato de Golgi y desde allí es transportado a la vía secretora, seguida por su recaptura dentro de los endosomas y su subsecuente incorporación en los endosomas tardíos, donde participa en el transporte de colesterol en conjunto con NPC1 (Strauss *et al.*, 2002). La participación de ambas proteínas es importante para el tránsito de colesterol, ya que se ha observado acumulación de colesterol lisosomal cuando sólo la proteína NPC1 es funcional, pero no la NPC2. Lo mismo sucede si la NPC1 no es funcional, pero si lo es la NPC2 (Strauss *et al.*, 2002). Además se sabe que NPC2 permanece en el fluido epididimal, bilis, plasma y en la leche materna, lo que sugiere que podría relacionarse con el transporte extracelular de esteroides en los ambientes acuosos (Dixit *et al.*, 2011).

2.12 Enfermedad “Niemann-Pick Tipo C”

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) es un desorden pediátrico neurodegenerativo que se caracteriza por la acumulación de colesterol en los endosomas tardíos y en los lisosomas de células del sistema nervioso central y de las vísceras (Carstea *et al.*, 1997, Naureckiene *et al.*, 2000, Chang *et al.*, 2005a, Vance *et al.*, 2006). Esta enfermedad afecta aproximadamente a uno de cada 150,000 recién nacidos vivos (Vanier *et al.*, 2003). Cerca del 95% de los casos de esta enfermedad se deben a mutaciones en el gen *npc1*, mientras que el 5% restante se producen por mutaciones en el gen *npc2* (Mukherjee *et al.*, 2004, Sturley *et al.*, 2004, Chang *et al.*, 2005a). La enfermedad NPC, comprende un grupo heterogéneo de enfermedades de almacenamiento de lípidos en el endolisosoma, con herencia autosómica recesiva (Watari *et al.*, 1999, Vanier *et al.*, 2003). Clínicamente, se puede diagnosticar utilizando el marcador fluorescente filipina, el cual es un antibiótico polieno (con más de dos dobles enlaces) que se une al grupo hidroxilo del colesterol no esterificado para formar un complejo fluorescente (Figura 10) (Vanier *et al.*, 2003).

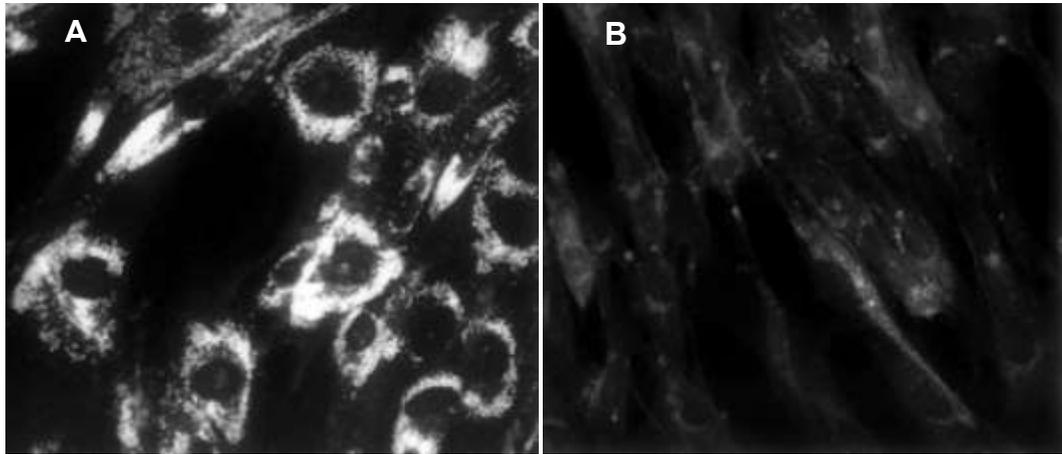


Figura 10. Fenotipo celular en la enfermedad de NPC. A) Línea celular de fibroblastos con la enfermedad NPC, donde se aprecia la acumulación de colesterol en el citoplasma a través de la tinción con filipina. B) Fibroblastos control, sin la enfermedad de NPC (Vanier *et al.*, 2003).

Además del colesterol, otros lípidos como la esfingomielina, la glucosilceramida, ciertos gangliosidos como GM2 y GM3 y el LBPA también se acumulan en células con el fenotipo NPC (Patterson *et al.*, 2001). La acumulación de glicosfingolípidos se debe a la alta afinidad entre el colesterol y los esfingolípidos, los cuales conforman los mayores componentes de los microdominios lipídicos o “rafts” (Simons *et al.*, 2000). También se ha observado que en células NPC la acumulación de colesterol endosomal/lisosomal conduce a la inhibición de esfingomielinasa y glucosilceramidasa lisosomales (Reagan *et al.*, 2000, Salvioli *et al.*, 2004).

2.13 Acumulación de colesterol producida por la droga U1866A

La droga U18666A (3β -[2-(dietilamino)etoxi]androst-5-en-17-ona) (Figura 11) se utiliza para inhibir el tráfico de colesterol y se ha implicado en el estudio de varias enfermedades, incluyendo NPC, Alzheimer y arterosclerosis. Esta droga permea dentro de las células e inhibe el transporte de colesterol desde los endosomas tardíos/lisosomas hacia el RE (Feng *et al.*, 2003, Koh *et al.*, 2006). En macrófagos, concentraciones micromolares de esta droga inhiben el tráfico de colesterol en los endosomas tardíos; mientras que concentraciones nanomolares impiden el tráfico de colesterol en el RE, similar a lo encontrado en la enfermedad de NPC (Feng *et al.*, 2003, Koh *et al.*, 2006).

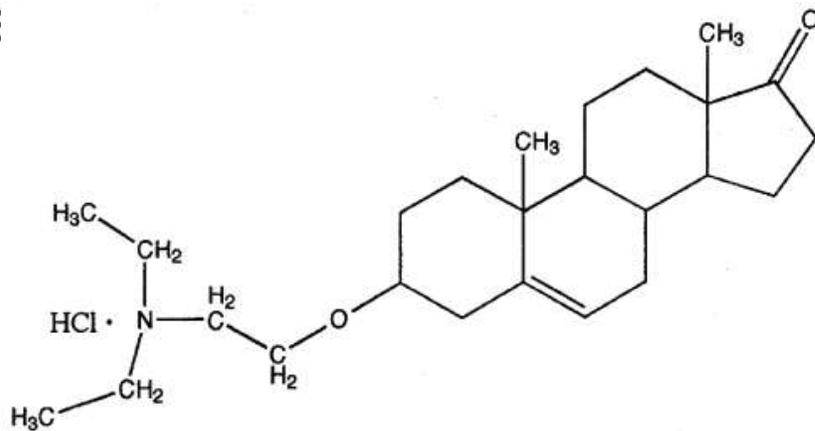


Figura 11. Representación de la estructura química de la droga U18666A. Estructura química de la droga U18666A (3 β -[2-(dietilamino)etoxi]androst-5-en-17-ona), la cual es permeable en la membrana celular dada su naturaleza anfifílica (Cenedella *et al.*, 2004).

El efecto que ejerce esta droga sobre el tráfico de colesterol, involucra la participación directa de la proteína NPC1 (Liscum *et al.*, 1991, Liscum *et al.*, 1992). En estudios con células de la granulosa (localizadas en los folículos ováricos, rodeando al ovocito), incubadas con la droga U18666A, se observó un aumento de más de dos veces en los niveles del RNAm del gen *npc1* y de la proteína NPC1. Estos resultados sugieren que la droga puede alterar las funciones de NPC1, activando un mecanismo compensatorio que da como resultado un incremento en la síntesis *de novo* de NPC1 (Watari *et al.*, 2000).

En los resultados obtenidos durante la maestría, observamos que después de bloquear el tráfico de colesterol en endosomas (tráfico vesicular) por efecto de la droga U18666A, incrementaban algunos procesos de virulencia como la eritrofagocitosis y la destrucción de monocapas de células epiteliales (después de revertir este bloqueo). Por lo que creemos que el tráfico vesicular es un evento indispensable para el movimiento tanto de colesterol como de otras moléculas involucradas en estos procesos de virulencia.

3. JUSTIFICACIÓN

E. histolytica es un protozooario intestinal capaz de provocar la muerte a millones de personas alrededor del mundo. Posee diferentes mecanismos de virulencia, siendo el tráfico vesicular imprescindible para que se lleve a cabo el transporte de diferentes proteínas y moléculas involucradas en estos mecanismos.

Estas proteínas y moléculas se transportan intracelularmente en vesículas que siguen el sistema endolisosomal y sus membranas están formadas por lípidos como el colesterol.

Se sabe que el colesterol es importante para la supervivencia y virulencia de *E. histolytica*, sin embargo, se desconoce cuáles son las proteínas con las que interactúa para su transporte y distribución hacia los sitios donde es requerido. En eucariontes superiores se ha descrito que, en el transporte intracelular de colesterol, específicamente a nivel de endosomas tardíos/lisosomas, participan esencialmente dos proteínas: NPC1 y NPC2. Por lo tanto, es de relevancia conocer si en el parásito *E. histolytica* se expresan las proteínas NPCs y cuál es su función en el transporte de colesterol y en los procesos patogénicos. Entender el tráfico vesicular de moléculas directamente involucradas en los mecanismos de virulencia, nos permitirá en un futuro el diseño de estrategias alternativas para el combate de la amibiasis.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar una posible EhNPC2 y caracterizar la función de ambas proteínas (EhNPC1 y EhNPC2) durante el transporte de colesterol en *E. histolytica* y estudiar cómo influye este transporte en diversos eventos relacionados con la virulencia del parásito.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar la estructura de las proteínas hipotéticas EhNPC1 y EhNPC2 y su asociación con el colesterol, mediante análisis bioinformáticos.
2. Comprobar que los genes, transcritos y proteínas están presentes en trofozoítos de *E. histolytica*.
3. Determinar la localización subcelular de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos de *E. histolytica*.
4. Analizar las interacciones entre EhNPC1, EhNPC2 y otras proteínas endosomales, así como con el colesterol y el LBPA en trofozoítos de *E. histolytica*.
5. Estudiar el tráfico del colesterol durante eventos relacionados con la virulencia *in vitro* e *in vivo* de *E. histolytica*, a través de su arresto mediante el uso de la droga U18666A.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

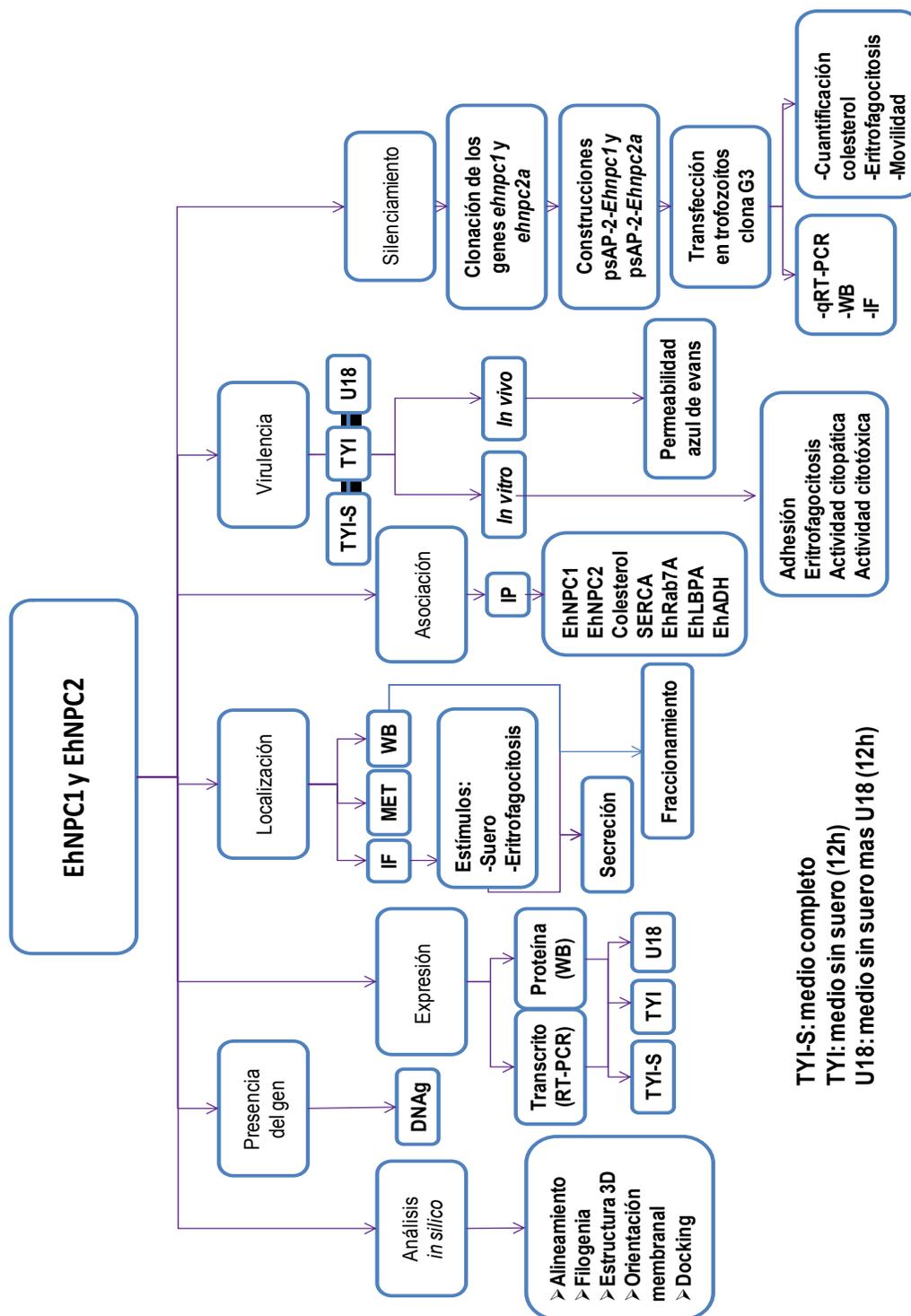


Figura 12. Estrategia experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis *in silico* de las proteínas hipotéticas EhNPC1 y EhNPC2

La secuencia proteica de NPC1 y NPC2 se buscó en el proteoma de *E. histolytica*, con ayuda de la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>). La similitud entre la proteína NPC1 de amiba y la de *H. sapiens*, se determinó mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y empleando el servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<https://www.expasy.org/>). Los criterios de selección fueron: 1) al menos el 20% de identidad y 2) un valor de “e” lo más cercano a 0. Se realizaron alineamientos con múltiples secuencias de la proteína NPC1 de otros organismos, auxiliándonos del programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). También se realizó la predicción de regiones transmembranales y su orientación en la membrana mediante el programa TMprep (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Para la identificación de dominios estructurales se utilizó el programa SMART genomic (Simple Modular Architecture Research Tool) ([Smart.embl-heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de)).

La secuencia NPC2 no se encontró en la base de datos KEGG, por lo cual se realizó una búsqueda a partir del dominio de reconocimiento de esteroides (E1_DerP2_DerF2) descrito en la proteína NPC2 de humano. Siguiendo esta estrategia, encontramos dos proteínas putativas NPC2 en *E. histolytica* con los números de acceso: EHI_068260 y EHI_188770 y que de ahora en adelante llamaremos EhNPC2a y EhNPC2b, respectivamente.

7.2 Modelaje molecular

Las secuencias de aminoácidos de EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b fueron analizadas mediante el servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) para predecir su estructura terciaria. La orientación en la membrana se obtuvo a través de la base de datos OPM (Orientations of Proteins in Membranes) (<http://opm.phar.umich.edu/>). La región amino terminal (NTD) de EhNPC1 (1 a

250 aminoácidos) se comparó con el cristal del NTD de la NPC1 de humano (número PDB 3GKI) (23 a 254 aminoácidos). En tanto que las estructuras tridimensionales de EhNPC2a y EhNPC2b se compararon con el cristal de la proteína NPC2 de *Bos taurus*. Ambos cristales se obtuvieron de la base de datos "Protein Data Bank" (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Los modelos obtenidos se analizaron mediante el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). El acoplamiento molecular de cada proteína con el colesterol, se realizó en el programa AutoDockTools V1.5.6 (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>) y los sitios de interacción se analizaron mediante el programa Ligplotv.4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/software/LIGPLOT/>). El tamaño de la cuadrícula usada fue de 126x126x126 puntos, con un espacio de 0.8 Å. Los acoplamientos moleculares se realizaron en función de la energía libre empírica y con base al algoritmo de genética Lamarckian. El número de corridas GA fue de 200, utilizando un número máximo para la evaluación de 2×10^6 . La estructura de colesterol en formato PDB se obtuvo de la base de datos ZINC12 (www.zinc.docking.org) y la energía de minimización se obtuvo en los programas PRODGR (davapc1.boich.dundee.ac.us/prodgr/) y CHIMERA V1.10.1.

7.3 Cultivo de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS clona A (Orozco *et al.*, 1983) y clona G3 (Bracha *et al.*, 2003), se cultivaron axénicamente en cajas de cultivo a 37°C, en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978) suplementado con 3% de mezcla de vitaminas Diamond (North American Biologicals), 0.25 UI/ml de bencilpenicilina (Lakeside), 35 µg/ml de estreptomycin (Lakeside) y 15% de suero bovino adulto (SBA) (Microlab). Una vez que los trofozoítos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se cosecharon a 800 g durante 5 min a 4°C y se utilizaron para los experimentos correspondientes. Para cuantificar el número de trofozoítos, se

realizó un conteo en la cámara de Neubauer, empleando la siguiente fórmula:

No. Amibas (sumatoria de los 4 cuadrantes) / 4* (Factor de dilución) = No. amibas/ml

En la mayoría de los casos se utilizaron trofozoítos de la clona A, excepto para los ensayos de silenciamiento de los genes *ehnpc1* y *ehnpc2a*, donde se emplearon trofozoítos de la clona G3.

7.4 Tratamiento con la droga U18666A

Cultivos de trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron durante 12 horas con medio TYI sin suero, suplementado con 3 µg/ml de la droga U18666A (Sigma-Aldrich) y enseguida se realizaron los experimentos correspondientes, manteniendo durante el procesamiento la misma concentración de tratamiento con la droga.

7.5 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de los trofozoítos se obtuvo con el kit DNA purification System (Promega). Los trofozoítos se colectaron mediante centrifugación a 800 g, a 4°C y la pastilla se lavó con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 2 mM). Posteriormente, al paquete celular se le adicionó 600 µl de la solución de lisis nuclear y se mezcló por pipeteo. A la muestra se le añadió 3 µl de solución de RNAasa, se agitó por 30 seg y se incubó a 37°C durante 30 min. Después de enfriar la muestra a TA, se adicionaron 250 µl de solución de lisis, se agitó por 30 seg y se incubó a 4°C durante 5 min. El tubo se centrifugó a 4000 g durante 6 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 600 µl de isopropanol a TA. Después de mezclar suavemente por inversión, el tubo se centrifugó nuevamente a 4000 g por 1 min y al sobrenadante se le adicionó 600 µl de etanol al 70%. La muestra se mezcló por pipeteo y se centrifugó a 4000 g por 1 min. El etanol se removió y el tubo se dejó secar en esterilidad aproximadamente durante 10 min. El DNA genómico se resuspendió con

agua inyectable estéril, y se hicieron alícuotas, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.6 Extracción de RNA total

Los trofozoítos de *E. histolytica* colectados a 4°C, se empastillaron por centrifugación a 800 g y se les adicionó 1 ml de Trizol (Sigma-Aldrich, USA) por cada 1×10^7 células. La mezcla se homogenizó y se incubó a TA por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de cloroformo por cada ml de Trizol, el tubo se agitó y se incubó a TA por 3-4 min. La preparación se centrifugó a 3500 g durante 15 min a 4°C y la parte acuosa se transfirió a un tubo nuevo, donde se adicionaron 500 μ l de isopropanol frío por cada ml de Trizol. Después de incubarse a TA por 10 minutos, la muestra se centrifugó a 3500 g durante 10 min a 4°C. La pastilla se lavó 2-3 veces con 1 ml de etanol al 75 % por cada ml de Trizol, se homogenizó y centrifugó a 3000 g, durante 5 min a 4°C. La pastilla que contenía el RNA total se secó en esterilidad, se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

7.7 Tratamiento con DNasa

Una vez obtenido el RNA total, las muestras se trataron con DNasa para eliminar la posible contaminación con DNA genómico. El RNA total (1 μ g) se incubó a 37°C durante 30 min con 1 μ l de DNasa libre de RNasa (Thermo Scientific). La DNasa se inactivó con EDTA 50 mM a 65°C durante 10 min e inmediatamente se usó para generar el DNA complementario (DNAc).

7.8 Síntesis de DNAc

Para la síntesis de DNAc, 1 μ g de RNA total pre-tratado con DNasa se incubó con 1 μ l de oligo dT 10 μ M (Sigma) y 1 μ l de dNTPs, durante 5 min a 65 °C. Para la reacción de retro-transcripción, se adicionaron 4 μ l de amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM), 2 μ l de DTT (ditiotreitól) 0.1 M y 2 μ l de inhibidor de RNasa. La mezcla se incubó a

42 °C durante 2 min y posteriormente se adicionó 1 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl, *SuperScript II*, Invitrogen), la cual se incubó a 42 °C durante 50 min. Para inactivar la transcriptasa reversa, la reacción se incubó a 70 °C por 15 min y el DNAC obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.9 Electroforesis en geles de agarosa

La separación del DNA, RNA total y RNAm se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE (40 mM Tris acetato y 1mM EDTA). A las muestras se les adicionó amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%) y la electroforesis se llevó a cabo por 1 h a 70-80 V. Posteriormente, los geles fueron observados bajo luz UV en el GelDoc (BioRad).

7.10 Diseño de oligonucleótidos y PCR

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar los genes completos *npc1*, *npc2a*, *npc2b* y *s2* se realizó empleando los programas Pearlprimer y DNABworks disponibles en internet (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks>). El gen que codifican para la proteína s2 de la subunidad 40s del ribosoma se usó como control de carga. A los oligonucleótidos se les añadieron secuencias específicas, para ser reconocidos por las enzimas de restricción *BamHI* en el oligo sentido y *Sall* en el oligo antisentido (Tabla 1). Además, añadimos los nucleótidos GC y CC en los oligos sentido y antisentido, respectivamente, para favorecer la estabilidad de unión de las enzimas de restricción (Tabla 1). También se diseñaron oligonucleótidos para los ensayos de PCR en tiempo real (Tabla 1). Así como los oligonucleótidos usados para amplificar los fragmentos específicos para silenciamiento (Tabla 1).

Todos los oligonucleótidos se alinearon en el genoma de *E. histolytica*, usando la base de datos AmoebaDB, con la finalidad de comprobar que estas secuencias sólo correspondieran a los genes de interés. Una vez comprobada la especificidad de los oligos, se enviaron a sintetizar.

Gen completo	Secuencia de los oligonucleótidos	Tamaño del amplicon (pb)
<i>Ehnpc1</i>	S GC GGATCC ATGTTTGTTTTCTTCTTCTTGATAAG TGTTGTAATTAGTATTAC	4020
	A CC GTCGAC CATTCAAAGTTTTGATATTCTCCTTT TGTA CTCTT	
<i>Ehnpc2a</i>	S GC GGATCC ATGCCATTGGTTAACCCATTATTTTT TTTATTACTTATTTTCATTC	441
	A CC GTCGAC CTATTTAACTAATACCGGACCAAAT TCTGAACA ACTGAATAGAGTGC	
<i>Ehnpc2b</i>	S GC GGATCC ATGTTTGTTGTTATTCATACTATTCAC TACTCTTTTTTGCA	426
	A CC GTCGAC TTATTTTCATATCAAGCATAAATCCTA ACAAGTGATATTATAGTCACC	
qRT-PCR	Secuencia de los oligonucleótidos	Tamaño del amplicon (pb)
<i>Ehnpc1</i>	S ATTTACCTCTGCTGGATTCTTCTC A GGAACATACTGACCATCTTTATCG	164
	<i>Ehnpc2a</i>	
<i>Ehnpc2b</i>	S CTCCATTTGTCTACCTGAACC A CTGGACATCTAACTACTGTTCC	232
	<i>R40s</i>	
Silenciamiento de los genes	Secuencia de los oligonucleótidos	Tamaño del amplicon (pb)
<i>Ehnpc1</i>	S AGCT AGGCCT ATGTTTGTTTTCTTCTTCTTGAT A GCAT GAGCTC TCATCAATTTTCAGTCCATCTTG	400
	<i>Ehnpc2a</i>	
A GCAT GAGCTC AACAAGTGATATTATAGTCACCG		

Tabla 1. Secuencias oligonucleótidos utilizados. Los sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* (rojo) y *Sall* (azul) se muestran subrayados en las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar los genes completos. También se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados en los ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR) y para el silenciamiento de los genes, donde se marcan los sitios de restricción *StuI* (verde) y *SacI* (morado). S: sentido. A: antisentido.

7.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes de interés mediante PCR convencional se utilizaron 100 ng de DNA genómico, 10 μ M de cada oligonucleótido sentido y antisentido correspondiente, 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), amortiguador GC 5X, 2.0 mM de cloruro de magnesio, 1 U de DNA polimerasa de alta fidelidad KAPA (HiFi HotStart, Biosystems) y agua inyectable, hasta completar un volumen de 50 μ l. Como control negativo, las reacciones se llevaron a cabo sin añadir ADN. Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Mastercycler personal (Eppendorf), utilizando las condiciones de la tabla 2.

7.11.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, preparados con amortiguador TBE (45 mM de tris base, 45 nM de ácido bórico y 1 mM de EDTA). A las muestras se les adicionó amortiguador de carga (azul de bromofenol, xileno cianol y glicerol al 80 %) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 80-90 V por 120 min. Posteriormente, los geles se desmontaron y se colocaron en una solución de bromuro de etidio al 0.05% para detectar, bajo luz UV, los fragmentos de PCR amplificados.

7.12 Clonación de los genes *ehnpc2a* y *ehnpc2b*

A partir de DNAC de *E. histolytica* se amplificaron los genes completos *npc2a* y *npc2b*, empleando la siguiente reacción de PCR: 1 μ g de DNAC, amortiguador KAPA Hifi 5X, 10 mM de la mezcla de dNTP (Mix KAPA), 10 mM de cada oligo sentido y antisentido y 2.5 U de la polimerasa de alta fidelidad KAPA Hifi. La amplificación se realizó en el termociclador Mastercycler personal, usando las condiciones descritas en la tabla 3. El producto amplificado se analizó en geles de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes al tamaño esperado para los genes *ehnpc2a* y *ehnpc2b* se cortaron y purificaron con el kit GeneJet Gel Extraction (Thermo Scientific).

Tabla 2. Condiciones para amplificar un fragmento de los genes *ehnpc1*, *ehnpc2a* y *ehnpc2b*

Temp. Inicial	95 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	98 °C	20 seg	40 ciclos
Alineamiento	58 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1 ciclo
Temperatura final	4 °C	∞	

Tabla 3. Condiciones para amplificar los genes completos *ehnpc2a* y *ehnpc2b*.

Temp. Inicial	95 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	98 °C	20 seg	40 ciclos
Alineamiento	63 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión final	72 °C	4 min	1 ciclo
Temperatura final	4 °C	∞	

Los genes fueron clonados en el vector *pJET* 1.2/blunt (Thermo Scientific) (Figura 13), previamente restringido con las enzimas *Bam*HI y *Sall* y utilizando el kit CloneJet (Thermo Scientific). La mezcla de reacción contenía: 1 µg del producto de PCR, buffer de reacción 2X, 50 ng/µl del plásmido *pJET* 1.2/blunt y 5 U/µl de ligasa de DNA T4 (Invitrogen). La mezcla de ligación se incubó durante 5 min a TA.

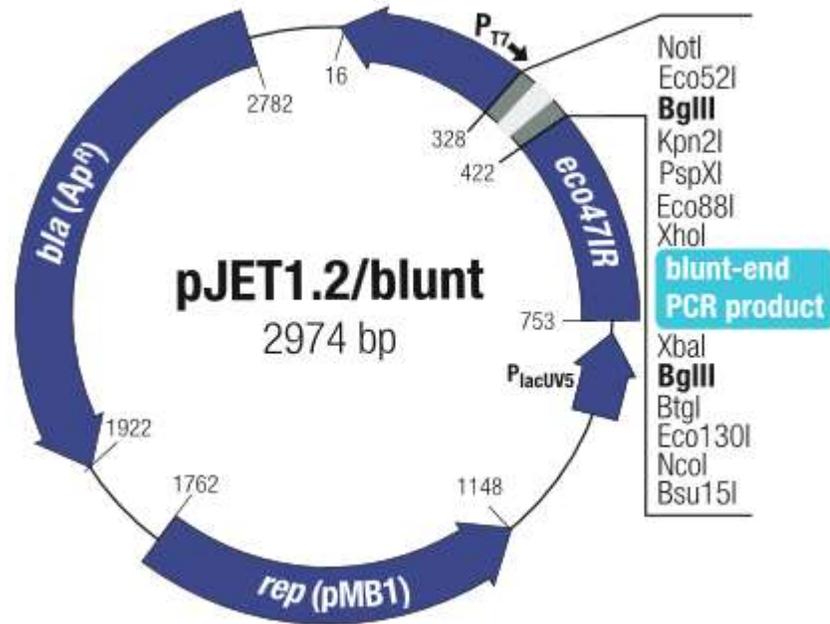


Figura 13. Vector de clonación pJET 1.2/blunt. Este vector consta de 2974 pb, posee un replicón (en la posición 1762-1148), un sitio de resistencia a la ampicilina (2782-1922), un sitio de inicio de la replicación (1162), un gen letal que permite la selección de las colonias que poseen el plásmido (753-16), múltiples sitios de clonación para colocar el inserto (422-328) y un sitio de inserción para ligar el inserto (371-372).

7.12.1 Preparación de bacterias competentes

A partir de una colonia de bacterias *Escherichia coli* DH5 α se obtuvo un cultivo con una densidad óptica (DO) de 0.4, medida a una longitud de onda de 600 nm. Las bacterias crecidas a 37 °C se empastillaron a 500 g, se lavaron con 50 mM de CaCl₂, nuevamente se centrifugaron a 1000 g y la pastilla se resuspendió en una mezcla de 50 mM de CaCl₂ y glicerol al 25%. Se realizaron alícuotas de las bacterias y se almacenaron a 4 °C, por no más de una semana, hasta su uso.

7.12.2 Transformación de bacterias

Bacterias *E. coli* DH5 α competentes frescas (50 μ l) se mezclaron con 30 ng de los plásmidos a insertar y se incubaron a 4 °C durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se sometió a un choque térmico a 42 °C, se le adicionó 500 μ l de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 °C durante 1 h. La reacción se sembró en placas de LB-agar con ampicilina (100 mg/ml) para seleccionar las bacterias transformadas y se incubaron a 37 °C durante toda la noche (ON).

7.12.3 Purificación de los plásmidos y de los productos de interés

Los plásmidos contenidos en las colonias de bacterias transformadas se aislaron con el kit Fast Plasmid Mini (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, el gen de interés se digirió con las enzimas de restricción correspondientes (*Sall* y *BamHI*) y los productos generados se analizaron en geles de agarosa al 1%.

El inserto de interés se cortó del gel de agarosa y los fragmentos del gel se pesaron dentro de un tubo de 1.5 ml. Después, se agregó un volumen 1:1 del amortiguador de unión y se incubó la mezcla a 50-60°C durante 10 min o hasta que el gel estuviera completamente disuelto. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se agregaron dos volúmenes de isopropanol al 100% y se mezcló vigorosamente. La mezcla se cargó en la columna de purificación GeneJET, se centrifugó a 18,000 g durante 1 min y se descartó lo

que no se unió. Con la finalidad de lavar el DNA unido a la columna, se colocaron 100 μ l del amortiguador de unión, se centrifugó como se mencionó anteriormente y se lavó con 700 μ l de amortiguador de lavado, nuevamente centrifugando en las condiciones establecidas. Finalmente, se realizó una centrifugación adicional para remover los residuos de etanol del amortiguador de lavado. Para eluir el DNA obtenido, la columna se colocó en un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril, se adicionaron 50 μ l de agua estéril en la columna a 50°C y se centrifugó a 14,000 g durante 1 min. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm en un equipo Nanodrop (Thermo) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.12.4 Ligación

El inserto de interés y el plásmido de expresión *pGEX-6P-1* (Amersham; Figura 14) digeridos y purificados, se ligaron en una proporción de 1:10 ó 1:20 (vector: inserto). Las mezclas de ligación se realizaron en un volumen final de 10-15 μ l, conteniendo 50 ng del plásmido *pGEX-6P-1-BamHI/Sall*, 50 ng del inserto, 1 μ l (100 unidades) de T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2 μ l de amortiguador T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen) y agua inyectable para completar el volumen final de reacción. La reacción se incubó por 16-18 h a 16°C. Como control negativo se llevó a cabo la misma reacción sin el inserto.

pGEX-6P-1

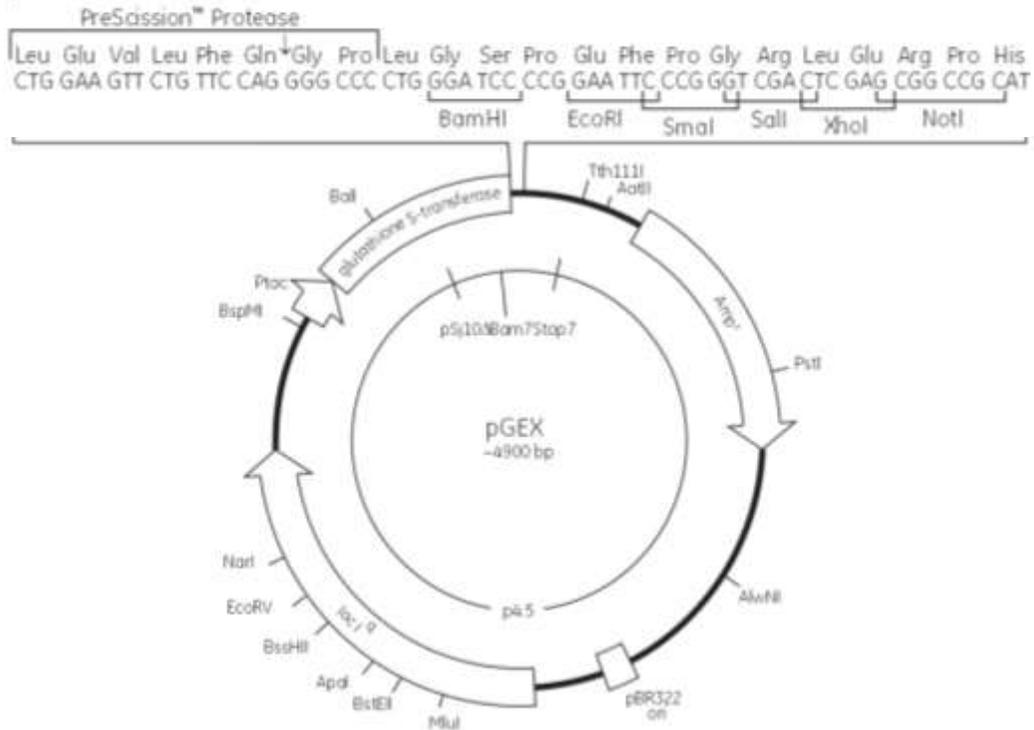


Figura 14. Vector de clonación *pGEX-6P-1*. Mapa del vector utilizado para la clonación de los genes *ehnpc2a* y *ehnpc2b*. Los sitios de restricción utilizados para insertar los productos de interés fueron los de las enzimas *BamHI* y *SalI*.

7.12.5 Inducción de las proteínas recombinantes EhNPC2a y EhNPC2b

Las construcciones *pGEX-ehnpc2a* y *pGEX-ehnpc2b* se transformaron en bacterias *E. coli* BL21 *pLysS* y se indujo la expresión de las proteínas recombinantes. Esta expresión se encuentra bajo el control del promotor *tac*, que es inducido por el isopropil- β -tio-galactopiranosido (IPTG). El gen *lacI^q* codifica para una proteína represora que se une al promotor *tac* y que sólo el inductor IPTG puede eliminar, manteniendo así un control en la expresión del inserto.

En todos los casos se sembró una colonia en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml de medio) y el cultivo se incubó con agitación orbital (*Lab-Line^R Incubator-Shaker*) a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una DO de 0.4-0.6 a 600 nm. Posteriormente, se llevó a cabo la inducción de la expresión adicionando de 0.5 mM de IPTG, durante 3 h a 37 °C.

7.12.6 Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes GST-EhNPC2a y GST-EhNPC2b

Para el análisis de la solubilidad, se utilizaron 100 ml de cultivo bacteriano transformado e inducido. Las bacterias se centrifugaron a 10,000 *g* por 5 min, la pastilla se resuspendió en 2.5 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2mM, NaCl 100mM y 1 mM PMSF), se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó por una h. Posteriormente, la mezcla se sometió a sonicación en frío (sonicador ultrasónico de punta *Vibra-Cell Sonics^R*), por 5 veces, con intervalos de 10 seg a una amplitud de 60 W. El lisado celular se centrifugó a 12,000 *g* por 20 min a 4°C, para separar la fracción soluble y la insoluble. Se tomó una alícuota de 100 μ l de cada fracción y se les adicionó 20 μ l de amortiguador de muestra 5X (Tris HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 40%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.05%). Las muestras se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), los cuales se tiñeron con solución de azul de Coomassie (Metanol 50%, ácido acético 10%,

azul de Coomassie R-250 0.2%) y se decoloraron posteriormente para observar las proteínas claramente.

7.12.7 Electroelución de las proteínas recombinantes

Se corrieron cuatro geles preparativos SDS-PAGE con la fracción insoluble de los lisados bacterianos y posteriormente se cortaron las bandas correspondientes al peso de cada proteína recombinante (incluyendo la etiqueta de GST). Las muestras se cortaron en pequeñas fracciones y se colocaron en una cámara de electroelución (Bio-Rad), que se sometió a 40 V, durante 2.5 h. Las proteínas electroeluídas se pasaron por Columnas de Sephadex G-25 (Columna PD-10; GE) para eliminar las sales. Las fracciones colectadas se cuantificaron y se utilizaron para inmunizar animales y generar anticuerpos.

7.13 Síntesis del péptido de la proteína EhNPC1

La secuencia de la proteína EhNPC1 se introdujo en los programas BCPREDS (B-cell epitope prediction server) (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>) y ABCpred (Artificial neural network based B-cell epitope prediction Server) (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), para determinar el epítipo idóneo para generar un anticuerpo contra la proteína EhNPC1. Los programas usados permitieron determinar: hidrofobicidad, accesibilidad, superficie expuesta, polaridad y antigenicidad de los candidatos analizados. El epítipo seleccionado fue DEQPMYDKDGQYVPVEKRLE, que consta de 20 aa (residuos 766-786).

7.14 Producción de anticuerpos

El péptido de la proteína EhNPC1 y la proteína recombinante EhNPC2a-GST se resuspendieron en el adyuvante TiterMax Gold (Sigma-Aldrich) y se inmunizaron en conejos Nueva Zelanda y ratones Balb/c, a una concentración de 100-200 y 50 µg, respectivamente. Se realizaron 2 inmunizaciones más cada 15 días y se obtuvo una muestra sanguínea antes

de cada inmunización para medir el título de anticuerpo, mediante ensayos de Western blot. Antes de iniciar con las inmunizaciones se tomó una muestra sanguínea de los animales para obtener el suero preinmune

7.15 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* se cosecharon cuando alcanzaron su fase logarítmica como se describió anteriormente. Posteriormente la pastilla se resuspendió (1 ml por cada 15×10^6 trofozoítos), en PBS en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (PHMB 100 mM, PMSF 100 mM; benzamidina 100 mM; aprotinina 10 mg/ml; pepstatina 1 mg/ml; leupeptina 10 mg/ml y E-64 1 mg/ml). La lisis celular se llevó a cabo congelando la muestra en nitrógeno líquido y descongelándola con agitación a temperatura ambiente (TA) con el vórtex y realizando pases consecutivos en hielo. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y los extractos amibianos se almacenaron en alícuotas a -70°C , hasta su uso.

7.15.1 Ensayos de Western blot (WB)

Las muestras de proteínas se mezclaron con amortiguador de carga 2X (Glicerol 20%, SDS 4%, Tris HCl 0.125 M, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.05%, pironina 0.05%) y se separaron por SDS-PAGE. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad). Las unidades se montan a manera de emparedado en el siguiente orden: ánodo, esponja, papel filtro Whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman, esponja y cátodo. La cámara se cargó con solución de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 100 mM, SDS 0.1 %, metanol 20%) fría y se colocó en un baño de hielo para transferir las proteínas a 400 mA por 1.5 h. Después, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%), para verificar la integridad de las muestras proteicas. A continuación, la membrana se incubó con solución bloqueadora (PBS-leche 5%) y para la inmunodetección se usaron los anticuerpos generados diluidos 1:3000 en PBS-leche 5%. El

anticuerpo primario se incubó toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS-Tween-20 al 0.5% y la membrana se incubó 2 h a TA con el anticuerpo secundario α -IgG acoplado a peroxidasa (de conejo o rata según el anticuerpo primario), diluido 1:10,000 en PBS-leche 5%. Al término de la incubación se realizaron los mismos lavados con PBS-Tween-20 al 0.5%, como se describió anteriormente. La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el método quimioluminiscente ECL (Amersham), en el equipo Microchemi 4.2 (Accesolab). Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa ImageJ 1.44p para realizar la cuantificación densitométrica.

7.16 Cuantificación de colesterol

Los trofozoítos (5×10^5) se cosecharon y lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, la pastilla celular se resuspendió en una mezcla de isopropanol, cloroformo y NP40 (7:11:1), Esta suspensión se centrifugó a 13000 g por 10 min y la fase orgánica se colectó. Esta fase se secó por aproximadamente 3 h a 55°C. Los lípidos fueron cuantificados mediante el kit "Quantitation colesterol" (Sigma-Aldrich), de acuerdo al protocolo del fabricante.

7.17 Tinción del colesterol (filipina)

Los trofozoítos (5×10^4) se colocaron en cubreobjetos estériles por 30-40 min a 37°C, para permitir la adhesión de las amibas al vidrio. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) tibio al 4%, diluido en PBS (pH 7.4), durante 60 min a 37°C. Después, se realizaron tres lavados con PBS tibio, para eliminar el exceso de PFA. A continuación, las células se incubaron con glicina 1.5 mg/ml, durante 10 min a TA, se realizaron de 2-3 lavados con PBS tibio y se incubaron durante 2 h a TA con 250 μ g/ml de filipina (Sigma-Aldrich). Las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con yoduro de propidio (2 μ g/ml) durante 20 min a T. A. Finalmente, las muestras se lavaron 3-4 veces con PBS, se montaron en

portaobjetos con el medio preservador de la fluorescencia VectaShield (Vector Laboratories Inc), se observaron en un microscopio confocal (Carl Zeiss LMS 700) y se analizaron con el software ZEN (Zen 2009 light Edition; Zeiss).

7.18 Co-localización por inmunofluorescencia durante la fagocitosis

Los trofozoítos se adhirieron por 30 min a cubreobjetos y posteriormente, se realizó la cinética de eritrofagocitosis (0, 15, 30, 60, 90 min) a 37°C. Las muestras se fijaron con PFA al 4%, durante 40-50 min a 37°C, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.05% durante 20 min y se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) al 10% durante 1 h a 37°C. Después, se colocaron los anticuerpos primarios (α -EhNPC1 de conejo, 1:100; α -EhNPC2a de rata, 1:100; α -EhADH de conejo, 1:500 (Banuelos *et al.*, 2005); α -EhRab7A de conejo, 1:500 (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005); α -lectina Gal/GalNAc de ratón, 1:50 (Petri *et al.*, 1989); α -LBPA de ratón, 1:30 (CIPQUIM); α -EhSERCA de conejo, 1:1000 (Martinez-Higuera *et al.*, 2013)), seguidos de sus correspondientes anticuerpos secundarios (α -IgG de conejo acoplado a FITC, 1:100; α -IgG de rata acoplado a TRITC, 1:100; α -IgG de conejo acoplado a Cy5, 1:100; α -IgG de ratón acoplado a TRITC, 1:100) (Zymed; 1:100). Finalmente, las preparaciones se lavaron 3-4 veces con PBS, se montaron en portaobjetos con el medio preservador de la fluorescencia Vecta-Shield y se procesaron para microscopía confocal como se describió en el apartado anterior.

7.19 Microscopia electrónica de transmisión (MET)

Para los experimentos de inmunomarcaje con oro coloidal, los trofozoítos fueron fijados con PFA al 4% y glutaraldehído al 0.5% en PBS durante una hora a TA. Las muestras fueron embebidas en resina LR white (London Resin Co) y polimerizadas bajo la luz UV a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, cortes de 60 nm fueron montados en rejillas de níquel y posteriormente se incubaron toda la noche con anticuerpos α -EhNPC1 o α -

rEhNPC2 (1:20) a TA, después se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios acoplados a partículas de oro de 20 nm (anti-conejo) y 10 nm (anti-rata) (Ted Pella Inc; 1:60). Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron con el microscopio de transmisión Joel JEM-1011. El número de partículas de oro se cuantificó a partir de 12 imágenes y se obtuvo la media por μm^2 .

7.20 Inmunoprecipitación

Extractos totales de trofozoítos (1×10^6) se incubaron ON a 4°C con 200 μl proteína A/G acoplada a perlas de agarosa (Invitrogen) y ligada a 1 μg de anticuerpo (α -NPC1 o α -NPC2). Las proteínas inmunoprecipitadas se colectaron por centrifugación a 800 g durante 5 min a 4°C , se lavaron 3 veces con amortiguador RIPA (40 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5 % DOC, 0.2% SDS, 1% Tritón x-100, 10% glicerol) y se extrajeron con amortiguador de Laemmli 2X (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 mM EDTA, 6% SDS, 4% 2- β mercaptoetanol, 10% glicerol) por ebullición durante 10 min. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se inmunodetectaron por ensayos de WB.

7.20.1 Dot blot

Los extractos totales (50 μg) obtenidos como se describió anteriormente, se colocaron por goteo en una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se realizó un WB convencional usando el anticuerpo α -colesterol en proporción 1:100 (Cloud Clone Co), seguido de su respectivo anticuerpo secundario acoplado a HRP (Zymed; 1:10,000).

7.21 Ensayo de secreción

Los trofozoítos (3×10^6) se crecieron en medio TYI (sin suero) durante 12 h y posteriormente, se incubaron con 100 μl de suero bovino adulto (SBA, Microlab Co.) durante 0, 0.5, 5 y 15 min a 37°C . Los trofozoítos se centrifugaron y los sobrenadantes se colectaron al igual que las pastillas

celulares. Ambas fracciones se procesaron con inhibidores de proteasa (utilizados anteriormente) y amortiguador de Laemmli 5X. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en geles al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para llevar a cabo experimentos de WB.

7.22 Obtención de eritrocitos

Se obtuvo una muestra de sangre humana por punción venosa y se colocó en solución Alsever, la cual se utilizó como anticoagulante y que contenía ácido cítrico 2.86 mM (Sigma), citrato de sodio 27.2 mM (Sigma), cloruro de sodio 71.8 mM (Merck) y dextrosa 113.7 mM a un pH de 6.1. La muestra se centrifugó a 500 g y se lavó cuatro veces por 10 min con la misma solución Alsever. Los sobrenadantes, que contenían las células blancas, se eliminaron y las pastillas, con los eritrocitos, se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Para el conteo celular se empleó la siguiente fórmula:

No. Eritrocitos (sumatoria de los 5 cuadrantes) / $5 \times 25 \times (\text{factor de dilución}) =$

No. eritrocitos/ml

7.23 Adhesión

Los trofozoítos se incubaron a 4°C con eritrocitos, en una proporción 1:50 en medio TYI sin suero, por diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min). Los eritrocitos adheridos a las amibas se tiñeron con diaminobencidina (DAB) 4.5 mM y se incubaron a 37°C por 30-40 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se resuspendieron en aproximadamente 100 µl de PBS, de los cuales se tomaron sólo 10 µl para cuantificar, mediante microscopia de luz, la cantidad de eritrocitos unidos a cada amiba. Se contaron 100 amibas por cada tiempo analizado y los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

7.24 Eritrofagocitosis

Los trofozoítos se incubaron a 37°C y con agitación suave con eritrocitos, en una proporción 1:50, en medio TYI sin suero a diferentes

tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min). Los eritrocitos no ingeridos por las amibas se lisaron con ácido acético al 3%. Las muestras se centrifugaron a 441 g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla, que contenía amibas que fagocitaron eritrocitos, se lisó con ácido fórmico absoluto. La suspensión celular se cuantificó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 400 nm. Estos ensayos se llevaron a cabo tres veces por triplicado.

7.25 Actividad citopática

Los trofozoítos (5×10^5) se incubaron sobre monocapas de células MDCK (3×10^5), a 37°C durante aproximadamente 2 h, hasta observar un 80% de destrucción de las monocapas. Para detener la acción citopática de las amibas, las preparaciones se incubaron a 4°C durante 15 min. El medio con las amibas despegadas se retiró y las monocapas epiteliales se lavaron seis veces con PBS frío y una vez con PBS a -20°C por 2 min. Para comprobar la completa remoción de las amibas sobre las MDCK, se realizaron observaciones al microscopio óptico. Posteriormente, las células epiteliales se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS, durante 15 min a TA y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se tiñeron con azul de metileno al 1%, en amortiguador de boratos 0.1 M (pH 8.7), por 10 min. Se realizaron tres lavados con amortiguador de boratos 0.01 M y el colorante fue extraído con 1 ml de HCl 1N, durante 30 min a 37°C . La suspensión se cuantificó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 660 nm. Estos ensayos se realizaron al menos tres veces y por triplicado, de manera independiente.

7.26 Actividad citotóxica

A partir de trofozoítos (2×10^6), se realizaron extractos totales que fueron colocados sobre monocapas de células MDCK (3×10^5), a 37°C durante aproximadamente 4-5 h, hasta observar un 80% de destrucción de las monocapas. Las preparaciones se incubaron a 4°C durante 15 min. Las monocapas epiteliales se lavaron tres veces con PBS frío. Posteriormente, las

células epiteliales se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS, durante 15 min a TA y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se tiñeron con azul de metileno al 1%, en amortiguador de boratos 0.1 M (pH 8.7), por 10 min. Se realizaron tres lavados con amortiguador de boratos 0.01 M y el colorante fue extraído con 1 ml de HCl 1N, durante 30 min a 37°C. La suspensión se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm. Estos ensayos se realizaron al menos tres veces y por triplicado, de manera independiente.

7.27 Permeabilidad epitelial del intestino de ratones

Grupos de ratones de la cepa C57BL/6 (6 animales por condición) se anestesiaron con una combinación de quetamina/xilacina (25/2.5 mg/ml por cada 30 gramos de peso) y se les inocularon durante 30 min trofozoítos (1×10^6) vía anal, a través de cánula lubricada con glicerol. Posteriormente, se colocó otra cánula entre el ciego y el intestino grueso para realizar 3 lavados con PBS y para inocular durante 15 min, el colorante azul de Evans al 1.5 %. A continuación, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajo el intestino grueso, el cual se lavó con una cánula insertada en el ciego y se trató con N-acetilcisteína, para eliminar el exceso de moco. El intestino grueso se pesó y se eluyó el colorante mediante dimetilformamida al 99%. La permeabilidad epitelial se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 610/660 nm y tomando en cuenta el peso del tejido, para expresarlo como daño por gramo de tejido.

7.28 Tinción con hematoxilina y eosina

Muestras de colon de ratón después de ser incubadas con los diferentes tratamientos fueron fijadas con formalina al 10% y embebidas en parafina, entonces, secciones de 4-6 μ m fueron teñidas con hematoxilina-eosina (Shibayama *et al.*, 1998). Las muestras se analizaron usando un microscopio de luz (Axiolab, Zeiss).

7.29 Construcción de plásmidos para silenciamiento

Se amplificaron los primeros 400 o 420 pares de bases de las secuencias, a partir de mRNA, correspondientes (*Ehnpc1* y *Ehnpc2a*) usando los oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Estos fragmentos fueron clonados dentro del vector psAP-2 río abajo de la región 5' del gen *ap-a* (473 bp) (Bracha *et al.*, 2003).

7.30 Transfección de trofozoítos

Trofozoítos de la clona G3 (8×10^5) fueron cultivados en placas de seis pozos y posteriormente se les adicionaron 20 μg del plásmido correspondiente: psAP-2-*Ehnpc1* (1-400 pb) o psAP-2-*Ehnpc2a* (1-420 pb), usando el reactivo Superfect (Quiagen). Los parásitos transfectados fueron incubados durante 48 h a 37°C, y posteriormente fueron seleccionados con 4 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 (Sigma-Aldrich). El cultivo se mantuvo estable, y el silenciamiento se corroboró por análisis de PCR en tiempo real, Western blot e inmunofluorescencia.

7.31 Ensayo de migración

Trofozoítos (7.5×10^4) transfectados con los plásmidos psAP-2-*Ehnpc1* o psAP-2-*Ehnpc2a*, fueron puestos en ayuno en medio TYI incompleto, sin suero, durante 3 h y posteriormente colocados en la parte superior de un transwell (poro de 5 μm de diámetro, Costar); en la parte inferior del transwell se colocaron 500 μl de SBA. Entonces los trofozoítos se incubaron durante 3 h a 37°C, al final de la incubación, los insertos fueron removidos para colectar los trofozoítos que migraron a la parte inferior del transwell y realizar la correspondiente cuantificación del número de trofozoítos que migraron con relación a los que colocamos en la parte superior del transwell. Los trofozoítos se cuantificaron en una cámara de Neubauer.

7.32 Análisis estadístico

Los datos se graficaron empleando el programa GraphPad Prism V 5.01 y los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno al menos por duplicado. El análisis estadístico se realizó en el mismo programa, empleando las pruebas Anova o “t” student, donde la significancia fue de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

7.33 Manejo ético de los animales

El comité institucional de ética acerca del uso y cuidado de los animales, revisó y aprobó el protocolo del uso y cuidado de los animales: dentro de los que se incluyen ratones, conejos y ratas para producir anticuerpos y ratones de la cepa C57BL6 utilizados en experimentos de virulencia *in vivo* (Número de protocolo 0313-06), establecidos en el documento CICUAL 001, en el cual se especifica que nuestra institución cumple la NOM-062-ZOO-1999 que se ocupa de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, dadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la cual verifica el cumplimiento de los lineamientos/regulación internacional para el uso y cuidado de los animales usados en el laboratorio y ha verificado y aprobado el cuidado de los animales en CINVESTAV (Número de verificación aprobado: BOO.02.03.02.01.908).

8. RESULTADOS

8.1 *E. histolytica* posee un gen *npc1* (*ehnpc1*) y dos genes *npc2* (*ehnpc2a* y *ehnpc2b*) y las proteínas que codifican se unen a colesterol (*in silico*)

Para realizar un análisis más profundo acerca de las características de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2, se realizó la búsqueda de sus secuencias en la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>), encontrando la presencia de una secuencia de 1339 aminoácidos para EhNPC1 (número de acceso EHI_080220) con 19.7 a 35% identidad con otras proteínas NPC1 de diferentes organismos (Tabla 3). La proteína putativa EhNPC1 mostró un dominio Patched (PD) y un dominio SSD (Figura 15A), que participan en la detección de esteroides y que están presentes en todas las proteínas NPC1 reportadas (Ioannou, 2000). Sin embargo, la secuencia EhNPC1 no mostró el dominio MMPL (Figura 15A), descrito primeramente en bacterias como un dominio de proteínas integrales de membrana, y que está presente en proteínas NPC1 de organismos superiores (Lander *et al.*, 2001) (Figura 15). También se obtuvieron las secuencias proteicas de EhNPC2a (EHI_068260) y EhNPC2b (EHI_188770) con una longitud de 141 y 146 aminoácidos, respectivamente. Ambas proteínas presentan 29.4% de identidad entre ellas, y al compararlas con otros organismos su identidad fue de 11% hasta 26% (Tabla 4). Ambas proteínas contienen un dominio MLD, el cual es un dominio que caracteriza a las proteínas NPC2 (Inohara *et al.*, 2002) (Figura 15A) y que pertenece a la familia involucrada en el reconocimiento de esteroides, lo cual refuerza el papel de las proteínas de ameba *E. histolytica* en el transporte y/o tráfico de colesterol.

Tabla 4. Análisis de las secuencias ortólogas de NPC1 en diferentes organismos

Organismo	Nombre	Número de acceso (KEGG)	Identidad (%)	Valor E
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCR1p	YPL006W	27.8	5e-98
<i>Candida albicans</i>	NCR1	CaO19.7242	26.9	3e-116
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NCR1	AFUA_6G09980	28.8	7e-141
<i>Dictyostelium discoideum</i>	NPC	DDB_G0269158	34.5	0.0
<i>Homo sapiens</i>	NPC1	4864	31.7	2e-150
<i>Homo sapiens</i>	NPC1-like 1	29881	28.9	6e-121
<i>Drosophila melanogaster</i>	NPC1a	Dmel_CG5722	30.7	2e-157
<i>Aedes aegypti</i>	NPC1	AaeL_AAEL003325	35.0	9e-136
<i>Bos taurus</i>	NPC1	286772	31.8	2e-150
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NCR1	CELE_F02E8.6	24.2	5e-75
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Proteína de la familia del eflujo de cationes	TVAG_237080	30.1	4e-05
<i>Toxoplasma gondii</i>	Proteína de la familia con el dominio Patched	TGME49_085470	20.1	7e-22
<i>Leishmania major</i>	Proteína hipotética	LMJF_28_0340	19.7	4.5

Tabla 5. Análisis de las secuencias ortólogas de NPC2 en diferentes organismos

Organismo	Nombre	Número de acceso (KEGG)	Identidad (%)		Valor E	
			2a	2b	2a	2b
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhNPC2a	EHI_068260	100	29.41	0	1.3e-15
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhNPC2b	EHI_188770	29.41	100	1.3e-15	0
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Proteína hipotética	DDB_G0270454	25.98	24	4.1e-09	8.8e-10
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética	CELE_F30H5.3	18.55	17.83	4.4e-05	1.1e-05
	Npc2a	Dmel_CG7291	13.45	11.20	0.0016	0.00075
<i>Drosophila melanogaster</i>	Npc2b	Dmel_CG3153	18.80	14.07	0.063	0.0055
	Npc2d	Dmel_CG12813	19.70	17.27	0.05	0.014
	Npc2e	Dmel_CG31410	14.17	14.07	0.05	0.00013
<i>Homo sapiens</i>	Npc2	hsa:10577	14.63	18.46	0.0091	5.2e-05
<i>Bos taurus</i>	Npc2	bta:280815	15.45	16.92	0.0018	0.00088
<i>Aedes aegypti</i>	Npc2	AaeL_AAEL006854	13.49	17.56	0.0027	0.14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Npc2p	YDL046W	25.93	21.58	1.5e-07	6.9e-06
<i>Candida albicans</i>	Similar a Npc2p	CaO19.10736	24.09	20.42	1.2e-08	2e-08

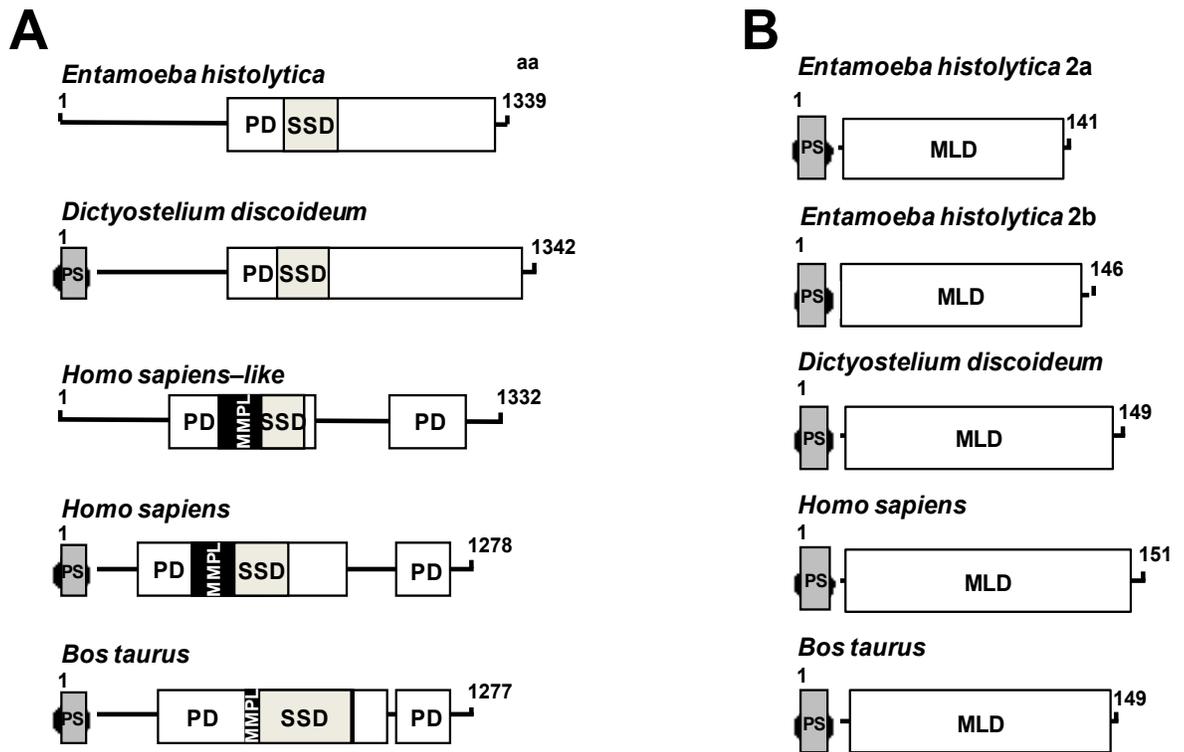


Figura 15. Análisis de la estructura secundaria de NPC. A) Longitud de las proteínas y dominios característicos de NPC1 en distintos organismos. PD: dominio Patched, SSD: dominio de detección de esteroides, MMPL: dominio hipotético integral de membrana, PS: péptido señal. B) Longitud de las proteínas y dominios característicos de NPC2 en distintos organismos. MLD: dominio de reconocimiento de lípidos relacionado a MD-2. Los números a la derecha corresponden a los aminoácidos que conforman a las proteínas.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b se compararon con secuencias de proteínas de NPCs de diferentes organismos obtenidas de la base de datos KEGG para construir sus respectivos arboles filogenéticos, usando el software MEGA 5.05. La proteína de ameba EhNPC1 se agrupó en el mismo clado que la NPC1 de *D. discoideum* y se encontró lejana a las proteínas NPC1s de otros protozoos como *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania major* (Figura 16). De manera interesante, EhNPC2a y EhNPC2b también muestran una cercana relación evolutiva con la proteína NPC2 de *D. discoideum* (Figura 16B), además comparte un ancestro común con la proteína NPC2 de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, a diferencia de las proteínas de eucariontes superiores que parecen más evolucionadas (Figura 16B).

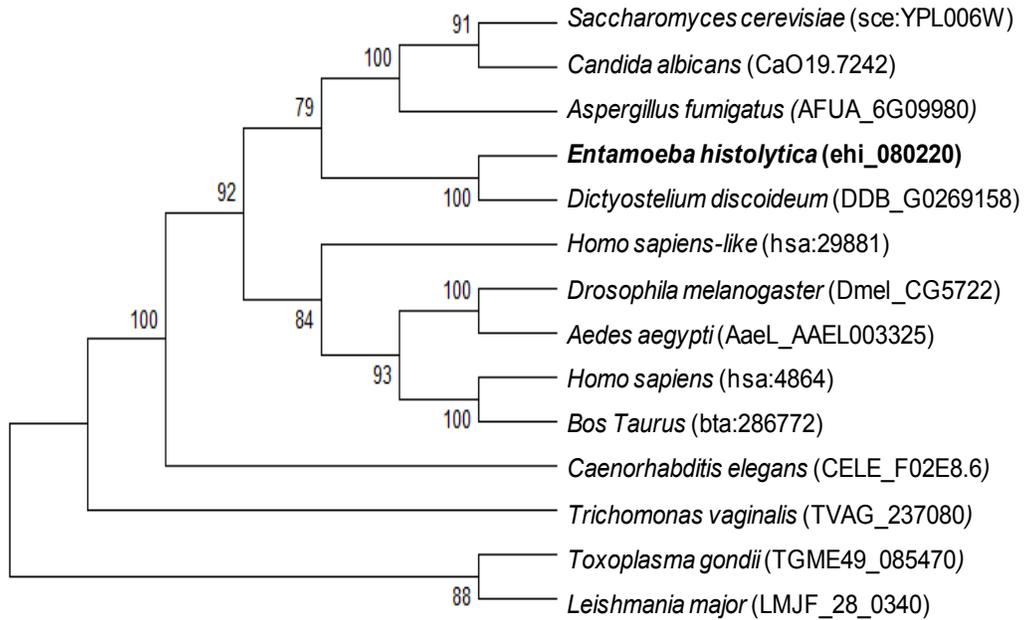
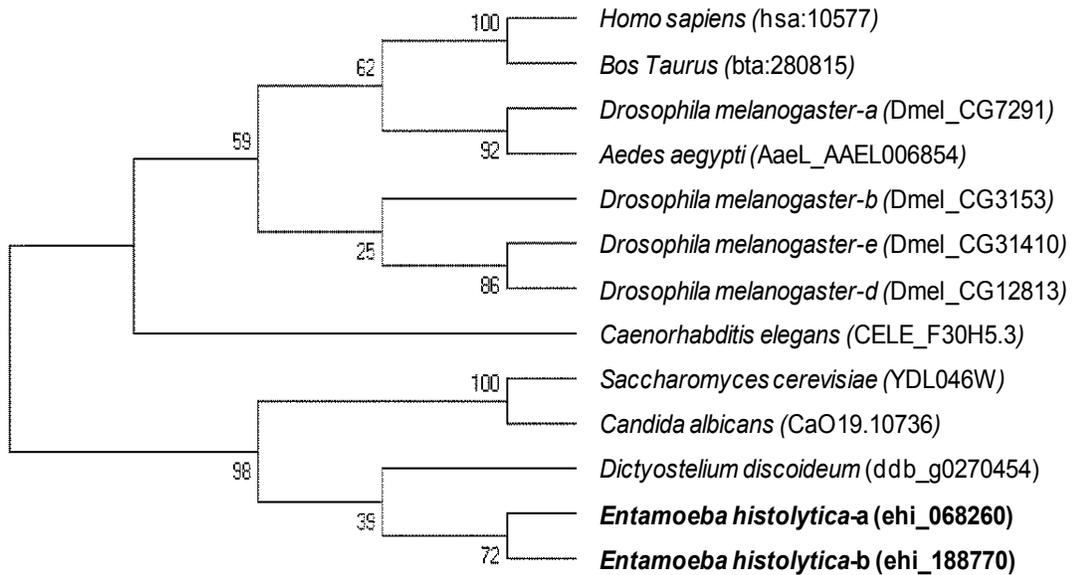
A**B**

Figura 16. Filogenia de NPC1 y NPC2. Árboles filogenéticos donde se indica la posición de las proteínas EhNPC1 (A), EhNPC2a y EhNPC2b (B) de *E. histolytica* (en negritas) entre diferentes especies. Los números sobre las líneas horizontales indican el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices re-muestreadas (bootstraps).

Para obtener mayor evidencia de la relación estructural entre EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b con sus respectivos ortólogos, construimos sus modelos tridimensionales usando el servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>). A partir de la estructura cristalizada del dominio amino terminal (NTD; residuos 23 al 252) de la proteína NPC1 de humano (Kwon *et al.*, 2009), se realizó el modelaje 3D del NTD (residuos 1 al 248) de la proteína EhNPC1 (Figura 17A). La comparación de ambas estructuras mostró una identidad del 92% (Figura 17A). La estructura 3D de las proteínas EhNPC2a y EhNPC2b presentó una identidad del 83.2% entre ellas y un 88.6 y 86% con la proteína cristalizada NPC2 de *Bos taurus* (Xu *et al.*, 2007), respectivamente. Las proteínas EhNPC2 mostraron siete hojas beta como se ha descrito para otras proteínas NPC2 (Xu *et al.*, 2007), y estructuralmente presentaron una conformación en forma de saco o bolsa, lo que podría facilitar su interacción con la molécula de colesterol. De manera interesante, EhNPC2a y EhNPC2b exhibieron una región en el amino terminal formada por 14 y 18 aminoácidos, respectivamente, que se encuentra presente en otras NPC2 y que les permite "viajar" por las distintas vacuolas y membranas, sugiriendo que las EhNPC2s podrían utilizar esta región para transitar por los endosomas o vacuolas, tan abundantes en el trofozoíto (Figura 17B y C).

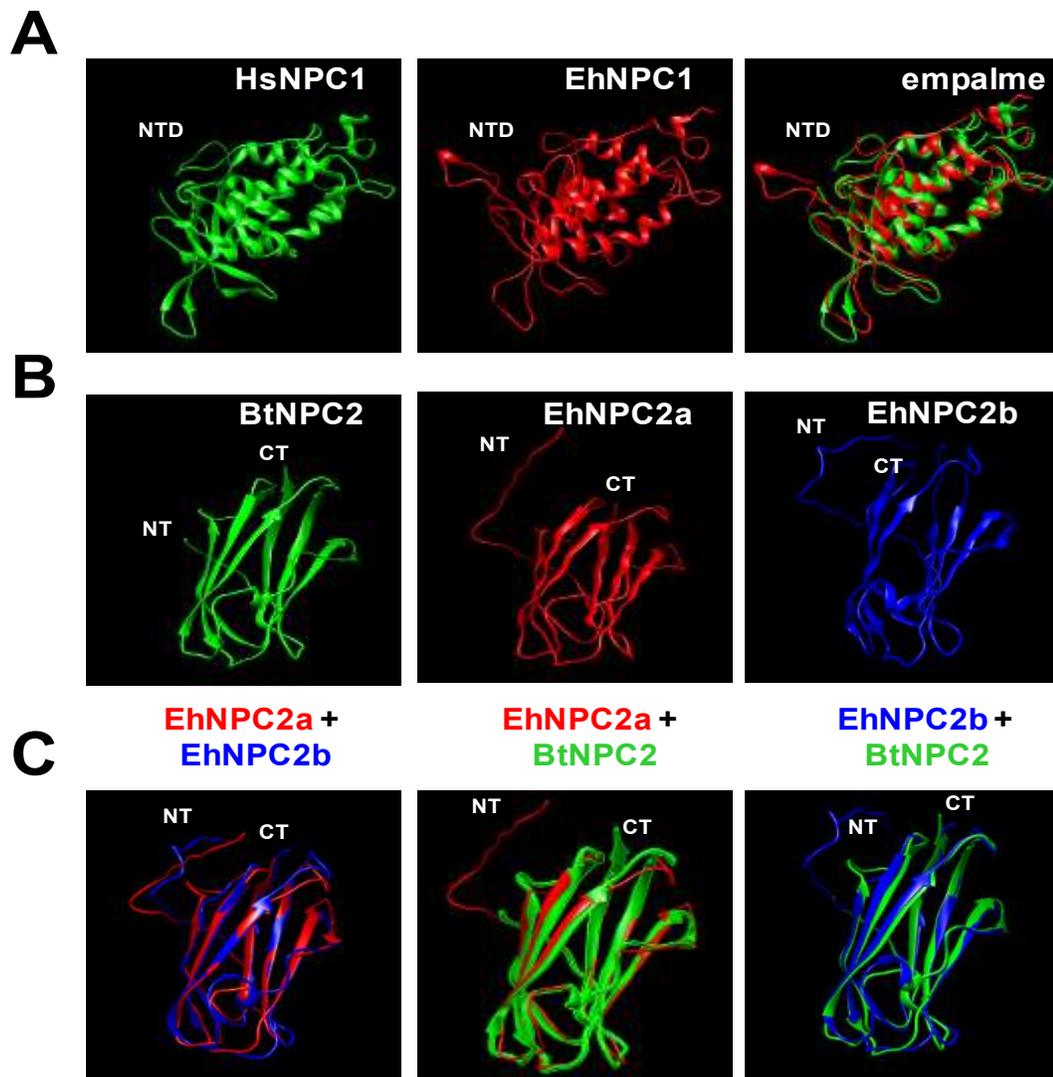


Figura 17. Modelaje estructural de las proteínas EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b. A) Modelo de la región NTD de EhNPC1 realizado en el servidor RaptorX, comparado con el cristal del NTD-NPC1 de humano (HsNPC1). B) Estructura tridimensional de EhNPC2a y EhNPC2b (secuencia de aminoácidos completa) comparada con el cristal de NPC2 de *B. taurus* (BtNPC2). NT: amino terminal. CT: carboxilo terminal.

El modelaje completo de la proteína EhNPC1 predijo que se trataba de una proteína transmembranal, con dos regiones estructurales posicionadas en el lumen endosomal (donde se localiza el NTD) y un dominio en la parte citosólica (Figura 18). Además, al realizar un acoplamiento molecular usando el colesterol como ligando, en EhNPC1 se predijeron dos sitios de unión con este esteroide. De acuerdo con el análisis *in silico*, un sitio de interacción se posiciona en el citosol y otro en la región NTD, en el lumen endosomal. Los resultados evidenciaron 13 interacciones hidrofóbicas de colesterol con EhNPC1 en la región citoplásmica (Thr 670, Asp 673, Val 671, Val 677, Leu 721, Val 724, Phe 725, Ala 728, Ala 738, Thr 743, Ile 746, Pro 747 and Tyr 823) y 11 interacciones en el dominio NTD (Val 39, Gly 41, Glu 100, Gln 101, Leu 104, Met 198, Asn 203, Pro 204, Val 205, Met 206 and Pro 207) (Figura 18). Las energías de unión que presentaron los acoplamientos fueron de $\Delta G = -8.6$ y $\Delta G = -7.3$ Kcal/mol, respectivamente, lo que sugiere una unión débil entre las proteínas y el colesterol.

La base de datos OPM (del inglés “Orientation of Proteins in Membranes”) predijo que en EhNPC2a, los aminoácidos Leu11, Phe12, Ala13 y Ala14 le permiten el anclaje a la membrana (Figura 18); mientras que en EhNPC2b los residuos en contacto con la membrana son Thr19, Ala18, Leu17, Met16, Leu12 y Phe6 (Figura 18); lo cual sugiere que ambas EhNPC2 podrían eventualmente ser proteínas periféricas de membrana.

Por otra parte, el acoplamiento molecular predijo que las proteínas EhNPC2 forman un surco donde interactúan con el colesterol, ubicado en la región de la proteína que se orienta hacia el lumen endosomal (Figura 18), similar a lo descrito para otras NPC2 en mamíferos (Xu *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2016). La interacción de la proteína EhNPC2a con el colesterol se predijo mediante uniones hidrofóbicas con los aminoácidos Pro67, Leu69, **Met71**, Thr78, **Val80**, Pro81, Leu82, Met107, Ile109, Pro110, Met112, Ser113 y **Phe122** (Figura 18). Mientras que EhNPC2b se une al colesterol mediante los residuos Leu40, Pro41, Trp42, Ser50, Ile52, **Met73**, **Val82**, Thr115, Gly123, **Phe125**, Phe140 y Pro142 (Figura 18). Los aminoácidos en negritas muestran

posiciones semejantes y separadas por el mismo número de aminoácidos en ambas proteínas. Las energías de unión entre las proteínas EhNPC2a y EhNPC2b con el colesterol, al igual que la EhNPC1 con el colesterol, son también bajas ($\Delta G = -9$ y -10.15 Kcal/mol, respectivamente).

El transporte intracelular de colesterol en organismos superiores sugiere que la proteína NPC2 le pasa el colesterol a la NPC1, desde el lumen vesicular hacia la membrana de la vesícula (Xu *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2010), por lo que a través de análisis bioinformáticos evaluamos si EhNPC2 podría interactuar con EhNPC1. Los resultados mostraron que EhNPC1 presentó dos posibles sitios de interacción con EhNPC2a, uno en el dominio NTD que se orienta hacia el lumen endosomal y otra región orientada hacia el citosol, cercana al dominio SSD/Patched (Figura 19); con una energía de unión de $\Delta G = -228.5$ y -55.02 Kcal/mol, respectivamente. A diferencia de las energías de unión observadas entre las proteínas y el colesterol, los valores de ΔG entre ambas proteínas sugieren una fuerte unión entre ellas

En conjunto, los análisis bioinformáticos revelaron que EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b son ortólogos de las proteínas NPC1 y NPC2, respectivamente, y que las tres proteínas interactúan con el colesterol y entre ellas, sugiriendo que podrían estar involucradas en el transporte de colesterol, como se ha descrito en otros eucariontes (Wang *et al.*, 2010), además la energía de unión indica que la transferencia de colesterol podría llevarse a cabo de manera rápida, mientras que la asociación proteína-proteína les permite una asociación más estable mientras ocurre el proceso.

Acoplamiento con colesterol

Sitios de interacción

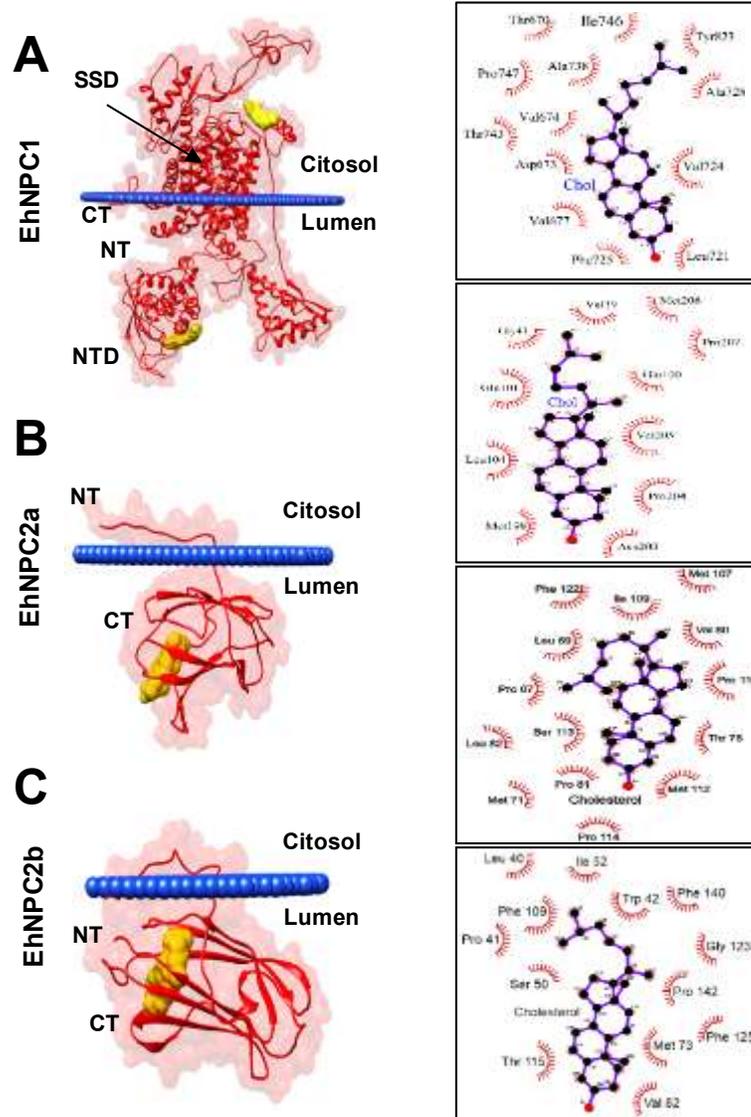


Figura 18. Ubicación de las proteínas EhNPC's en la membrana y su interacción con colesterol. Acoplamiento molecular de EhNPC1 (A), EhNPC2a (B) y EhNPC2b (C) con colesterol, realizado en el programa AutoDock Tools V1.5.6. Las líneas de color azul representan la membrana. Los cuadros del lado derecho muestran los aminoácidos involucrados en la interacción proteína-colesterol.

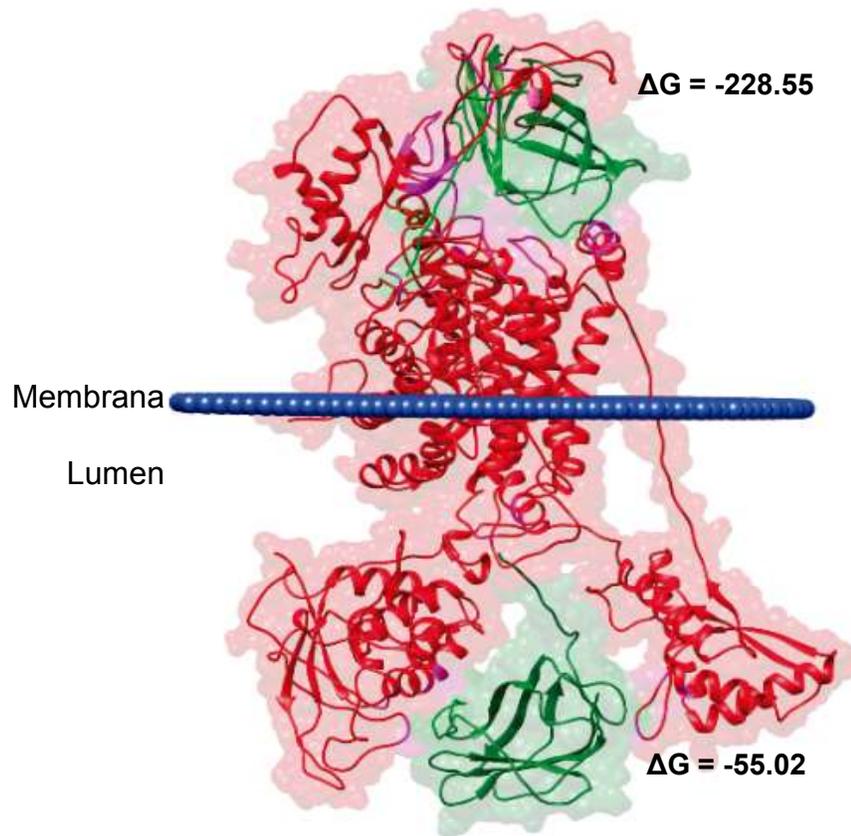


Figura 19. Interacción entre EhNPC1 y EhNPC2a. A) Modelaje molecular donde se representa la unión de EhNPC1 (rojo) con EhNPC2a (verde). ΔG : energía de unión.

8.2 Los genes *Ehnpc1*, *Ehnpc2a* y *Ehnpc2b* se transcriben en los trofozoítos

Para corroborar que los genes encontrados *in silico* estaban presentes en el parásito *E. histolytica*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1) para cada gen, usando sus secuencias obtenidas de la base de datos AmoebaDB. A partir de DNA genómico, se amplificaron los genes completos mediante ensayos de PCR, obteniendo fragmentos de 4.0, 0.42 y 0.44 kpb que corresponden a los tamaños esperados para los genes *Ehnpc1*, *Ehnpc2a* y *Ehnpc2b*, respectivamente (Figura 20A). La secuenciación de los tres genes reveló que poseen un marco de lectura abierto, no poseen intrones y muestran una identidad del 100% con los genes que se encuentran en la base de datos AmoebaDB.

Además, empleando RNAm de trofozoítos, se amplificaron fragmentos del tamaño esperado de los genes de interés mediante RT-PCR, indicando que estos genes se transcriben (Figura 20B). Se realizó también la amplificación de los genes mediante RT-qPCR en condiciones basales, es decir, de trofozoítos cultivados en medio suplementado con suero (TYI-S), donde se observó que *ehnpc2a* se expresó al menos 30 veces más que *ehnpc1*; por otra parte, encontramos que *ehnpc2b* presentó una expresión mínima con relación a los genes *ehnpc1* y *ehnpc2a* (Figura 20C).

Estos resultados indican que *E. histolytica* presenta en su genoma un gen *ehnpc1* y dos *ehnpc2s*, los cuales se transcriben de manera diferencial en condiciones basales.

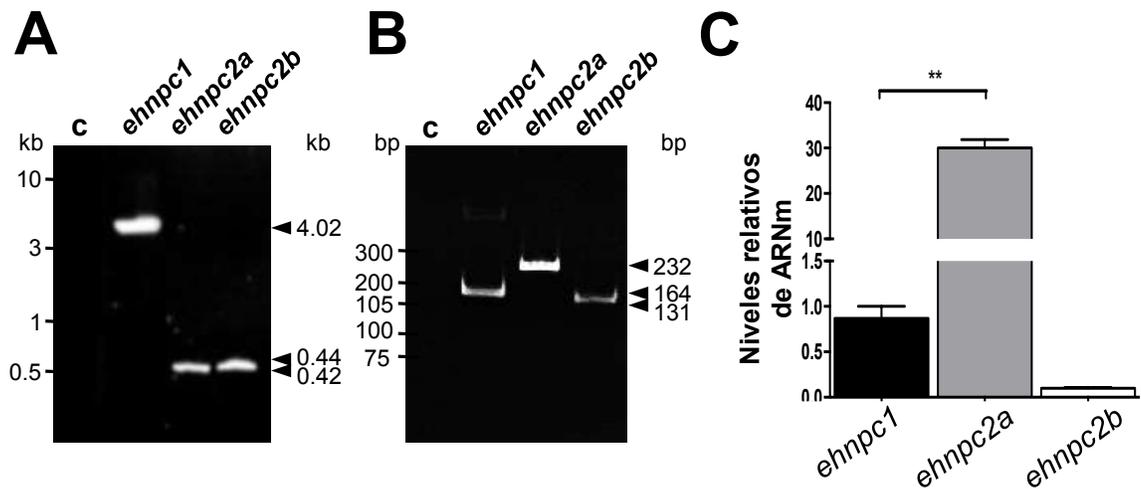


Figura 20. Identificación de genes y transcritos de *ehnpc1*, *ehnpc2a* y *ehnpc2b* en trofozoítos. A) Los genes completos *Ehnpc1*, *Ehnpc2a* y *Ehnpc2b* fueron amplificados usando oligonucleotidos específicos y DNA genómico. B) Amplificación de fragmentos mediante RT-PCR usando oligonucleotidos específicos y DNAc. c: Controles sin DNAg o con RNAm tratado con DNasa como molde. C) Niveles relativos de expresión de los genes medidos mediante RT-qPCR en trofozoítos en condiciones basales, usando como control interno el gen *s2*. *** $p < 0.001$.

8.3 Las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 se expresan en los trofozoítos

Con la finalidad de estudiar la presencia de las proteínas EhNPC1, EhNPC2a y EhNPC2b en los trofozoítos de *E. histolytica*, en primer lugar se produjeron anticuerpos específicos para cada una. Para la proteína EhNPC1, se diseñó un péptido específico (766-DEQPMYDKDGQYVPVEKRLE-785), el cual se empleó para inmunizar conejos y obtener los anticuerpos α -EhNPC1.

En el caso de las proteínas EhNPC2s, se produjeron proteínas recombinantes para generar los anticuerpos específicos para cada una. Para ello se inició con la amplificación de los genes completos *Ehnpc2a* y *Ehnpc2b* usando oligonucleótidos específicos (Tabla 1), los cuales contenían en los extremos 5' y 3' las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall*, respectivamente. Los genes completos se clonaron en el plásmido *pJET 1.2/blunt*, y las construcciones generadas *pJET-ehnpc2a* y *pJET-ehnpc2b* se digirieron con las enzimas *BamHI* y *Sall*, observando la liberación de los fragmentos correspondientes al tamaño de los genes *ehnpc2a* y *ehnpc2b* (426 y 441 pb, respectivamente) (Figura 21A). Posteriormente, los fragmentos liberados fueron purificados para su posterior subclonación en el plásmido *pGEX-6P-1*. Las construcciones generadas *pGEX-ehnpc2a* y *pGEX-ehnpc2b* se transformaron en bacterias DH5 α y los plásmidos se purificaron y se digirieron con las enzimas *BamHI* y *Sall* para corroborar la presencia de los insertos. Como se esperaba, las construcciones liberaron los insertos de 426 y 441 pb, respectivamente (Figura 21B). Además, estas construcciones fueron secuenciadas, obteniendo una identidad del 100% para los genes *ehnpc2a* y *ehnpc2b*, comparada con la secuencia génica reportada en la base de datos AmoebaDB (datos no mostrados) e indicando que los genes se encontraban en el correcto marco abierto de lectura. Parte del electroferograma, correspondiente a la secuenciación de cada uno de los genes (*Ehnpc2a* y *Ehnpc2b*), se muestra en la figura 21C.

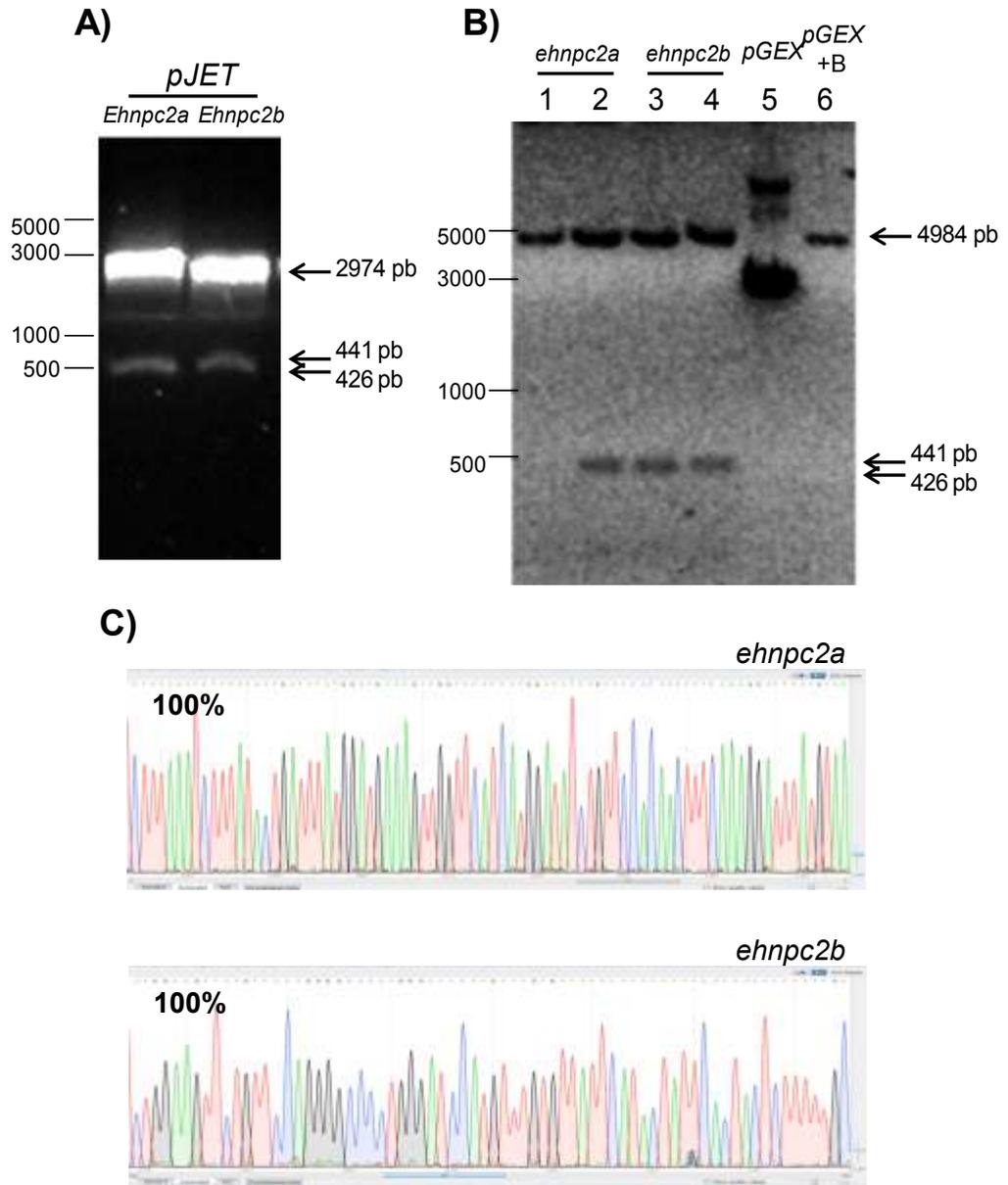


Figura 21. Clonación y secuenciación de los genes *ehnpc2a* y *ehnpc2b*. A) Digestión de los plásmidos *pJET/Blunt* que contenían clonados los genes *ehnpc2a* (426 pb) y *ehnpc2b* (441 pb). B) Digestión de los plásmidos *pGEX-6P-1* que contenían subclonados los genes *ehnpc2a* (426 pb) y *ehnpc2b* (441 pb). C) Sección de los electroferogramas correspondientes a la secuenciación de las construcciones *pGEX-ehnpc2a* y *pGEX-ehnpc2b* que muestra la detección de las primeras 70 bases (el inicio del ORF).

Enseguida, los plásmidos obtenidos se transformaron en bacterias BL21 pLysS, donde se indujo con IPTG por 3 horas, la expresión de las proteínas recombinantes GST-rEhNPC2a y GST-rEhNPC2b. La inducción de ambas proteínas se comprobó mediante ensayos de WB, utilizando anticuerpos contra la etiqueta de GST (Figura 22A). En estos lisados bacterianos se detectó la expresión de dos proteínas con un peso de 41 y 42 kDa, correspondientes a EhNPC2a (15 kDa) y EhNPC2b (16 kDa) más la etiqueta de GST (26 kDa). Al analizar la solubilidad de las proteínas recombinantes, se observó que ambas proteínas permanecieron en la fracción insoluble o cuerpos de inclusión (Figura 22B); por lo cual, para su purificación se sometieron a un proceso de electroelución a partir de geles preparativos donde se cortaron las bandas correspondientes al peso molecular de cada proteína recombinante. Las proteínas contenidas en los geles se purificaron en una columna PD10 para eliminar las sales e impurezas y posteriormente, se usaron como antígenos para inmunizar ratas (rEhNPC2a) y ratones (rEhNPC2b).

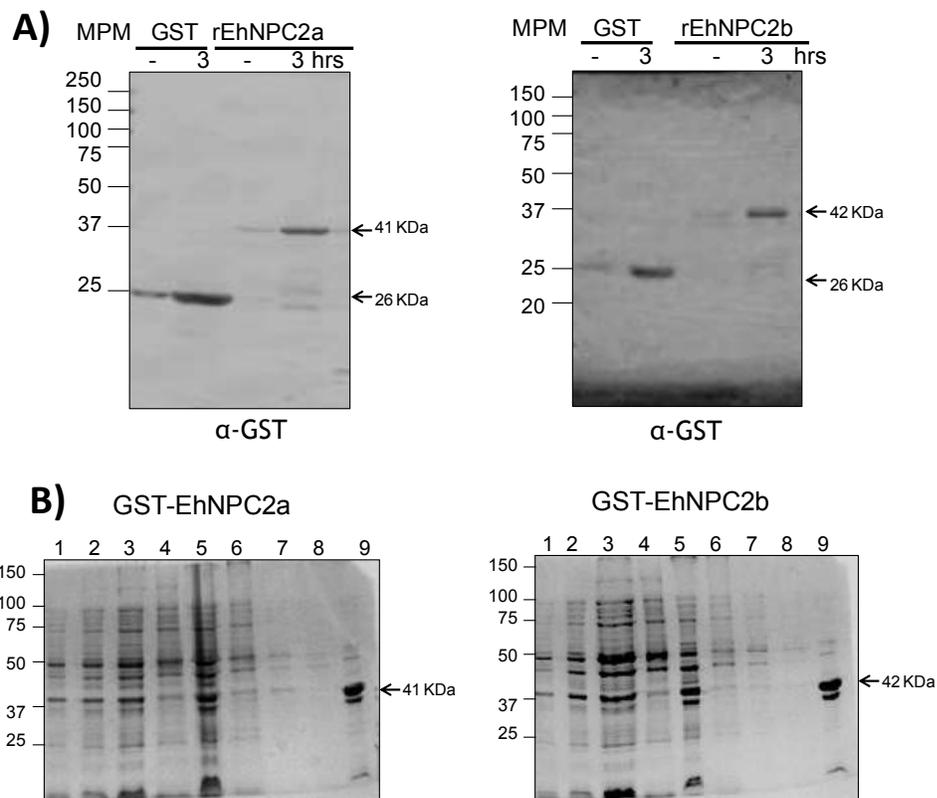


Figura 22. Generación de las proteínas recombinantes GST-rEhNPC2a y GST-rEhNPC2b. A) Bacterias transformadas con las construcciones *pGEX*, *pGEX-ehnpc2a* y *pGEX-ehnpc2b* se indujeron con IPTG 0.1M por 3 h y se lisaron para su análisis por WB empleando el anticuerpo α -GST. B) Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes GST-EhNPC2a y GST-EhNPC2b en lisados de bacterias inducidas, mediante geles de Coomassie. Carril 1: lisado total, carril 2: fracción soluble, carril 3: fracción insoluble, carril 4: amortiguador de lisis, carril 5: amortiguador con urea 4M, carril 6: lavado1, carril 7: lavado 2, carril 8: lavado 3 y carril 9: cuerpos de inclusión (urea 8M).

Se obtuvieron anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2a, sin embargo, no se pudieron generar anticuerpos α -EhNPC2b. Con estos anticuerpos se analizó la expresión de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en lisados totales de trofozoítos de *E. histolytica* mediante ensayos de WB. Los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2a reconocieron una sola banda de 150 y 17 kDa, respectivamente, correspondiente al peso teórico reportado para cada proteína (Figura 23A y B). En ambos casos se utilizó como control negativo el suero preinmune, el cual no reconoció a ninguna proteína (Figura 23A y B). Por otra parte, se probó la especificidad del anticuerpo α -EhNPC2a en ensayos de WB, empleando las proteínas recombinantes rEhNPC2a y rEhNPC2b. Los resultados mostraron que este anticuerpo reconoció a las dos proteínas recombinantes (Figura 23C), por lo que en los subsecuentes experimentos se utilizó como un pan anticuerpo α -EhNPC2, capaz de reconocer a ambas proteínas EhNPC2 en *E. histolytica*.

Nuestros resultados indican que *E. histolytica* expresa a las proteínas EhNPC1 y EhNPC2, aunque con las herramientas con que contamos, hasta el momento no podemos saber si se expresa EhNPC2a o EhNPC2b o las dos.

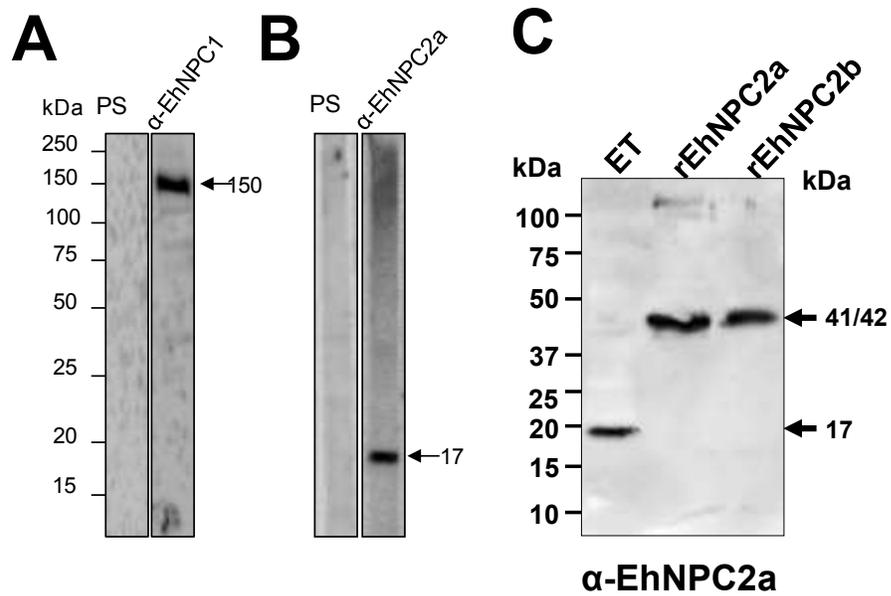


Figura 23. *E. histolytica* expresa a las proteínas EhNPC1 y EhNPC2. Extractos totales de *E. histolytica* separados por electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% y analizados por WB con los anticuerpos α -EhNPC1 (A) y α -EhNPC2a (B). PS: suero preinmune. C) Análisis mediante WB de extractos totales de *E. histolytica* (ET) y de las proteínas recombinantes GST-EhNPC2a y GST-EhNPC2b, empleando el anticuerpo α -EhNPC2a.

8.4 Localización de EhNPC1 y EhNPC2 en la membrana, en vesículas citoplásmicas y en el núcleo de los trofozoítos

Para determinar la localización subcelular de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2, se usaron los anticuerpos generados anteriormente (α -EhNPC1 y α -EhNPC2) y las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal. Las preparaciones mostraron que en condiciones basales (trofozoítos cultivados en medio TYI-S), EhNPC1 se localizó en la membrana plasmática y en el citoplasma (en forma de vesículas) del 100% de los trofozoítos analizados, en tanto que se ubicó en el núcleo del 37% de los parásitos observados (Figura 24A y C). Mientras que EhNPC2 se encontró en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo del 79, 85 y 100%, respectivamente de los trofozoítos analizados (Figura 24A y C). Para corroborar la presencia de ambas proteínas en la membrana plasmática, se analizó su co-localización con la lectina Gal/GalNAc, la cual ha sido ampliamente usada como marcador de membrana plasmática en *E. histolytica* (Petri et al., 1989). Las imágenes de microscopía confocal revelaron la co-localización de EhNPC1 y EhNPC2 con la lectina Gal/GalNAc en la membrana plasmática y el análisis del coeficiente de correlación de Pearson mostró valores de 0.3115 y 0.5221, respectivamente en la célula completa, pero un incremento de 0.3575 y 0.6553, respectivamente en la membrana (Figura 24A y D). Adicionalmente, en estos experimentos y en los subsecuentes de microscopía confocal usamos como controles negativos únicamente los anticuerpos secundarios, los cuales en ningún caso dieron reconocimiento.

Para corroborar la localización subcelular de estas proteínas, los trofozoítos en condiciones basales se analizaron por MET, usando los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2 con sus respectivos anticuerpos secundarios α -conejo o α -rata acoplados a partículas de oro coloidal de diferentes tamaños. El inmunomarcaje reveló la localización politópica de ambas proteínas (Figura 25A, C), encontrando a EhNPC1 en la membrana plasmática así como a la membrana de vesículas, incluso en la membrana

nuclear (Figura 25A, E). Por otra parte, EhNPC2 se localizó principalmente en el interior de vesículas y en la membrana de las mismas, incluso presentó una importante localización en el núcleo de los trofozoítos (Figura 25C, F); sin embargo, desconocemos cual podría ser la función de EhNPC2 en este compartimento. Realizando un análisis de doble marcaje, encontramos que la mayoría de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 están separadas y sólo en algunos casos se encuentran asociadas o cercanas (Figura 26A, B), sugiriendo una asociación similar a la descrita en el modelo de “hand-off” propuesto en otros organismos (Wang *et al.*, 2010).

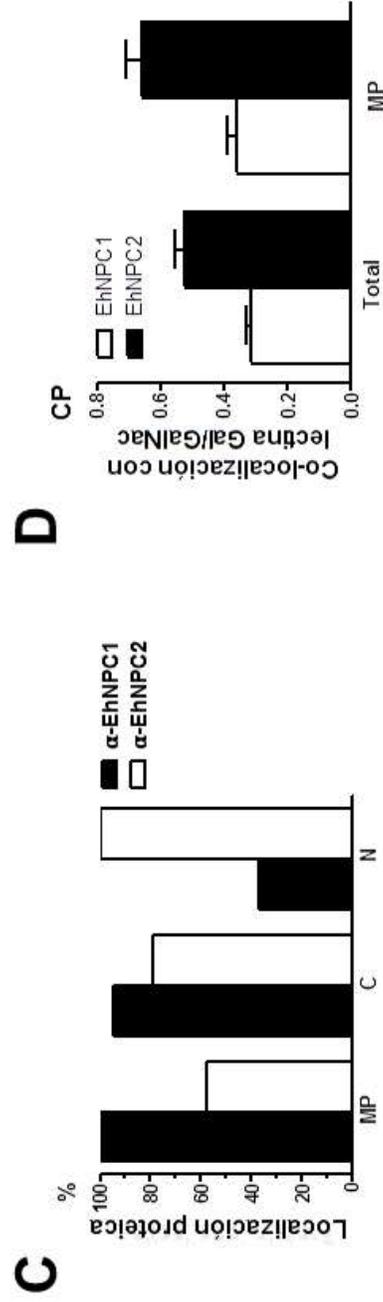
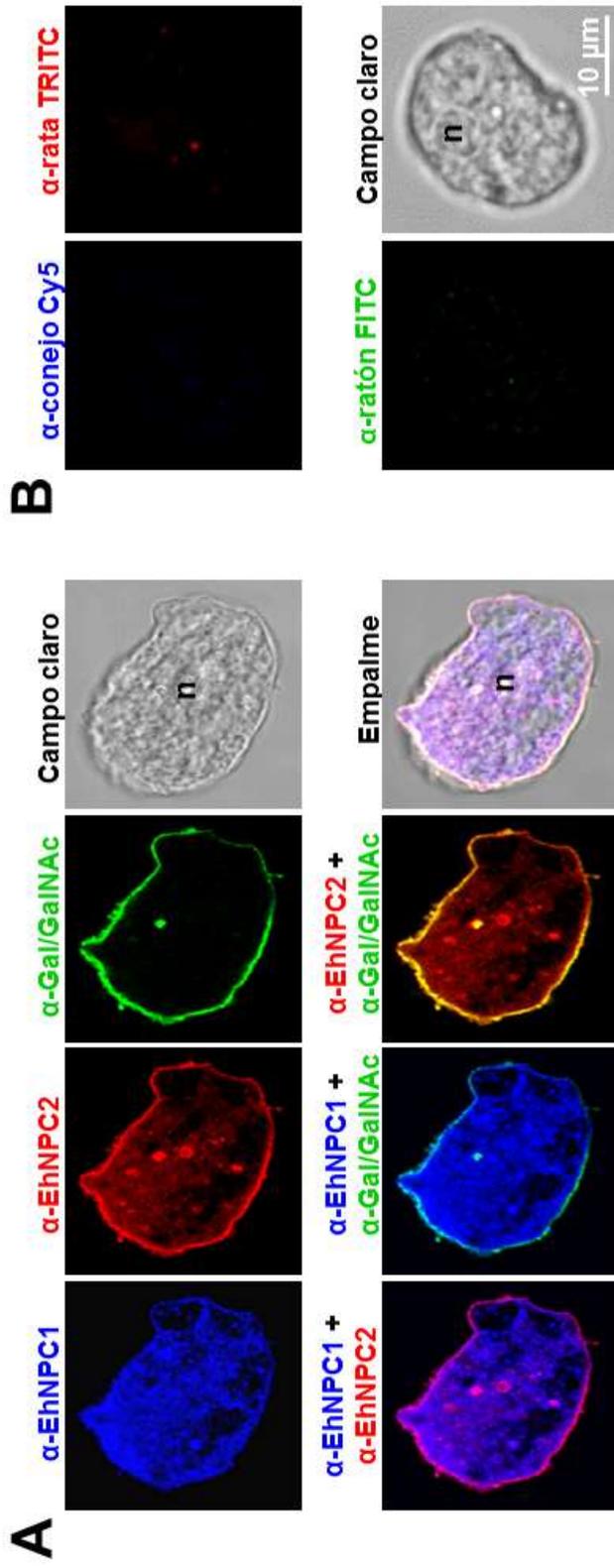


Figura 24. Localización subcelular de EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos analizados mediante microscopía confocal. Trofozoítos en condiciones basales fueron fijados sobre cubreobjetos y marcados con los anticuerpos α -lectina Gal/GalNAc, α -EhNPC1 y α -EhNPC2 para su análisis por microscopía confocal. A) Distribución subcelular de EhNPC1 y EhNPC2 y co-localización con la lectina Gal/GalNAc. B) Control negativo usando sólo el anticuerpo secundario. C) Porcentaje de trofozoítos que presentaron a EhNPC1 o EhNPC2 en la membrana plasmática, citoplasma y núcleo. D) Coeficiente de correlación de Pearson que indica la co-localización de las proteínas EhNPC1 o EhNPC2 con la lectina Gal/GalNAc en la célula completa (total) o en la membrana plasmática (MP).

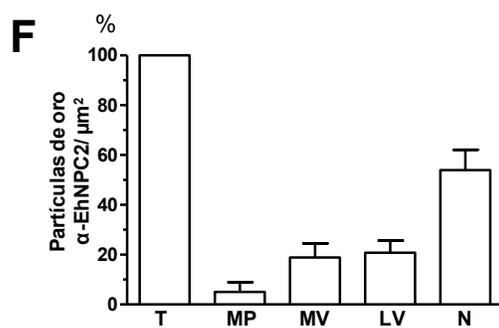
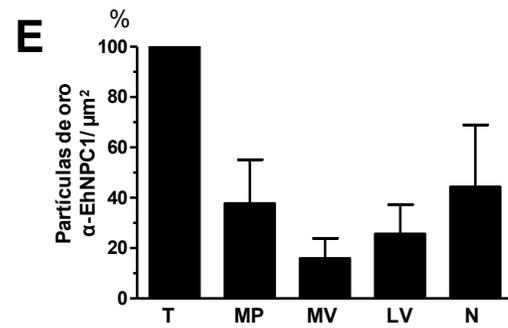
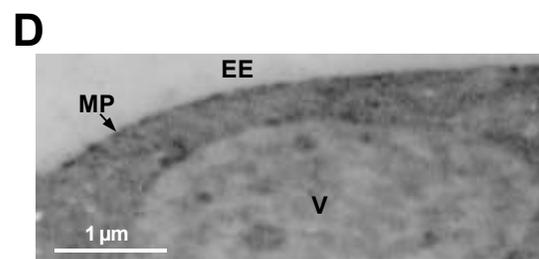
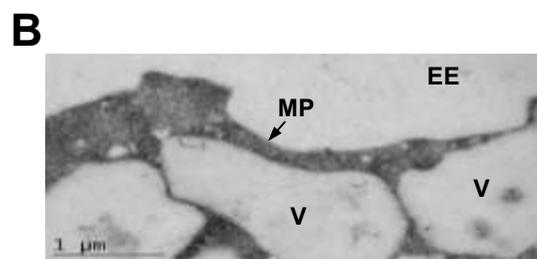
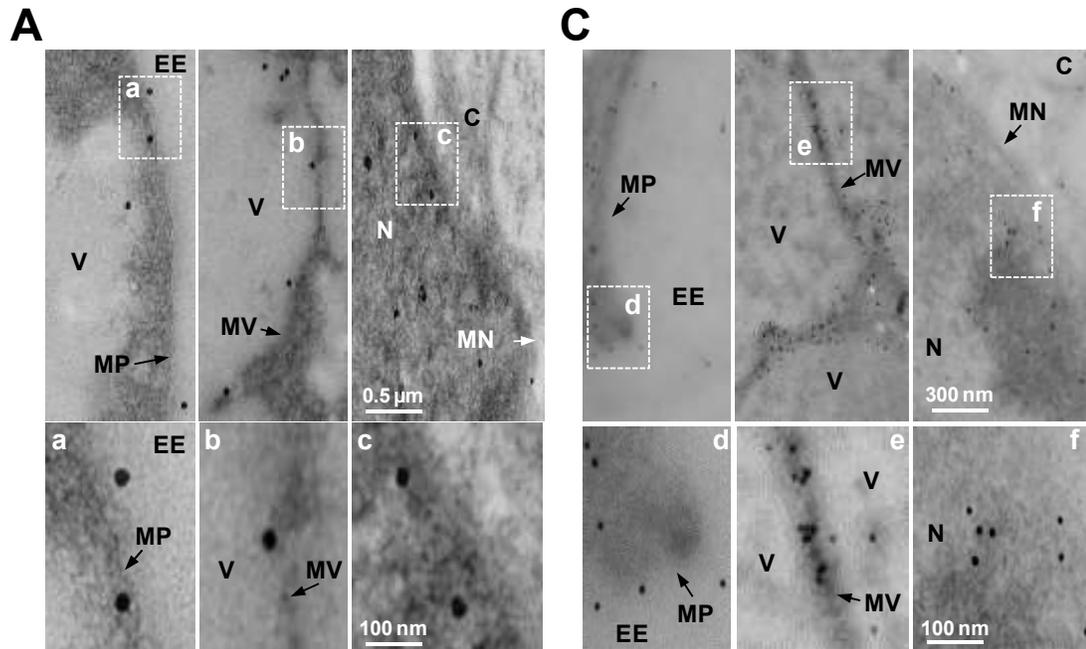


Figura 25. Localización subcelular de EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos analizados mediante MET. Trofozoítos fueron fijados con paraformaldehído y glutaraldehído y las muestras fueron procesadas por MET, empleando los anticuerpos α -EhNPC1 (A) o α -EhNPC2 (C), seguidos por la incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a oro coloidal de 20 nm o 10 nm, respectivamente. Los cuadros corresponden a las magnificaciones señaladas con letras minúsculas. Controles negativos donde únicamente se emplearon los anticuerpos secundarios α -conejo (B) o α -rata (D). E) y F) Cuantificación de las partículas de oro en un área de 10 μm^2 en al menos 15 imágenes. MP: membrana plasmática, V: vesícula, MV: membrana de la vesícula, LV: lumen vesicular, EE: espacio extracelular, MN: membrana nuclear, N: núcleo, T: total.

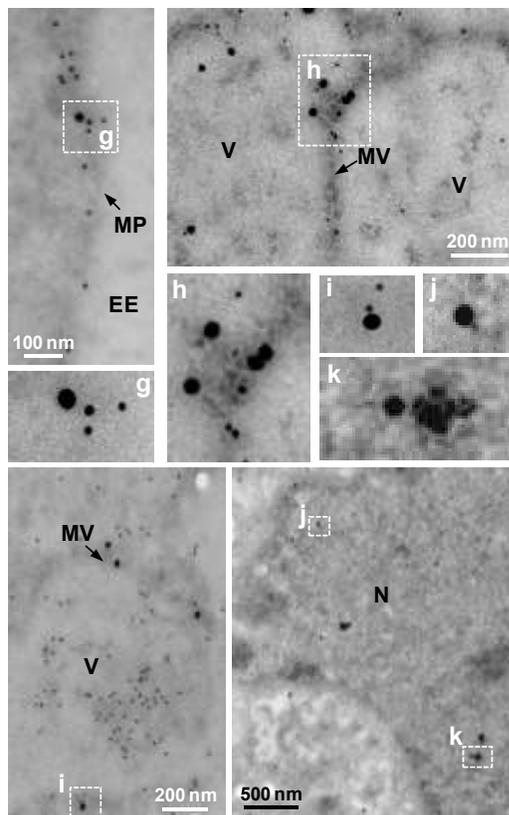
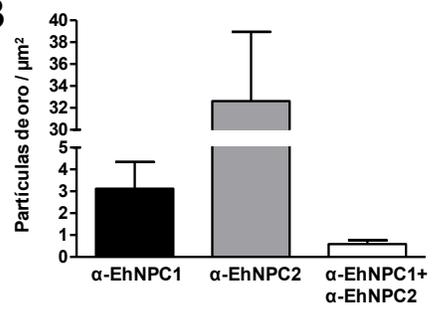
A**B**

Figura 26. Co-localización de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos analizados mediante MET. A) Trofozoítos en condiciones basales fueron fijados con paraformaldehído y glutaraldehído y las muestras fueron procesadas para MET, empleando los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2, seguidos por la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a oro coloidal de 20 nm y 10 nm, respectivamente. Los cuadros corresponden a las magnificaciones señaladas con letras minúsculas. B) Cuantificación de las partículas de oro en un área de $10 \mu\text{m}^2$ en al menos 15 imágenes. MP: membrana plasmática, V: vesícula, MV: membrana de la vesícula, EE: espacio extracelular, MN: membrana nuclear, N: núcleo.

Estos hallazgos demuestran que EhNPC1 y EhNPC2 presentan una localización celular politópica, principalmente unidas a la membrana plasmática y de los endosomas/vesículas, sugiriendo que ambas son proteínas móviles, lo cual concuerda con su posible función como transportadores de colesterol.

8.5 EhNPC1 and EhNPC2 co-localizan con colesterol, después del estímulo con SBA

Para explorar la participación de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en el tráfico de colesterol, los trofozoítos se ayunaron de suero por 12 h y posteriormente se incubaron por diferentes tiempos con SBA, como fuente de colesterol. Después del ayuno, las imágenes de microscopía confocal mostraron que ambas proteínas aparecieron pobremente en la membrana plasmática de los trofozoítos y en pequeñas vesículas en el citoplasma; mientras que el colesterol fue teñido débilmente por la filipina (fármaco que se une a colesterol). A pesar del ayuno de suero, el remanente de la tinción de filipina observada quizá se deba a que otros componentes del medio TYI contienen colesterol (Figura 27, 0 min). Inmediatamente después del pulso con SBA (0.5 min), el colesterol pareció acumularse en el núcleo, junto con EhNPC1 y EhNPC2; sin embargo, el papel de estas proteínas y el colesterol en el núcleo aún es desconocido. En este corto tiempo, EhNPC1 y EhNPC2 co-localizaron en vesículas citoplásmicas con un patrón punteado y uniforme alrededor de la membrana plasmática. EhNPC2 se localizó principalmente hacia el espacio extracelular y en algunos casos EhNPC1 se observó en la parte externa de la membrana plasmática (Figura 27, a-d). Las áreas de color amarillo en el interior de las vesículas indicaron que ambas proteínas también co-localizan (Figura 27a-d), sugiriendo la posible fusión de vesículas ya que en la mayoría de los casos, no se observó membrana limitante entre las vesículas teñidas con verde, amarillo y rojo. Además, aún cuando EhNPC1 y EhNPC2 aparecen cercanas, en la mayoría de los casos pueden observarse de manera separadas, sugiriendo su papel como un equipo, pero no

necesariamente formando un complejo proteína-proteína todo el tiempo. También se observó a ambas proteínas expuestas hacia el exterior celular (Figura 27g-j). Después de 2 min, las vesículas de la membrana contenían colesterol; y nuevamente, en la mayoría de los casos EhNPC2 se encontró hacia el exterior (Figura 27e,k), fortaleciendo la hipótesis acerca de la movilización de ambas proteínas durante la captura del colesterol, después de un estímulo, como la presencia de suero. El número y tamaño de las vesículas de membrana incrementaron durante el tiempo de endocitosis, y ambas proteínas se encontraron cercanas a las vesículas que contenían colesterol, dentro y fuera de los trofozoítos (Figura 27a,b,e,f,h,l). En algunas ocasiones, las vesículas fueron observadas de manera polarizada, en forma de “cap” (Figura 27, 5 min), además se observaron en otras partes de la membrana plasmática (Figura 27, 7 min). Fuera de la célula, junto o no a la membrana plasmática, EhNPC2 se observó en vacuolas de diferentes tamaños y formas, incluyendo esferas y barras (Figura 27g-m). También se observaron estructuras tipo redes que se dirigían al interior de los trofozoítos, formadas principalmente por EhNPC1 y colesterol, y como se describió anteriormente, éstas redes estaban decoradas por esferas de aproximadamente 1.5-2 μm de diámetro que contenían EhNPC2 (Figura 27 i,k,m). Las estructuras esféricas podrían corresponder a las vesículas detectadas por MET (Figura 25).

En algunas imágenes de microscopía confocal y de MET, se detectó a las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en el espacio extracelular (Figura 28A, B). Por lo tanto, para determinar si realmente las proteínas se estaban secretando, se realizaron ensayos de secreción donde a los trofozoítos privados de suero se les dio un pulso de SBA durante diferentes tiempos. Después, las amibas se lisaron y los sobrenadantes se colectaron y procesaron en presencia de inhibidores de proteasas para evitar la degradación de las proteínas y a continuación ambas fracciones se procesaron mediante experimentos de WB. En esos ensayos encontramos que inmediatamente después del ayuno, EhNPC1 se detectó pobremente en

los extractos totales y no fue posible detectarla en el sobrenadante (Figura 28C). Sin embargo, después de 0.5 min de estímulo con suero, la proteína incrementó en el extracto total y se detectó en la fracción de secreción donde permaneció hasta los 15 min. Por su parte, EhNPC2 estuvo presente durante todos los tiempos analizados de la cinética, desde el minuto 0 hasta los 15 min de estímulo con suero (Figura 28C). De manera interesante, se observó que en la fracción de secreción, la proteína EhNPC2 presentó una migración aberrante, es decir que la encontramos en un peso mayor al esperado (25 kDa), lo que nos llevó a pensar que posiblemente esto se debía a su interacción con colesterol. Para corroborar esta hipótesis, estas mismas membranas se re-inmunodetectaron con el anticuerpo α -colesterol. Nuestros resultados indicaron que el anticuerpo α -colesterol reconoció las bandas correspondientes a las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 y también a la banda de 25 kDa (Figura 28C), concluyendo que en la fracción de secreción EhNPC2 se asocia con el colesterol. Se sabe que la proteína de amiba EhCP112 es secretada al medio (Ocadiz *et al.*, 2005), por lo que la usamos como control positivo de secreción. En nuestras muestras de extractos totales y de secreción encontramos a la enzima EhCP112 desde el tiempo 0, demostrando que nuestras fracciones de secreción estuvieron bien obtenidas. Por otra parte, para demostrar que los sobrenadantes no estuvieran contaminados con detritus celulares, usamos el anticuerpo α -actina, y observamos que solo en los extractos celulares el anticuerpo detectó a la actina (Figura 28C).

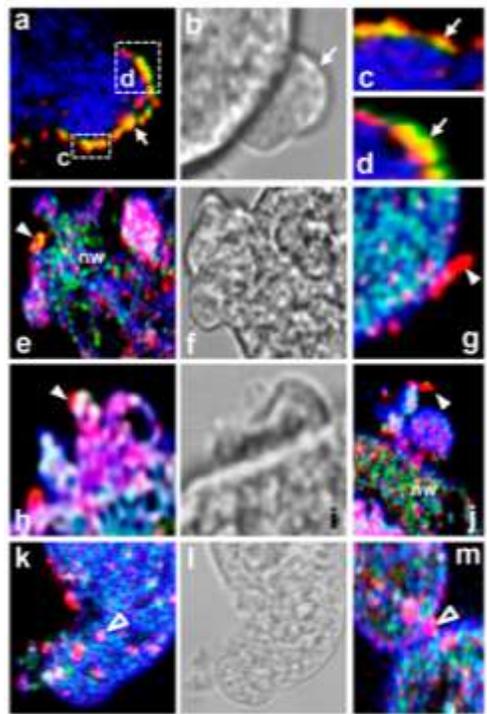
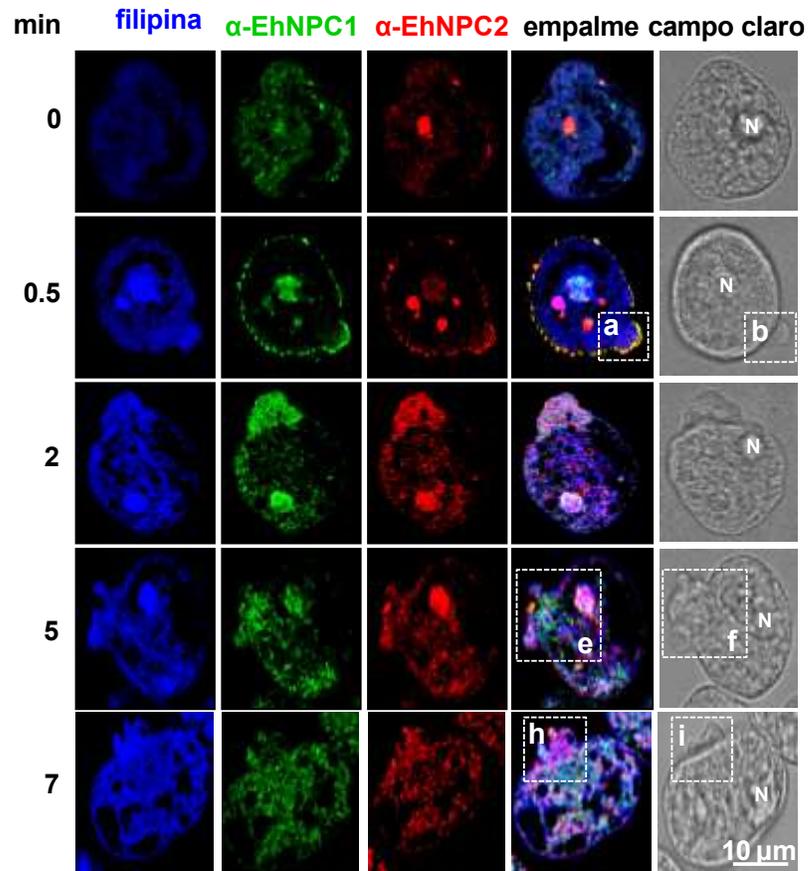


Figura 27. Localización del colesterol y las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 durante el estímulo de SBA. Trofozoítos se sembraron sobre cubreobjetos durante 12 h en medio TYI (sin suero). Posterior a un pulso de SBA a 37°C por 0.5 a 7 min, las células se lavaron y fijaron con PFA al 4% y se marcaron con filipina, α -EhNPC1 y α -EhNPC2 para su análisis mediante microscopía confocal. Los recuadros marcados con letras minúsculas son magnificados a la derecha. (a-d) Vacuolas de membrana que contienen EhNPC1 y EhNPC2. Flechas: pequeñas vacuolas alrededor de la membrana plasmática con EhNPC2 o EhNPC1 orientadas hacia el espacio extracelular. (e) Redes teñidas con el anticuerpo α -EhNPC1. (e-j) Estructuras con forma de salchicha y esféricas (cabeza de flecha), expuestas al espacio extracelular y marcadas principalmente con α -EhNPC2. (k-m) Estructuras esféricas de 1 a 2 μ m (cabeza de flecha vacía) dentro de la célula y teñidas por el anticuerpo α -EhNPC2. N: núcleo; nw: estructuras tipo redes.

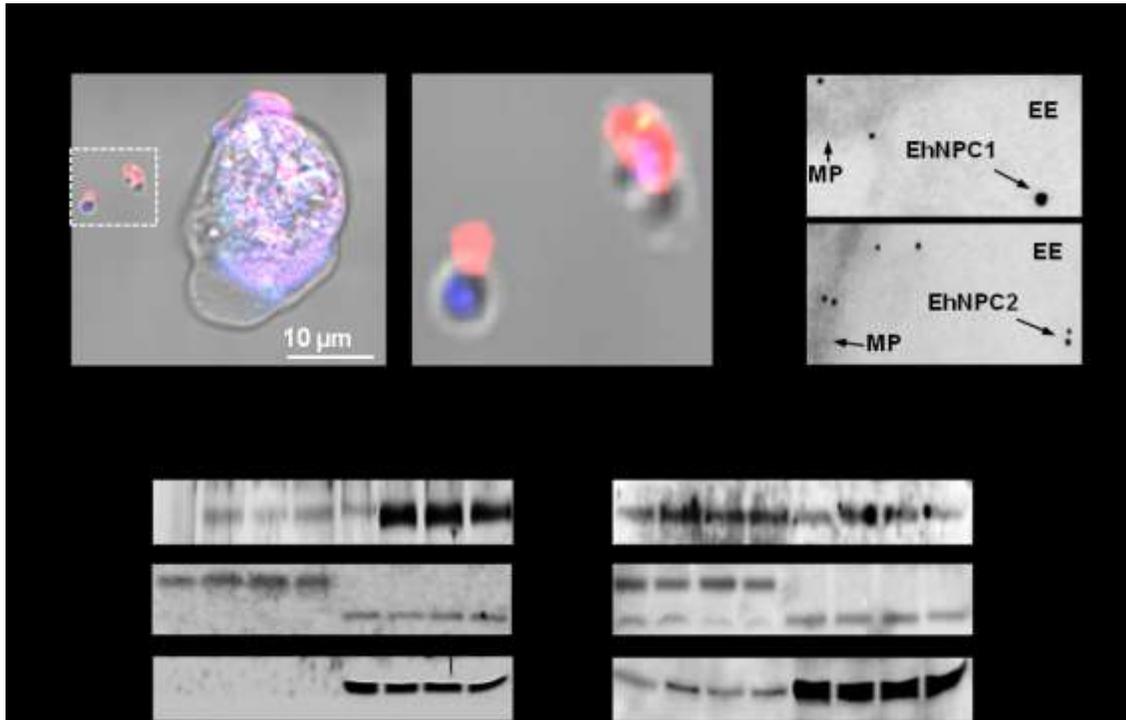


Figura 28. Secreción de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2. A) Microscopía confocal de trofozoítos en condiciones basales donde se muestra extracelularmente el colesterol (azul), EhNPC1 (verde) y EhNPC2 (rojo). B) MET de trofozoítos en condiciones basales donde se observan partículas de oro coloidal que corresponden a las proteínas EhNPC1 (20 nm) y EhNPC2 (10 nm), respectivamente. MP: membrana plasmática, EE: espacio extracelular. C) Trofozoítos mantenidos en ayuno por 12 h fueron sometidos a un pulso de SBA durante diferentes tiempos y después el medio se colectó y los trofozoítos se lisaron. Los sobrenadantes y los lisados (total) se analizaron por WB usando anticuerpos α -EhNPC1, α -EhNPC2, α -colesterol, α -actina y α -EhCP112. Actina fue usada como control de integridad celular y EhCP112 se usó como control de secreción.

8.6 EhNPC1 y EhNPC2 co-localizan con el colesterol durante la eritrofagocitosis

Posteriormente, analizamos el comportamiento de EhNPC1 y EhNPC2 durante el tráfico de colesterol en la eritrofagocitosis. La figura 29 muestra imágenes representativas de los hechos más relevantes donde ocurren los cambios. En condiciones basales, las proteínas EhNPC1, EhNPC2 y el colesterol se encontraron en la membrana plasmática, citoplasma, núcleo y alrededor del núcleo (Figura 29A, tiempo 0). Inmediatamente después de detectar la presencia de eritrocitos, las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 se movilizaron al sitio de contacto en la membrana plasmática; y también en vesículas citoplásmicas donde también se localizó el colesterol (Figura 29, 2 min). De manera interesante, EhNPC2 apareció dentro de los eritrocitos que comenzaban a ser ingeridos por los trofozoítos, co-localizando con el colesterol de los eritrocitos (Figura 29A,B). Las proteínas y el lípido se observaron en un patrón punteado continuo desde los eritrocitos adheridos hasta el citoplasma (Figura 29, 2 min, 29a-d). EhNPC1 se observó en la parte externa de la copa fagocítica y alrededor de los eritrocitos que comenzaban a ser ingeridos (Figura 29A,B). Entre el núcleo y los eritrocitos, se observaron estructuras tipo redes decoradas principalmente por el anticuerpo α -EhNPC1 y la filipina, y algunos puntos/parches reconocidos por el anticuerpo α -EhNPC2 (Figura 29 A,B, 2 min). A los 90 min, el colesterol apareció distribuido en la membrana plasmática, y dentro de vacuolas de mayor tamaño que pudieran corresponder a fagolisosomas y MVBs que contienen eritrocitos digeridos, co-localizando con EhNPC2 y EhNPC1 (Figura 29, 90 min, 27f).

Recientemente, se han identificado fagolisosomas y MVBs después de 60 y 90 min de fagocitosis, que contienen eritrocitos parcialmente digeridos, vesículas de menor tamaño con EhADH, otras con LBPA y otras con ambas (Castellanos-Castro *et al.*, 2016a). Estas vesículas posiblemente correspondían a las detectadas aquí por filipina, α -EhNPC1 y α -EhNPC2 en la fagocitosis tardía. Los coeficientes de correlación de Pearson (CP) mostraron que la mayor co-localización entre colesterol y EhNPC1 o EhNPC2 y entre

ambas proteínas fue después de los 2 min de eritrofagocitosis (Figura 29C). Sin embargo, la co-localización entre ambas proteínas no fue mayor de 0.59 (Figura 29E), sugiriendo que estas moléculas no se encuentran juntas todo el tiempo.

Posteriormente, se realizaron ensayos de eritrofagocitosis en un modelo de pulso y caza para detectar la movilización de ambas proteínas. En estos experimentos, los trofozoítos fueron incubados con eritrocitos durante 5 min y posteriormente, los eritrocitos externos y adheridos fueron removidos con una mezcla de agua:TYI; y el proceso de eritrofagocitosis continuó a 37°C durante diferentes tiempos. Posteriormente los trofozoítos se lisaron y fueron centrifugados, el sobrenadante contenía principalmente vesículas pequeñas y proteínas solubles, mientras que las pastillas contenían células rotas, núcleos y lisosomas (Michelsen *et al.*, 2009). Entonces, las muestras se sometieron a SDS-PAGE y las proteínas fueron identificadas mediante ensayos de WB. En condiciones basales (tiempo 0), EhNPC1 se detectó enriquecida en la pastilla celular, mientras que en menor cantidad se presentó en el sobrenadante (Figura 30A,B). Sin embargo, después de 5 min de eritrofagocitosis las proteínas se observaron distribuidas de manera similar en el extracto total, en la pastilla y en el sobrenadante y su distribución continuó así durante el proceso de eritrofagocitosis (Figura 30A). En contraste, en condiciones basales, el anticuerpo α -EhNPC2 detectó a la proteína EhNPC2 en las tres muestras, pero fue más abundante en el sobrenadante. Durante el proceso de eritrofagocitosis, EhNPC2 se enriqueció en las fracciones de sobrenadante y pastilla (Figura 30A). El análisis densitométrico usando el anticuerpo α -actina como control de carga, confirmó los datos obtenidos mediante el WB (Figura 30 B, C).

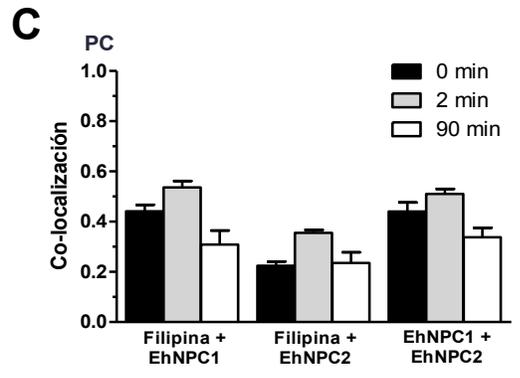
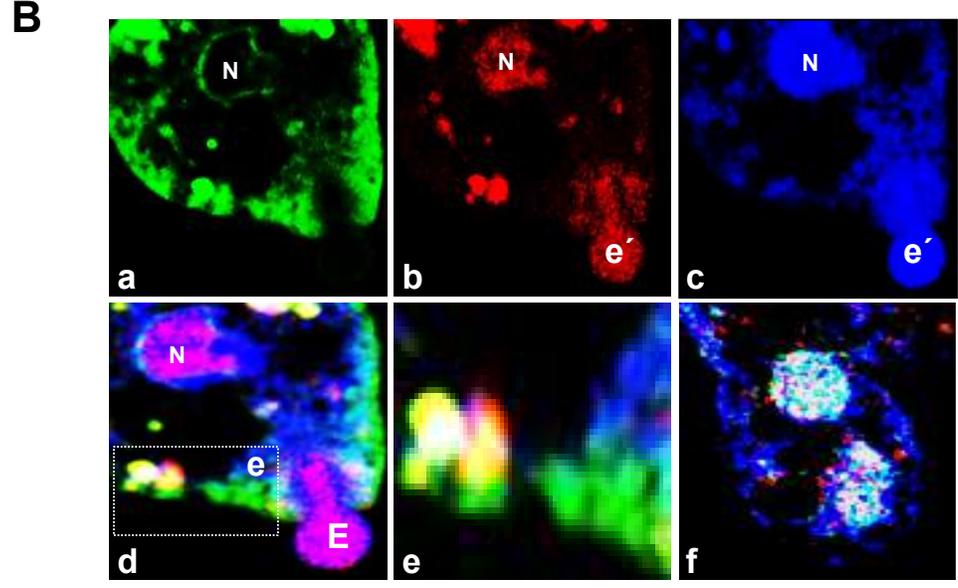
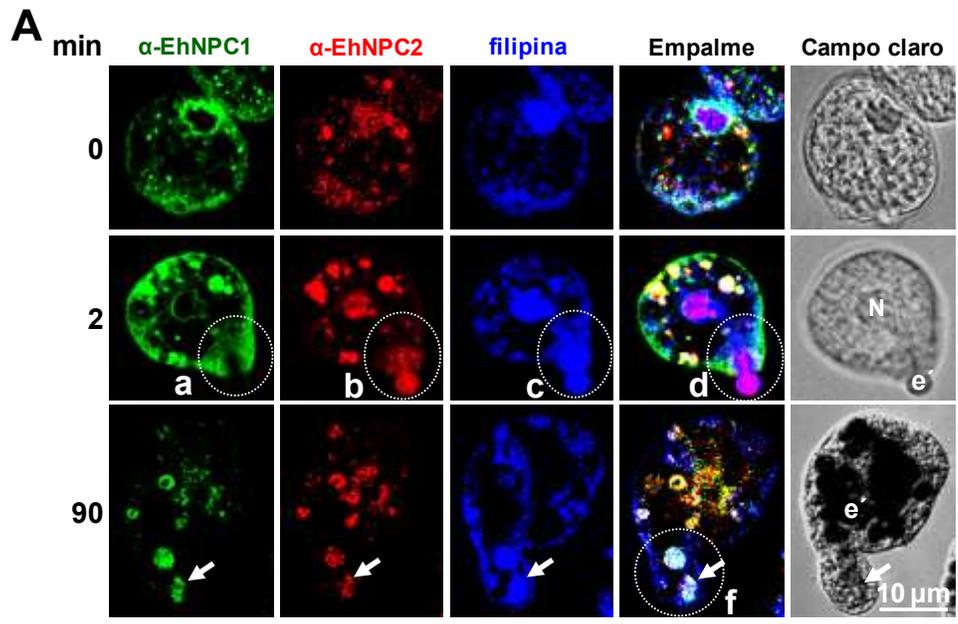


Figura 29. Localización de EhNPC1, EhNPC2 y colesterol durante la fagocitosis. A) Trofozoítos incubados con eritrocitos por 2 y 90 min fueron fijados y analizados por microscopía confocal y teñidos con filipina y los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2. e': eritrocitos, N: núcleo. B) (a-d) Aumento de un eritrocito que comienza a ser internalizado. (e) Magnificación de vesículas cercanas a la membrana plasmática. (f) Magnificación de un fagosoma (observado en campo claro) que contiene eritrocitos digeridos (flechas). C) Correlación del coeficiente de Pearson (CP) entre la filipina y EhNPC1 o EhNPC2 o de EhNPC1 con EhNPC2 en los distintos tiempos de la fagocitosis.

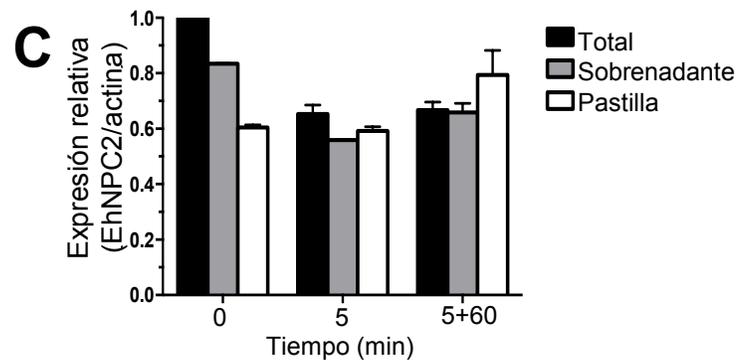
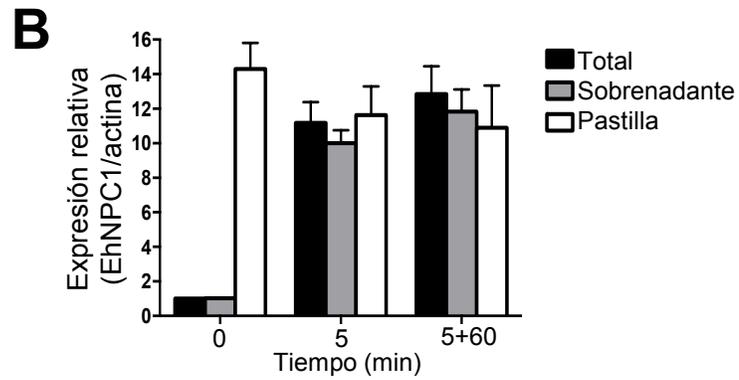
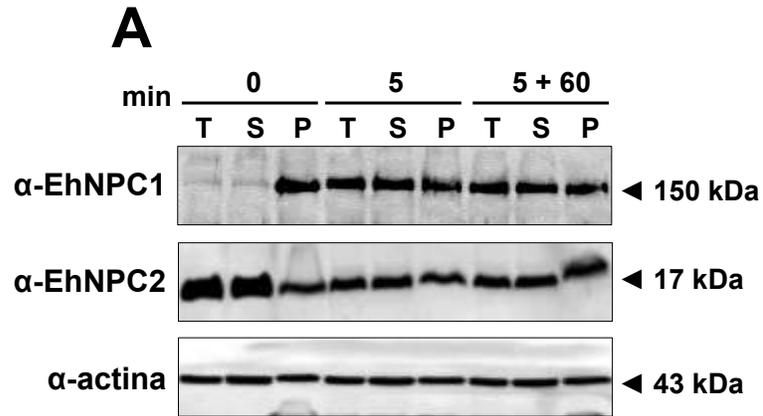
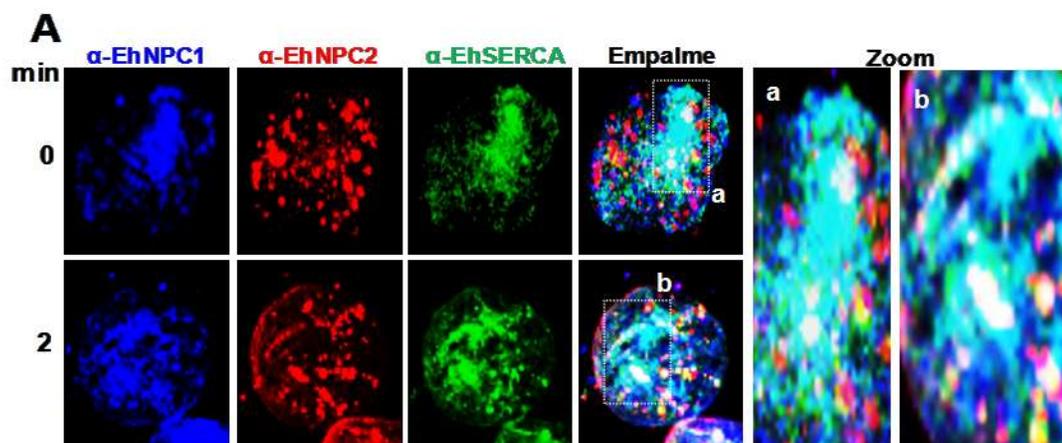


Figura 30. Localización subcelular de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en trofozoítos durante la eritrofagocitosis. A) Trofozoítos fueron incubados con eritrocitos a 37°C durante 5 min, los eritrocitos adheridos y no ingeridos se removieron con agua:TYI. Después los trofozoítos se incubaron con medio TYI para continuar con el proceso de fagocitosis, después de 60 min los trofozoítos se lisaron para llevar a cabo el fraccionamiento celular. Las fracciones se analizaron mediante WB y usando los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC1. T: total, S: sobrenadante. P: pastilla. B) y C) Densitometría de las bandas correspondientes a EhNPC1 y EhNPC2, usando actina como control de carga.

Los análisis de microscopía confocal y WB demostraron que después de detectar la presencia de los eritrocitos, EhNPC1 y EhNPC2 se movilizaron hacia la membrana plasmática. Allí, se organizan de manera similar que en los experimentos de endocitosis de colesterol, pero la co-localización de ambas proteínas es más evidente durante la eritrofagocitosis (Figura 29).

8.7 EhNPC1 y EhNPC2 se localizan en el retículo endoplásmico

Debido a que ambas proteínas se han localizado alrededor del núcleo, se investigó si esta localización correspondía al retículo endoplásmico (RE), mediante experimentos de pulso y caza como se describió anteriormente. A diferentes tiempos de fagocitosis, EhNPC1 y EhNPC2 co-localizaron con EhSERCA, una marcador del RE en *E. histolytica* que transporta calcio (Martinez-Higuera *et al.*, 2013). Imágenes de microscopía confocal en condiciones basales mostraron que las tres proteínas se localizaron en redes y vacuolas identificadas anteriormente como el RE (Martinez-Higuera *et al.*, 2013). EhNPC2 también apareció en esferas de 1 a 1.5 μm de diámetro en el citoplasma (Figura 31). Durante la fagocitosis, la co-localización no se modificó de manera significativa (Figura 31), indicando que las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 mantienen una presencia constante en el RE. El valor del coeficiente de Pearson mostró que la co-localización de EhNPC1 y EhNPC2 con EhSERCA fue de 0.25 y 0.51, respectivamente (Figura 31). Estos resultados comprobaron nuestra hipótesis acerca de que el sitio donde se localizan las proteínas encontradas alrededor del núcleo, corresponde al RE.



B

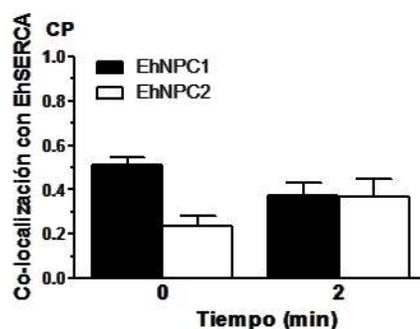


Figura 31. Localización de EhNPC1 y EhNPC2 en el RE. A) Trofozoítos fueron incubados con eritrocitos a 37°C por 2 min, fijados y procesados para microscopía confocal usando los anticuerpos α -EhNPC1 (azul), α -EhNPC2 (rojo) y α -EhSERCA (verde). (a-b) Áreas magnificadas de los recuadros blancos. B) Coeficiente de correlación de Pearson (CP) que muestra la co-localización de EhNPC1 o EhNPC2 con EhSERCA.

8.6 EhNPC2 co-localiza con EhRab7A en los endosomas y EhNPC1 se localiza alrededor de ellos.

En *E. histolytica* el grupo de proteínas Rab participa en el tráfico vesicular (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005). Dentro de ellas, se ha descrito que EhRab7A está involucrada en el transporte retrógrado de los fagosomas hacia el aparato de Golgi y se ha localizado principalmente en los endosomas tardíos (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005). Con estos antecedentes, exploramos si las estructuras esféricas que contenían EhNPC1 y EhNPC2, correspondían a endosomas. Mediante microscopía confocal, observamos que los anticuerpos α -EhRab7A reconocieron estas estructuras citoplásmicas, las cuales incrementaron de tamaño durante los ensayos de pulso y caza en la eritrofagocitosis. En condiciones basales y durante la fagocitosis, EhRab7A se asoció con EhNPC1 y EhNPC2, formando frecuentemente estructuras tipo donas que contenían EhNPC2 en la parte interna. También EhNPC1 co-localizó con EhRab7A alrededor de estas estructuras, rodeando a EhNPC2 (Figura 32A). Los valores del coeficiente de Pearson para EhNPC1 y EhNPC2 con EhRab7A fueron de 0.39 a 0.55 en el total de la célula, y estos valores incrementaron ligeramente de 0.47 a 0.78 cuando se midieron las estructuras donde las proteínas EhRab7A y EhNPC1 o EhNPC2 co-localizaron (Figura 32B, C). Estos resultados reforzaron la hipótesis de que EhNPC2 se localizó en endosomas tardíos, co-localizando con EhRab7A y EhNPC1.

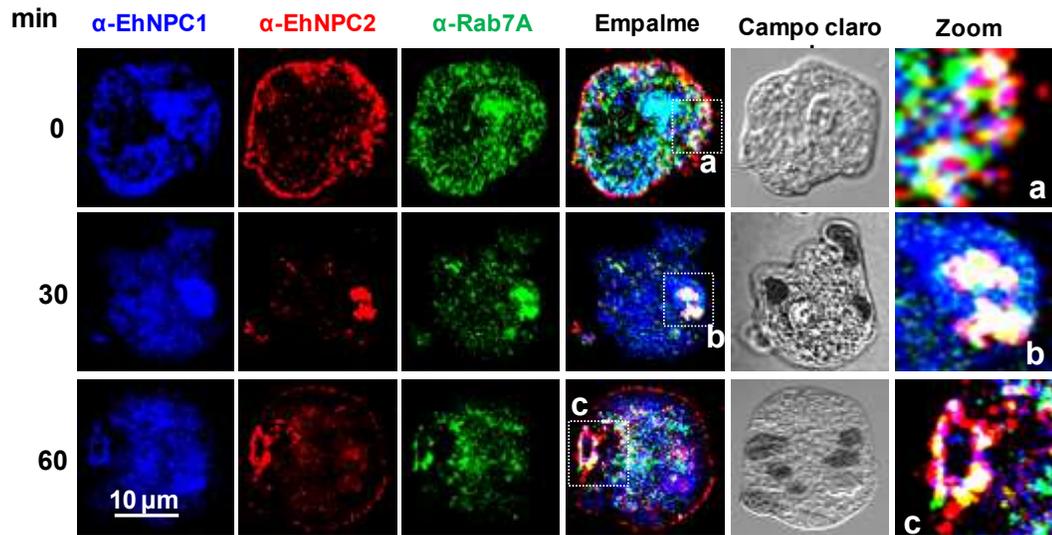
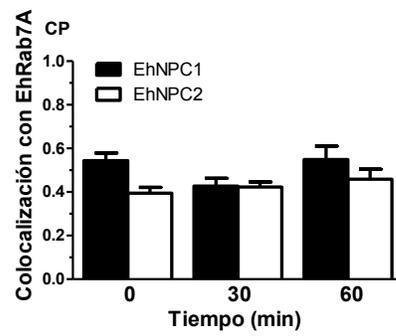
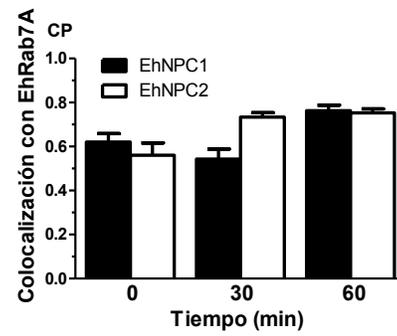
A**B****C**

Figura 32. EhNPC1 y EhNPC2 co-localizan con EhRab7A. Trofozoítos fueron incubados con eritrocitos a 37°C por 5 min, posteriormente, los eritrocitos adheridos y no ingeridos se lisaron con agua:TYI y se continuó con el proceso de fagocitosis por 30 y 60 min en medio TYI. A) Las muestras se procesaron para microscopía confocal usando los anticuerpos α -EhNPC1 (azul), α -EhNPC2 (rojo) y α -EhRab7A (verde). (a-e) Amplificación de los recuadros blancos. B) y C) Co-localización entre EhNPC1 o EhNPC2 con EhRab7A en toda la célula (B) o en estructuras intracelulares marcadas con los tres anticuerpos (C).

8.8 EhNPC1 y EhNPC2 se asocian con moléculas endosomales en vesículas ácidas

En mamíferos, NPC1 se une al colesterol en endosomas tardíos en un medio ácido, donde se encuentran el lípido LBPA y la proteína Alix, los cuales además participan en la regulación del colesterol (Chevallier *et al.*, 2008). Es por esto que hipotetizamos que las vesículas que contienen colesterol dentro de los fagolisosomas, además poseen LBPA y EhADH, moléculas previamente descritas en fagolisosomas y MVBs en trofozoítos de *E. histolytica* (Banuelos *et al.*, 2005, Castellanos-Castro *et al.*, 2016a).

Por lo tanto, se investigó primero la naturaleza de las vesículas que contenían colesterol a través de los ensayos de fagocitosis pulso-caza anteriormente descritos, pero en este caso usando LysoTracker como marcador de vesículas ácidas. Después de 5+30 y 5+90 min de eritrofagocitosis, más del 90% de los fagosomas se tiñieron con LysoTracker y fueron reconocidos con los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2 (Figura 33). El LysoTracker apareció en fagolisosomas y MVBs, que contenían eritrocitos parcial o totalmente digeridos, mientras que EhNPC1 se localizó alrededor de los fagosomas y EhNPC2 al interior de ellos (Figura 33), lo que sugiere que las proteínas analizadas tienen un papel independiente, aunque no se descarta la posibilidad de que participen en conjunto en algún punto del proceso endocítico. Estos resultados demostraron que EhNPC1 y EhNPC2 se localizaron en vesículas de naturaleza ácida, que son características de los fagolisosomas.

Lysotracker: 5 min fagocitosis +

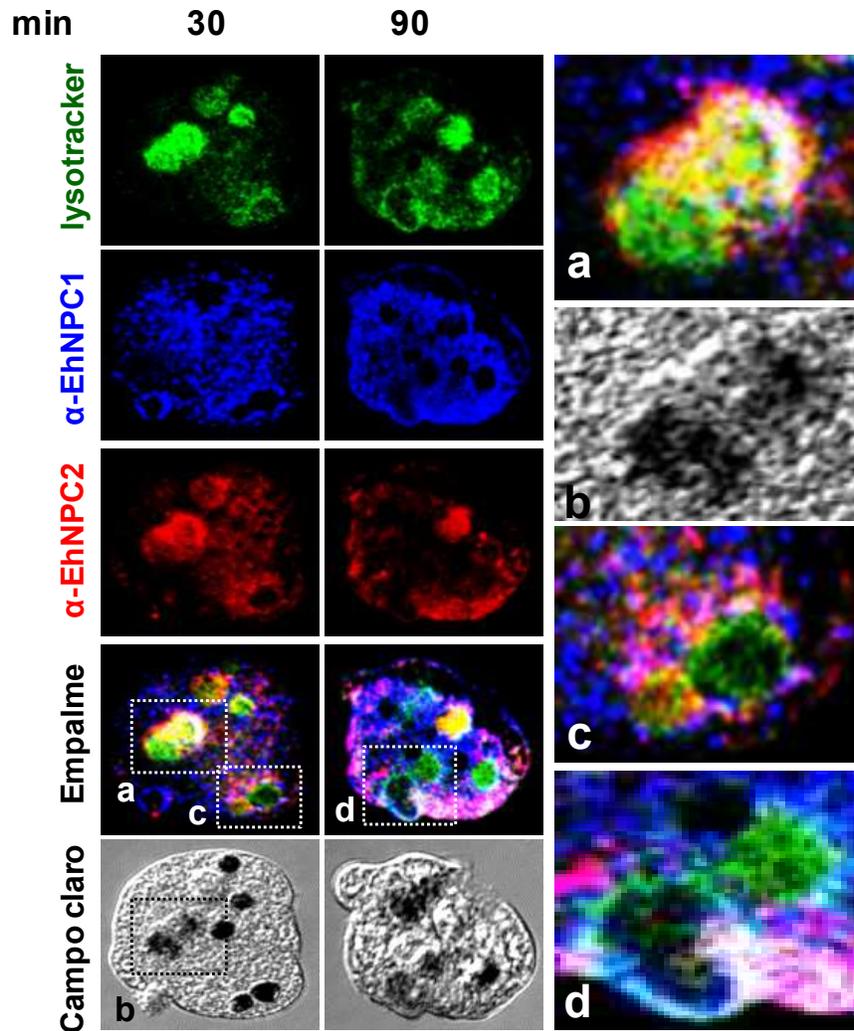


Figura 33. Localización de EhNPC1 y EhNPC2 en vesículas ácidas. Trofozoítos se incubaron con eritrocitos como en la figura 30 y fueron procesados para microscopía confocal, empleando los anticuerpos α -EhNPC1 (azul) y α -EhNPC2 (rojo) y Lysotracker (verde). (a-d) ampliaciones de los recuadros blancos.

Posteriormente se utilizaron anticuerpos específicos para LBPA y EhADH, moléculas descritas en los endolisosomas (Banuelos *et al.*, 2005, Castellanos-Castro *et al.*, 2016a) y que pudieran participar en la regulación del colesterol de estos compartimentos. LBPA mostró un incremento en relación al tiempo de fagocitosis, en estructuras que pueden corresponder a fagolisosomas (Figura 34A). A 5+30 min, los fagolisosomas que contenían eritrocitos en proceso de degradación, fueron reconocidos por los anticuerpos α -EhNPC1, α -EhNPC2 y α -LBPA (Figura 34A). Por otro lado, EhADH co-localizó con EhNPC1 o EhNPC2 en condiciones basales, principalmente en la membrana plasmática y durante la fagocitosis en fagolisosomas y MVB (Figura 34B).

En conjunto, estos resultados sugieren que LBPA, EhADH, EhRab7A, EhNPC1 y EhNPC2 están presentes durante las fases tardías del proceso de fagocitosis-digestión. Por lo tanto, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación, para determinar si estas moléculas se asocian entre ellas y con el colesterol, durante el proceso de fagocitosis. Los resultados indicaron que EhNPC1 se asoció con EhNPC2, EhRab7A, EhADH y colesterol pero no con EhSERCA, tanto en condiciones basales como después de 60 min de fagocitosis (Figura 35A). Por otra parte, el anticuerpo α -EhNPC2 precipitó todas estas moléculas incluyendo EhSERCA, sugiriendo que estas proteínas están interaccionando en algún punto del proceso de fagocitosis (Figura 35B). Estos hallazgos demostraron la asociación de EhNPC1 y EhNPC2 con proteínas involucradas en la endocitosis y de manera importante se reafirmó la asociación con el colesterol, sugiriendo que ambas proteínas participan en el transporte de este lípido hacia los distintos compartimentos donde es requerido, como se ha observado en sus ortólogos de eucariontes superiores.

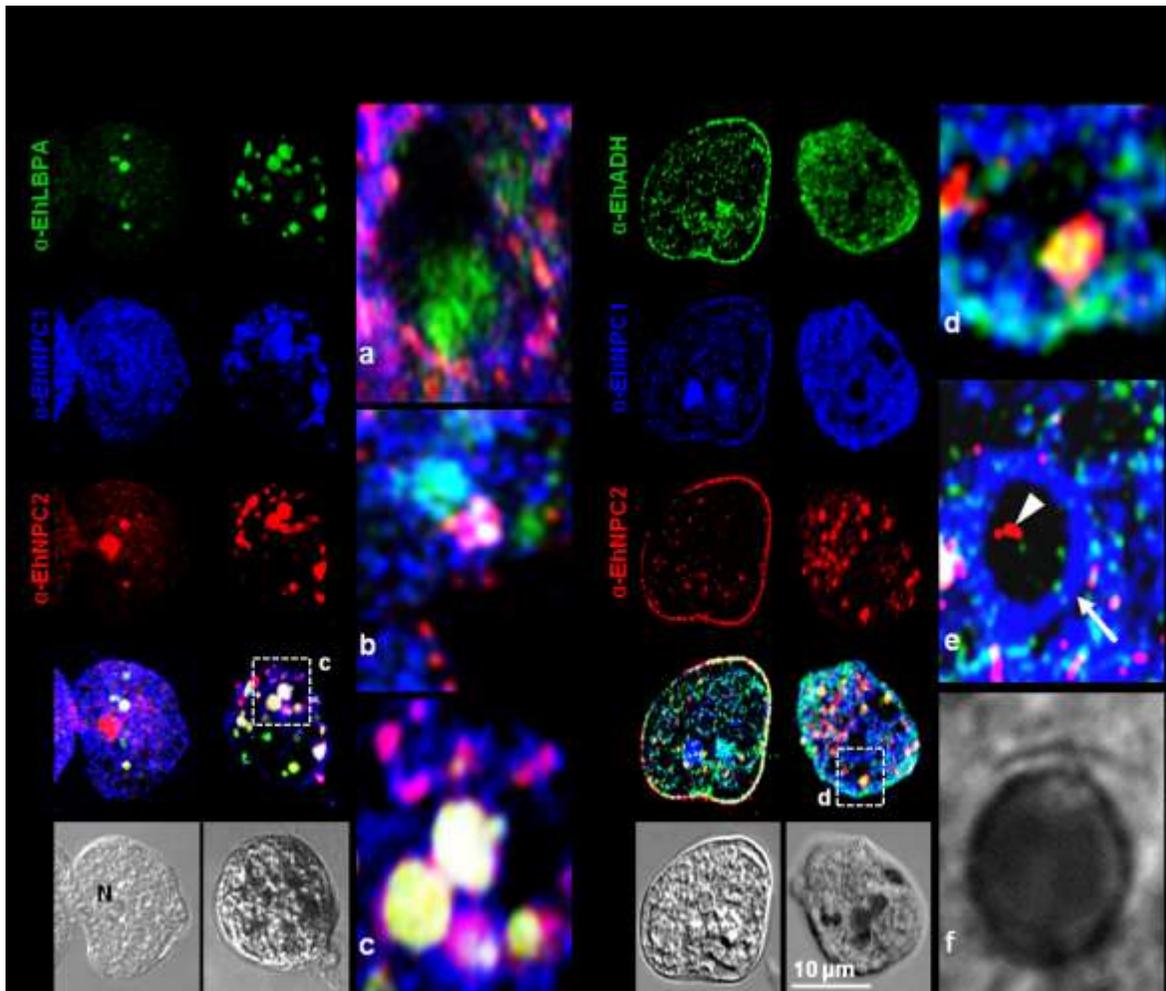


Figura 34. Co-localización de EhNPC1 y EhNPC2 con moléculas endosomales. Trofozoítos procesados como en la figura 30 fueron incubados con los anticuerpos α -EhNPC1 (azul), α -EhNPC2 (rojo) y A) α -LBPA (verde) o B) α -EhADH (verde). (c-d) Amplificaciones de los recuadros blancos. (a-b) y (e-f) representación de otros campos. Flechas: EhNPC1 fuera de los endosomas. Cabeza de flecha: EhNPC2 dentro de los endosomas.

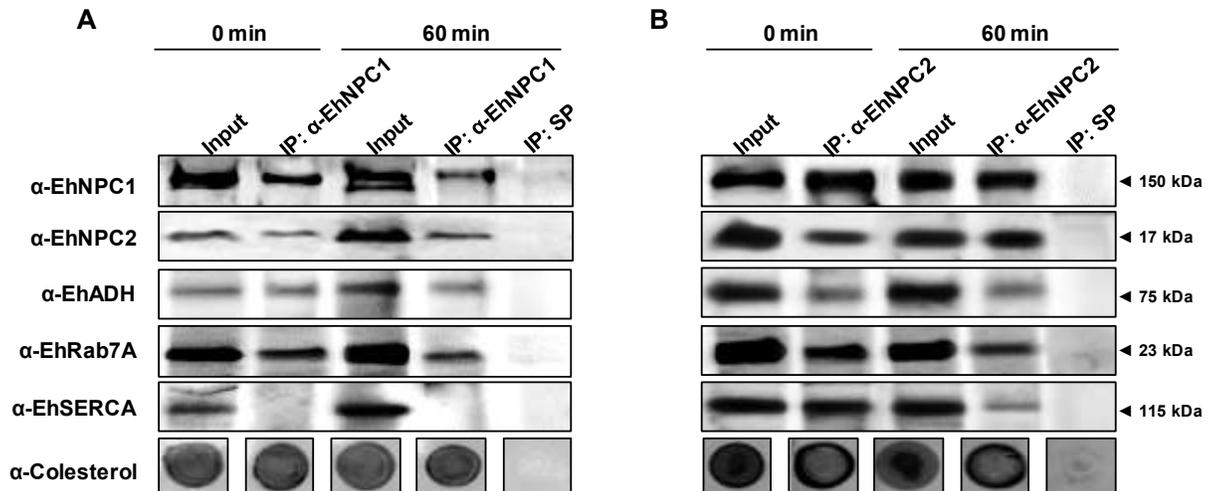


Figura 35. Interacción de EhNPC1 y EhNPC2 con moléculas endosomales y colesterol. Trofozoítos en condiciones basales y después de 5 + 60 min de eritrofagocitosis fueron lisados y sometidos a ensayos de inmunoprecipitación usando los anticuerpos α -EhNPC1 (A), α -EhNPC2 (B) o suero preinmune (SP). Los complejos inmunoprecipitados fueron analizados por WB usando los anticuerpos α -EhNPC1, α -EhNPC2, α -EhADH, α -EhRab7A, α -EhSERCA y α -colesterol.

8.9 La baja concentración de colesterol intracelular disminuye la tasa de eritrofagocitosis y su capacidad de destruir la barrera epitelial intestinal en ratones

Con la finalidad de evaluar si el tráfico de colesterol influye en la virulencia *in vitro* de *E. histolytica*, realizamos experimentos con trofozoítos cultivados durante 12 h en TYI-S, TYI, o TYI suplementado con U18, fármaco que bloquea el tránsito intracelular de colesterol (Lange *et al.*, 2002). En primer lugar, se analizó la expresión de los genes *ehnpc1*, *ehnpc2a* y *ehnpc2b* mediante RT-qPCR. El análisis reveló que la transcripción de *ehnpc2a* se estimuló en ausencia de suero (trofozoítos cultivados en medio TYI) y en presencia de la droga U18 (Figura 36A). Por el contrario, la transcripción de los genes *Ehnpc2b* y *Ehnpc1* no se modificó significativamente en los trofozoítos cultivados en las diferentes condiciones (Figura 36A), lo cual sugiere que posiblemente el gen *ehnpc2a* se regula positivamente cuando hay bajas concentraciones de colesterol intracelular o éste se encuentra acumulado.

Por otra parte, dado que estas proteínas en otros organismos participan de manera activa en el transporte de colesterol intracelular, se determinó la concentración intracelular de colesterol total de los trofozoítos cultivados en las diferentes condiciones. Los trofozoítos sin suero y con la droga U18, presentaron 38.5% y 49% menos concentración de colesterol, respectivamente, en comparación con trofozoítos cultivados en medio TYI-S (Figura 36B), lo que sugirió que al eliminar la fuente natural de colesterol en el medio de cultivo, se minimizó la captación y por tanto el contenido intracelular de colesterol.

Como se ha descrito anteriormente en otros eucariontes superiores, la distribución y movilización de colesterol depende de las proteínas NPC1 y NPC2 (Chang *et al.*, 2005b, Ikonen, 2008), por lo tanto es relevante conocer la localización de colesterol intracelular cuando se privan los trofozoítos de su fuente natural de colesterol y cuando se arresta el tráfico de este lípido por efecto del fármaco U18. Mediante ensayos de microscopía confocal, se pudo

observar que los trofozoítos tratados con la droga U18 mostraron abundantes grumos de colesterol en el citoplasma (Figura 36C), a diferencia de los trofozoítos cultivados en TYI-S o TYI, donde se observó que la distribución de colesterol fue homogénea en el citoplasma (Figura 36C).

Estos resultados en conjunto, indican que al menos el gen *Ehnpc2a*, es regulado positivamente cuando se arresta el tráfico de colesterol por efecto de la droga U18. Por otra parte, la privación de suero, como era de esperarse, induce una menor captura de colesterol, fenómeno que también se observa al bloquear el tráfico de este lípido. Finalmente, se observó una reorganización de colesterol en los trofozoítos donde se bloqueó el tránsito de este esterol.

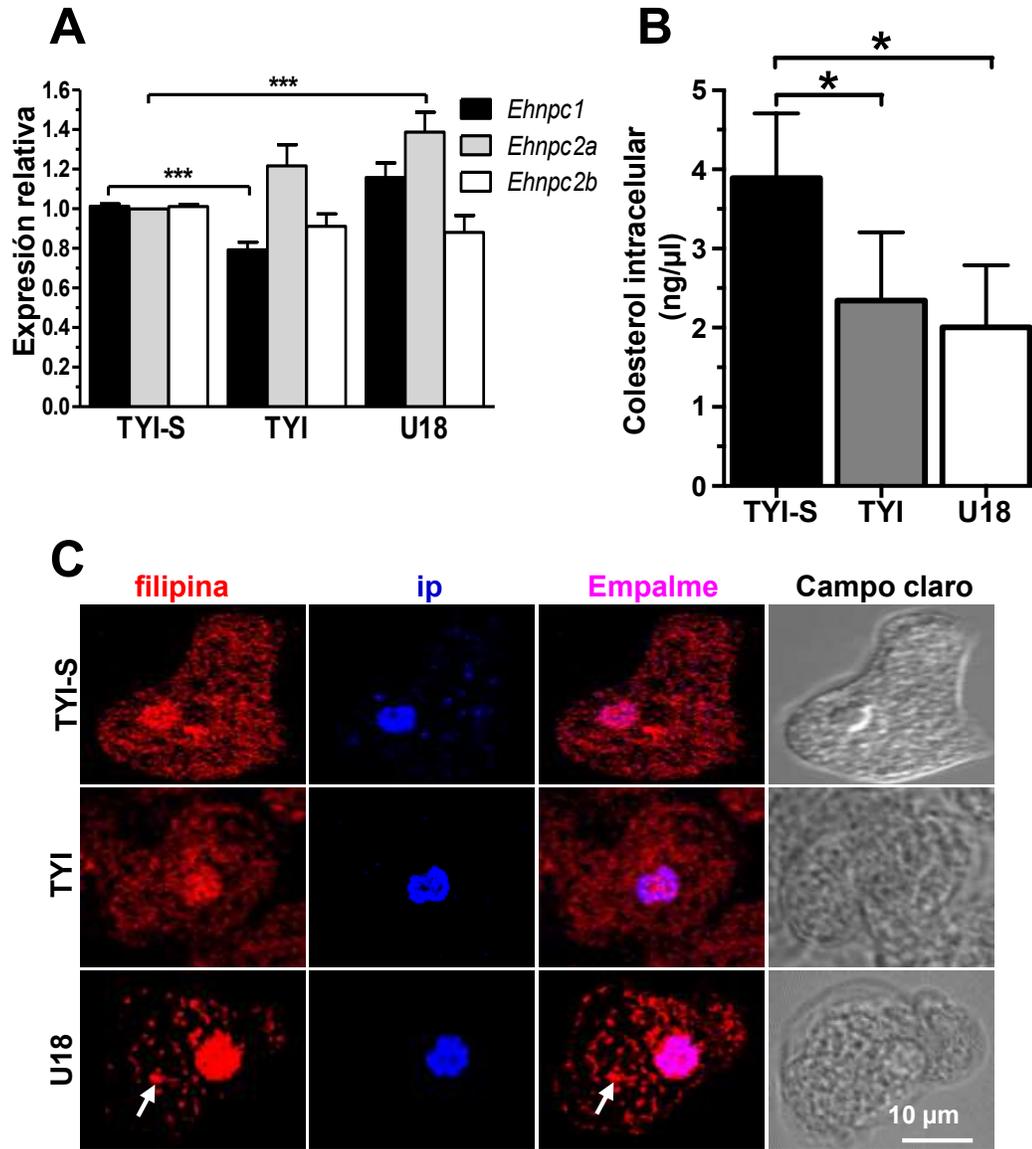


Figura 36. Expresión de los genes *ehnpc1*, *ehnpc2a* y *ehnpc2b*, cuantificación y distribución de colesterol en trofozoítos cultivados en TYI-S, TYI y TYI más U18. Trofozoítos fueron incubados durante 12 h a 37°C en medio TYI-S, TYI y TYI más U18. A) Mediante ensayos de RT-qPCR usando mRNA de los trofozoítos en las distintas condiciones, se amplificaron los transcritos con oligonucleótidos específicos para los genes *Ehnpc1*, *Ehnpc2a* y *Ehnpc2b*, así como el gen *s2* que codifican para la proteína *s2* de la subunidad 40s del ribosoma, el cual se usó como control de carga. B) Cuantificación de colesterol intracelular total en los trofozoítos con los diferentes tratamientos, realizada como se describe en materiales y métodos. C) Microscopía confocal que muestra la localización del colesterol teñido con filipina (rojo) y la morfología de los trofozoítos observada en el campo claro. El núcleo fue teñido en azul con yoduro de propidio (Ip). Flecha: indica la acumulación de colesterol en “parches” intracelulares.

Posteriormente, se evaluaron algunos procesos de virulencia *in vitro* como: eritrofagocitosis, adhesión, actividad citotóxica y actividad citopática de los trofozoítos con los diferentes tratamientos. La tasa de eritrofagocitosis, fue severamente afectada por la ausencia de una fuente de colesterol, y aún más en presencia de la droga U18, que bloqueó el tráfico intracelular del lípido. En esta última condición, los trofozoítos ingirieron alrededor de 2 eritrocitos por trofozoíto desde los 5 hasta los 60 min de interacción. La tasa de eritrofagocitosis fue 5 veces menor en trofozoítos tratados con U18 que en trofozoítos cultivados en TYI-S, y de menos de 2 veces que los cultivados en TYI (Figura 37A). Al evaluar si el bloqueo en el tráfico de colesterol afectaba la adhesión, no se observaron cambios significativos en los trofozoítos tratados con las diferentes condiciones hasta los 60 min, donde al parecer la disminución de colesterol afectó la capacidad de los trofozoítos de adherir eritrocitos (Figura 37B). Estos resultados, sugieren que la acumulación de colesterol no afecta a los componentes membranales, que incluyen los receptores a eritrocitos expuestos en la membrana plasmática. Además, analizamos la capacidad de destrucción de monocapas de células epiteliales MDCK por trofozoítos vivos (actividad citopática). Los hallazgos revelaron que aquellos trofozoítos cultivados en TYI y U18 dañaron de 40 a 50 % menos respectivamente, que los trofozoítos cultivados en medio TYI-S (Figura 37C), sugiriendo que la falta de colesterol proveniente del medio afecta la capacidad citopática de los trofozoítos. Por otra parte, los extractos de trofozoítos (actividad citotóxica) presentaron la misma capacidad de destruir monocapas de células MDCK (Figura 37D), independientemente del tratamiento de los parásitos, indicando que la cantidad y actividad tanto de proteasas como de algunas otras moléculas involucradas en la lisis de las células epiteliales no son afectadas por la reducción y bloqueo del tráfico de colesterol.

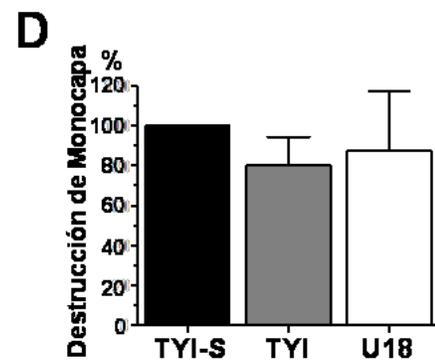
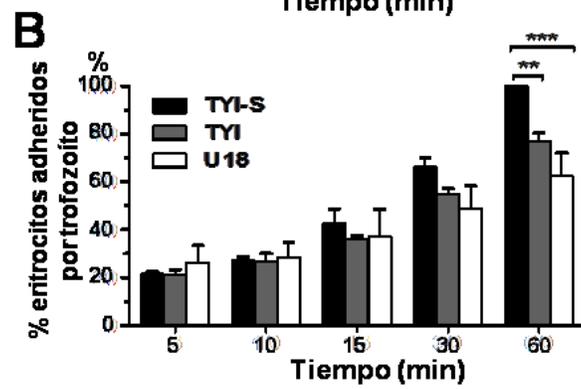
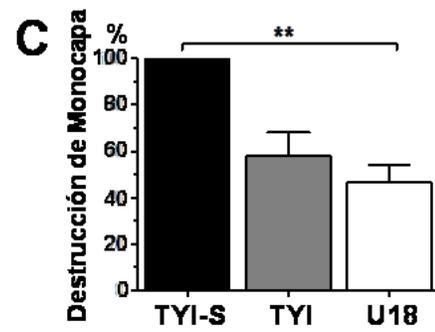
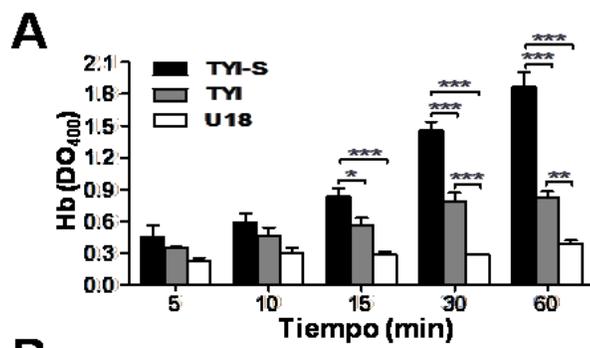
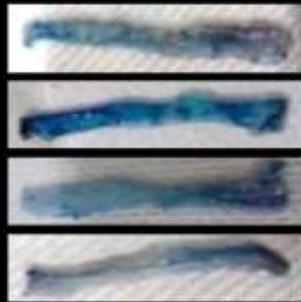


Figura 37. Virulencia *in vitro* de trofozoítos cultivados en TYI-S, TYI y TYI más U18. A) Tasa de eritrofagocitosis, donde se midió la concentración de hemoglobina dentro de los trofozoítos mediante espectrofotometría. B) Adhesión de eritrocitos a trofozoítos. Datos obtenidos a partir del conteo de eritrocitos teñidos con diaminobencidina en 100 trofozoítos. C) Trofozoítos vivos se interaccionaron con monocapas de células MDCK para evaluar su capacidad de destrucción, la cual se midió mediante la tinción de las células MDCK restantes con el colorante azul de metileno, el cual fue eluído y leído espectrofotométricamente. D) Lisados de trofozoítos se incubaron con monocapas de células MDCK y la destrucción de éstas se evaluó como en el inciso anterior.

Adicionalmente, realizamos ensayos de virulencia *in vivo* usando ratones de la cepa C57BL/6 (Kissoon-Singh *et al.*, 2013) como un modelo de amibiasis intestinal, los cuales fueron inoculados analmente con trofozoítos cultivados en medio TYI-S, TYI o con la droga U18. Posterior a la incubación con los trofozoítos, se inyectó el colorante azul de Evans en el intestino y permaneció ahí durante 15 minutos permitiendo su absorción en los sitios con daño del epitelio intestinal (Figura 38A). La intensidad en la coloración azul fue proporcional al daño causado en la permeabilidad del epitelio intestinal. Los ratones inoculados con trofozoítos cultivados con U18, mostraron resultados similares a los obtenidos con el control negativo (ratones no inoculados), lo que indicó que la barrera epitelial no fue alterada. Mientras que los trofozoítos cultivados en TYI presentaron 60-70% de destrucción epitelial, tomando como 100% el daño producido por trofozoítos cultivados en TYI-S (Figura 38B), demostrando que la ausencia de suero disminuyó la capacidad de los trofozoítos para romper las uniones intercelulares en el modelo *in vivo*.

Adicionalmente, el colon de los ratones fue analizado por histología y tinción con hematoxilina y eosina. El colon de ratones que no fueron inoculados con parásitos presentó un epitelio intestinal integro y la capa muscular intacta,; mientras que los trofozoítos crecidos en medio TYI-S produjeron un daño importante en el epitelio, provocando discontinuidad en la barrera epitelial, redondeamiento celular, multicapas en el epitelio, infiltrados celulares e inflamación celular. Por su parte, los animales inoculados con trofozoítos cultivados con U18, mostraron un epitelio normal sin infiltrado ni inflamación celular, similar al presentado por los ratones inoculados sólo con PBS (Figura 38C).



2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

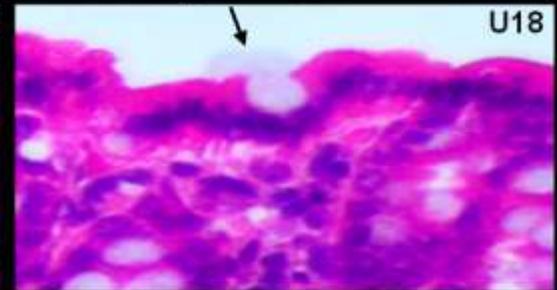
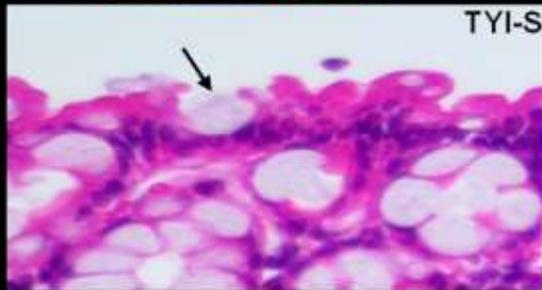
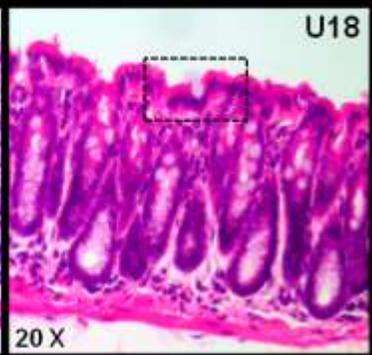
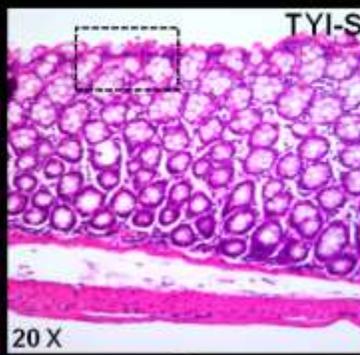


Figura 38. Virulencia *in vivo* de trofozoítos cultivados en TYI-S, TYI y TYI más U18. Trofozoítos cultivados bajo distintas condiciones fueron inoculados analmente en ratones de la cepa C57BL/6 para evaluar su capacidad de dañar la barrera del epitelio intestinal. A) Colon de ratones inoculados con trofozoítos, teñidos con azul de Evans. B) El daño a la barrera del epitelio intestinal se cuantificó espectrofotométricamente mediante la elución del colorante azul de Evans extraído del colon. Neg: ratones control inoculados sólo con PBS. ** $p < 0.01$. (C) Tinción del colon con hematoxilina-eosina (40X).

En conjunto, nuestros resultados muestran que el colesterol es necesario para algunos procesos de virulencia de los trofozoítos, tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo para ingerir eritrocitos, destruir monocapas celulares y dañar la barrera del epitelio intestinal, afectando la permeabilidad por el daño a las uniones intercelulares. Sin embargo, a tiempos cortos de interacción, la disminución y bloqueo del colesterol intracelular no afectaron la adhesión de los trofozoítos a sus células blanco, ni la destrucción de las células epiteliales por efecto de los lisados ricos en proteasas.

8.10 Trofozoítos mutantes en los genes *Ehnpc1* y *Ehnpc2s* presentan una disminución en la tasa de eritrofagocitosis y en la movilidad celular

La fagocitosis y movilidad celular requieren de colesterol para la fluidez y síntesis de membranas. Para determinar si EhNPC1 y EhNPC2 participan en estos eventos, generamos trofozoítos mutantes en los genes *Ehnpc1* y *Ehnpc2a*, usando trofozoítos de la clona G3, los cuales fueron transfectados con el vector psAP-2 (Bracha *et al.*, 2003). Ambas clonas de trofozoítos silenciados (KD *Ehnpc1* y KD *Ehnpc2a*) expresaron 70 y 50% menos mRNA respectivamente, en comparación con los trofozoítos control (transfectados sólo con el vector vacío) (Figura 39A). La expresión de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 también se observó disminuida en los trofozoítos silenciados, aunque los niveles de proteína fueron 25% y 60% menos que en los trofozoítos control, respectivamente (Figura 39B,C).

Mediante imágenes de microscopía confocal se confirmó la disminución de EhNPC1 y EhNPC2 en los trofozoítos mutantes, además, se observó que la escasa presencia de estas proteínas se concentró en ciertas áreas (Figura 40A). En los trofozoítos KD *Ehnpc1*, la proteína EhNPC1 se polarizó hacia la membrana plasmática, mientras que las células KD *Ehnpc2*, la proteína EhNPC2 se encontró pobremente distribuida en la membrana plasmática y en algunos puntos del citoplasma (Figura 40A). Por otra parte, se midieron los niveles de colesterol intracelular total en los trofozoítos silenciados; los trofozoítos KD *Ehnpc2* presentaron menor cantidad de colesterol intracelular

(1.9 ng/μl), en comparación con los parásitos KD *Ehnpc1* (2.8 ng/μl); mientras que los trofozoítos transfectados con el vector vacío presentaron 4.0 ng/μl (Figura 40B). Estos resultados sugieren fuertemente que EhNPC1 y EhNPC2 son indispensables para la captación del colesterol del medio.

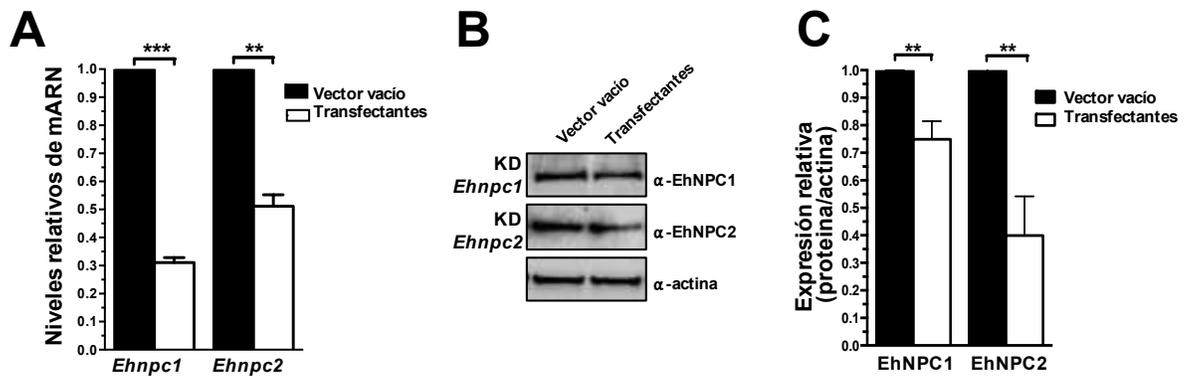


Figura 39. Silenciamiento de los genes *Ehnpc1* y *Ehnpc2* en *E. histolytica*. (A) Trofozoítos de la clona G3 fueron transfectados con los plásmidos *psAP-2*, *psAP-2Ehnpc1* o *psAP-2Ehnpc2a* y se seleccionaron poblaciones estables con 4 μ g/ml de G-418. Mediante ensayos de RT-qPCR se analizaron los genes *Ehnpc1* y *Ehnpc2a* usando mRNA de los trofozoítos transfectados (vector vacío, KD *Ehnpc1* y KD *Ehnpc2*) y oligonucleótidos específicos. Como control interno se empleó el gen ribosomal *s2*. (B) Extractos totales de trofozoítos transfectados fueron procesados para WB usando los anticuerpos α -EhNPC1 y α -EhNPC2. Como un control de carga, la misma membrana fue re-inmunodetectada con el anticuerpo α -actina. (C) Análisis densitométrico de las bandas mostradas en (B), normalizadas con la proteína actina.

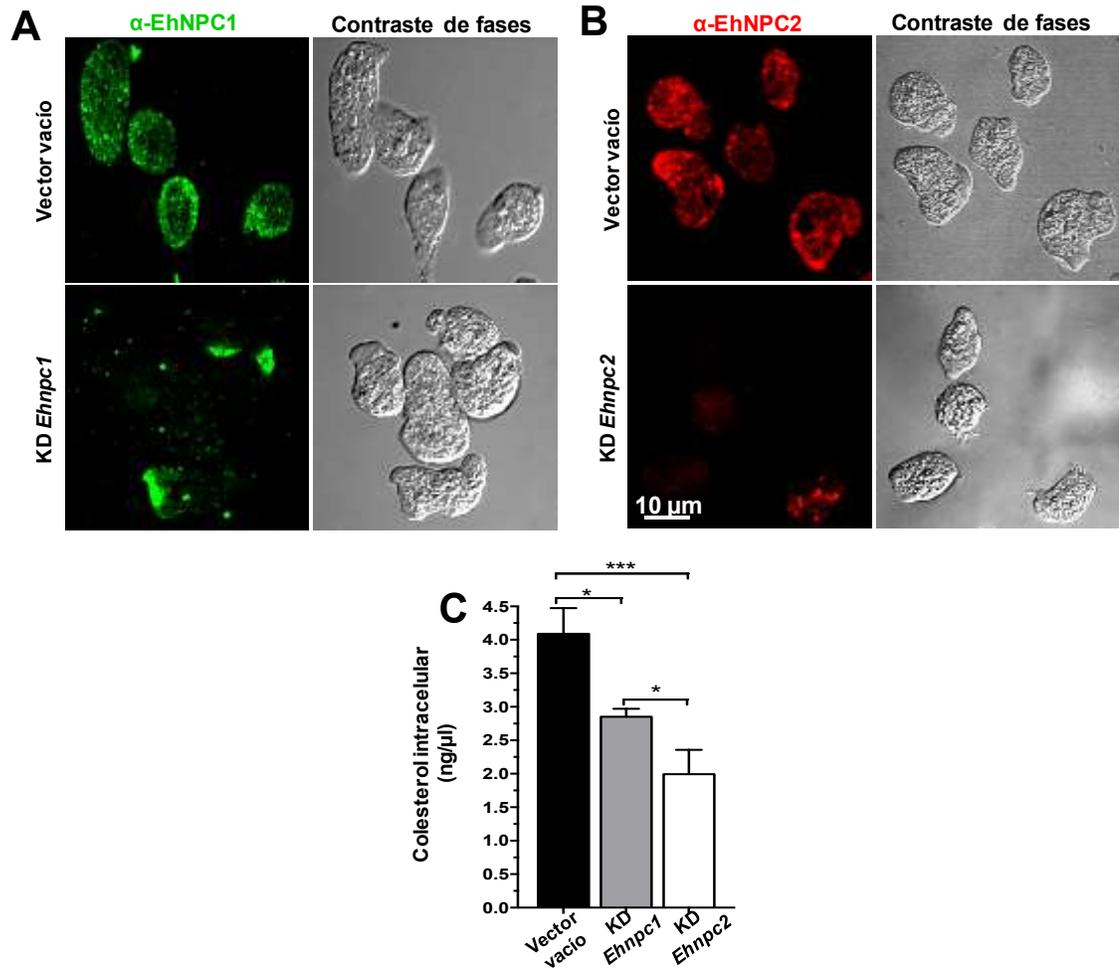


Figura 40. Localización de EhNPC1 y EhNPC2, y concentración intracelular de colesterol en trofozoítos transfectados. Los trofozoítos transfectados con el vector vacío y silenciado en *Ehnpc1* (KD *Ehnpc1*) y en *Ehnpc2* (KD *Ehnpc2*) se montaron en laminillas y se prepararon para analizarse mediante microscopía confocal (A) en condiciones basales usando anticuerpos α -EhNPC1 o α -EhNPC2. Se midió la concentración intracelular de colesterol (B) en trofozoítos transfectados en condiciones basales mediante un kit para cuantificación de colesterol. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

A continuación, se evaluó la tasa de eritrofagocitosis en estos trofozoítos silenciados. Durante los tiempos tempranos de la fagocitosis (2 a 5 min), los trofozoítos KD *Ehnpc1* y los trofozoítos control, ingirieron la misma cantidad de eritrocitos (6 eritrocitos/trofozoítos). Sin embargo, después de 5 min, los trofozoítos KD *Ehnpc1* no ingirieron más de 10 eritrocitos/trofozoíto, en comparación con los trofozoítos control, que continuaron ingiriendo eritrocitos (aproximadamente 18 eritrocitos/trofozoíto) hasta los 30 min (Figura 41A,B). Por otra parte, de 2 a 15 min de fagocitosis, los trofozoítos KD *Ehnpc2* ingirieron de 4 a 10 eritrocitos/trofozoíto en comparación con los trofozoítos control, los cuales ingirieron de 5.6 a 14.4 eritrocitos/trofozoíto. Sin embargo, a los 30 min de eritrofagocitosis, los trofozoítos KD *Ehnpc2* recuperaron la tasa de eritrofagocitosis e ingirieron una media de 18 eritrocitos/trofozoítos, similar a los trofozoítos control (Figura 41A,B). Estos resultados sugieren que en los trofozoítos KD *Ehnpc2*, la tasa de eritrofagocitosis fue afectada solamente en los tiempos tempranos de la cinética, mientras que en los trofozoítos KD *Ehnpc1* este proceso se afectó sólo después de 10 min de contacto con los eritrocitos (Figura 41A,B).

Para evaluar el impacto del silenciamiento de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en la movilidad de los trofozoítos, estos se colocaron en la parte superior de un transwell y se contó el número de trofozoítos que fueron capaces de migrar hacia la parte inferior de la cámara, siguiendo un estímulo de suero. De manera interesante, después de 3 h de incubación, los trofozoítos KD *Ehnpc1* permanecieron en la parte superior, mostrando incapacidad de migración, mientras que los trofozoítos KD *Ehnpc2* mostraron una migración similar a los trofozoítos control (Figura 41C).

Estos resultados en conjunto revelan que las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 no tienen una función redundante, pero si son capaces de cooperar durante el tráfico de colesterol y de esta manera facilitar y hacer más eficiente la captación y el transporte del colesterol.

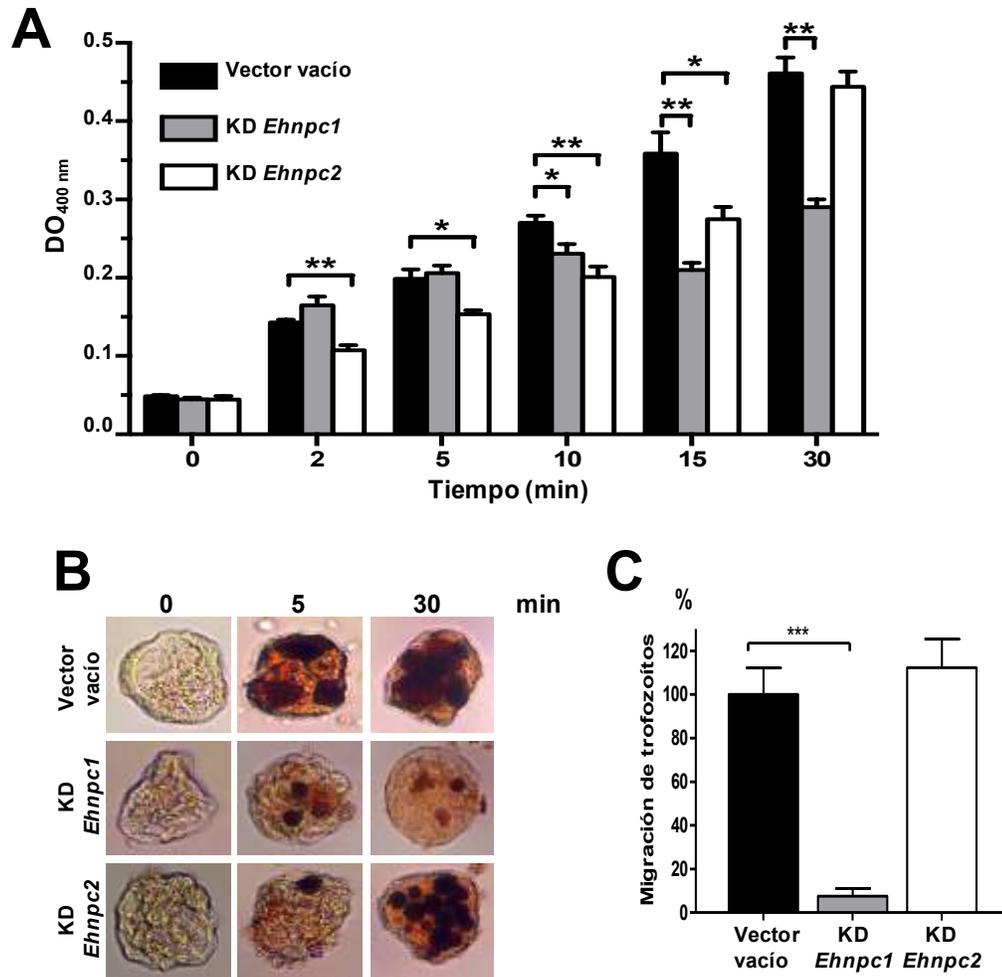


Figura 41. Alteración en la tasa eritrofagocítica y movilidad en trofozoítos transfectados. A) Tasa de eritrofagocitosis de trofozoítos mutantes en KD *Ehnpc1* y KD *Ehnpc2*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. B) Imágenes representativas de trofozoítos donde se muestran los eritrocitos ingeridos teñidos con diaminobencidina, a diferentes tiempos. C) Migración de trofozoítos mutantes en KD *Ehnpc1* y KD *Ehnpc2*, a través de filtros transwell. *** $p < 0.001$.

9. DISCUSIÓN

El protozooario *E. histolytica* es un parásito altamente fagocítico, que requiere de colesterol para su supervivencia y virulencia. Se sabe que este parásito no es capaz de sintetizar colesterol, por lo tanto, lo toma del medio donde se encuentra. Recientemente se ha propuesto que la proteína TMK39 podría participar en la captura de lipoproteínas LDL (Christy *et al.*, 2012), aunque se desconoce realmente cómo se lleva a cabo la captación/tráfico de colesterol desde el exterior celular. En eucariontes superiores se han descrito las proteínas NPC1 y NPC2, las cuáles son las responsables de distribuir el colesterol en los endosomas tardíos/lisosomas (Davies *et al.*, 2000a).

A través del análisis *in silico* y de distintas herramientas experimentales, en este trabajo demostramos que el protozooario *E. histolytica* posee un gen *Ehnpc1* y dos genes *Ehnpc2*. Contrario a lo encontrado en la mayoría de los organismos eucariontes, donde existen generalmente dos genes *npc1* (*npc1* y *npc1l1*) y un gen *npc2* (Akaboshi *et al.*, 1995, Davies *et al.*, 2000b). Ensayos de modelaje molecular e inmunoprecipitación mostraron que las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 pueden interaccionar entre ellas y con el colesterol con bajas energías de asociación, los valores bajos podrían corresponder a interacciones cortas entre proteínas y el esteroide para permitir la correcta y rápida transferencia de colesterol entre ambas proteínas, EhNPC1 y EhNPC2a. Los sitios de unión entre la proteína EhNPC2a y EhNPC1 son muy parecidos a los obtenidos con el colesterol, estas diferencia podrían deberse a cambios conformacionales necesarios para la unión de las distintas moléculas, lo cual facilitarían la transferencia de colesterol entre estas proteínas siguiendo el modelo “hand-off” como se ha descrito para eucariontes superiores (Kwon *et al.*, 2009, (Wang *et al.*, 2010). Además, se encontró que estas proteínas EhNPC1 y EhNPC2 se asociaron con EhRab7A y EhADH, mientras que sólo EhNPC2 interactuó con EhSERCA, en los tiempos explorados. Conocer las moléculas involucradas en la captación y el tráfico de colesterol, nos ayudará a entender cómo se lleva a cabo la fusión de vacuolas y la síntesis de membranas. La relevancia de nuestros hallazgos

radica en tres hechos principales; primero: el colesterol es fundamental para la endocitosis y fagocitosis, los cuales son eventos importantes para la nutrición y virulencia de *E. histolytica* (Bansal *et al.*, 2005). Segundo: el colesterol no puede ser sintetizado por los trofozoítos y se conoce muy poco acerca del tráfico de esta molécula en el protozooario, en particular de su captación (Christy *et al.*, 2012). En estos eventos podrían participar las proteínas NPC1 y NPC2, como sucede en organismos superiores. En protozoarios, a excepción de una proteína NPC1-like identificada en *T. gondii* (Lige *et al.*, 2011), no existen estudios sobre la presencia y función de NPC1 y NPC2. Esto hace de *E. histolytica* el primer protozooario en el cual se ha identificado y caracterizado estos genes y las proteínas correspondientes. Tercero: *E. histolytica* presenta un tráfico simple de colesterol comparado con otros eucariontes, dado que depende totalmente del colesterol exógeno, proporcionando así un modelo excelente y menos complicado para dilucidar este intrincado evento en células eucariotas (Davies *et al.*, 2000a).

NPC1 y NPC2 son proteínas ancestrales, altamente conservadas a través de la evolución eucarionte (Higaki *et al.*, 2004); ya que los genes NPC1 humanos y de levadura son genéticamente y funcionalmente intercambiables (Higaki *et al.*, 2004). Nuestros resultados fortalecen esta idea, debido a la alta homología estructural que presenta el cristal del amino terminal de NPC1 y NPC2 de *H. sapiens* y *B. taurus* con las estructuras tridimensionales EhNPC1 y EhNPC2, respectivamente (Kwon *et al.*, 2009). Sin embargo, contrario a otros eucariontes, las proteínas EhNPC2s presentan una cadena de aminoácidos con varios residuos que podrían eventualmente estar en contacto con la membrana, la unión o cercanía de las proteínas a la membrana, hipotéticamente esto, junto con las regiones cargadas positivamente (Kirchhoff *et al.*, 1996), le brinda a EhNPC2 la posibilidad de traslocarse a través de la membrana plasmática, retículo endoplásmico y otros organelos, como sugieren nuestros resultados experimentales, al co-localizar y asociarse con EhSERCA. Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación usando anticuerpos α -EhNPC1 o α -EhNPC2,

confirmamos que ambas proteínas se asocian entre ellas y con el colesterol, en los trofozoítos en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis, aunque generalmente estas proteínas se encuentran de forma separada. Estas características refuerzan la hipótesis de que el modelo “hand-off” podría ser la forma de trabajo para la captación y tráfico de colesterol en *E. histolytica* como se ha observado en eucariontes superiores (Wang *et al.*, 2010).

En este estudio también nos preguntamos: ¿Cómo los trofozoítos de *E. histolytica* llevan el colesterol exógeno a los distintos organelos sin un receptor para LDL canónico? Con los hallazgos de este trabajo, ahora podemos concluir que las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 participan en la detección y captación de colesterol, en su transporte por los endosomas y otros organelos (RE y núcleo), hasta la digestión de los productos endocitados en los fagolisosomas. La proximidad y co-localización de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 en la superficie de los trofozoítos inmediatamente después de un pulso con colesterol y en el comienzo de eritrofagocitosis, así como su detección en los productos secretados, indican que estas proteínas son las encargadas de capturar el colesterol en *E. histolytica*. Sin embargo, no descartamos la participación de otras moléculas del parásito, como la proteína TMK39 (Christy *et al.*, 2012). EhNPC1 y EhNPC2 también están presentes durante el transporte de colesterol exógeno hacia el RE y otros organelos. Además, parecen estar cerca de eritrocitos ingeridos, desde el contacto inicial hasta su digestión, posiblemente extrayendo el colesterol. Esto refuerza la evidencia de la participación de ambas proteínas en el tráfico de colesterol hacia el interior celular; como se ha observado en las células intestinales, donde la proteína NPC1L1 es capaz de internalizar el colesterol extracelular (Davies *et al.*, 2000b). Ambas proteínas se han observado trabajando en conjunto, pero con tareas específicas, dado que no se encuentran formando complejo proteína-proteína todo el tiempo. Las funciones exactas de cada proteína independiente y en complejo necesitan ser estudiadas en el futuro.

Con nuestros experimentos usando trofozoítos cultivados sin suero y sometidos a un estímulo de SBA, podemos sugerir que el colesterol externo es tomado e internalizado por EhNPC1 y EhNPC2 en varios pasos:

- I) Inmediatamente después de que los trofozoítos detectan el colesterol, EhNPC1 y EhNPC2 se organizan en pequeñas vesículas en la membrana plasmática, co-localizando en la mayoría de los casos, pero permaneciendo cercanas y no en complejo en algunas áreas. Es posible especular que EhNPC1 facilita el transporte de EhNPC2 a la membrana plasmática para tomar el colesterol exógeno.
- II) Posteriormente, las pequeñas vacuolas de la membrana crecen en tamaño y cantidad a través del proceso de endocitosis. Cabe señalar que en los tiempos tempranos estas vesículas parecen estar repletas de EhNPC1 y EhNPC2, estando en la mayoría de los casos EhNPC2 orientada hacia el medio externo.
- III) Entonces, las vesículas que contienen EhNPC2 aparecen hacia el exterior celular, asumiendo formas tipo esferas y de salchicha, que están en contacto con las vesículas llenas de colesterol. También es posible distinguir pequeños puntos que contienen EhNPC1. Imágenes de microscopía confocal y ensayos de secreción confirman que EhNPC1 y EhNPC2 están, en efecto, siendo liberadas al medio externo. Al respecto se sabe que al menos NPC2 se localiza en fluido epididimal en humanos (Kirchhoff *et al.*, 1996).
- IV) EhNPC2 aparece en vesículas co-localizando con colesterol dentro de los trofozoítos, frecuentemente haciendo contacto con pequeñas vesículas que contienen EhNPC1, lo que coincide con el papel cooperativo de ambas proteínas en el modelo “hand-off” (Wang *et al.*, 2010).
- V) EhNPC1 y el colesterol forman redes desde la membrana plasmática hacia el RE y el núcleo, donde también aparece EhNPC2. Posiblemente, esta localización permite la mejor internalización y distribución del colesterol.

- VI) El colesterol es llevado hacia la membrana plasmática y vacuolas que están rodeadas por EhNPC1 y que en su interior contienen EhNPC2. Todos estos pasos se representan en la figura 42.

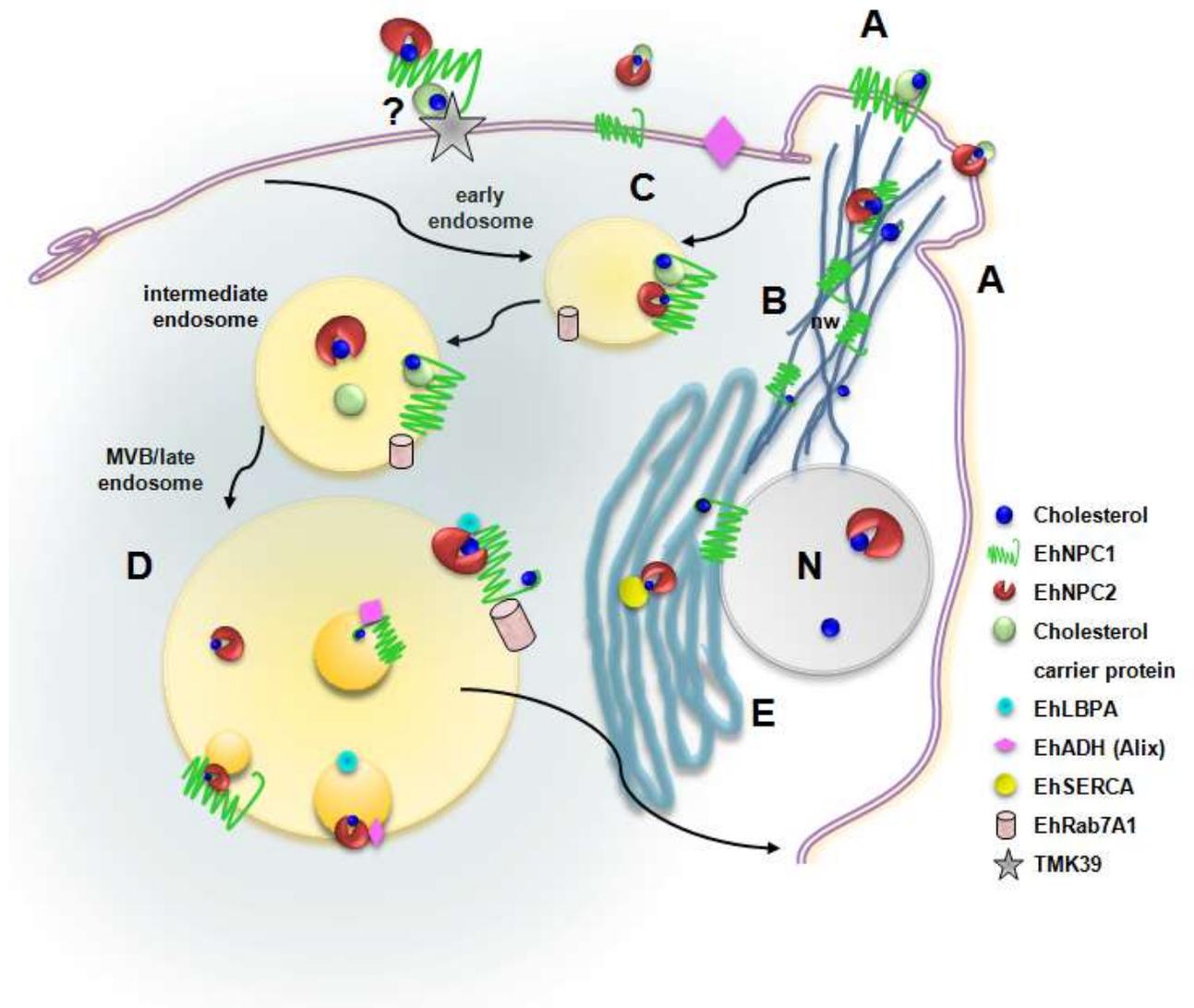


Figura 42. Modelo de la participación de EhNPC1 y EhNPC2 en el tráfico de colesterol en *E. histolytica*. A) Captación de colesterol: EhNPC1 y EhNPC2 capturan el colesterol del espacio extracelular y desde la membrana plasmática probablemente siguiendo el modelo “hand-off”: EhNPC1-colesterol-EhNPC2-colesterol-EhNPC1. B) Formación de estructuras tipo redes: EhNPC1 y el colesterol forman redes que llevan vesículas con EhNPC2. Probablemente estas vesículas transportan el colesterol hacia el RE, endosomas y núcleo, siguiendo el modelo “hand-off”. C) EhNPC1 y EhNPC2 se asocian con el colesterol y son internalizadas en endosomas que contienen EhRab7A, tanto en condiciones basales como durante la eritrofagocitosis. D) EhNPC1 y EhNPC2 se asocian con moléculas fagolisosomales y de los MBVs, particularmente con LBPA y EhADH, las cuales probablemente regulan el tráfico de colesterol. E) EhNPC1 y EhNPC2 se acumulan en el núcleo y RE, a partir de donde se distribuyen hacia otros organelos.

Durante la fagocitosis, la mayoría de estos pasos también fueron evidentes, con algunas particularidades:

- I) La co-localización de EhNPC1 y EhNPC2 es más frecuente después de dos minutos de interacción con eritrocitos, lo cual confirma la movilización y cooperación de ambas proteínas durante la eritrofagocitosis en forma similar al modelo de “hand-off” (Wang *et al.*, 2010).

Los eritrocitos adheridos, pero no los ingeridos, parecen cubrirse de la proteína EhNPC2. Los trofozoítos presentan un canal, con eritrocitos digeridos parcialmente, el cual es decorado principalmente por EhNPC2 y colesterol, mientras que la parte externa de la copa fagocítica fue rodeada por EhNPC1. Ensayos de microscopía confocal usando α -EhSERCA, confirmaron la presencia de EhNPC1 y EhNPC2 en el RE, donde vesículas y redes que contienen EhNPC1 se conectan con otras vesículas con EhNPC1, EhNPC2 y filipina, sugiriendo que el colesterol podría ser transportado del RE hacia otros organelos, incluso su presencia en este compartimento se deba a que es el lugar donde se sintetizan y posiblemente, desde aquí el colesterol sea distribuido hacia otros organelos, como se ha descrito en otros eucariontes superiores (Lange *et al.*, 1999).

- II) Después de 30 y 90 min de eritrofagocitosis, el colesterol aparece junto con EhNPC1 y EhNPC2 en vacuolas, algunas con un tamaño uniforme, dentro de fagolisosomas. De manera interesante, EhRab7A co-localiza en endosomas tardíos con EhNPC1 y EhNPC2. LBPA y EhADH también aparecen cercanos o co-localizando con EhNPC1 y EhNPC2 en fagolisosomas, sugiriendo que podrían participar en la regulación del colesterol, como en las células de mamífero (Chevallier *et al.*, 2008). El colesterol es regresado a la membrana plasmática siguiendo un movimiento similar a EhNPC1 y EhNPC2. Los análisis de inmunoprecipitación muestran que EhNPC1 y EhNPC2 se asocian, directa o indirectamente, con moléculas involucradas en la endocitosis, tales como EhADH, EhRab7A y colesterol. Nuestros datos sugieren que el papel de

EhNPC1 y EhNPC2 no termina hasta finalizar el proceso de digestión, donde ya no hay más colesterol disponible en el eritrocito fagocitado (Figuras 31-35).

Aunque se sabe que la adición de liposomas ricos en colesterol incrementa la virulencia del parásito (Serrano-Luna *et al.*, 2010), en este trabajo se analizó el efecto de la reducción de colesterol y la inhibición del tráfico de colesterol en trofozoítos, sobre las propiedades de virulencia, mediante el uso de la droga U18. Como era de esperarse, la fagocitosis y la destrucción de monocapas de células epiteliales fueron afectadas por la falta de colesterol, debido a que ambos eventos requieren de la síntesis de membranas para la formación de vacuolas y endosomas. De acuerdo a nuestros resultados, el 50% del colesterol presente en los trofozoítos control fue suficiente para adherirse a los eritrocitos. Sin embargo, nuestros resultados difieren de otros reportes que indican que la adhesión es más eficiente en altas concentraciones de colesterol (Mittal *et al.*, 2008). Aquí, nosotros disminuimos la concentración de colesterol y bloqueamos su tráfico dentro de las células. Posiblemente, el uso de diferentes concentraciones de colesterol podría explicar estas discrepancias. Nuestros resultados al analizar la capacidad de adhesión de los trofozoítos a eritrocitos no se vio afectada cuando se acumuló el colesterol, posiblemente este arresto en el tráfico de colesterol no modifique los sitios donde se localizan los receptores para eritrocitos, es decir, las balsas lipídicas; los cuales son microdominios de membranas enriquecidos en colesterol. Por otra parte, el análisis citotóxico tampoco se observó alterado, indicando que el contenido de proteasas no se modificó al arrestar el tráfico de colesterol. Por lo tanto se confirmó que el contenido de moléculas, en algunos sitios específicos, no depende del tráfico de colesterol.

De mayor interés aún, fue determinar cómo se ve afectada la virulencia *in vivo* bajo estas mismas condiciones. En efecto al interferir con el movimiento de colesterol con la droga U18, se reduce significativamente la virulencia de los trofozoítos en el modelo de infección de colon en ratón, posiblemente el

bloqueo del tráfico de colesterol inhibe la formación de membranas nuevas necesarias para el desplazamiento de los trofozoítos en el epitelio del intestino, aunque no se descarta la posibilidad de que el microambiente presente en el intestino afecte también la capacidad del trofozoítos para causar daño. Por último, los trofozoítos silenciados en *Ehnpc1* y *Ehnpc2* que muestran menor contenido de colesterol, también presentan una tasa eritrofagocítica diferencial, indicando que probablemente la proteína EhNPC2 sea la primera en responder al estímulo con eritrocitos, saliendo por el colesterol de estos; seguida posteriormente por la proteína EhNPC1, la cual cooperaría en la entrada/traslocación de EhNPC2+colesterol hacia el interior del trofozoíto.

Las proteínas EhNPC1 y EhNPC2 son moléculas involucradas en la captación y transporte de colesterol, indispensable para la síntesis de membranas, además EhNPC1 es necesaria para el movimiento de los trofozoítos, por lo tanto más adelante se podrían buscar estrategias dirigidas hacia estas proteínas y de esta manera ayudar a diseñar un mecanismo o terapia que ayude a combatir la amibiasis.

10. CONCLUSIÓN

Este estudio provee la primera evidencia de la presencia de proteínas que transportan el colesterol: EhNPC1 y EhNPC2 en *E. histolytica*. Las cuales participan en la captación del colesterol exógeno y en su tráfico intracelular. Combinando los resultados aquí mostrados con lo obtenido en otros organismos eucariontes, nosotros proponemos que EhNPC2 es transportada por EhNPC1 hacia la membrana plasmática y hacia el exterior celular. Pero, ¿cómo entra EhNPC2 en los eritrocitos fagocitados? Nosotros hipotetizamos que el modelo “hand-off” propuesto en células de mamíferos (Wang *et al.*, 2010) podría funcionar de manera similar en los trofozoítos de *E. histolytica*. Esto implica que EhNPC2 se moviliza hacia la membrana plasmática, junto con EhNPC1 y, de ahí, el colesterol es transportado a través del medio hidrofóbico, alcanzando de manera eficiente sus organelos blanco y facilitando así la expresión de las propiedades de virulencia que requieren la síntesis de membrana y fusión de vacuolas. El transporte de colesterol es de vital importancia para la virulencia de *E. histolytica*, y como hemos observado, requiere de la participación de las proteínas EhNPC1 y EhNPC2, haciendo de estas proteínas probables blancos terapéuticos para generar vacunas contra este parásito.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar los cambios de expresión, a nivel de transcrito y proteína, de EhNPC1 y EhNPC2 durante la eritrofagocitosis.
- Analizar los cambios de expresión, a nivel de transcrito y proteína, de EhNPC1 y EhNPC2 durante la eritrofagocitosis de trofozoítos silenciados.
- Verificar experimentalmente la asociación del colesterol con las proteínas recombinantes rEhNPC2a y rEhNPC2b.
- Evaluar si las regiones de EhNPC1 y EhNPC2 predichas por nuestros resultados bioinformáticos, son las responsables de su unión al colesterol mediante la clonación y expresión de estas regiones.
- Analizar la virulencia *in vivo* de los trofozoítos deficientes en EhNPC1 y EhNPC2 sobre el daño a la barrera epitelial en intestino de ratones de la cepa C57BL/6.

12. REFERENCIASReferences

- SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. [WWW document]. URL http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/sinave/intd_sinave.html
- Akaboshi, S. and Ohno, K. (1995). [Niemann-Pick disease type C]. *Nihon Rinsho* **53**, 3036-3040.
- Alberts, B., Johnson, A. and Lewis, J. (2002) *Molecular Biology of the Cell* New York, Garland Science.
- Andra, J., Berninghausen, O. and Leippe, M. (2004). Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett* **564**, 109-115.
- Aniento, F. and Gruenberg, J. (1995). Membrane transport from early to late endosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 205-209.
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Lagunes-Guillen, A., *et al.* (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* **11**, e1005079.
- Babalola, J.O., Wendeler, M., Breiden, B., Arenz, C., Schwarzmann, G., Locatelli-Hoops, S. and Sandhoff, K. (2007). Development of an assay for the intermembrane transfer of cholesterol by Niemann-Pick C2 protein. *Biol Chem* **388**, 617-626.
- Bansal, D., Bhatti, H.S. and Sehgal, R. (2005). Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids Health Dis* **4**, 10.
- Banuelos, C., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I. and Orozco, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp Parasitol* **110**, 292-297.
- Berrueta, T.U. (2015). ENTAMOEBOISIS o AMIBIASIS o AMEBIASIS. [WWW document]. URL <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>
- Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Banuelos, C., Gonzalez-Mariscal, L., Schnoor, M. and Orozco, E. (2013). The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One* **8**, e65100.
- Biagi, F. (1962). Pathogenesis of amebiasis: the parasite. *Gac Med Mex* **92**, 143-145.
- Bolaños Rebolledo, J. and Orozco Orozco, E. (2012) Efecto de la acumulacion de colesterol en la virulencia in vitro de entamoeba histolytica. In *Infectómica y Patogénesis Molecular*. D. F., CINVESTAV.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y. and Mirelman, D. (2003). Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell* **2**, 295-305.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Carstea, E. D., Morris J. A., Coleman K. G., Loftus S. K., Zhang D., *et al.* (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **277**, 228-231.
- Castellanos-Castro, S., Cerda-García-Rojas, C.M., Javier-Reyna, R., Pais-Morales, J., Chávez-Munguía, B. and Orozco, E. (2016a). Identification of the phospholipid

- lysobisphosphatidic acid in the protozoan *Entamoeba histolytica*: An active molecule in endocytosis. *Biochemistry and Biophysics Reports* **5**, 224-236.
- Castellanos-Castro, S., Montano, S. and Orozco, E. (2016b). Data on docking and dynamics simulation of *Entamoeba histolytica* EhADH (an ALIX protein) and lysobisphosphatidic acid. *Data Brief* **7**, 457-459.
- CDC. (2015). Center for disease control and prevention. [WWW document]. URL <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/index.html>
- Cenedella, R.J., Jacob, R., Borchman, D., Tang, D., Neely, A.R., Samadi, A., *et al.* (2004). Direct perturbation of lens membrane structure may contribute to cataracts caused by U18666A, an oxidosqualene cyclase inhibitor. *J Lipid Res* **45**, 1232-1241.
- Chang, TY, Reid, PC, Sugii, S, *et al.* (2005a). Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking
J Biol Chem **280**, 20917-20920.
- Chang, T.Y., Reid, P.C., Sugii, S., Ohgami, N., Cruz, J.C. and Chang, C.C. (2005b). Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem* **280**, 20917-20920.
- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Gonzalez-Lazaro, M., Gonzalez-Robles, A., Cedillo-Rivera, R., Bonilla, P. and Martinez-Palomo, A. (2007). Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitol Res* **100**, 1169-1175.
- Chen, F.W., Gordon, R.E. and Ioannou, Y.A. (2005). NPC1 late endosomes contain elevated levels of non-esterified ('free') fatty acids and an abnormally glycosylated form of the NPC2 protein. *Biochem J* **390**, 549-561.
- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., *et al.* (2008). Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem* **283**, 27871-27880.
- Chikh, K., Vey, S., Simonot, C., Vanier, M.T. and Millat, G. (2004). Niemann-Pick type C disease: importance of N-glycosylation sites for function and cellular location of the NPC2 protein. *Mol Genet Metab* **83**, 220-230.
- Christy, N.C., Buss, S.N. and Petri, W.A., Jr. (2012). Common pathways for receptor-mediated ingestion of *Escherichia coli* and LDL cholesterol by *Entamoeba histolytica* regulated in part by transmembrane kinase 39. *Int J Parasitol* **42**, 393-400.
- Dancygier, H. (2009) *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. 1 edn., Springer; 1 edition
- Das, S. and Gillin, F.D. (1991). Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*. *Biochem J* **280 (Pt 3)**, 641-647.
- Das, S., Stevens, T., Castillo, C., Villasenor, A., Arredondo, H. and Reddy, K. (2002). Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol* **32**, 655-675.
- Davies, J.P. and Ioannou, Y.A. (2000a). 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**, 24367-24374.
- Davies, J.P., Levy, B. and Ioannou, Y.A. (2000b). Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1. *Genomics* **65**, 137-145.
- Delton-Vandenbroucke, I., Bouvier, J., Makino, A., Besson, N., Pageaux, J.F., Lagarde, M. and Kobayashi, T. (2007). Anti-bis(monoacylglycero)phosphate antibody accumulates acetylated LDL-derived cholesterol in cultured macrophages. *J Lipid Res* **48**, 543-552.

- Derewenda, U., Li, J., Derewenda, Z., Dauter, Z., Mueller, G.A., Rule, G.S. and Benjamin, D.C. (2002). The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. *J Mol Biol* **318**, 189-197.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**, 431-432.
- Dixit, S.S., Jadot, M., Sohar, I., Sleat, D.E., Stock, A.M. and Lobel, P. (2011). Loss of Niemann-Pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway. *PLoS One* **6**, e23677.
- Espinosa-Cantellano, M. and Martinez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* **13**, 318-331.
- Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., *et al.* (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* **5**, 781-792.
- Friedland, N., Liou, H.L., Lobel, P. and Stock, A.M. (2003). Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2512-2517.
- Gruenberg, J. and Maxfield, F.R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 552-563.
- Gruenberg, J. and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-323.
- Higaki, K., Almanzar-Paramio, D. and Sturley, S.L. (2004). Metazoan and microbial models of Niemann-Pick Type C disease. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 38-47.
- Ichikawa, S., Hatanaka, H., Yuuki, T., Iwamoto, N., Kojima, S., Nishiyama, C., *et al.* (1998). Solution structure of Der f 2, the major mite allergen for atopic diseases. *J Biol Chem* **273**, 356-360.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125-138.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2002). ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* **27**, 219-221.
- Ioannou, Y.A. (2000). The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab* **71**, 175-181.
- Kirchhoff, C., Osterhoff, C. and Young, L. (1996). Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol Reprod* **54**, 847-856.
- Kissoon-Singh, V., Moreau, F., Trusevych, E. and Chadee, K. (2013). *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. *Am J Pathol* **182**, 852-865.
- Ko, D.C., Binkley, J., Sidow, A. and Scott, M.P. (2003). The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2518-2525.
- Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., *et al.* (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* **1**, 113-118.
- Koh, C.H. and Cheung, N.S. (2006). Cellular mechanism of U18666A-mediated apoptosis in cultured murine cortical neurons: bridging Niemann-Pick disease type C and Alzheimer's disease. *Cell Signal* **18**, 1844-1853.

- Kolter, T. and Sandhoff, K. (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.
- Kwon, H.J., Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Infante, R.E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* **137**, 1213-1224.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M. and Steck, T.L. (1999). Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* **40**, 2264-2270.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M. and Steck, T.L. (2002). Dynamics of lysosomal cholesterol in Niemann-Pick type C and normal human fibroblasts. *Journal of lipid research* **43**, 198-204.
- Letourneur, F. and Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-1157.
- Li, X., Saha, P., Li, J., Blobel, G. and Pfeffer, S.R. (2016). Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle luminal domain bound to NPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10079-10084.
- Lidell, M.E., Moncada, D.M., Chadee, K. and Hansson, G.C. (2006). Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9298-9303.
- Lige, B., Romano, J.D., Bandaru, V.V., Ehrenman, K., Levitskaya, J., Sampels, V., *et al.* (2011). Deficiency of a Niemann-Pick, type C1-related protein in toxoplasma is associated with multiple lipidoses and increased pathogenicity. *PLoS Pathog* **7**, e1002410.
- Liscum, L. and Collins, G.J. (1991). Characterization of Chinese hamster ovary cells that are resistant to 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one inhibition of low density lipoprotein-derived cholesterol metabolism. *J Biol Chem* **266**, 16599-16606.
- Liscum, L. and Dahl, N.K. (1992). Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* **33**, 1239-1254.
- Lodish, H., Berk, A. and Zipursky, S. (2000) Molecular Cell Biology. In, 4 edn. New York.
- Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., *et al.* (1997). Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* **277**, 232-235.
- Lopez-Reyes, Israel, García-Rivera, Guillermina, Bañuelos, Cecilia, *et al.* (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in Entamoeba histolytica and Characterization of the EhVps4 Protein. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**.
- Lopez-Romero, E. and Villagomez-Castro, J.C. (1993). Encystation in Entamoeba invadens. *Parasitol Today* **9**, 225-227.
- Martinez-Higuera, A., Salas-Casas, A., Calixto-Galvez, M., Chavez-Munguia, B., Perez-Ishiwara, D.G., Ximenez, C. and Rodriguez, M.A. (2013). Identification of calcium-transporting ATPases of Entamoeba histolytica and cellular localization of the putative SERCA. *Exp Parasitol* **135**, 79-86.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., *et al.* (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-534.

- Michelsen, U. and von Hagen, J. (2009). Isolation of subcellular organelles and structures. *Methods Enzymol* **463**, 305-328.
- Mittal, K., Welter, B.H. and Temesvari, L.A. (2008). Entamoeba histolytica: lipid rafts are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components. *Exp Parasitol* **120**, 127-134.
- Mortimer, L. and Chadee, K. (2010). The immunopathogenesis of Entamoeba histolytica. *Exp Parasitol* **126**, 366-380.
- Mukherjee, S, Maxfield and FR. (2004). Lipid and cholesterol trafficking in NPC. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 28-37.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V. and Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Mol Biol Cell* **16**, 5294-5303.
- Naureckiene, S., E., D., Sleat, H., Lackland, *et al.* (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* **290**, 2298-2301.
- Ocadiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L.I., Ortega-Lopez, J., Garcia-Perez, R.M., *et al.* (2005). EhCP112 is an Entamoeba histolytica secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* **7**, 221-232.
- Olivos-Garcia, A., Saavedra, E., Ramos-Martinez, E., Nequiz, M. and Perez-Tamayo, R. (2009). Molecular nature of virulence in Entamoeba histolytica. *Infect Genet Evol* **9**, 1033-1037.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. and Sanchez, T. (1983). Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158**, 1511-1521.
- Patterson, M.C., Vanier, M.T., Suzuki, K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Neufeld, E.B., *et al.* (2001). Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. *McGraw-Hill*. **3**, 3611-3633.
- Petri, W.A., Jr., Chapman, M.D., Snodgrass, T., Mann, B.J., Broman, J. and Ravdin, J.I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. *J Biol Chem* **264**, 3007-3012.
- Piper, R.C. and Katzmann, D.J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 519-547.
- Pritt, B.S. and Clark, C.G. (2008). Amebiasis. *Mayo Clin Proc* **83**, 1154-1159; quiz 1159-1160.
- Reagan, J.W., Jr., Hubbert, M.L. and Shelness, G.S. (2000). Posttranslational regulation of acid sphingomyelinase in niemann-pick type C1 fibroblasts and free cholesterol-enriched chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **275**, 38104-38110.
- Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H. and Gigli, I. (1989). Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. *J Immunol* **143**, 189-195.
- Rodriguez, M.A., Garcia-Perez, R.M., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., Mendoza, L., Ortiz-Navarrete, V. and Orozco, E. (2000). An Entamoeba histolytica rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem Parasitol* **108**, 199-206.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M. and Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *J Biol Chem* **279**, 49497-49507.
- Salvioli, R., Scarpa, S., Ciaffoni, F., Tatti, M., Ramoni, C., Vanier, M.T. and Vaccaro, A.M. (2004). Glucosylceramidase mass and subcellular localization are modulated by cholesterol in Niemann-Pick disease type C. *J Biol Chem* **279**, 17674-17680.

- Sawyer, M.K., Bischoff, J.M., Guidry, M.A. and Reeves, R.E. (1967). Lipids from *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* **20**, 295-302.
- Schroeder, F. and Nemezc, G. (1990) Transmembrane cholesterol distribution. In *Advances in Cholesterol Research*. West Caldwell, NJ, Telford Press, pp. 47-87.
- Sehgal, D., Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S. (1996). Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci.* **21**, 423-432.
- Serrano-Luna, J., Gutierrez-Meza, M., Mejia-Zepeda, R., Galindo-Gomez, S., Tsutsumi, V. and Shibayama, M. (2010). Effect of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes on *Entamoeba histolytica* virulence. *Can J Microbiol* **56**, 987-995.
- Shibayama, M., Campos-Rodriguez, R., Ramirez-Rosales, A., Flores-Romo, L., Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A. and Tsutsumi, V. (1998). *Entamoeba histolytica*: liver invasion and abscess production by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Exp Parasitol* **88**, 20-27.
- Simons, K. and Ikonen, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721-1726.
- SINAVE. (2012). SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. [WWW document]. URL http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/sinave/intd_sinave.html
- Storch, J. and Xu, Z. (2009). Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 671-678.
- Strauss, J.F., 3rd, Liu, P., Christenson, L.K. and Watari, H. (2002). Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. *Steroids* **67**, 947-951.
- Sturley, SL, Patterson, MC, Balch, W, *et al.* (2004). The pathophysiology and mechanisms of NP-C disease. *Biochim Biophys Acta* **1685**, 83-87.
- Van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-124.
- Van Vliet, H.H., Spies, F., Linnemans, W.A., Klepke, A., Op den Kamp, J.A. and van Deenen, L.L. (1976). Isolation and characterization of subcellular membranes of *Entamoeba invadens*. *J Cell Biol* **71**, 357-369.
- Vance and JE (2006). Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann- Pick C disease. *FEBS Lett* **580**, 5518-5524.
- Vanier, M.T. and Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet* **64**, 269-281.
- Wang, M.L., Motamed, M., Infante, R.E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H.J., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2010). Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab* **12**, 166-173.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Sun, G., Glick, J.M., Patel, S., *et al.* (2000). NPC1-containing compartment of human granulosa-lutein cells: a role in the intracellular trafficking of cholesterol supporting steroidogenesis. *Exp Cell Res* **255**, 56-66.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Neufeld, E.B., Patel, S., *et al.* (1999). Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *J Biol Chem* **274**, 21861-21866.
- Welter, B.H., Laughlin, R.C. and Temesvari, L.A. (2002). Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **121**, 254-264.
- Wright, C.S., Li, S.C. and Rastinejad, F. (2000). Crystal structure of human GM2-activator protein with a novel beta-cup topology. *J Mol Biol* **304**, 411-422.

- Xu, S., Benoff, B., Liou, H.L., Lobel, P. and Stock, A.M. (2007). Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *J Biol Chem* **282**, 23525-23531.
- Xu, Z., Farver, W., Kodukula, S. and Storch, J. (2008). Regulation of sterol transport between membranes and NPC2. *Biochemistry* **47**, 11134-11143.
- Yu, J., Carroll, T.J. and McMahon, A.P. (2002). Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development* **129**, 5301-5312.

RESEARCH ARTICLE

EhNPC1 and EhNPC2 Proteins Participate in Trafficking of Exogenous Cholesterol in *Entamoeba histolytica* Trophozoites: Relevance for Phagocytosis

Jeni Bolaños¹, Abigail Betanzos^{1,2}, Rosario Javier-Reyna¹, Guillermina García-Rivera¹, Miriam Huerta¹, Jonnatan Pais-Morales¹, Arturo González-Robles¹, Mario A. Rodríguez¹, Michael Schnoor³, Esther Orozco^{1*}

1 Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, D.F., México, **2** Cátedras, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, D.F., México, **3** Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, D.F., México

* esther@cinvesjv.mx


 OPEN ACCESS

Citation: Bolaños J, Betanzos A, Javier-Reyna R, García-Rivera G, Huerta M, Pais-Morales J, et al. (2016) EhNPC1 and EhNPC2 Proteins Participate in Trafficking of Exogenous Cholesterol in *Entamoeba histolytica* Trophozoites: Relevance for Phagocytosis. *PLoS Pathog* 12(12): e1006089. doi:10.1371/journal.ppat.1006089

Editor: William A. Petri, Jr., University of Virginia Health System, UNITED STATES

Received: November 3, 2016

Accepted: November 25, 2016

Published: December 21, 2016

Copyright: © 2016 Bolaños et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT; Grant number 220949). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Entamoeba histolytica, the highly phagocytic protozoan causative of human amoebiasis lacks the machinery to synthesize cholesterol. Here, we investigated the presence of NPC1 and NPC2 proteins in this parasite, which are involved in cholesterol trafficking in mammals. Bioinformatics analysis revealed one *Ehnpc1* and two *Ehnpc2* genes. EhNPC1 appeared as a transmembrane protein and both EhNPC2 as peripheral membrane proteins. Molecular docking predicted that EhNPC1 and EhNPC2 bind cholesterol and interact with each other. Genes and proteins were identified in trophozoites. Serum pulse-chase and confocal microscopy assays unveiled that after trophozoites sensed the cholesterol source, EhNPC1 and EhNPC2 were organized around the plasma membrane in a punctuated pattern. Vesicles emerged and increased in number and size and some appeared full of cholesterol with EhNPC1 or EhNPC2 facing the extracellular space. Both proteins, but mostly EhNPC2, were found out of the cell associated with cholesterol. EhNPC1 and cholesterol formed networks from the plasma membrane to the nucleus. EhNPC2 appeared in erythrocytes that were being ingested by trophozoites, co-localizing with cholesterol of erythrocytes, whereas EhNPC1 surrounded the phagocytic cup. EhNPC1 and EhNPC2 co-localized with EhSERCA in the endoplasmic reticulum and with lysobisphosphatidic acid and EhADH (an Alix protein) in phagolysosomes. Immunoprecipitation assays confirmed the EhNPC1 and EhNPC2 association with cholesterol, EhRab7A and EhADH. Serum starved and blockage of cholesterol trafficking caused a low rate of phagocytosis and incapability of trophozoites to produce damage in the mouse colon. *Ehnpc1* and *Ehnpc2* knockdown provoked in trophozoites a lower intracellular cholesterol concentration and a diminished rate of phagocytosis; and *Ehnpc1* silencing also produced a decrease of trophozoites movement. Trafficking of EhNPC1 and EhNPC2 during cholesterol uptake and phagocytosis as well as their association with molecules involved in endocytosis strongly suggest that these proteins play a key role in cholesterol uptake.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

NPC1 and NPC2 proteins are involved in cholesterol trafficking in mammals. Using different approaches, we have detected the orthologues EhNPC1 and EhNPC2 proteins in *Entamoeba histolytica*. Trophozoites are particularly rich in membranes and vacuoles, but they do not possess the machinery to synthesize cholesterol. Thus, they are completely dependent on molecules able to “fish” cholesterol from the medium. The relevance of our findings lies in the fact that cholesterol is fundamental for endocytosis and motility; and, phagocytosis is an important nutritional and virulence factor for *E. histolytica*. *In silico* and experimental strategies, using U18666A to arrest cholesterol trafficking, as well as, knockdown mutants, showed that EhNPC1 and EhNPC2 participate in cholesterol uptake and trafficking in this parasite. They are secreted by trophozoites and directly involved in erythrophagocytosis and motility. Our findings revealed *E. histolytica* as one of the first protozoa in which these proteins are being characterized. Moreover, *E. histolytica* provides an excellent and less complicated model to elucidate the intricate event of cholesterol trafficking in eukaryotic cells. The relevance of cholesterol transport for the parasite virulence and the involvement of EhNPC1 and EhNPC2 in this process, make these proteins promising targets for therapy strategies development against the parasite.

Introduction

Entamoeba histolytica is the protozoan responsible for intestinal and hepatic amoebiasis, considered the third leading cause of death worldwide due to parasites [1]. *E. histolytica* trophozoites are highly dynamic cells with active movement and voracious phagocytosis. High cholesterol concentration in the medium enhances their virulence [2–4] and trophozoites loaded with cholesterol showed an enrichment of the Gal/GalNAc lectin in rafts and an increase of amoeba adherence to target cells [5]. Cholesterol is fundamental for vesicle formation and lipid rafts arrangements, and both are crucial events for movement and endocytosis [4]. However, *E. histolytica* lacks the machinery to synthesize cholesterol [6]. Cells ingested by the parasite, including erythrocytes, are a natural cholesterol source, but, trophozoites can also uptake it from the serum-supplemented culture medium [7, 8].

Mammalian cells synthesize cholesterol through a complex pathway, in which at least 30 enzymes participate [9]. Cholesterol homeostasis is controlled by feedback regulation of its biosynthesis and uptake through receptor-mediated endocytosis by low density lipoproteins (LDL) [10]. Failures in cholesterol storage in humans cause the Niemann–Pick type C (NPC) disease, which is linked to mutations in NPC1 or NPC2 proteins that are directly involved in cholesterol trafficking [11, 12]. NPC1 (1278 amino acids) is a polytopic endosomal membrane glycoprotein required for efflux of cholesterol from endosomes [13]. It has 13 transmembrane domains, four luminal and six cytoplasmic loops, a C-terminal cytoplasmic tail and a sterol sensing domain (SSD) [14]. NPC2 (151 amino acids) is a soluble lysosomal protein with a MLD domain (ML [MD-2 (myeloid differentiation factor-2)]-related lipid-recognition) [15, 16] that regulates cholesterol trafficking from lysosomes to the endoplasmic reticulum (ER) [17, 18]. NPC2 possesses positively charged regions that facilitate its interaction with negatively charged membranes [17]. NPC2 binds to NPC1; and NPC1 binds to cholesterol by the SSD domain in an acidic milieu [18]. Moreover, cholesterol is transferred from the N terminus domain (NTD) of NPC1 to NPC2 in a bidirectional manner [19]. Based on this, Infante *et al.* [19] proposed the “hand-off” working model, which assumes that NPC2 takes cholesterol in

the lysosomal lumen and transports it to membrane-bound NPC1 for exportation to the ER [19–21]. In late endosomes, lysobisphosphatidic acid (LBPA) regulates cholesterol, under the control of Alix protein [22, 23]. The molecular mechanisms of this regulation are not completely understood.

In *E. histolytica*, neither LDL receptors, nor NPC1 and NPC2 have been identified yet. The TMK39 protein participates in cholesterol uptake, however, it does not have cholesterol binding domains, suggesting that it could associate to cholesterol through other trophozoite molecules [24]. As in mammals, *E. histolytica* LBPA binds to EhADH (an *E. histolytica* ALIX family protein) [25] inside phagolysosomes and multivesicular bodies (MVB) [26]. Though, we do not discard the participation of other Alix proteins involved in endomembrane trafficking [27, 28]. Thus, it is plausible to assume that the “hand-off” model, “NPC2-NPC1-cholesterol-NPC2-NPC1” proposed for mammalian cells, could also be functioning in trophozoites to first carry exogenous cholesterol inside the cell and then, to transport it to distinct organelles. Here, we searched for NPC1 and NPC2 orthologues in *E. histolytica* and studied their participation in cholesterol uptake and trafficking, as well as their association with molecules involved in phagocytosis. We also provide evidence that cholesterol depletion and trafficking arrest as well as *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes knockdown, affect virulence, particularly erythrophagocytosis and cell motility.

Results

E. histolytica possesses one *npc1* (*Ehnpc1*) and two *npc2* (*Ehnpc2a*, *Ehnpc2b*) genes and their respective proteins bind cholesterol

Our exploration in the AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) revealed the presence of a 1339 amino acid sequence (EHI_080220) with 19.7 to 35% identity to NPC1 proteins of different species (Fig 1A, S1 Table). The putative EhNPC1 protein exhibited the patched (PD) and the SSD domains present in all reported NPC1 proteins [29]. However, it did not show the MMPL domain, found in bacteria as a putative integral membrane protein domain [30]. This domain is also absent in *Dictyostelium discoideum* NPC1 [31] (Fig 1A). We also found two sequences of 141 (EHI_068260) (EhNPC2a) and 146 (EHI_188770) (EhNPC2b) amino acids containing the MLD domain, which is a NPC2 signature [15] (Fig 1B). These sequences showed 29.4% identity between them and 11 to 26% with other NPC2 proteins (S2 Table).

The full length amino acid sequences of EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b were compared with NPC1 and NPC2 protein sequences from other organisms to construct phylogenetic trees using the MEGA 5.05 software. EhNPC1 was grouped in a single clade with *D. discoideum* NPC1 in the branch of slime molds, yeasts and filamentous fungus and far from hypothetical NPC1s from protozoa such as *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* and *Leishmania major* (Fig 1C). Interestingly, EhNPC2a and EhNPC2b also displayed a close relationship with *D. discoideum* NPC2 in the branch of slime molds and yeasts (Fig 1D).

To obtain further evidence on the structural relationship of EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b with their respective orthologues, we constructed their 3D models using RaptorX server (<http://raptorx.uchicago.edu>). The predicted 3D structure of NTD EhNPC1 (1–248 amino acids) presented 92% structural identity to the *Homo sapiens* NTD NPC1 crystal (23 to 252 amino acids) [20]; and their merged images extensively overlapped (Fig 2A). EhNPC1 appeared as a membrane protein with 16 transmembrane domains, two structural regions located in the endosomal lumen, where the NTD is found, as described for other organisms [20], and a single larger domain in the cytosolic side (Fig 2B).

Docking analysis revealed two main interaction sites of EhNPC1 with cholesterol. According to *in silico* predictions, one site was located in the cytosol and the other at the NTD, in the

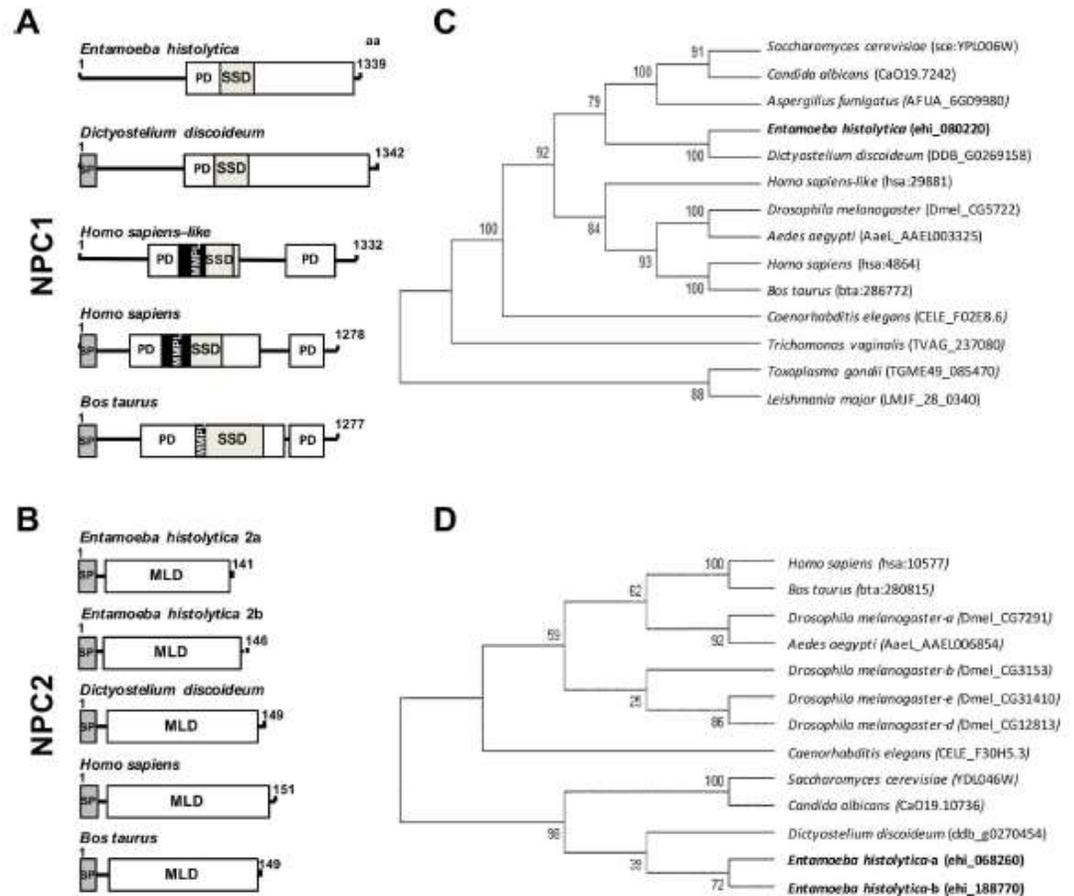


Fig 1. Structural domains and phylogenetic trees of EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b. (A, B) Schemes show the main structural characteristics of NPC1 (A) and NPC2 (B) from distinct organisms. PD: patched domain, SSD: sterol sensing domain, MMPL: putative integral membrane domain, SP: signal peptide, MLD: MD-2 related lipid recognition domain. Numbers at the right correspond to the amino acids forming the proteins. (C, D) Phylogenetic tree indicating the position of *E. histolytica* NPC1 (C), NPC2a and NPC2b (D) proteins among different species. Numbers on horizontal lines in the trees indicate the confidence percentages of the tree topology from bootstrap analysis of 1000 replicates.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g001

endosomal lumen (Fig 2B). Results evidenced hydrophobic interactions of cholesterol with 13 amino acids of EhNPC1 at cytoplasmic domain (Thr670, Asp673, Val671, Val677, Leu721, Val724, Phe725, Ala728, Ala738, Thr743, Ile746, Pro747 and Tyr823); and with eleven residues of the NTD (Val39, Gly41, Glu100, Gln101, Leu104, Met198, Asn203, Pro204, Val205, Met206 and Pro207) (Fig 2B). The binding energies for these sites were $\Delta G = -8.6$ and $\Delta G = -7.3$ Kcal/mol, respectively, indicating a weak binding.

The 3D structures of EhNPC2a and EhNPC2b proteins presented 83.2% structural identity between themselves, and 88.6 and 86% with the *Bos taurus* crystal [32], respectively. EhNPC2 proteins exhibited seven beta strands (Fig 2C and 2D), as described for other NPC2 [32]. Interestingly, EhNPC2a and EhNPC2b displayed an extra amino acid tail at the N-terminus formed

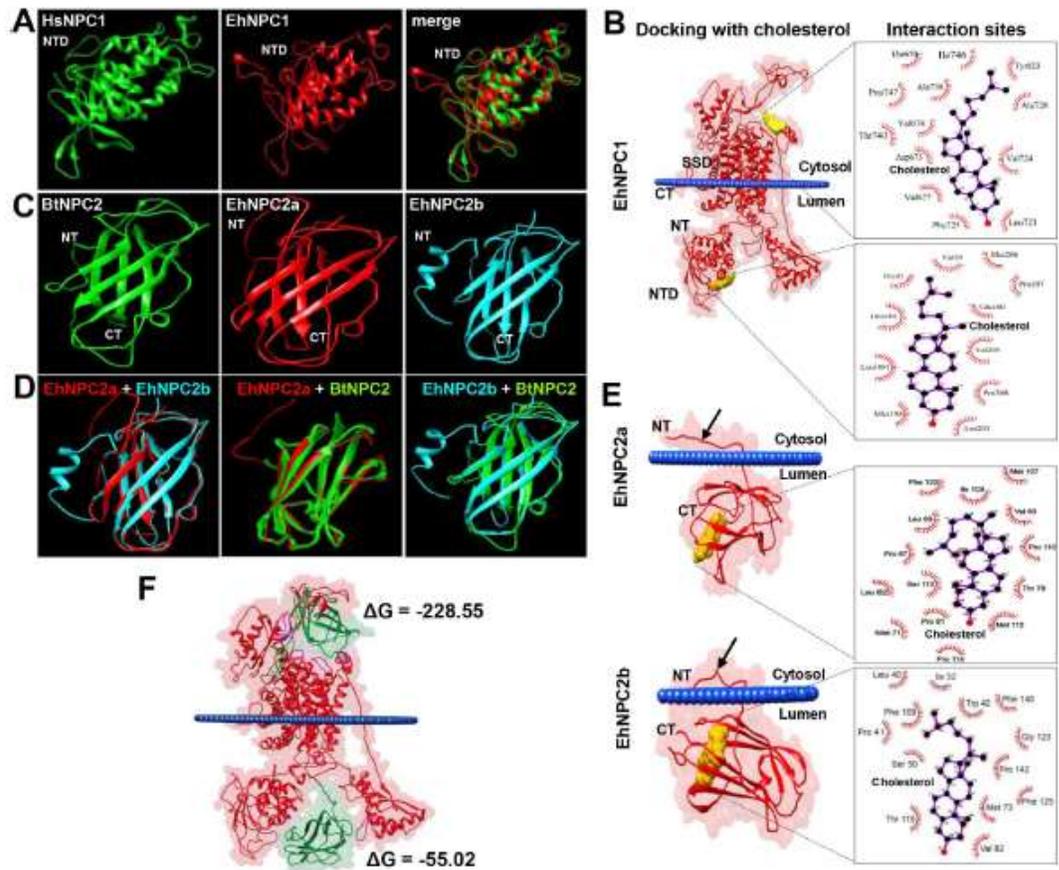


Fig 2. 3D structures of NTD-EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b and molecular dockings between them and with cholesterol. (A) NTD-EhNPC1 model (1 to 250 amino acids) predicted by RaptorX server was compared with the crystal of human NTD-NPC1 protein (HsNPC1) (23 to 254 amino acids). (B) Docking simulation of EhNPC1 with cholesterol performed using the AutoDock Tools V1.5.6 program. SSD: sterol sensing domain. NTD: amino terminal domain. (C, D) The EhNPC2a and EhNPC2b 3D structures (full-length amino acid sequences) were compared between them and with the NPC2 *B. taurus* crystal (BtNPC2). (E) Docking simulation of EhNPC2a and EhNPC2b with cholesterol. Arrows: amino acids tail at the amino terminus that it is not present in the crystal of *Btaurus* NPC2. Squares at the right in B and E show the amino acids involved in the protein-cholesterol interaction. (F) Docking simulation of EhNPC1 and EhNPC2a binding. ΔG : binding energy. Blue lines in dockings: plasmatic membrane. NT: amino terminus. CT: carboxy terminus.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g002

by 14 and 18 residues, respectively (Fig 2C–2E) that have not been reported in other NPC2 orthologues. The Orientation of Proteins in Membranes (OPM) database (<http://opm.phar.umich.edu/>) predicted that in EhNPC2a, Leu11, Phe12, Ala13 and Ala14 residues were attached to the membranes (Fig 2E); whereas in EhNPC2b the residues in contact with membranes were Thr19, Ala18, Leu17, Met16, Leu12 and Phe6 (Fig 2E), these results suggest that both EhNPC2 could be peripheral membrane proteins, which allow them to cross the membranes during cholesterol transport. The EhNPC2a interaction with cholesterol was predicted to be carried out by hydrophobic bonds corresponding to Pro67, Leu69, Met71, Thr78, Val80,

Pro81, Leu82, Met107, Ile109, Pro110, Met112, Ser113 and Phe122 residues (Fig 2E). By contrast, EhNPC2b binds to cholesterol through Leu40, Pro41, Trp42, Ser50, Ile52, Met73, Val82, Thr115, Gly123, Phe125, Phe140 and Pro142 residues (Fig 2E). Amino acids in bold are in comparable positions and separated by the same number of residues in both proteins. The cholesterol binding energies to EhNPC1 and EhNPC2 were also low: $\Delta G = -9$ and -10.15 Kcal/mol, respectively.

We also performed docking analysis using EhNPC1 and EhNPC2. Interestingly, results showed that EhNPC1 presents two putative interaction sites with EhNPC2, in cytosol and endosomal lumen (Fig 2F), with $\Delta G = -228.5$ and -55.02 Kcal/mol, respectively. ΔG values reflect a stronger binding between the proteins compared to those with cholesterol. However, these values are still comparably low, corresponding to rather short-lived interactions. In summary, our bioinformatics analysis revealed that EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b are NPC1 and NPC2 orthologues [21] that interact between them and with cholesterol, suggesting that they could play an important role in cholesterol transport.

Ehnpc1, *Ehnpc2a* and *Ehnpc2b* genes are expressed in trophozoites

To confirm that the genes found *in silico* were *bona fide* genes in the parasite, we designed specific primers (S3 Table) using sequences obtained from the AmoebaDB. PCR amplification from genomic DNA gave 4.0, 0.42 and 0.44 kbp fragments, corresponding to the expected size of *Ehnpc1*, *Ehnpc2a* and *Ehnpc2b* full length genes, respectively (Fig 3A). Sequencing of the three genes revealed full open reading frames, no introns and 100% identity to the genes annotated in the AmoebaDB. RT-PCR assays evidenced bands at the expected size, indicating that genes are transcribed (Fig 3B). Intriguingly, RT-qPCR assays showed that *Ehnpc2a* was expressed 30 folds more than *Ehnpc1* gene, whereas, *Ehnpc2b* was poorly expressed (Fig 3C).

We generated an antibody against an EhNPC1 specific polypeptide (766-DEQPMYDKDG-QYVPVEKRLE-785) that detected in western blot assays the expected single 150 kDa band in trophozoites samples (Fig 3D). Antibodies against EhNPC2a were produced in rats using recombinant proteins. They revealed the expected 17 kDa band (Fig 3E) and it was used as a pan antibody because they recognized both EhNPC2 recombinant proteins (S1 Fig), furthermore, the *Ehnpc2a* gene is transcribed more efficiently than *Ehnpc2b*. Pre-immune sera did not recognize any band (Fig 3D and 3E).

Confocal images showed that in basal conditions (trophozoites cultured in TYI-S medium, without stimulus), 100 and 60% of trophozoites were labeled in plasma membrane by α -EhNPC1 and α -EhNPC2 antibodies, respectively (Fig 3F and 3H), co-localizing with the α -Gal/GalNAc lectin antibody, used as a plasma membrane marker (Fig 3F). However, Pearson coefficient (PC) showed a higher co-localization of Gal/GalNAc lectin with EhNPC2 (Fig 3I). 100 and 80% of trophozoites showed α -EhNPC1 and α -EhNPC2 antibodies label in the cytoplasm, and only 40 and 100% of trophozoites, respectively, presented fluorescence in the nuclei (Fig 3F and 3H). We do not know yet the function, if any, of EhNPC1 and EhNPC2 in the nucleus. In all experiments reported here, we used as controls only the secondary antibodies, which always gave negative results (Fig 3G).

TEM gold immunolabeling assays confirmed the polytopic cellular location of these proteins (Fig 4A). Images evidenced that in basal conditions, the majority of EhNPC1 and EhNPC2 proteins appeared separated, some of them localized close each other and only few appeared together (Fig 4A–4D). EhNPC1 and EhNPC2 were localized at plasma membrane, in the vesicle lumen and membranes. The labeled vesicles could correspond to endosomes; in there EhNPC1 was frequently surrounding them and EhNPC2 appeared inside (Fig 4A). Controls using only the secondary antibodies gave none or scarce signals (Fig 4B and 4C). These

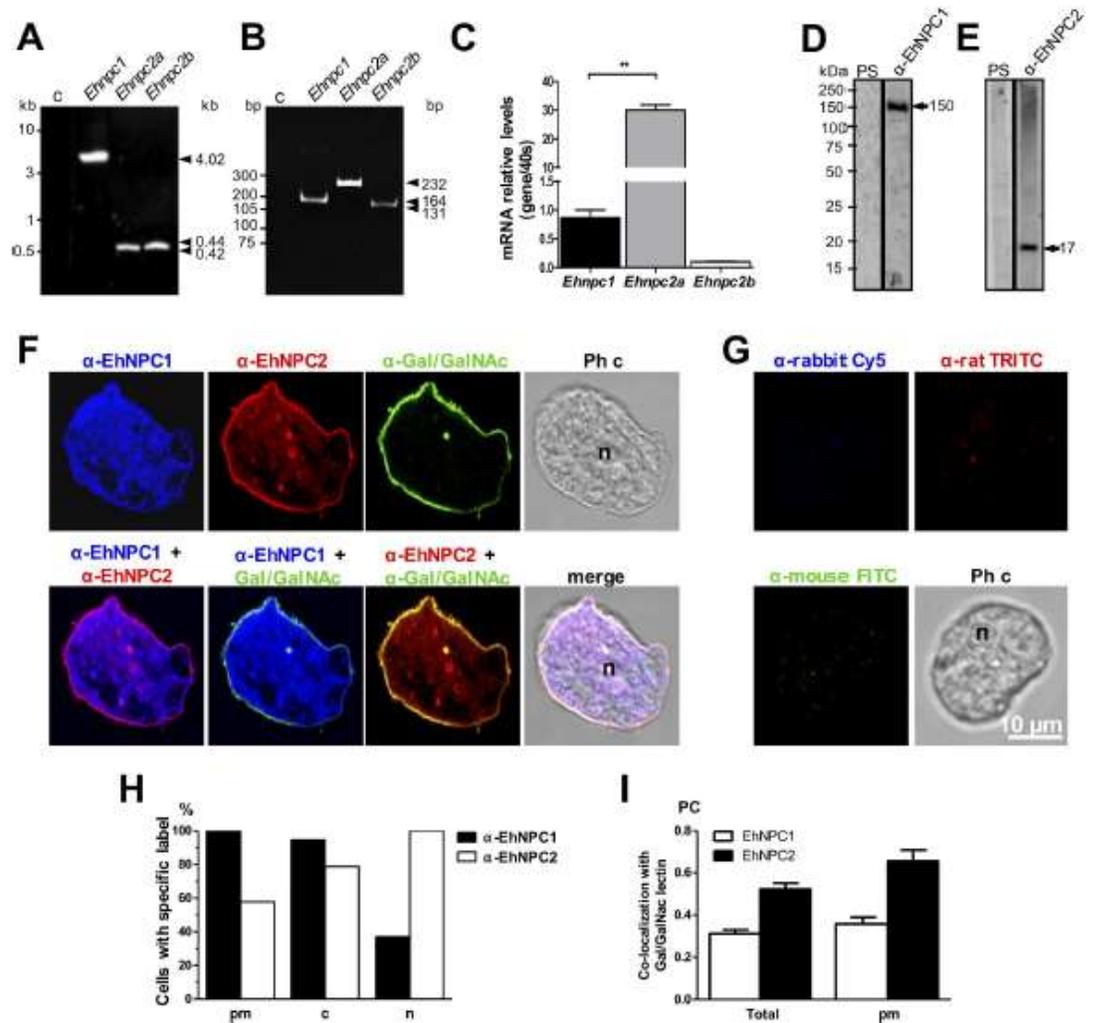


Fig 3. Expression and localization of EhNPC1 and EhNPC2 in trophozoites. (A) *Ehnpc1*, *Ehnpc2a* and *Ehnpc2b* full-length genes were PCR amplified using specific primers and genomic DNA. (B) RT-PCR amplification of transcript fragments using specific primers and cDNA. c: Controls without gDNA or with mRNA as template. (C) The relative expression of the three genes was measured by RT-qPCR in trophozoites, using as a control the 40s ribosomal S2 protein gene. ** $p < 0.01$. (D, E) Total extracts of *E. histolytica* were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blot assays using pre-immune serum (PS) or rabbit α-EhNPC1 (D) or rat α-EhNPC2 (E) antibodies. (F) Representative images of laser confocal microscopy of PFA-fixed trophozoites using rabbit α-EhNPC1 or rat α-EhNPC2 or mouse α-Gal/GalNAc lectin antibodies. (G) Controls using only secondary antibodies. Ph c: phase contrast images. (H) Protein localization of EhNPC1 and EhNPC2 in plasma membrane (pm), cytoplasm (c) or nucleus (n). Counts were performed in 50 cells. (I) Pearson coefficient (PC) correlation measured in at least 15 confocal images, indicating co-localization of EhNPC1 or EhNPC2 with Gal/GalNAc lectin in the entire cell and in the plasma membrane. Laser sections = 0.5 μm.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g003

results together evidenced that *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes are transcribed and translated and their proteins are localized in several cellular regions, indicating that they are highly mobile proteins, which is in agreement with their hypothetical function as cholesterol transporters.

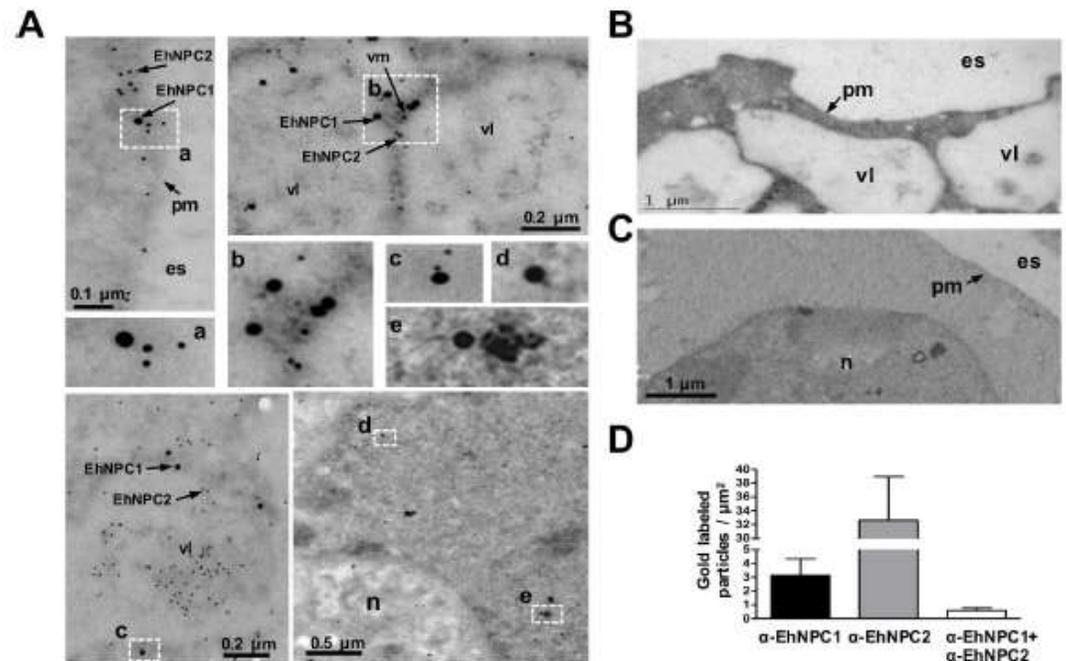


Fig 4. Localization of EhNPC1 and EhNPC2 in trophozoites analyzed by TEM. (A) Thin sections of trophozoites were incubated with rabbit α-EhNPC1 and rat α-EhNPC2 antibodies, followed by incubation with gold labeled α-rabbit and α-rat secondary antibodies (20 and 10 nm gold particles, respectively). Squares indicate the magnified areas marked with the corresponding lower case letters. pm: plasma membrane, vl: vesicle lumen, vm: vesicle membrane, es: extracellular space, n: nucleus. (B, C) Controls using only secondary antibodies. (D) Graph showing number of EhNPC1 and EhNPC2 molecules recognized by the respective gold-labeled antibodies and their co-localization.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g004

After serum stimulus, EhNPC1 and EhNPC2 co-localize with cholesterol

The main source of cholesterol in trophozoites in culture comes from adult bovine serum (ABS). We explored the participation of EhNPC1 and EhNPC2 in cholesterol trafficking after a serum stimulus. After serum starving of trophozoites, confocal images revealed that both proteins were barely present in the plasma membrane and cholesterol was faintly stained by filipin, a highly specific compound for cholesterol detection (Fig 5). Immediately after ABS addition (0.5 min), filipin detected cholesterol in the cytoplasm and nucleus, together with EhNPC1 and EhNPC2 (Fig 5). At this time, EhNPC1 and EhNPC2 co-localized in vesicles and in a uniform punctuate pattern at the plasma membrane (Fig 5A–5D). In most cases a yellow area was evident in membrane protrusions, indicating co-localization of both proteins (Fig 5A–5D). We also observed both proteins out of the cell (Fig 5G and 5I). After 2 to 5 min, membrane protrusions or putative vesicles appeared carrying cholesterol, and, in most of them, EhNPC2 was outwardly (Fig 5E and 5K), strengthening the hypothesis on the mobilization of both proteins during cholesterol capture. Number and size of membrane protrusions or putative vesicles increased through incubation time, and both proteins were close to cholesterol-containing vesicles outside and inside of the cell (Fig 5A, 5B, 5E, 5F, 5H and 5I). In some trophozoites, membrane protrusions or putative vesicles appeared at a cellular pole, in a “cap” model (Fig 5, 5 min), but they were also seen in other parts of the plasma membrane (Fig 5, 7

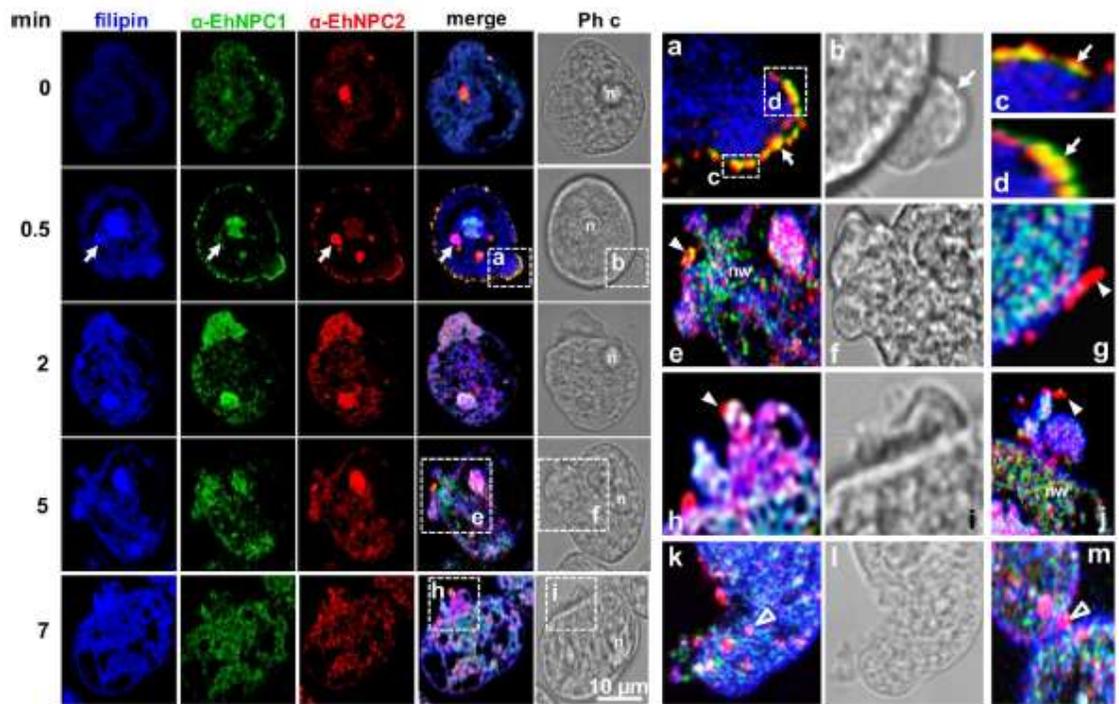


Fig 5. Localization of EhNPC1 and EhNPC2 in trophozoites after an ABS pulse. Trophozoites were serum starved for 12 h by culturing in TYI medium on coverslips. Then, ABS was added as a cholesterol source at 37°C for 0.5 to 7 min. Cells were washed, fixed and incubated with filipin, rabbit α -EhNPC1 and rat α -EhNPC2 antibodies, secondary antibodies, and examined by laser confocal microscopy. Arrows: cytoplasmic dots. Squares marked with lower case letters are magnified at the right. (a-d) Membrane vacuoles containing EhNPC1 and EhNPC2. Arrows: show the plasma membrane with EhNPC2 or EhNPC1 facing the extracellular space. (e) Networks stained by α -EhNPC1 antibody. (e-j) rod and spherical structures (arrowheads) facing the extracellular space, stained mainly by α -EhNPC2 antibody. (k-m) Spherical structures of 1 to 2 μ m (empty arrowheads) inside the cell. n: nucleus, Ph c: phase contrast images, nw: networks like structures.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g005

min). Outside of the cell, joined or not to the plasma membrane, EhNPC2 was revealed in vacuoles with rod and sphere shaped forms (Fig 5G–5M). Network-like structures mainly formed by EhNPC1 and cholesterol were observed inside the cells, adjacent to the networks formed mainly by EhNPC1 and cholesterol, and inside EhNPC2-containing spheres (1.5 to 2 μ m) also appeared there (Fig 5E–5I). The spherical structures may correspond to the vesicles detected by TEM (Fig 4). These findings strongly suggest that cholesterol promotes the mobilization and secretion of EhNPC1 and EhNPC2.

In TEM images, we detected EhNPC1 and EhNPC2 in the extracellular space of trophozoites in basal conditions (Fig 6A). To explore whether the proteins were secreted, we performed secretion assays, giving an ABS pulse for different times to serum-starved trophozoites. In agreement with the confocal microscopy images (Fig 5, 0 min), EhNPC1 and EhNPC2 were poorly detected in secreted products of starved trophozoites. However, they were found in the supernatants of trophozoites challenged with ABS for 0.5 min (Fig 6B), indicating that they were secreted in response to the ABS pulse. Surprisingly, the α -EhNPC2 antibody did not reveal the expected 17 kDa band, but only a 25 kDa band was detected in the secreted products. This aberrant migration could be due to the binding of EhNPC2 to cholesterol present in the

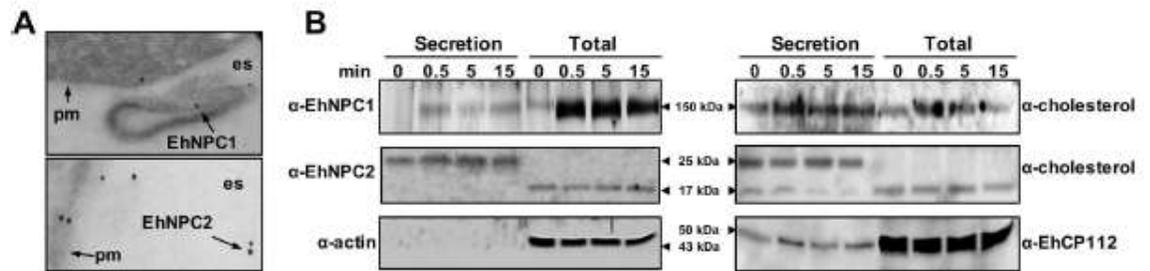


Fig 6. Secretion of EhNPC1 and EhNPC2 after ABS stimulus. (A) TEM of trophozoites under basal condition showing EhNPC1 and EhNPC2 in the extracellular space. pm: plasma membrane, es: extracellular space. (B) After the ABS stimulus, supernatants were collected and trophozoites were lysed at the indicated times. Secreted products and total extracts were analyzed by SDS-PAGE and western blot assays using rabbit α -EhNPC1, rat α -EhNPC2, rabbit α -cholesterol, rabbit α -EhCP112 and mouse α -actin antibodies and corresponding secondary antibodies. Actin was used as a control of cell integrity and EhCP112 as a secretion control.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g006

serum. To get further evidence on this, the nitrocellulose membranes were re-blotted using an α -cholesterol antibody. This antibody detected a band with similar migration than EhNPC1 and two bands of 17 and 25 kDa, corresponding to those detected by the α -EhNPC2 antibody. EhCP112, used as a positive secretion control, was found in both, supernatant and trophozoites extracts at all times, whereas actin, used as a negative control for secretion, was only detected in trophozoites samples. These results strongly suggest that these proteins are associated with cholesterol. A hypothesis could be that vesicles containing EhNPC1 and EhNPC2 come from and back to the cell, possibly carrying cholesterol from outside.

EhNPC1 and EhNPC2 co-localize with cholesterol during phagocytosis

As phagocytosis is one of the main mechanisms for nutrients uptake and virulence expression in the parasite and trophozoites have an intense membrane synthesis during the event, we analyzed the EhNPC1 and EhNPC2 behavior when cells ingest erythrocytes. Fig 7 shows images of the most relevant facts observed in different experiments. Under basal conditions, both proteins and cholesterol were found at the plasma membrane, cytoplasm, and nuclei (Fig 7A, 0 min). Immediately after sensing the presence of erythrocytes, EhNPC1 and EhNPC2 proteins moved to the contact sites at the plasma membrane (Fig 7A and 7B); and they were present in cytoplasmic vesicles with cholesterol inside (Fig 7, 2 min). Interestingly, EhNPC2 co-localized with cholesterol of phagocytosed erythrocytes (Fig 7A and 7B). Both proteins were observed in trophozoites as a continuous dot pattern from the partially ingested erythrocytes to the cytoplasm (Fig 7A, 2 min; 7Ba-d). EhNPC1 was seen in the external part of the phagocytic cup (Fig 7A and 7B). Between the nucleus and erythrocytes, networks-like structures were observed decorated mainly by the α -EhNPC1 antibody and filipin, and spots recognized by α -EhNPC2 antibodies (Fig 7A, 2 min; 7B). At 90 min, cholesterol appeared distributed at the plasma membrane, and in vacuoles inside other huge vacuoles that may correspond to phagolysosomes and MVBs containing digested erythrocytes, and co-localizing with EhNPC2 and EhNPC1 (Fig 7A, 90 min; 7Bf). Co-localization of both proteins was not higher than 0.59 (Fig 7C), suggesting that they do not interact all the time. Recently, we have identified LBPA and EhADH inside phagolysosomes and MVBs after 60 and 90 min of phagocytosis [26]. By their size and appearance at late times of phagocytosis, we presume that they correspond to the ones detected here containing cholesterol, EhNPC1 and EhNPC2.

Then, we performed erythrophagocytosis assays in a pulse-chase model to detect protein mobilization by western blot assays. In these experiments, trophozoites were incubated with

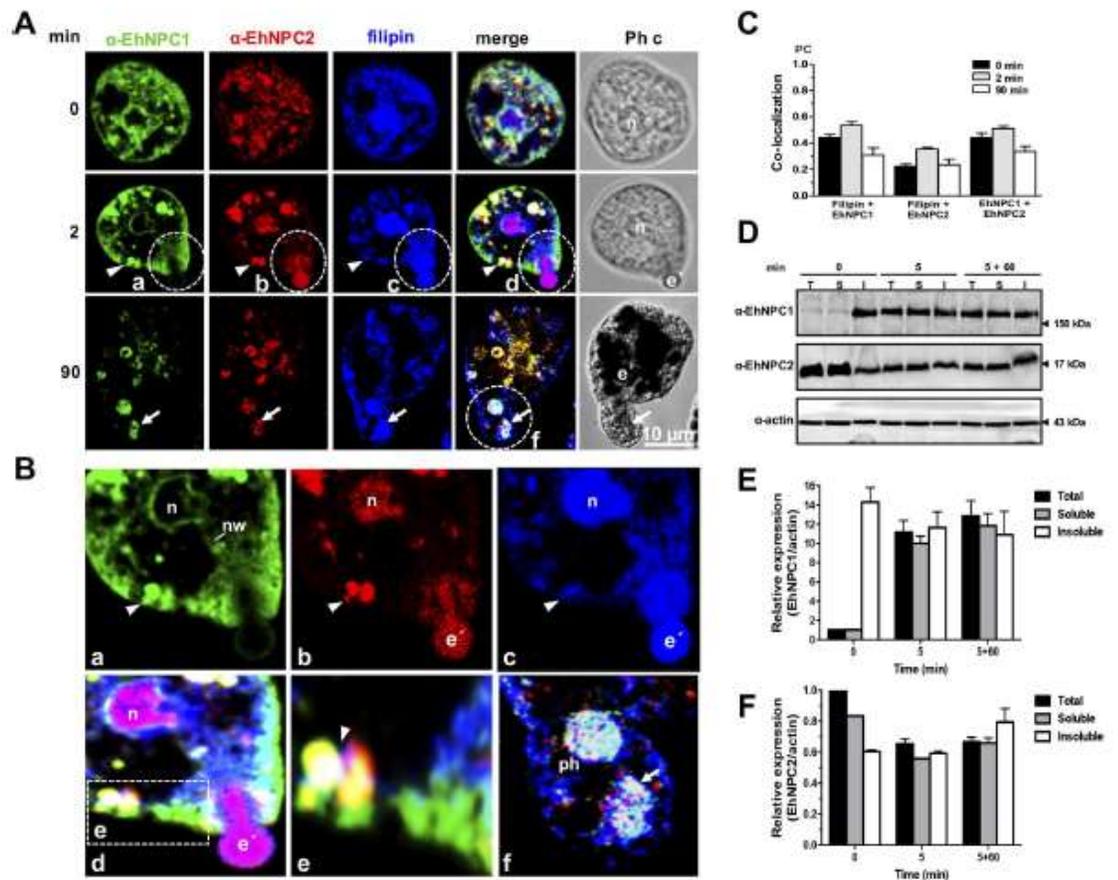


Fig 7. Localization of EhNPC1, EhNPC2 and cholesterol during phagocytosis. (A) Trophozoites were incubated with erythrocytes (1:25) at 37°C, for the indicated times. Then, samples were prepared for laser confocal microscopy and stained with filipin, rabbit α -EhNPC1 and rat α -EhNPC2 antibodies and secondary antibodies. Ph c: phase contrast images, e': erythrocytes, n: nucleus. Arrow head: cytoplasmic vesicles. (B) (a-d) Dotted circles: Magnification of an erythrocyte that is being internalized. (e) Magnification of vesicles close to the plasma membrane. (f) Magnification of a huge phagosome (ph) containing digested erythrocytes (arrows). nw: networks. (C) P.C of the co-localization between filipin and EhNPC1 or EhNPC2 or EhNPC1 with EhNPC2 at distinct phagocytosis time. (D) Trophozoites were incubated with erythrocytes at 37°C for 5 min, then adherent and non-ingested erythrocytes were removed by washing with a mixture of water-TY1 medium. Later, trophozoites were incubated at 37°C again for 60 min with TY1 to continue the process. Trophozoites were lysed and also cellular fractionation was carried out. Samples were processed for 12% SDS-PAGE and western blot assays. Representative blots of three experiments are shown. T: total extracts, S: soluble fraction, I: insoluble fraction. (E,F) Densitometry of the bands in (D) corresponding to EhNPC1 (E) and EhNPC2 (F) using actin as loading control.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g007

erythrocytes for 5 min, then, free and adhered erythrocytes were removed by washing samples; and the phagocytic process of the already ingested erythrocytes continued at 37°C for different times. Total proteins and the soluble and insoluble fractions of lysed trophozoites taken at 0, 5 and 5+60 min of phagocytosis were identified by western blot assays. In basal conditions (0 min), EhNPC1 was detected enriched in the insoluble fraction. However, after 5 and 5+60 min of phagocytosis the protein was similarly distributed in the three samples (Fig 7D). By contrast, under basal conditions, EhNPC2 was more abundant in the soluble fraction (Fig 7D).

Densitometry analysis using α -actin antibodies as loading control, confirmed this (Fig 7E and 7F). These findings suggest that in basal conditions EhNPC1 is more abundant in membranes, whereas EhNPC2 is concentrated in the cytoplasm; while during phagocytosis they are more homogeneously distributed in the entire cells, evidencing the dynamic cholesterol trafficking.

EhNPC1 and EhNPC2 are located in the ER

In mammalian cells, NPC1 and NPC2 are located in the ER from where they distribute cholesterol to different organelles. Here we searched for EhNPC1 and EhNPC2 in the ER. Confocal images of trophozoites in basal conditions showed that both proteins co-localized in networks and vacuoles with EhSERCA, an ER marker [33] (Fig 8Aa,b). EhNPC2 also appeared as 1.5 to 2 μ m spheres in the cytoplasm (Fig 8A). After 5+2 min phagocytosis, co-localization did not vary significantly (Fig 8A), suggesting that EhNPC1 and EhNPC2 proteins maintain a constant presence in ER, as it has been described for other eukaryotes [34]. PC values of co-localization of EhNPC1 and EhNPC2 with EhSERCA were between 0.25 and 0.51 (Fig 8B). These findings corroborate that the proteins detected around the nuclei are indeed in the ER.

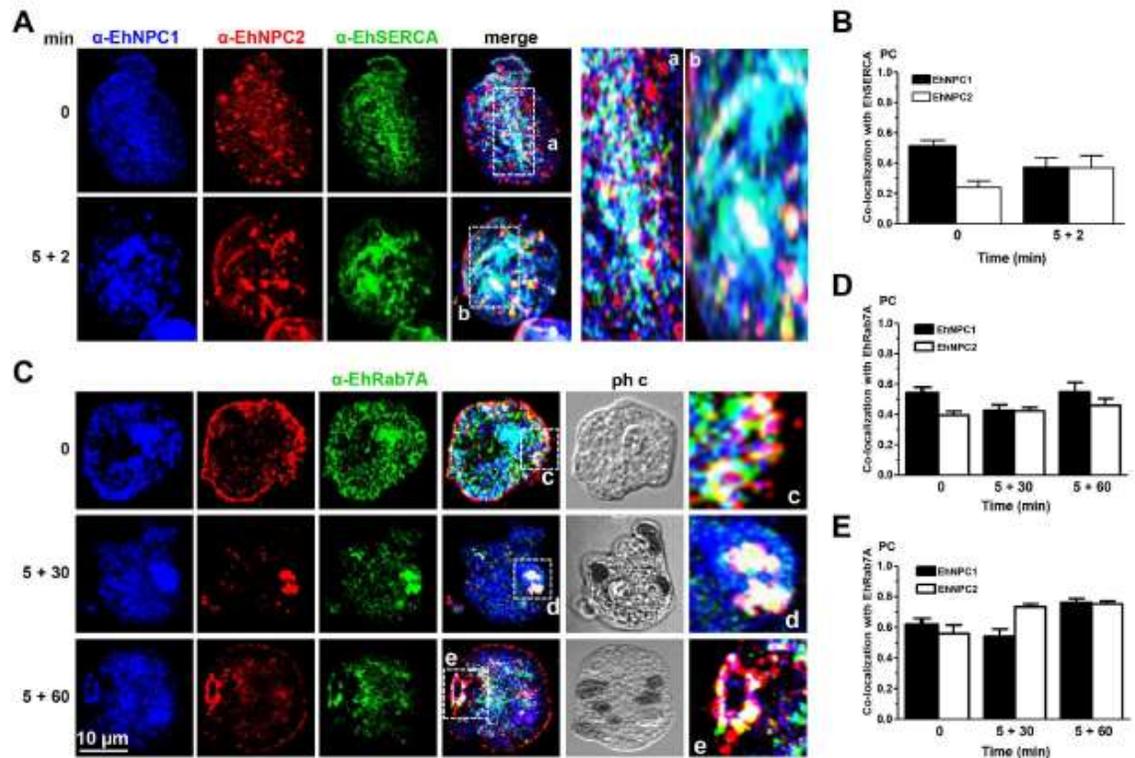


Fig 8. Co-localization of EhNPC1 and EhNPC2 with EhSERCA and EhRab7A. Trophozoites were incubated with erythrocytes at 37°C and treated as Fig 7. Samples were processed for confocal microscopy using α -EhNPC1, α -EhNPC2 and (A) α -EhSERCA or (C) α -EhRab7A antibodies. (a-e) Magnification of the white squares. (B, D, E) PC of the co-localization between EhNPC1 or EhNPC2 with EhSERCA (B), or with EhRab7A in the whole cell (D) or in cellular structures stained by the three antibodies (E).

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g008

EhNPC1 and EhNPC2 co-localize with EhRab7A in endosomes.

The Nozaki group has found that EhRab7A is involved in the retrograde transport from phagosomes to the Golgi apparatus and it is located mainly in late endosomes [35, 36]. Based on their elegant work, we explored whether spherical structures containing EhNPC2 detected in trophozoites, corresponded to endosomes. By laser confocal microscopy, the α -EhRab7A antibody recognized these cytoplasmic structures, which increased in size throughout the chase-time phagocytosis assays (Fig 8C), evidencing that they are endosomes. In basal conditions and throughout phagocytosis, EhRab7A was associated with EhNPC1 and EhNPC2; frequently forming donut-like structures that may be phagolysosomes and MVBs (Fig 8C-c-e). PC values for EhNPC1 and EhNPC2 with EhRab7A were 0.39 to 0.55 in the entire cell (Fig 8D) and increased to 0.47 to 0.78 in the donut-like structures (Fig 8E). These results strengthen the assumption that EhNPC1 and EhNPC2 are also in endosomes.

EhNPC1 and EhNPC2 associate with endosomal molecules in acidic vesicles

In mammals, NPC1 binds to cholesterol in late endosomes in an acidic milieu where LBPA and Alix protein participate in cholesterol homeostasis [22]. We hypothesized that cholesterol containing vesicles inside phagolysosomes, together with EhNPC1 and EhNPC2, also contain LBPA and EhADH [25, 26]. Thus, we investigated the nature of these vesicles during phagocytosis using LysoTracker, a marker of acidic vesicles. After 5+30 and 5+60 min of erythrophagocytosis, more than 90% of the phagosomes were positive for α -EhNPC1, α -EhNPC2 antibodies and LysoTracker (Fig 9A). LysoTracker appeared in phagolysosomes and MVBs, containing partially digested erythrocytes (Fig 9Aa-d). These results show that EhNPC1 and EhNPC2 are in an acidic milieu characteristic of phagolysosomes.

Besides, at 5+30 min, all phagolysosomes showed EhNPC1, EhNPC2 and LBPA (Fig 9Bc-g). Moreover, EhADH co-localized with EhNPC1 or EhNPC2 under basal conditions, mainly in the plasma membrane, and, during phagocytosis, in phagolysosomes and MVBs (Fig 9Ch-j). Immunoprecipitation assays using α -EhNPC1 antibody confirmed that this protein is associated under basal conditions and during phagocytosis with EhNPC2, EhADH and EhRab7A, but not with EhSERCAs (Fig 9D). However, α -EhNPC2 antibody precipitated all of these proteins including EhSERCAs, suggesting that at some point these proteins are interacting (Fig 9E). Cholesterol was also detected in dot blots in both immunoprecipitates (Fig 9D and 9E). These results evidenced that cholesterol, LBPA, EhADH, EhRab7A, EhNPC1 and EhNPC2 co-localize in phagolysosomes and MVBs, probably cooperating to facilitate the phagocytosis-digestion processes; and our data also reinforce the association of EhNPC1 and EhNPC2 with cholesterol.

Trophozoites with stocked cholesterol diminish their rate of phagocytosis and do not disturb the intestinal barrier

To evaluate the effect of cholesterol trafficking on phagocytosis, we used the U18666A (3- β [(2-diethyl-amino)ethoxy]androst-5-en-17-one) (U18) drug that binds to NPC1 in the SSD, blocking the cholesterol traffic [37]. For these experiments, trophozoites cultured without serum (TYI), to eliminate part of the cholesterol source, showed less than 50% of the cholesterol concentration that the cells cultured in basal conditions (with serum). Trophozoites cultured without serum and in the presence of U18 presented slight differences in cholesterol concentration (Fig 10A). By confocal microscopy, U18 treated trophozoites, showed filipin-positive abundant clumps in the cytoplasm suggesting cholesterol accumulation (Fig 10B).

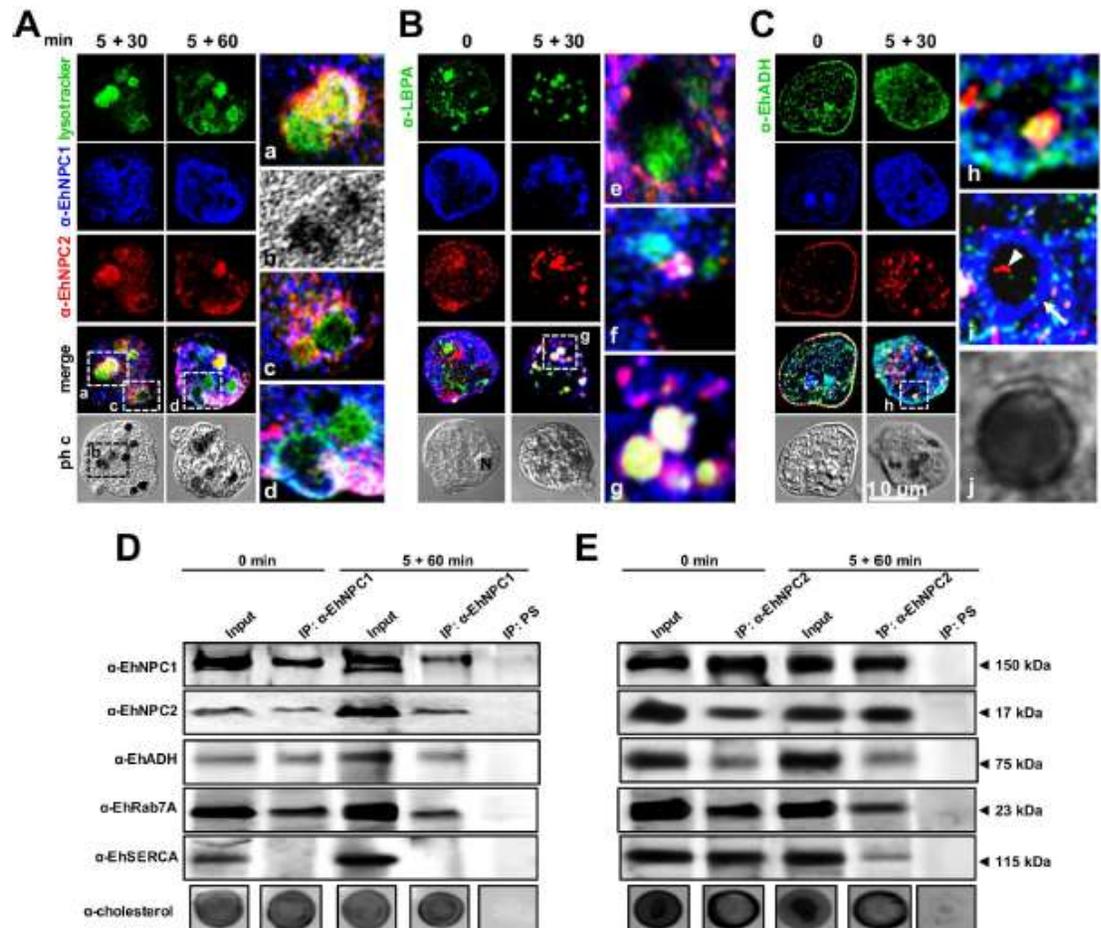


Fig 9. Co-localization and association of EhNPC1 and EhNPC2 with cholesterol and endosomal molecules. Trophozoites were incubated with erythrocytes as in Fig 7 and processed for confocal microscopy after incubation with α -EhNPC1 and α -EhNPC2 antibodies and (A) Lysotracker or (B) α -LBPA or (C) α -EhADH antibody and corresponding secondary antibodies. (a-d,g,h) Magnification of white squares. (e,f,i,j) Magnifications from other images. Ph c: phase contrast images, arrow in i: EhNPC1 outside endosomes, arrowhead: EhNPC2 inside endosomes. D, E) Trophozoites in basal condition or after 5+60 min of erythrophagocytosis were lysed and immunoprecipitation assays (IP) were performed using α -EhNPC1 (D) or α -EhNPC2 (E) antibodies or preimmune serum (PS). Immunoprecipitated proteins of trophozoites were analyzed by western blot and dot blot experiments, using α -EhNPC1, α -EhNPC2, α -EhADH, α -EhRab7A, α -EhSERCA and α -cholesterol antibodies.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g009

These results suggest that in *E. histolytica*, U18 also interferes with the cholesterol trafficking, but not with the cholesterol amount inside the trophozoites (Fig 10A and 10B). However, U18 treated cells ingested at 60 min, 2 erythrocytes/trophozoite, whereas trophozoites cultured in TYI medium engulfed about 6 erythrocytes, and trophozoites cultured in TYI-S medium ingested a mean of 18 erythrocytes (Fig 10C). These findings suggested that the cholesterol arresting by U18 interferes with the rate of phagocytosis.

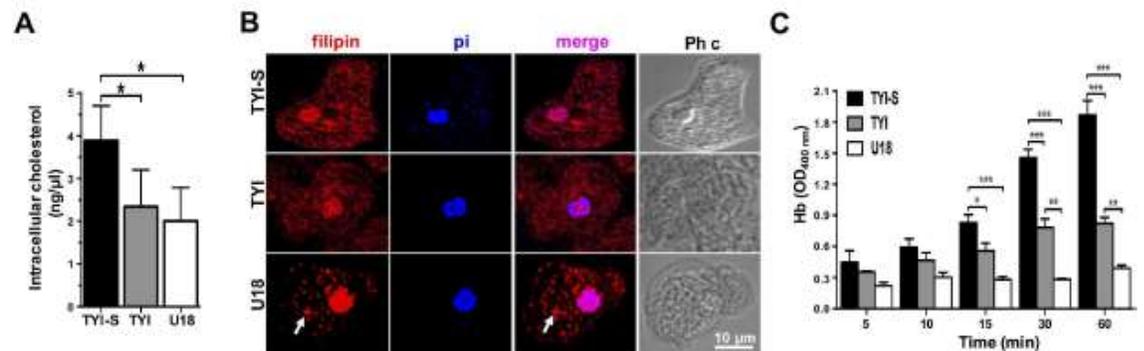


Fig 10. Erythrophagocytosis of trophozoites cultured in TYI-S, TYI and TYI plus U18. Trophozoites were incubated ON at 37°C in TYI-S, TYI and TYI plus U18. (A) Cholesterol concentration in the respective trophozoites was measured as described in material and methods. (B) Laser confocal microscopy showing the morphology and the cholesterol localization by filipin staining. Nuclei were counterstained with propidium iodide (pi). Images were false colored to obtain a better contrast. Ph c: phase contrast images, arrows: cytoplasmic dots. (C) Rate of erythrophagocytosis spectrophotometrically measured by hemoglobin (Hb) concentration inside trophozoites.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g010

We also analyzed the effect of the cholesterol trafficking arrest by using U18 in the amoebiasis in intestinal mice model (strain C57BL/6) [38]. In this model, virulent trophozoites compromise the intestinal epithelial barrier, which could be monitored by Evans blue dye permeability [39]. The intestinal epithelium of mice inoculated with U18-treated trophozoites did not suffer damage, giving similar results to the negative controls (mice inoculated only with PBS), and showing that the epithelial barrier was not disrupted (Fig 11A and 11B). By contrast, trophozoites cultured in TYI induced 62% permeability in colonic epithelium compared to trophozoites cultured in TYI-S medium, that was taken as 100% (Fig 11A and 11B). Thus, while cholesterol depletion only ameliorated the capacity of trophozoites to induce intestinal epithelial permeability, U18 treatment completely inhibited it. Tissue sections of colon epithelium stained with hematoxylin-eosin showed that trophozoites grown in TYI-S medium provoked discontinuity in epithelial layer, cells rounding, and a higher number of cells layers, cellular infiltration and swelling, whereas animals inoculated with U18 treated trophozoites presented normal epithelium, similar to the negative controls (Fig 11C). Our results showed that cholesterol is necessary for trophozoites to ingest red blood cells, and to impair the intestinal epithelial barrier.

Knockdown of *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes diminishes rate of phagocytosis and cell motility

Phagocytosis and cell motility require cholesterol for membrane synthesis and fluidity. To get further evidence that EhNPC1 and EhNPC2 proteins are responsible for transporting the cholesterol for these events, we knocked down trophozoites in the *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes, using trophozoites of clone G3 and the psAP-2 vector to transfect them [40]. Both types of silenced trophozoites (KD *Ehnpc1* and KD *Ehnpc2*) expressed 30 and 50% of *Ehnpc1* and *Ehnpc2* mRNA, respectively, compared with the G3 trophozoites transfected only with the empty vector (Fig 12A). Protein expression was also diminished in silenced trophozoites in basal conditions; although, surprisingly, protein level decreased more in EhNPC2 than in EhNPC1 (Fig 12B and 12C), even when *E. histolytica* has two *Ehnpc2* genes that are transcribed (Fig 3), and only *Ehnpc2a* was silenced. These suggest mechanisms for a fine regulation in the level or in the half-

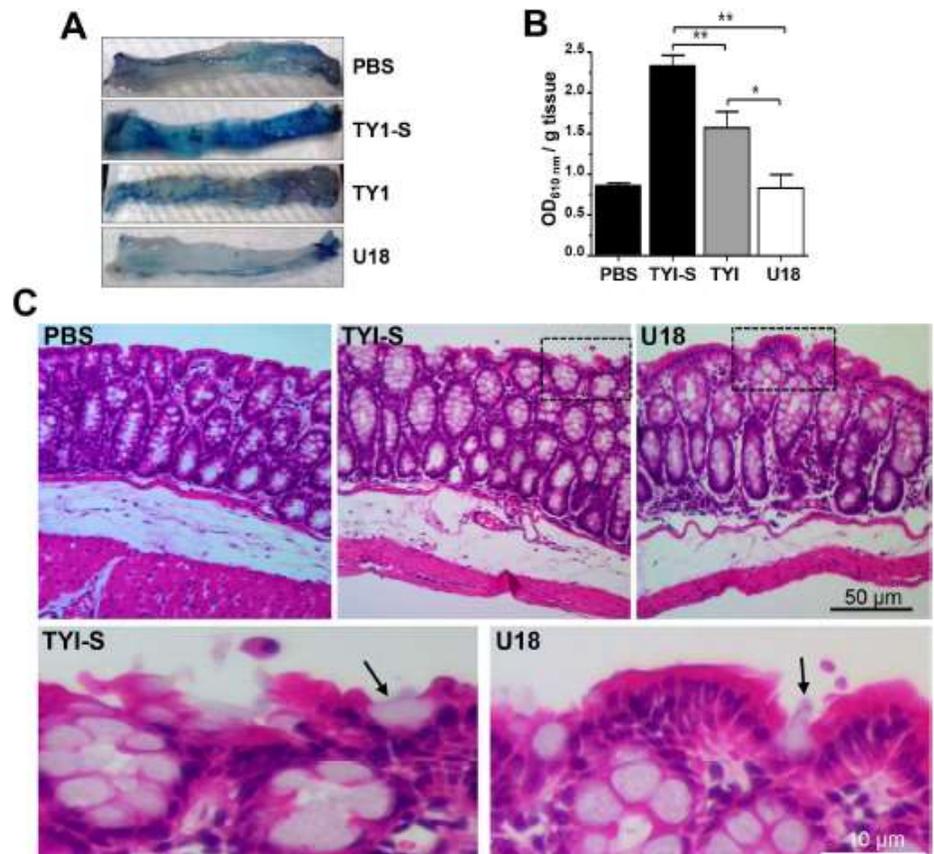


Fig 11. *In vivo* virulence of trophozoites cultured in TY1-S, TY1 and TY1 plus U18. Capability of trophozoites to impair the mouse intestinal barrier. (A) Distal parts of the mouse colons after treatment with trophozoites or with PBS. Intestinal barrier impairment was measured as the ability of the Evans blue dye to permeate the mouse intestinal epithelium after contact with trophozoites. $n = 5$. (B) Data represent the mean \pm standard error. PBS: mice undergoing surgery, but not inoculated with trophozoites. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Hematoxylin-eosin staining of tissues. Squares were magnified in the corresponding lower panels. Arrows: trophozoites.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g011

life of the proteins that might be elucidated in the future. Confocal microscopy images confirmed the decrease of both proteins in mutant trophozoites in basal conditions; and showed that proteins were re-localized (Fig 12D). In KD *Ehnp1* trophozoites, EhNPC1 protein was polarized in the plasma membrane, whereas, in KD *Ehnp2* cells, EhNPC2 was scarcely found in plasma membrane and it was detected as few cytoplasmic dots (Fig 12D). KD *Ehnp2* trophozoites presented a lesser amount of intracellular cholesterol (1.9 ng/ μ l) than KD *Ehnp1* (2.8 ng/ μ l) whereas, the trophozoites transfected with the empty vector presented 4.0 ng/ μ l (Fig 12E), strongly suggesting the participation of these proteins in cellular cholesterol uptake.

The rate of erythrophagocytosis was also modified in silenced trophozoites. In early times of phagocytosis (2 to 5 min), KD *Ehnp1* and control trophozoites ingested the same amount

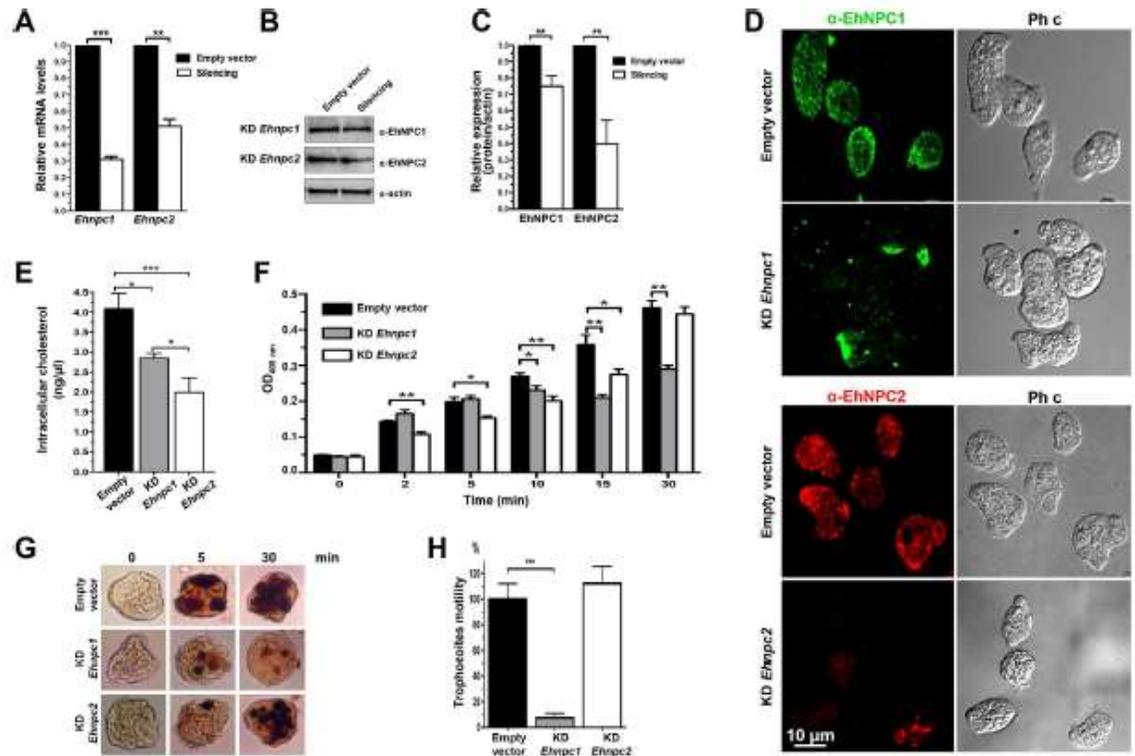


Fig 12. Silencing of *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes in *E. histolytica*. (A) Trophozoites clone G3 were transfected with *psAP-2*, *psAP-2Ehnpc1* or *psAP-2Ehnpc2* plasmids and stable populations were selected with 4 μ g/ml G-418. RT-qPCR assays were performed using mRNA from transfected trophozoites (empty vector, KD *Ehnpc1* and KD *Ehnpc2*), using specific primers for *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes and as a housekeeping the 40s ribosomal S2 protein gene. (B) Western blot assays of transfected trophozoites extracts, using α -EhNPC1 and α -EhNPC2 antibodies and respectively secondary antibody. As a loading control, the same membrane was reblotted with α -actin antibodies. (C) Densitometry analysis of bands showed in (B) normalized again actin protein. (D) Confocal microscopy of transfected trophozoites in basal conditions using α -EhNPC1 or α -EhNPC2 antibodies. Ph c: phase contrast. (E) Cholesterol concentration in the transfected trophozoites was measured as described in material and methods. (F) Rate of erythrophagocytosis of transfected trophozoites. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (G) Diaminobenzidine-stained trophozoites that ingested erythrocytes for different times. (H) Motility assays of transfected trophozoites cultured in transwell inserts. *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g012

of erythrocytes (6 erythrocytes/trophozoite). However, after 5 min, KD *Ehnpc1* trophozoites arrived to a plateau, ingesting a mean of 10 erythrocytes/trophozoite, in comparison with control trophozoites that continued erythrocytes ingestion, reaching 18 erythrocytes/trophozoite at 30 min (Fig 12F and 12G). On the other hand, from 2 to 15 min of phagocytosis, the KD *Ehnpc2* trophozoites ingested a mean of 4 to 10 erythrocytes/trophozoite in comparison with control trophozoites, which ingested a mean of 5.6 to 14.4 erythrocytes/trophozoite. However, at 30 min of phagocytosis, KD *Ehnpc2* trophozoites recuperated the rate of phagocytosis and ingested a mean of 18 erythrocytes/trophozoite, similar to control trophozoites (Fig 12F and 12G). These results indicate that in the KD *Ehnpc2* trophozoites, the rate of erythrophagocytosis was affected only in early times, whereas, in KD *Ehnpc1* trophozoites, the erythrophagocytosis was affected after 10 min of contact with erythrocytes.

To evaluate the impact of EhNPC1 and EhNPC2 proteins on motility, we placed the transfected trophozoites in the upper chamber of transwell inserts and counted the number of

trophozoites that were able to move toward the lower chamber, following a serum stimulus. Interestingly, after 3 h incubation, KD *Ehnpc1* trophozoites remained in the upper chamber, showing migration incapacity, whereas, KD *Ehnpc2* trophozoites showed similar motility than the control. (Fig 12H). These findings altogether revealed that EhNPC1 and EhNPC2 proteins have no redundant functions but they cooperate during cholesterol trafficking.

Discussion

Using *in silico* analysis and distinct experimental approaches, we have shown here that the early emerging protozoan *E. histolytica* has one *Ehnpc1* and two *Ehnpc2* genes. In contrast, most eukaryotes have two *npc1* (*npc1* and *npc1l1*) and one *npc2* genes [14, 29, 32]. Molecular docking, co-localization and immunoprecipitation assays revealed that EhNPC1 and EhNPC2 proteins can interact between them and with cholesterol. Moreover, they associate with EhRab7A and EhADH proteins, whereas only EhNPC2 interacts with EhSERCA, although both proteins co-localized, immunoprecipitation assays showed no interaction between them at the times explored. Experiments with silenced trophozoites in *Ehnpc1* and *Ehnpc2* genes gave evidence that their corresponding proteins do not carry out redundant functions, but they cooperate in the cholesterol trafficking. The relevance of our findings lies in three main facts: firstly, cholesterol is fundamental for endocytosis and motility; both important for nutrition and virulence of *E. histolytica* [2–4, 8]. Secondly, cholesterol is not synthesized by trophozoites and very little is known on cholesterol trafficking in protozoa. In particular, the mechanism of cholesterol uptake and trafficking in *E. histolytica* trophozoites was almost unknown, except for the role of TMK39 protein in LDL proteins uptake [24], which could function in association with other proteins, such as EhNPC1 and EhNPC2, because it has not the canonical cholesterol binding sites [24]. In protozoa, except for a NPC1 like protein identified in *T. gondii* [41], no other references were found by us about the presence and function of NPC1 and NPC2; their genes only appear in the databases, but no experimental characterization has been done. This makes *E. histolytica* the first protozoa in which both genes and proteins has been identified and characterized. Thirdly, *E. histolytica* has a simple cholesterol trafficking, compared to other eukaryotes, because it depends on exogenous cholesterol, providing an excellent and less complicated model to elucidate this intricate event in eukaryotic cells.

NPC1 and NPC2 are ancient proteins, highly conserved throughout eukaryotic evolution [42]; to the extent that human and yeast *npc1* genes are genetically and functionally interchangeable [42]. Our results fortify this assumption by the high structural homology presented by human NTD-NPC1 and the *B. taurus* NPC2 crystals with EhNPC1 and EhNPC2 3D structures, respectively. The recent publication elucidating the 3D structure of the complete NPC1 protein in human [37] gives support to our model. In contrast to other eukaryotes, EhNPC2a and EhNPC2b present an amino acids tail with several residues that could be in contact with membranes. This, together with the positively charged protein regions [17], gives to EhNPC2 proteins the possibility of translocation across the plasma membrane and other organelle membranes, as our experimental approaches have suggested. These characteristics give further support to the hypothesis of the "hand-off" model, which can be working also in *E. histolytica* for cholesterol uptake and trafficking [19]. Immunoprecipitation assays using α -EhNPC1 or α -EhNPC2 antibodies confirmed that both proteins are associated, among them and with cholesterol, in trophozoites in basal conditions and during phagocytosis although sometimes they also appeared separated, supporting the "hand-off" model.

In this study we also asked: How do *E. histolytica* trophozoites bring exogenous cholesterol to their distinct organelles without a canonical LDL receptor?

Now, have evidences that EhNPC1 and EhNPC2 proteins carry cholesterol and participate in all processes from the sensing of external cholesterol sources to the digestion of the endocytosed products in phagolysosomes. Proximity and co-localization of EhNPC1 and EhNPC2 in the trophozoites surface immediately after ABS pulse and at the beginning of erythrophagocytosis, as well as their detection in secreted products, suggest that they are in charge of cholesterol capturing in *E. histolytica*. Our results do not discard the participation of other proteins, such as TMK39 protein.

Experiments using serum-starved trophozoites suggest that the external cholesterol is taken up into the cell by EhNPC1 and EhNPC2 in several steps: i) Immediately after sensing the cholesterol, EhNPC1 and EhNPC2 are organized in the plasma membrane in a punctuated pattern, co-localizing in some regions, but staying close and uncomplexed in some areas. It is plausible to speculate that EhNPC1 facilitates the transport of EhNPC2 to the plasma membrane to uptake exogenous cholesterol, but more experiments are necessary to probe this. ii) Next, small membrane projections or putative vacuoles that grow in size and amount throughout the endocytosis process appear at early times of endocytosis that are full of EhNPC1 and EhNPC2. iii) Then, EhNPC2-containing vesicles appear outside the cell, assuming rod- and sphere-like shapes that are in contact with vesicles full of cholesterol. It was also possible to distinguish in them small spots recognized by α -EhNPC1. Secretion assays confirmed that EhNPC1 and EhNPC2 are indeed released into the medium, probably to capture cholesterol. iv) EhNPC2 appears in vesicles co-localizing with cholesterol inside trophozoites, frequently making contact with smaller EhNPC1 containing vesicles. v) EhNPC1 and cholesterol formed networks from the plasma membrane to the nucleus and the ER; and also EhNPC2 appears there. vi) EhNPC1 and EhNPC2 accumulate in the ER and the nucleus. We do not know yet the significance of these proteins in the nucleus. vii) Cholesterol was driven to the plasma membrane and to vacuoles that are surrounded by EhNPC1 with EhNPC2 inside. All these steps are summarized in the cartoon of Fig 13.

Through erythrophagocytosis, most of these steps are also evident with some particularities. i) Co-localization of EhNPC1 and EhNPC2 is starting after two minutes contact or before. ii) Adhered, but not yet ingested, erythrocytes appear covered by EhNPC2 protein before target cell ingestion is finished. Trophozoites presented a channel, with partially ingested erythrocytes strongly stained by the α -EhNPC2 antibody and filipin, whereas the external part of the phagocytic cup was detected by α -EhNPC1 antibody. iii) At 30 and 90 min after phagocytosis, cholesterol appeared together with EhNPC1 and EhNPC2 in vacuoles, some with a relative uniform size, inside of phagolysosomes or MVBs. Interestingly, EhRab7A, LBPA, EhADH and cholesterol co-localized in late endosomes with EhNPC1 and EhNPC2, suggesting that they may participate in the cholesterol trafficking and homeostasis, as in mammalian cells [22]. vi) Cholesterol returned to plasma membrane following a similar movement than EhNPC1 and EhNPC2. It is possible that EhNPC1 and EhNPC2 tasks do not end until the digestion process is finished and no more cholesterol is available in the phagocytosed erythrocytes (Fig 13).

The phagocytosis process relies on cholesterol trafficking through the distinct type of endosomes formation. Here we used two strategies to evaluate this: i) we arrested the cholesterol trafficking by U18 drug which binds to the SSD sites in NPC1 [37, 43]. In our experiments we confirmed that the intracellular cholesterol concentration did not vary in comparison with TYI cultures trophozoites, but it accumulates in dumps and severely affected phagocytosis and *in vivo* virulence. Mice inoculated with U18 treated trophozoites did not present damage in the colon epithelium. ii) Experiments with trophozoites knocked down in *Ehnpc1* and *Ehnpc2a* genes gave strong support to the fact that both genes are important in cholesterol uptake. The diminish expression of proteins, provoked a reduction in the rate of phagocytosis. Interestingly, *Ehnpc1* knocked down trophozoites presented a dramatic decrease in motility, strongly

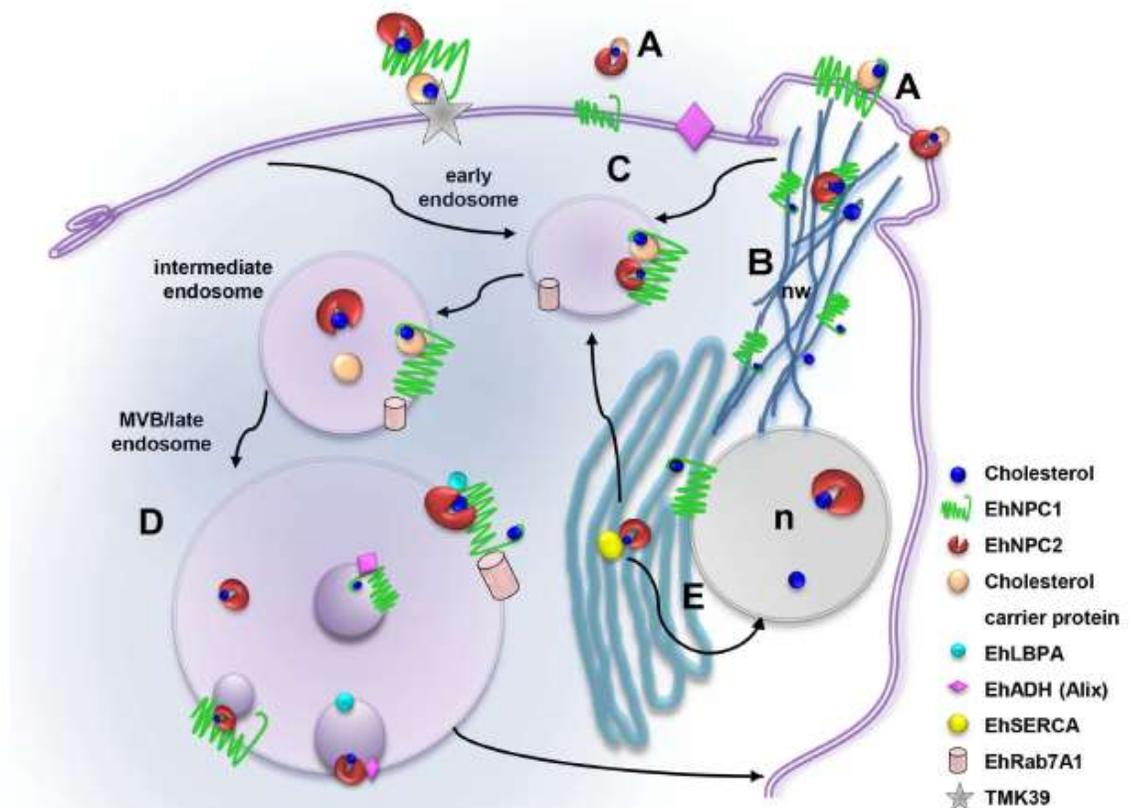


Fig 13. Working model of the EhNPC1 and EhNPC2 participation in cholesterol trafficking in *E. histolytica*. (A) Cholesterol uptake: EhNPC1 and EhNPC2 capture the cholesterol in the extracellular space and in the plasma membrane probably following the "hand-off" model (EhNPC1-cholesterol-EhNPC2-cholesterol-EhNPC1) and with the TMK39 participation. (B) Network-like structures formation: EhNPC1 and cholesterol form networks from cholesterol-containing membrane protrusions to ER, endosomes and nucleus that possibly facilitate cholesterol trafficking through EhNPC2 in a "hand-off" model. (C) Cholesterol influx: EhNPC1 and EhNPC2 associate with cholesterol and are internalized in EhRab-7A containing endosomes under basal conditions and during erythrophagocytosis. (D) EhNPC1 and EhNPC2 associate with phagolysosomal and MBVs molecules, particularly with LBPA and EhADH, which probably regulate cholesterol trafficking. (E) EhNPC1 and EhNPC2 accumulate in nucleus (n) and ER and may be distributed from there to other organelles.

doi:10.1371/journal.ppat.1006089.g013

suggesting a role of EhNPC1 protein in this function. We do not speculate on the role of EhNPC2 protein, because the presence of two genes and a possible compensatory mechanism in the cell could promote the transcription of the Ehnpc2b gene after the stimulus given by serum or erythrocytes. Another possibility is a half-life increase of the EhNPC2 protein. It is currently under study in our laboratory.

In conclusion, we provide the first evidence that *E. histolytica* presented two cholesterol transporting proteins, EhNPC1 and EhNPC2, that participate in exogenous cholesterol uptake and in its cellular trafficking, impacting in motility and phagocytosis. Future studies need to be addressed to fully elucidate remaining questions: How do EhNPC1 and EhNPC2 arrive to

the plasma membrane and leave the cell? Combining our findings with results in other eukaryotes [44] we propose that EhNPC2 is transported by EhNPC1 to these places. How does EhNPC2 enter to the phagocytosed erythrocytes? We hypothesized that the "hand-off" model proposed for mammalian cells could be also applicable to *E. histolytica*. This implies that EhNPC2 moves to the plasma membrane, together with EhNPC1 and from there, cholesterol is "handed-off" from one protein to another, avoiding cholesterol trafficking through the hydrophobic medium, efficiently reaching its target organelles and facilitating the expression of virulence properties that require membrane synthesis and vacuoles fusion. The importance of cholesterol transport for the virulence and the involvement of EhNPC1 and EhNPC2 in this process, make these proteins promising targets for developing better strategies to defeat the amoebiasis.

Materials and Methods

E. histolytica cultures

Trophozoites of *E. histolytica*, clone A, strain HM1:IMSS [45] (already-existing collection) and clone G3 [46] were axenically grown at 37°C in TYI-S-33 medium (TYI-S) and harvested at logarithmic growth phase by chilling the culture flasks at 4°C [46]. For some experiments, trophozoites were cultured in TYI medium without serum during 12 h (TYI) or in TYI supplemented with 3 µg/ml of U18 during 12 h (Sigma-Aldrich). Then, fresh medium with or without the drug was added to proceed with the experiments. All experiments presented here were performed at least three times in duplicate.

In silico analysis and phylogenetic trees construction

Human NPC1 (access number: hsa_4864) and bovine NPC2 (access number: bta_280815) protein sequences retrieved from the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>) were used as query to search putative *E. histolytica* EhNPC1 and EhNPC2 proteins and their orthologues. Structural domains were identified using the SMART genomics server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Identity and e-value between EhNPC1 and EhNPC2 hypothetical proteins, compared with their orthologues, were determined using the Expert Protein Analysis System (ExPASy) of the Proteomic Analysis Server from the NCBI Blast service program (<http://www.expasy.org/>). The predicted amino acid sequences of EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b (ehi_080220, ehi_068260 and ehi_188770, respectively) were aligned with orthologues sequences by ClustalW and data were submitted to phylogenetic analysis by UPGMA using MEGA 5.05 software [47]. Bootstrapping was performed for 1000 replicates.

3D structure modeling and molecular docking

The amino acid sequences of EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b were analyzed using the RaptorX server (<http://raptorx.uchicago.edu/>) and predicted structures and orientation were obtained via the OPM database (<http://opm.phar.umich.edu/>). The 3D NTD EhNPC1 model (1 to 250 amino acids) was compared with the human NTD-NPC1 (3GKI) (23 to 254 amino acids) crystal, whereas the EhNPC2 3D structure (full amino acid sequence) was compared with the *B. taurus* NPC2 crystal (2HKA). Both crystals were retrieved from the Protein Data Bank (PDB). Templates of other NPC1 and NPC2 proteins, located at PDB, were used to obtain the EhNPC1, EhNPC2a and EhNPC2b 3D structures, which were visualized using the UCSF Chimera software. Molecular docking with cholesterol was performed for the three proteins using the AutoDockTools V1.5.6 program, and the interaction sites were analyzed by Ligplotv.4.5.3 program (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>). The grid size was 126x126x126 points

with a 0.8 Å spacing. Dockings were performed with the empiric free energy function and the Lamarckian genetic algorithm. Number of GA runs was 200, using a maximum number for evaluation of 2×10^6 . Cholesterol structure was obtained from the ZINC12 database (zinc.docking.org) in PDB format and energy minimization was obtained through PRODGR (davapc1.boich.dundee.ac.us/prodgr/) and the CHIMERA V1.10.1 software.

PCR and RT-PCR assays

Genomic DNA and total RNA were isolated from trophozoites using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) and Trizol reagent (Invitrogen), respectively, according to the manufacturer's recommendations. cDNA was synthesized using oligo dT primers and the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplifications were carried out using 200 ng of DNA or cDNA as template and specific primers for *Ehnpc1* or *Ehnpc2a* or *Ehnpc2b* genes (S3 Table). We used 20 µl reaction volume containing 0.5 µM each primer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1X Taq buffer and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Cycling conditions included an initial denaturing step at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 50 or 55°C (according to respective T_m) for 1 min, and 72°C for 3 min, with a final extension step at 72°C for 7 min. Products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels and then, cloned and sequenced. As controls, for PCR amplification of DNA we omitted the DNA in the reaction mixture, and for RT-PCR we used DNase-treated RNA as template. For RT-PCR assays, 100 ng of cDNA, 0.15 µM of each primer (S3 Table) and the KAPA SYBR FAST PCR Master Mix (Kapa Biosystems) were used in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Data from three independent cDNA preparations were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with *ribosomal 40s S2* protein as house-keeping gene.

Production of α-EhNPC1 and α-EhNPC2 antibodies

The DEQPMYDKDGQYVPVEKRLK polypeptide from EhNPC1 (776 to 785 amino acids) was synthesized together with the KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) tag to increase its immunogenicity (GenScript). New Zealand rabbits (already-existing collection) were immunized first with 100 µg of this polypeptide resuspended in Titermax Gold adjuvant (1:1) (Sigma) and then, with two more weekly doses of 50 µg each, to generate the α-EhNPC1 antibody.

The *Ehnpc2a* and *Ehnpc2b* full-length genes were PCR-amplified using cDNA as template and specific primers, which introduced unique *Bam*HI and *Sal*I restriction enzyme sites, in the sense and antisense primers, respectively (underlined in S3 Table). Genes were cloned into the *pGEX6P-1* plasmid to generate *pGEX6P-Ehnpc2a* and *pGEX6P-Ehnpc2b* constructs. *E. coli* pLys-S bacteria were transformed with the plasmids, then, recombinant proteins were obtained by 0.1 mM IPTG induction. Recombinant proteins were electro-cluted and purified by size exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare). Then, 60 µg of each purified recombinant protein (rEhNPC2a and rEhNPC2b) were emulsified in Titer-Max Gold adjuvant (Sigma) and subcutaneously and intramuscularly inoculated in Wistar rats (already-existing collection) and BALB/C mice (already-existing collection), respectively. Two more doses (30 µg) of each protein were injected at 20 day intervals followed by bleeding to obtain antibodies. In all experiments, we used the rat α-EhNPC2a antibody (α-EhNPC2) as pan antibody, because it detected both EhNPC2a and EhNPC2b recombinant proteins. Pre-immune serum was obtained before immunizations.

Cell fractionation and western and dot blot assays

Trophozoite extracts (30 µg) were centrifuged 10 min at 13,000xg, and, soluble (supernatant) and insoluble (pellet) fractions were obtained. Samples were separated by 10 or 12% sodium

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes and probed with rabbit α -EhNPC1 (1:3000) or rat α -EhNPC2 (1:3000) or rabbit α -EhADH (1:500) [24] or rabbit α -EhRab7A (1:200) (kindly provided by Dr. Tomoyoshi Nozaki, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) [36] or rabbit α -EhCP112 (1:3000) [48] or rabbit α -SERCA (1:200) [32] or mouse α -actin (1:200) [49] antibodies. Membranes were washed and incubated with the species-specific HRP-labeled secondary antibodies (Zymed; 1:10000), and developed with ECL Prime detection reagent (GE-Healthcare). Pre-immune sera were used as controls. For dot blots analysis, samples were prepared as described [26], dripped on nitrocellulose membranes and treated with rabbit α -cholesterol antibodies (1:100). (Cloud Clone Co) followed by HRP-labeled secondary antibodies.

Laser confocal microscopy experiments

Trophozoites (grown in coverslips) in basal conditions or after phagocytosis were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at 37°C for 1 h, permeabilized with 0.2% Triton X-100 and blocked with 10% fetal bovine serum (FBS) in PBS. Then, preparations were incubated at 37°C for 1 h with α -EhNPC1 (1:100) or α -EhNPC2 (1:100) or α -EhADH (1:500) or α -EhRab7A (1:500) or α -Gal/GalNAc lectin (1:50) (kindly provided by Dr. W. Petri, University of Virginia, Charlottesville, USA) [50] or α -LBPA (1:30) [23, 26] or α -EhSERCA (1:1000) antibodies; followed by extensive washing and incubation for 1 h with species-specific FITC-, TRITC- or Cy5- labeled secondary antibodies (Zymed; 1:100) as appropriate. In some cases, nuclei were counterstained with propidium iodide (0.1 μ g/ml) (Sigma) for 5 min. For cholesterol detection, cells were stained with 250 μ g/ml filipin (Sigma). For acidic vacuoles detection, fixed trophozoites were incubated with 2 μ g/ml of LysoTracker (Molecular Probes) for 2 h at 37°C. We also performed experiments using 12 h ABS-starved trophozoites (incubated in TYI medium), cultured on coverslips, and challenged with 100 μ l of ABS for 0.5 to 7 min at 37°C, then, samples were processed as above. All preparations were preserved using Vecta Shield antifade reagent (Vector), examined using a Carl Zeiss LMS 700 confocal microscope and processed with ZEN 2009 Light Edition Software (Zeiss). To evaluate the co-localization between molecules, Pearson coefficients (PC) were obtained from at least 15 confocal independent images (laser sections: 0.5 μ m) using the ImageJ 1.45v software and the JACoP plugin [51].

Transmission electron microscopy (TEM)

For immunogold-labeling experiments, trophozoites in basal conditions were fixed with 4% PFA and 0.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at room temperature (RT). Samples were embedded in LR White resin (London Resin Co) and polymerized under UV at 4°C for 48 h. Thin sections (60 nm) were mounted on formvar-covered nickel grids followed by overnight (ON) incubation with α -EhNPC1 or α -EhNPC2 antibodies (1:20) and, then, incubated ON, with the respective secondary antibodies (1:60) conjugated to 20 and 10 nm gold particles, respectively (Ted Pella Inc.). Thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Jeol JEM-1011 transmission electron microscope. Number of gold particles was counted in 12 independent images of 10 μ m² each.

Cholesterol quantification

Trophozoites (5×10^5) were re-suspended in a mixture of chloroform:isopropanol:Nonidet P40 (7:1:1) and centrifuged at 13,000xg for 10 min. The organic phase was collected and dried at 50°C. Lipid samples were processed according to the Cholesterol Quantitation kit (Sigma)

Secretion assay

Trophozoites were grown in TYI medium for 12 h and incubated with 100 μ l of ABS for 0.5, 5 and 15 min at 37°C. Then, medium was collected in the presence of 1 mg/ml of E64 (Sigma) and centrifuged at 13,000 \times g for 10 min to obtain the secreted molecules in the supernatant fraction. To obtain the trophozoite extracts, cells were washed and lysed with proteases inhibitors as reported [52]. Samples were submitted to 12% SDS-PAGE and western blot assays using α -EhNPC1, or α -EhNPC2, or α -cholesterol, or α -EhCP112 or α -actin antibodies as described above.

Immunoprecipitation assays

Trophozoites were lysed in the presence of 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl and protease inhibitors by freeze-thawing cycles and vortexing. Immunoprecipitation assays were performed using 200 μ l of protein G-agarose (Invitrogen) and α -EhNPC1 or α -EhNPC2 antibodies as described [53]. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and western blot assays using α -EhNPC1 or α -EhNPC2 or α -EhADH or α -EhRab7A or α -EhSERCA or α -cholesterol antibodies, as described [24].

Phagocytosis assays

Trophozoites were incubated with human erythrocytes (already-existing collection) (1:25) at 37°C (for phagocytosis assays) for 5 to 60 min. For pulse-chase experiments, incubation was carried out for 5 min at 37°C. Then, preparations were quickly washed three times with TYI-water (1:1) to remove the adhered and non-ingested erythrocytes. Adhered and non-ingested erythrocytes were lysed by incubation in distilled water for 10 min at RT. Then, trophozoites and ingested erythrocytes were lysed using absolute formic acid and the hemoglobin was quantified by spectrophotometry at 400 nm [54]. In some experiments ingested erythrocytes were stained by Novikoff solution [55] and samples were observed through the light microscope (Axiolab, Zeiss).

In vivo virulence assays

Mice C57BL/6 strain (already-existing collection, 8–12 week old in a weight range of 22–30 g each), were anesthetized by an intraperitoneal injection of 25 mg/ml of ketamine and 2.5 mg/ml of xylazine in PBS. Then, 10^6 trophozoites were anally inoculated (with previously glycerol lubrication) in five mice per condition. As a control, mice were inoculated with PBS. After 30 min, laparotomy was performed, a cannula was inserted through a small incision in the proximal colon and the colon was washed extensively with PBS. After this, using the same cannula, Evans blue dye was administrated into the colon and mice were left at RT for 15 min. Then, anesthetized mice were euthanized by cervical dislocation. Subsequently, the colon was flushed with abundant PBS to remove the dye, followed by washing with 1 mM N-acetylcysteine to remove dye from mucus. Colon was dissected, weighted and the leaked dye was extracted with gentle shaking in 2 ml dimethyl formamide and spectrophotometrically measured at 620 nm. Permeability was calculated as OD₆₂₀ per g tissue.

Hematoxylin and eosin staining

Colon samples were fixed in 10% phosphate-buffered formalin and processed for conventional embedding paraffin, then, 4–6 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin [56]. Samples were analyzed using a light microscope (Axiolab, Zeiss).

Plasmid construction for silencing experiments

The first 400 or 420 bp from the 5'-end of *Ehnpc1* and *Ehnpc2a* genes, respectively, were PCR amplified using specific primers (S3 Table) and cloned into the vector psAP-2 downstream of the 5' upstream segment (473 bp) of the *ap-a* gene [40].

Transfection assays

Trophozoites of clone G3 were transfected as described [57]. Briefly, G3 trophozoites were cultured in 35-mm Petri dishes and transfected with 20 µg of the corresponding plasmid: psAP-2-*Ehnpc1* (1–400 bp) or psAP-2-*Ehnpc2a* (1–420 bp) containing gene fragments, using SuperFect (Qiagen) reagent. The transfected parasites were incubated for 48 h at 37°C, selected by 4 µg/ml of G-418 (Sigma-Aldrich) and maintained as a stable cell line. Then, *Ehnpc1* and *Ehnpc2a* silencing was confirmed by RT-qPCR, western blot analysis and immunofluorescence.

Migration assays

Serum-starved (3 h) trophozoites (7.5×10^4) were placed in the upper chamber of transwell inserts (5 µm pore size, 24 well, Costar) and 500 µl of ABS were added to the lower chamber. Trophozoites were then incubated for 3 h at 37°C. At the end of the incubation, the inserts and media were removed, and trophozoite migration was determined by counting the number of trophozoites that were attached to the lower chamber of the well.

Statistical analysis

Values of all assays were expressed as mean ± standard error of three independent experiments, each in duplicate. Statistical analyzes were carried out using the GraphPad Prism V 5.01 software by Anova or Student's test.

Ethic Statements

The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) ethics committee reviewed and approved the animal care and use of mice, rabbits and rats to produce antibodies and mice used in virulence *in vivo* experiments (Protocol Number 0313–06) by the document CICUAL 001, in which is specified that our institute fulfils the NOM-062-ZOO-1999 that deals with the Technical Specifications for Production, Care and Use of Laboratory Animals given by the General Direction of Animal Health of the Minister of Agriculture (SAGARPA), that verify the fulfil of the international regulations/guidelines for the use and care of animals used in laboratory and has verified and approved the animal care at CINVESTAV (Verification Approval Number: BOO.02.03.02.01.908).

Supporting Information

S1 Fig. Immunodetection of EhNPC2 proteins. Western blot assays of rEhNPC2a and rEhNPC2b recombinant proteins immunodetected with rat α-EhNPC2a antibodies. Trophozoites lysates (ET) were used as a positive control.
(TIF)

S1 Table. Sequence analysis of NPC1 in orthologues organisms
(DOCX)

S2 Table. Sequence analysis of NPC2 in orthologues organisms
(DOCX)

S3 Table. Oligonucleotides sequences. *Bam*HI and *Sal*I restriction enzyme sites are underlined in forward and reverser primers, respectively. (DOCX)

Acknowledgments

Authors are deeply grateful to Dr. Mineko Shibayama (Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, CINVESTAV-IPN) and María Eugenia Mendoza (Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN) for their valuable advises and help for the animal experiments. The authors thank Tomás Sánchez and Alejandrina Reyes for technical support.

Author Contributions

Conceptualization: EO JB AB MH MAR RJR.

Data curation: JB GGR JPM RJR AB MH EO.

Formal analysis: JB AB RJR GGR JPM MH EO.

Funding acquisition: EO.

Investigation: JB AB RJR MH GGR JPM AGR EO.

Methodology: JB RJR GGR JPM MH AGR MS.

Project administration: EO.

Resources: AGR MAR MS EO.

Software: JPM JB.

Supervision: EO AB.

Validation: EO.

Visualization: JB RJR EO JB AB GGR JPM MH.

Writing – original draft: EO JB AB RJR.

Writing – review & editing: EO JB AB RJR MH MS MAR.

References

1. Mortimer L, Chadee K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. 2010; 126(3):366–80. Epub 2010/03/23. S0014-4894(10)00090-1 [pii]. doi: [10.1016/j.exppara.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.005) PMID: [20303955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303955/)
2. Serrano-Luna J, Gutierrez-Meza M, Mejia-Zepeda R, Galindo-Gomez S, Tsutsumi V, Shibayama M. Effect of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes on *Entamoeba histolytica* virulence. *Can J Microbiol*. 2010; 56(12):987–95. Epub 2010/12/18. w10-088 [pii]. doi: [10.1139/W10-088](https://doi.org/10.1139/W10-088) PMID: [21164568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21164568/)
3. Das SR, Singh BN. Virulence of Strains of *Entamoeba Histolytica* to Rats & Guinea-Pigs, & Effect of Cholesterol on Virulence. *Indian J Exp Biol*. 1965; 3:106–9. Epub 1965/04/01. PMID: [14338050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14338050/)
4. Mittal K, Welter BH, Temesvari LA. *Entamoeba histolytica*: lipid rafts are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components. *Exp Parasitol*. 2008; 120(2):127–34. Epub 2008/07/01. S0014-4894(08)00146-X [pii]. PubMed Central PMCID: PMC2615684. doi: [10.1016/j.exppara.2008.06.003](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.06.003) PMID: [18588878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18588878/)
5. Welter BH, Goldston AM, Temesvari LA. Localisation to lipid rafts correlates with increased function of the Gal/GalNAc lectin in the human protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*. 2011; 41(13–14):1409–19. Epub 2011/11/17. S0020-7519(11)00252-9 [pii]. PubMed Central PMCID: PMC3232469. doi: [10.1016/j.ijpara.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.10.003) PMID: [22085647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22085647/)

6. Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 2005; 433(7028):865–8. Epub 2005/02/25. [nature03291](https://doi.org/10.1038/nature03291) [pii]. doi: [10.1038/nature03291](https://doi.org/10.1038/nature03291) PMID: [15729342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15729342/)
7. Mata-Cardenas BD, Vargas-Villarreal J, Martinez-Rodriguez HG, Castro-Garza J, Gonzalez-Garza MT, Said-Fernandez S. Auxotrophy to lipoproteins of *Entamoeba histolytica* cultivated under axenic conditions. *Parasitol Res*. 2000; 86(12):1018–21. Epub 2001/01/02. PMID: [11133106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11133106/)
8. Latour NG, Reeves RE, Guidry MA. Steroid Requirement of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. 1965; 16:18–22. Epub 1965/02/01. PMID: [14296055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14296055/)
9. Gaylor JL, Delwiche CV. Investigation of the multienzymic system of microsomal cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1973; 212:122–38. Epub 1973/01/01. PMID: [4532473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4532473/)
10. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(2):125–38. Epub 2008/01/25. [nrm2336](https://doi.org/10.1038/nrm2336) [pii]. doi: [10.1038/nrm2336](https://doi.org/10.1038/nrm2336) PMID: [18216769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18216769/)
11. Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet*. 2003; 64(4):269–81. Epub 2003/09/17. PMID: [12974729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12974729/)
12. Akaboshi S, Ohno K. [Niemann-Pick disease type C]. *Nihon Rinsho*. 1995; 53(12):3036–40. Epub 1995/12/01. PMID: [8577055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8577055/)
13. Ko DC, Gordon MD, Jin JY, Scott MP. Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol Biol Cell*. 2001; 12(3):601–14. Epub 2001/03/17. PubMed Central PMCID: [PMC30967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC30967/). PMID: [11251074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11251074/)
14. Davies JP, Ioannou YA. 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*. 2000; 275(32):24367–74. Epub 2000/05/24. [M002184200](https://doi.org/10.1074/jbc.M002184200) [pii]. doi: [10.1074/jbc.M002184200](https://doi.org/10.1074/jbc.M002184200) PMID: [10821832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10821832/)
15. Inohara N, Nunez G. ML—a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27(5):219–21. Epub 2002/06/22. [S0968-0004\(02\)02084-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02084-4) [pii]. PMID: [12076526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12076526/)
16. Kirchoff C, Osterhoff C, Young L. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol Reprod*. 1996; 54(4):847–56. Epub 1996/04/01. PMID: [8924505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8924505/)
17. McCauliff LA, Xu Z, Li R, Kodukula S, Ko DC, Scott MP, et al. Multiple Surface Regions on the Niemann-Pick C2 Protein Facilitate Intracellular Cholesterol Transport. *J Biol Chem*. 2015; 290(45):27321–31. Epub 2015/08/25. [M115.667469](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667469) [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC4646368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4646368/). doi: [10.1074/jbc.M115.667469](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667469) PMID: [26296895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26296895/)
18. Storch J, Xu Z. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791(7):671–8. Epub 2009/02/24. [S1388-1981\(09\)00043-2](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.02.001) [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC4281484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4281484/). doi: [10.1016/j.bbali.2009.02.001](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.02.001) PMID: [19232397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19232397/)
19. Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. 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*. 2008; 105(40):15287–92. Epub 2008/09/06. [0807328105](https://doi.org/10.1073/pnas.0807328105) [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC2563079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2563079/). doi: [10.1073/pnas.0807328105](https://doi.org/10.1073/pnas.0807328105) PMID: [18772377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18772377/)
20. Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Delsenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, et al. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*. 2009; 137(7):1213–24. Epub 2009/07/01. [S0092-8674\(09\)00393-6](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049) [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC2739658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2739658/). doi: [10.1016/j.cell.2009.03.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049) PMID: [19563754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19563754/)
21. Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, et al. Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab*. 2010; 12(2):166–73. Epub 2010/08/03. [S1550-4131\(10\)00233-0](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.016) [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC3034247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3034247/). doi: [10.1016/j.cmet.2010.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.016) PMID: [20674861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20674861/)
22. Chevallier J, Chamoun Z, Jiang G, Prestwich G, Sakai N, Matile S, et al. Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem*. 2008; 283(41):27871–80. Epub 2008/07/23. [M801463200](https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200) [pii]. doi: [10.1074/jbc.M801463200](https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200) PMID: [18644787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18644787/)
23. Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, et al. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol*. 1999; 1(2):113–8. Epub 1999/11/13. doi: [10.1038/10084](https://doi.org/10.1038/10084) PMID: [10559883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10559883/)
24. Christy NC, Buss SN, Petri WA Jr. Common pathways for receptor-mediated ingestion of *Escherichia coli* and LDL cholesterol by *Entamoeba histolytica* regulated in part by transmembrane kinase 39. *Int J Parasitol*. 2012; 42(4):393–400. Epub 2012/05/24. [S0020-7519\(12\)00050-1](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.009) [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC3449034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3449034/). doi: [10.1016/j.ijpara.2012.02.009](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.009) PMID: [22619755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22619755/)

25. Banuelos C, Garcia-Rivera G, Lopez-Reyes I, Orozco E. Functional characterization of EhADH1 12: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp Parasitol*. 2005; 110(3):292–7. Epub 2005/06/16. S0014-4894(05)00080-9 [pii]. doi: [10.1016/j.exppara.2005.03.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.005) PMID: [15955327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955327/)
26. Castellanos-Castro S, Cerda-Garcia-Rojas CM, Javier-Reyna R, Pais-Morales J, Chávez-Munguía B, Orozco E. Identification of the phospholipid lysobisphosphatidic acid in the protozoan *Entamoeba histolytica*: An active molecule in endocytosis. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; 5:224–36.
27. Perdomo D, Manich M, Syan S, Olivo-Marin JC, Dufour AC, Guillen N. Intracellular traffic of the lysine and glutamic acid rich protein KERP1 reveals features of endomembrane organization in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol*. 18(6):1134–52. Epub 2016/02/10. doi: [10.1111/cmi.12576](https://doi.org/10.1111/cmi.12576) PMID: [26857352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26857352/)
28. Perdomo D, Ait-Amman N, Syan S, Sachse M, Jhingan GD, Guillen N. Cellular and proteomics analysis of the endomembrane system from the unicellular *Entamoeba histolytica*. *J Proteomics*. 112:125–40. Epub 2014/08/12. S1874-3919(14)00395-9 [pii]. doi: [10.1016/j.jprot.2014.07.034](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.034) PMID: [25109464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25109464/)
29. Ioannou YA. The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab*. 2000; 71(1–2):175–81. Epub 2000/09/26. S1096-7192(00)93061-0 [pii]. doi: [10.1006/mgme.2000.3061](https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3061) PMID: [11001806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11001806/)
30. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822):860–921. Epub 2001/03/10. doi: [10.1038/35057062](https://doi.org/10.1038/35057062) PMID: [11237011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11237011/)
31. Eichinger L, Paschebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, et al. The genome of the social amoeba *Dictyostellium discoideum*. *Nature*. 2005; 435(7038):43–57. Epub 2005/05/06. nature03481 [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC1352341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1352341/). doi: [10.1038/nature03481](https://doi.org/10.1038/nature03481) PMID: [15875012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15875012/)
32. Xu S, Benoff B, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *J Biol Chem*. 2007; 282(32):23525–31. Epub 2007/06/19. M703848200 [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC3645284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3645284/). doi: [10.1074/jbc.M703848200](https://doi.org/10.1074/jbc.M703848200) PMID: [17573352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17573352/)
33. Martínez-Higuera A, Salas-Casas A, Calixto-Gálvez M, Chavez-Munguía B, Perez-Ishiwara DG, Ximenez C, et al. Identification of calcium-transporting ATPases of *Entamoeba histolytica* and cellular localization of the putative SERCA. *Exp Parasitol*. 2013; 135(1):79–86. Epub 2013/06/27. S0014-4894(13)00162-8 [pii]. doi: [10.1016/j.exppara.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.004) PMID: [23800535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23800535/)
34. Phillips MJ, Voeltz GK. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 17(2):69–82. Epub 2015/12/03. nrm.2015.8 [pii]. doi: [10.1038/nrm.2015.8](https://doi.org/10.1038/nrm.2015.8) PMID: [26627931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26627931/)
35. Verma K, Saito-Nekano Y, Nozaki T, Datta S. Insights into endosomal maturation of human holo-transferrin in the enteric parasite *Entamoeba histolytica*: essential roles of Rab7A and Rab5 in biogenesis of giant early endocytic vacuoles. *Cell Microbiol*. 2015; 17(12):1779–96. Epub 2015/06/23. doi: [10.1111/cmi.12470](https://doi.org/10.1111/cmi.12470) PMID: [26096601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096601/)
36. Nakada-Tsukui K, Saito-Nekano Y, Ali V, Nozaki T. A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell*. 2005; 16(11):5294–303. Epub 2005/08/27. E05-04-0283 [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC1266427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1266427/). doi: [10.1091/mbc.E05-04-0283](https://doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0283) PMID: [16120649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120649/)
37. Li X, Wang J, Coutavas E, Shi H, Hao Q, Blobel G. Structure of human Niemann-Pick C1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(29):8212–7. Epub 2016/06/17. 1607795113 [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC4961162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4961162/). doi: [10.1073/pnas.1607795113](https://doi.org/10.1073/pnas.1607795113) PMID: [27307437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27307437/)
38. Kiso-on-Singh V, Moreau F, Trusevych E, Chadee K. *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. *Am J Pathol*. 2013; 182(3):852–65. Epub 2013/01/30. S0002-9440(13)00003-5 [pii]. doi: [10.1016/j.ajpath.2012.11.035](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.11.035) PMID: [23357502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23357502/)
39. Lange S, Delbro DS, Jennische E, Evans blue permeation of intestinal mucosa in the rat. *Scand J Gastroenterol*. 1994; 29(1):38–46. Epub 1994/01/01. PMID: [8128176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8128176/)
40. Bracha R, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell*. 2003; 2(2):295–305. Epub 2003/04/10. PubMed Central PMCID: [PMC154849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC154849/). doi: [10.1128/EC.2.2.295-305.2003](https://doi.org/10.1128/EC.2.2.295-305.2003) PMID: [12684379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12684379/)
41. Lige B, Romano JD, Bandaru VV, Ehrenman K, Levitskaya J, Sampels V, et al. Deficiency of a Niemann-Pick, type C1-related protein in toxoplasma is associated with multiple lipidoses and increased pathogenicity. *PLoS Pathog*. 2011; 7(12):e1002410. Epub 2011/12/17. PPATHOGENS-D-11-00951 [pii]. PubMed Central PMCID: [PMC3234224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3234224/). doi: [10.1371/journal.ppat.1002410](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002410) PMID: [22174676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174676/)
42. Higaki K, Almanza-PParamio D, Sturley SL. Metazoan and microbial models of Niemann-Pick Type C disease. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1685(1–3):38–47. Epub 2004/10/07. S1388-1981(04)00133-7 [pii]. doi: [10.1016/j.bbalip.2004.08.010](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.010) PMID: [15465425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465425/)

43. Lu F, Liang Q, Abi-Mosleh L, Das A, De Brabander JK, Goldstein JL, et al. Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *Elife*. 2015; 4. Epub 2015/12/10. e121777 [pii]. PubMed Central PMCID: PMC4718804.
44. Dixit SS, Sleat DE, Stock AM, Lobel P. Do mammalian NPC1 and NPC2 play a role in intestinal cholesterol absorption? *Biochem J*. 2007; 408(1):1–5. Epub 2007/09/21. BJ20071167 [pii]. PubMed Central PMCID: PMC2049080. doi: [10.1042/BJ20071167](https://doi.org/10.1042/BJ20071167) PMID: [17880278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17880278/)
45. Orozco E, Guarneros G, Martínez-Palomo A, Sanchez T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med*. 1983; 158(5):1511–21. Epub 1983/11/01. PubMed Central PMCID: PMC2187140. PMID: [6313842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6313842/)
46. Diamond LS. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*. 1961; 134(3475):336–7. Epub 1961/08/04. PMID: [13722605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13722605/)
47. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28(10):2731–9. Epub 2011/05/07. msr121 [pii]. PubMed Central PMCID: PMC3203626. doi: [10.1093/molbev/msr121](https://doi.org/10.1093/molbev/msr121) PMID: [21546353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21546353/)
48. Montano S, Orozco E, Correa-Basurto J, Bello M, Chavez-Munguia B, Betanzos A. Heterodimerization of the *Entamoeba histolytica* EhCPADH virulence complex through molecular dynamics and protein-protein docking. *J Biomol Struct Dyn*. 2016:1–18. Epub 2016/02/11.
49. Kettis AA, Lidman K, Fagraeus A. Actin in *Entamoeba histolytica* trophozoites revealed by human actin antibodies. *J Parasitol*. 1977; 63(3):581–3. Epub 1977/06/01. PMID: [194025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/194025/)
50. Petri WA Jr., Chapman MD, Snodgrass T, Mann BJ, Broman J, Ravdin JI. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*. 1989; 264(5):3007–12. Epub 1989/02/15. PMID: [2536731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2536731/)
51. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 2006; 224(Pt 3):213–32. Epub 2007/01/11. JMI1706 [pii]. doi: [10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x) PMID: [17210054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210054/)
52. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. Epub 1970/08/15. PMID: [5432063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/)
53. Avalos-Padilla Y, Betanzos A, Javier-Reyna R, Garcia-Rivera G, Chavez-Munguia B, Lagunes-Guillen A, et al. EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog*. 2015; 11(7):e1005079. Epub 2015/08/01. PPATHOGENS-D-15-00139 [pii]. PubMed Central PMCID: PMC4521941. doi: [10.1371/journal.ppat.1005079](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005079) PMID: [26230715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26230715/)
54. Talamas-Lara D, Chavez-Munguia B, Gonzalez-Robles A, Talamas-Rohana P, Salazar-Villatoro L, Duran-Diaz A, et al. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: a comparative study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:626259. Epub 2014/07/09. PubMed Central PMCID: PMC4066688. doi: [10.1155/2014/626259](https://doi.org/10.1155/2014/626259) PMID: [25003123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003123/)
55. Novikoff AB, Novikoff PM, Davis C, Quintana N. Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1972; 20(12):1006–23. Epub 1972/12/01. PMID: [4640962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4640962/)
56. Shibayama M, Campos-Rodriguez R, Ramirez-Rosales A, Flores-Romo L, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A, et al. *Entamoeba histolytica*: liver invasion and abscess production by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Exp Parasitol*. 1998; 88(1):20–7. doi: [10.1006/expr.1998.4218](https://doi.org/10.1006/expr.1998.4218) PMID: [9501845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9501845/)
57. Baxt LA, Rastew E, Bracha R, Mirelman D, Singh U. Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryot Cell*. 9(8):1283–93. Epub 2010/06/29. EC.00015-10 [pii]. PubMed Central PMCID: PMC2918930. doi: [10.1128/EC.00015-10](https://doi.org/10.1128/EC.00015-10) PMID: [20581296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20581296/)