



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**“Análisis de factores de virulencia en vesículas
extracelulares producidas por *Entamoeba
histolytica*”**

T E S I S

Que presenta

Biól. Armando Daniel Corona Arzola

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

Directora de tesis:

Dra. Ma. Esther Orozco Orozco

Asesoras de tesis:

Dra. Cecilia Bañuelos Barrón Dra. Rosa Ma. del Ángel Núñez

Ciudad de México

Noviembre 2021

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco, así como la asesoría de la Dra. Cecilia Bañuelos Barrón y la Dra. Rosa Ma. del Ángel Núñez del mismo departamento.

Durante este proyecto de investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca No. 746935 del programa 000049 – Maestría en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular. CVU 721449, matrícula 191220002.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó entre el 2020 y 2021 en plena pandemia del virus SARS-CoV-2 por lo que sacarlo a flote y terminarlo fue muy complicado para mí, a pesar de las limitantes se finalizó gracias a la ayuda de varias personas, entre ellas quiero dar un doble agradecimiento a:

-La **Dra. Esther Orozco** por permitirme estar en su laboratorio y siempre apoyarme, siempre fue muy amable conmigo y se convirtió en alguien que admiro mucho.

-A la **Dra. Cecilia Bañuelos** que me ayudó muchísimo. Ella es un modelo a seguir para mí porque me recuerda que, en un mundo donde muchos pierden el piso por un simple título, hay quienes llegan alto sin dejar de ser una bonita persona.

-A la **Dra. Rosa Ma. del Ángel**, que me tuvo mucha paciencia y amabilidad y es una mujer muy fuerte.

-A la **Dra. Bibiana Chávez Munguía** y a la **Biol. Lizbeth Iliana Salazar** por ayudarme en la parte de microscopía electrónica de transmisión.

-A la **Dra. Guille** que me enseñó con mucha paciencia los tips para mejorar mis experimentos y por ser una persona muy amable conmigo y a **Gabriela Herrera Reyes** por instruirme y enseñarme como se manejan las cosas en el laboratorio.

-A mis amigas **Mizti, Dxine, Diana y Anais**, por amenizar mi estancia en el laboratorio, brindarme su amistad, su apoyo cuando tenía dudas en mis experimentos, darme posada cuando ya era tarde y no había transporte para ir a casa y ser mis psicólogas siempre que lo necesitaba.

-A mi mejor amiga **Jimena**, que después de 11 años de amistad seguimos apoyándonos y creciendo juntos.

-A mis amix de la carrera: **Alondra, Liliana y Kevin**, con quienes hice una bonita amistad que sé que perdurará a pesar de separar nuestros caminos.

-A la **Dra. Susana Munguía** quien me enseñó que las clases pueden ser divertidas y de calidad.

-A **Randy** y a **Gaby** por creer en mí, siempre fue muy padre encontrármelos en el pasillo y desahogar nuestras penas.

-A mi amigo **Miguel Ruiz** quien es un gran científico y siempre me brindó su apoyo.

-Y finalmente a mi amiga la **Dra. Elvia Gallegos**, a quien le prometí que haría esta maestría y crecería profesionalmente.

いい人にあっただけで最後にいい経験になった

DEDICATORIA

♥ *A mi mamá y a mi papá. Quienes siempre me han apoyado en todos los retos que he enfrentado. Y cada vez que quiero tirar la toalla me dicen: “¿A poco esto va a poder más que tu?”.....Esta vez no fue la excepción.*

♥ *A mis 2 hermanos, mi cuñada, mi sobrina y toda mi familia que siempre han creído en mi.*

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia sobre las vesículas extracelulares (VE)	1
1.2. Definición de las VE	2
1.3. Clasificación por origen	2
1.4. Clasificación por tamaño	5
1.5. Contenido de las vesículas	5
1.6. Secreción de exosomas	7
1.7. Maquinaria ESCRT	9
1.8. Vía dependiente de ESCRT	10
1.9. Vías independientes de ESCRT	11
1.10. Estudios de VE en parásitos	11
1.11. <i>Entamoeba histolytica</i> Schaudinn, 1903	13
1.12. Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	14
1.13. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	15
1.14. Epidemiología de <i>E. histolytica</i>	17
1.15. Factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	17
1.16. VE producidas por <i>E. histolytica</i>	18
1.17. Proteínas ESCRT de <i>E. histolytica</i>	19
1.18. Proteína EhVps23	21
1.19. Proteína accesoria EhCP112	23
1.20. Proteína accesoria EhADH	24
1.21. Proteínas EhVps26 y EhVps35	25
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	30

4.1. OBJETIVO GENERAL	30
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
5. MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1. Diseño experimental	31
5.2. Etapas experimentales	32
<i>Obtención de anticuerpos</i>	32
<i>Cultivo de E. histolytica</i>	33
<i>Técnica de obtención de extractos totales</i>	34
<i>Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE</i>	35
<i>Tinción con azul de Coomassie</i>	36
<i>Western-blot</i>	36
<i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	37
6. RESULTADOS	38
6.1. Selección del método para aislar VE de <i>E. histolytica</i>	38
6.2. Detección de las proteínas de interés en las VE	41
6.3. Determinación del tipo de VE producidas por <i>E. histolytica</i>	44
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	53
10. REFERENCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los tipos de VE -----	3
Figura 2. Biogénesis de exosomas-----	4
Figura 3. Moléculas comúnmente encontradas en exosomas -----	6
Figura 4. Etapas en la biogénesis de exosomas-----	8
Figura 5. Procesos que involucran la participación de la maquinaria ESCRT -----	10
Figura 6. Morfología de <i>E. histolytica</i> -----	14
Figura 7. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> -----	16
Figura 8. Maquinaria ESCRT en <i>E. histolytica</i> -----	21
Figura 9. Estructura terciaria de EhVps23-----	22
Figura 10. Estructura terciaria de EhCP112 -----	24
Figura 11. Estructura terciaria de EhADH -----	25
Figura 12. Formación de estructuras tubulares por el complejo del retrómero -----	26
Figura 13. Modelaje de las proteínas del retrómero -----	27
Figura 14. Estrategia experimental-----	32
Figura 15. Obtención de VE por ensayo de secreción -----	38
Figura 16. Obtención de VE por la técnica de Chiou y Ansel (2016) modificada-----	39
Figura 17. Patrón proteico de las distintas técnicas utilizadas para aislamiento de VE --	41
Figura 18. Detección de las proteínas EhVps23, EhADH y EhCP112 en VE -----	43
Figura 19. Detección de las proteínas EhVps26, EhVps35 en VE -----	44
Figura 20. Fotografías de VE secretadas por <i>E. histolytica</i> -----	45

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Proteínas ESCRT encontradas previamente en VE producidas por <i>E. histolytica</i>	19
TABLA 2. Preparación estándar de la mezcla de inhibidores.	34
TABLA 3. Mezcla para secreción.	35

ABREVIATURAS

ADN -----	Ácido Desoxirribonucleico
ADP -----	Adenosín difosfato
ARN -----	Ácido ribonucleico
ATP -----	Adenosín trifosfato
CP -----	Cisteína proteasa.
CRC -----	Complejo de reconocimiento de carga. Del inglés "Cargo recognition complex".
E64 -----	N-(N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil)agmatina. Es un epóxido inhibidor de un gran número de proteasas, como las proteasas de cisteínas.
et al. -----	Abreviación de la locución latina " <i>Et alii</i> " que significa "y otros", refiriéndose a los autores de una referencia bibliográfica.
ESCRT -----	Complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte. Del inglés "Endosomal Sorting Complexes Required for Transport".
HSC70 -----	Proteína de choque térmico constitutiva de 70 kDa. Traducción del inglés "Heat Shock Cognate".
ILVs -----	Vesículas intraluminales. Del inglés "Intraluminal vesicles".
IPMCs -----	Compartimentos intracelulares conectados a la membrana plasmática. Del inglés "Intracellular plasma membrane-connected compartments".
kDa -----	Kilodalton.
MVB -----	Cuerpo multivesicular. Del inglés "Multivesicular body".
nm -----	Nanómetro.
PHMB -----	Ácido p-hidroximercuribenzoico. Inhibe la proteasas de cisteínas y actúa como un bloqueador reversible específico de tioles.
PI3P -----	Fosfatidilinositol 3-fosfato.
PVs -----	Vacuolas periféricas. Del inglés "Peripheral vacuoles".
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. Del inglés "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis".
TEM -----	Microscopía electrónica de transmisión. Del inglés "Transmission electron microscopy".
VE -----	Vesículas extracelulares.
Vps -----	Proteína de clasificación vacuolar. Del inglés "Vacuolar protein sorting".
xg -----	Unidad que determina la aceleración de centrifugación, también se le conoce como fuerza centrífuga relativa o "Relative Centrifugal Force (RCF)". En este trabajo se usa esta unidad preferentemente a comparación de las "Revoluciones por minuto (rpm)", ya que estas últimas varían dependiendo el radio del rotor que se use en cada centrifuga.

RESUMEN

Los estudios en vesículas extracelulares (VE) han cobrado importancia hoy en día debido a la gran cantidad de moléculas que se han encontrado en su interior, en especial en microvesículas y exosomas de mamíferos. Un grupo de proteínas que claramente se encuentra dentro de las VE son las pertenecientes a la maquinaria ESCRT. En parásitos como *E. histolytica* son pocos los estudios que se han realizado enfocados en analizar las VE y su contenido, sin embargo, se ha reportado la presencia de las proteínas de la maquinaria ESCRT como EhVps23, y EhADH y algunas del complejo del retrómero como EhVps26 y EhVps35 en VE liberadas por el parásito. Aún falta realizar más estudios que se enfoquen en las concentraciones de estas proteínas dentro de la VE secretadas por la amiba y a la función de éstas, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de proteínas de la maquinaria ESCRT y del retrómero en VE producidas por *E. histolytica*. Para esto, se analizaron dos técnicas, el ensayo de secreción y la técnica modificada de Chiou y Ansel para aislamiento de VE, ambos con trofozoítos cultivados en condiciones estándar, siendo más práctico para este trabajo el ensayo de secreción. Por Western-blot se analizaron: la proteína EhVps23 de la maquinaria ESCRT-I, las proteínas accesorias EhADH y EhCP112 y las proteínas del retrómero EhVps26 y EhVps35, comparando sus niveles de expresión dentro de la amiba antes de la secreción y en las VE liberadas. Como resultado, dentro de las VE se encontró una disminución de las proteínas EhVps23, EhADH y EhCP112, mientras que la proteína EhVps26 presentó un posible enriquecimiento y a su vez la proteína EhVps35 presentó los mismos niveles tanto en las VE como en las amibas antes de la secreción. Finalmente, se observó por tinción negativa en microscopía electrónica de transmisión (TEM), que las VE encontradas eran tanto microvesículas como exosomas. Este trabajo abre la puerta a un gran número de futuros experimentos para entender mejor la presencia de estas proteínas dentro de las VE de *E. histolytica*.

ABSTRACT

Nowadays the studies about extracellular vesicles (EVs) have gained importance due to the wide range of molecules found inside them, specially, in mammal's microvesicles and exosomes. One group of proteins clearly found inside the EVs are those belonging to the ESCRT machinery. In parasites like *E. histolytica*, the studies focused on the analysis of its EVs and its content are few, nevertheless, the presence of proteins like EhVps23, EhADH from ESCRT's machinery as well as EhVps26 and EhVps35 from retromer complex has already been reported. Because of the absence of studies concerned about the presence of these kind of proteins inside of the amoeba's EVs, the main objective of this work was to analyze the presence of ESCRT and retromer proteins inside of the *E. histolytica* EVs. To accomplish this, we develop two EVs isolation techniques, the secretion assay, and a modification of Chiou and Ansel's EVs isolation technique, being more practical for this work the secretion assay. By Western-blot we analyzed the ESCRT-I protein EhVps23, the accessory proteins EhADH and EhCP112 and the retromer proteins EhVps26 and EhVps35, comparing their expression before the secretion inside the amoeba and after the secretion inside the EVs. In our results we found inside the EVs, a minor concentration of EhVps23, EhADH and EhCP112, a probable enrichment of EhVps26 and an equal concentration of EhVps35 between the EVs and the levels inside the amoeba before the secretion. Finally, using negative staining, we observed by electron transmission microscopy (TEM) that the EVs found in this work were microvesicles and exosomes. So, this work opens the door to a range of future experiments to a better understanding the presence of these proteins inside the EVs from *E. histolytica*.

1. INTRODUCCIÓN

Recientemente los estudios de interacciones entre parásitos y hospederos se han enfocado en el análisis y caracterización de vesículas extracelulares (VE) que liberan tanto los parásitos como las células del hospedero. Las vesículas son liberadas por el hospedero en respuesta al parásito intruso, y por parte del parásito como una respuesta a cambios ambientales para proveer condiciones que permitan la supervivencia y la expresión de la patogenicidad (Coakley *et al.*, 2015). Los potenciales usos de estas vesículas extracelulares se han enfocado principalmente en tres aplicaciones clínicas: 1) la inmunoterapia (para atenuar respuestas autoinmunes), 2) la inmunización, como en el caso de las vacunas y 3) el diagnóstico, el cual consiste en la detección de moléculas propias del parásito a través de las vesículas que éste libera en la sangre del paciente (Khosravi *et al.*, 2020). También existen potenciales usos de las VE como acarreadores de fármacos ya que su composición es similar a las células del cuerpo humano, por lo que no generan respuestas inmunogénicas, además de tener la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Ha *et al.*, 2016).

1.1. Historia sobre las vesículas extracelulares (VE)

Los primeros estudios que describen algunas de estas VE fueron los de Peter Wolf en 1967 y Clarke Anderson en 1969. Wolf estudiaba las propiedades de las plaquetas de la sangre humana, encontrando que el plasma humano contenía unas pequeñas partículas con propiedades coagulantes, al cual llamó “polvo de plaquetas”; por su parte, Anderson estudiaba las placas epifisarias de las tibias de ratones, e identificó dentro de la matriz del cartílago, unas “vesículas” que producían los condrocitos y que participaban en la calcificación. Tiempo después, en 1981 Trams y colaboradores, estudiando neoplastomas de ratón describieron que éstas “exfoliaban” unas vesículas de membrana que llamaron “microvesículas”, las cuales tenían funciones fisiológicas, separándolas en dos poblaciones por su tamaño, unas entre 500-1000 nm de diámetro y otras más pequeñas de alrededor de 40 nm, sugiriendo que se empezara a referirse a estas

vesículas como “exosomas”. Finalmente en 1987, Rose Johnstone y colaboradores, al estudiar la maduración de los reticulocitos de oveja, utilizaron el término de “exosomas” en las vesículas que secretaban estas células al momento de deshacerse del receptor de transferrina y madurar. Hoy en día, las VE presentan distintos nombres dependiendo los criterios de clasificación que han establecido algunos autores, sin embargo, entre cada autor existen diferencias que aun crean discrepancias para la clasificación de las VE.

1.2. Definición de las VE

Actualmente se consideran a las VE como partículas de escala nanométrica formadas por dobles membranas fosfolipídicas liberadas a partir de una célula madre, las cuales encapsulan distintas moléculas como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos, con el fin de transferir estos materiales a una célula receptora. Son liberadas por células tanto procariontas como eucariotas y su biogénesis se realiza por distintas vías, dependiendo la célula que las origina, por lo que su contenido puede variar. Existen diversos rangos de tamaño que van desde los 30 nm hasta los 10 μm de diámetro. Actualmente se realizan muchos estudios enfocados en analizar su composición membranal, biogénesis, funciones y contenido, y en el caso de haber células receptoras, se busca entender como se da el proceso de especificidad, reconocimiento e integración. Tampoco se han esclarecido todavía las causas por las que son tan altamente eficientes durante la entrega de moléculas a otras células receptoras y la forma en que varía el contenido dependiendo la célula productora, por lo que, su clasificación aún se encuentre en discusión. Por ahora, los criterios más utilizados para clasificarlas son: su origen, tamaño y contenido (Margolis y Sadovsky, 2019), los cuales se describen a continuación:

1.3. Clasificación por origen

Khosravi y colaboradores (2020) mencionan que los tipos de VE son:

- i) Microvesículas: Proviene de pequeñas escisiones de la membrana plasmática

- ii) Cuerpos apoptóticos: Se forman tras la desintegración de la membrana.
- iii) Oncosomas: Vesículas grandes producidas por células cancerígenas.
- iv) Exosomas: Son las vesículas intraluminales que se forman dentro de los cuerpos multivesiculares y después son liberadas al medio extracelular (**Figura 1**).

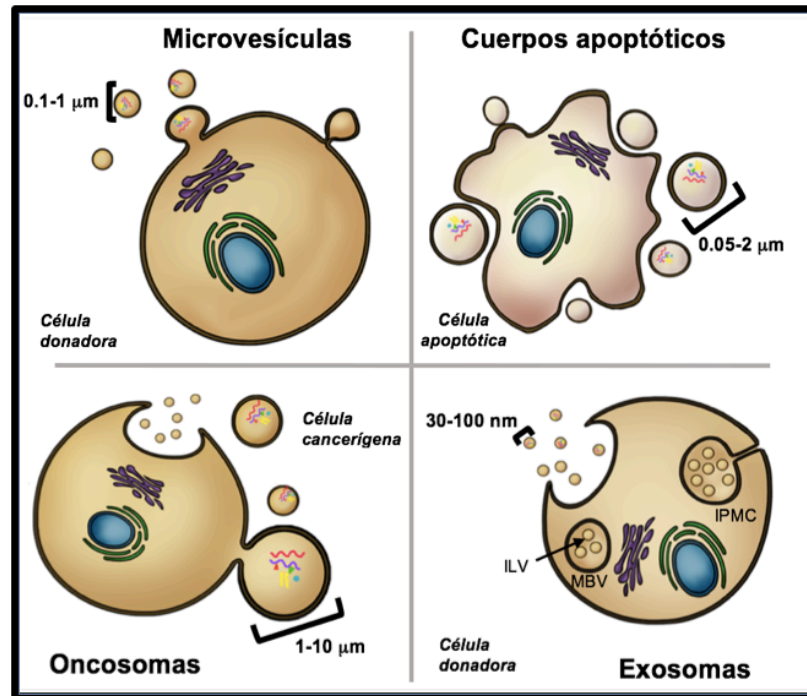


Figura 1. Clasificación de los tipos de VE. Reuniendo la información de Khosravi y colaboradores (2020) y de Matarredona y Pastor (2020), las VE se clasifican en **A)** Microvesículas, provenientes de escisiones de la membrana plasmática de tamaños entre 0.1-1 μm . **B)** Cuerpos apoptóticos de células en procesos de muerte celular de tamaños entre 0.05 y 2 μm . **C)** Oncosomas, que son las VE que liberan las células cancerígenas con diámetros de 1-10 μm . **D)** Exosomas, que son las VE más pequeñas proveniente de MBVs y de IPMCs o directamente por escisiones de la membrana plasmática, su tamaño varía entre los 30 y 100 nm. **MBV:** Cuerpo multivesicular. **IPMC:** Compartimento intracelular conectado a la membrana plasmática. **ILV:** Vesícula intraluminal. μm : micrómetros. **nm:** nanómetros. (**Figura basada en el diagrama original de Matarredona y Pastor del 2020**).

Los primeros tres tipos (las microvesículas, los cuerpos apoptóticos y los oncosomas) se consideran ectosomas por provenir de protuberancias que salen de la membrana plasmática, mientras que los exosomas se consideran de origen endosómico por ser formados dentro de las células. En el caso de los exosomas, aunque la mayoría de las investigaciones mencionan que su biogénesis es

únicamente a partir de los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares, Pegtel y Gould en 2019 mencionan que este tipo de vesículas también pueden formarse a partir de escisiones directas de la membrana plasmática y de compartimentos intracelulares conectados a la membrana plasmática llamados IPMCs (intracellular plasma membrane-connected compartments), estos últimos son invaginaciones profundas de la membrana plasmática que presentan cuellos largos que permiten el libre paso de pequeñas moléculas, dentro de ellas se da la formación y acumulación de vesículas que después son liberadas (**Figura 2**). Esto se sabe porque experimentalmente se ha demostrado que en células embrionarias de riñón humano HEK293, el sitio predominante para la formación de exosomas es la membrana plasmática y no las membranas endosomales. También se ha visto que tanto proteínas endosomales, como CD63 y algunas de membrana plasmática como CD9 y CD81 se encuentran presentes en estos exosomas, por lo que las vías para su biogénesis son compartidas (Fordjour *et al.*, 2019).

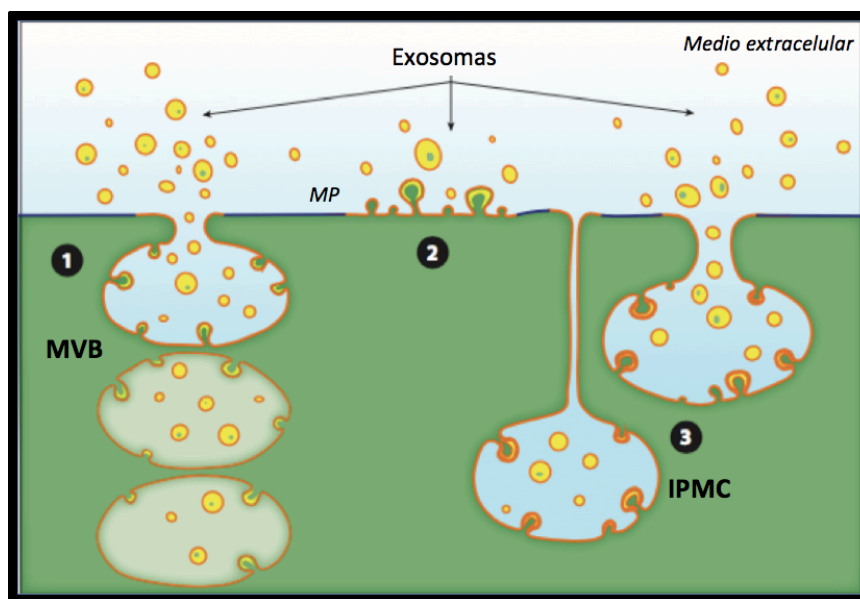


Figura 2. Biogénesis de exosomas. La formación de exosomas puede darse de distintas maneras. **1)** por la formación de vesículas dentro de endosomas tempranos, los cuales se convierten en cuerpos multivesiculares (MVB) y se unen a la membrana plasmática para liberar los exosomas; **2)** escisiones directas de la membrana plasmática y **3)** vesículas que se forman dentro de los compartimentos intracelulares conectados a la membrana plasmática (IPMCs) que posteriormente serán liberadas al medio extracelular. **MP:** Membrana plasmática (**Esquema modificado de Pegtel y Gould, 2019**).

1.4. Clasificación por tamaño

Aunque existe la clasificación por origen, el tamaño es el criterio más utilizado para distinguir entre los distintos tipos de VE, sin embargo en este caso, las clasificaciones varían dependiendo los autores que se consulten, por ejemplo Khosravi y colaboradores (2020), mencionan que en general el término de VE engloba a todos los tipos de vesículas que van desde los 30 nm hasta los 5 μm , mientras que otros autores como Margolis y Sadovsky (2019) proponen que el rango mínimo es de 10 o 20 nm y el máximo aún es desconocido porque la mayoría de los estudios han estado enfocados en vesículas que miden menos de 1 μm , teniendo en promedio un diámetro cercano a los 100 nm. Por lo tanto se puede considerar que los tamaños son de: 30 -150 nm para los exosomas, 100 – 1000 nm para las mircovesículas, 500 – 2000 nm para los cuerpos apoptóticos y los tamaños mayores como de 10 μM son para los oncosomas.

1.5. Contenido de las vesículas

Una de las características claras que hasta ahora se sabe sobre las VE es que tienen un contenido heterogéneo que consta de proteínas, lípidos, material genético y metabolitos (**Figura 3**) (Khosravi *et al.*,2020). Diversos estudios se han enfocado en analizar algún compuesto específico dentro de las VE, por ejemplo, Skotland y colaboradores (2017) recopilando la información de distintos autores y distintas líneas celulares, encontraron que respecto a lípidos, la mayoría de las VE tienen un enriquecimiento de dos a tres veces mayor de colesterol, esfingomielina, glicoesfingolípidos y fosfatidil mielina comparados con la célula que las origina, mientras que la cantidad de fosfatidil colina generalmente es menor.

En cuanto al contenido proteico, muchos estudios se han enfocado principalmente en exosomas y en células de mamíferos encontrando comúnmente algunos tipos de proteínas específicas. Debido a esto, a partir de aquí nos enfocaremos más a los exosomas, Pegtel y Gould (2019), explican que un grupo de proteínas que claramente se encuentra dentro de estas partículas son las pertenecientes a la

maquinaria ESCRT, como la proteína TSG101 (llamada así en humanos o su homóloga Vps23 en levaduras), la cual pertenece al complejo ESCRT-I y es un marcador exosomal.

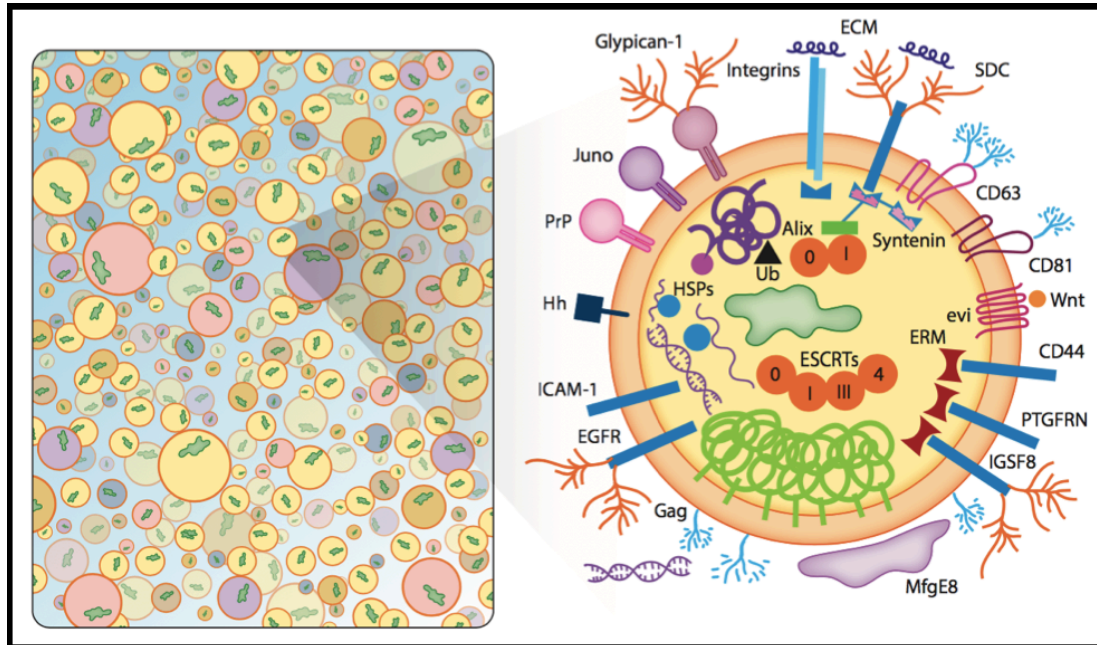


Figura 3. Moléculas comúnmente encontradas en exosomas. Se han encontrado hasta ahora distintos materiales dentro de una gran cantidad de exosomas de mamíferos como son material genético, lípidos y proteínas como tetraspaninas y proteínas pertenecientes a la maquinaria ESCRT entre otras. **ECM:** Matriz extracelular. **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico. **ERM:** Proteínas del grupo Ezrina, Radixina y Moesina. **ESCRTs:** Proteínas del complejo de clasificación endosómica necesarios para el transporte. **Gag:** Proteínas retrovirales Gag. **Hh:** Proteínas Shh Hedgehog. **Hsp:** Proteínas de choque térmico. **ICAM-1:** Moléculas de adhesión intercelular 1. **IGSF8:** Miembro 8 de la superfamilia de inmunoglobulinas. **Integrins:** Integrinas. **MfgE8:** Proteína glóbulo de grasa de la leche-factor 8 EGF. **Prp:** Proteína priónica. **PTGFRN:** Regulador negativo del receptor de prostaglandina F2. **SDC:** Sindecano. **Ub:** Ubiquitina. **Syntenin:** Sintenina. **Wnt:** Proteína Wnt Wingless. (Esquema tomado de Pegtel y Gould, 2019).

A pesar de que no se han encontrado todas las proteínas de la maquinaria ESCRT, Pegtel y Gould (2019) consideran que toda la maquinaria ESCRT podría ser necesaria para la producción de exosomas, ya que ésta participa en varios procesos celulares importantes, principalmente, la formación de cuerpos multivesiculares, la citocinesis y los eventos de escisión de la membrana; Sin embargo, existe evidencia de que la biogénesis de exosomas no es un proceso del

todo dependiente de la maquinaria ESCRT, por lo que para ellos, la maquinaria ESCRT podría contribuir más bien como andamio para el reclutamiento de cargos en las vesículas nacientes y no estar involucrada en la escisión de las vesículas. Finalmente, ellos también aclaran que algunos componentes de la maquinaria ESCRT-III que están relacionados con la autofagia podrían estar fuertemente involucradas en la secreción de exosomas. Estos datos experimentales demuestran la necesidad de realizar aún más estudios para precisar la participación de la maquinaria ESCRT en la biogénesis de VE y determinar los mecanismos alternos para su secreción.

1.6. Secreción de exosomas

Se han identificado claramente varios pasos en la biogénesis de exosomas:

I) Primero se da un proceso de endocitosis que permite la formación de un endosoma temprano por gemación hacia adentro de la membrana celular quedando las proteínas de la membrana en la parte interna del endosoma.

II) Después se da otra gemación dentro de los endosomas formándose varias vesículas intraluminares (ILVs por la abreviación del inglés “intraluminal vesicles”) el cual ahora se llama endosoma tardío o cuerpo multivesicular (MVBs del inglés “multivesicular body”).

III) Durante la invaginación de la membrana endosomal para formar las ILVs, quedan dentro proteínas citoplasmáticas, las cuales se formaron previamente en el retículo endoplásmico, se clasificaron y se procesaron en el complejo de Golgi, fusionándose posteriormente con la membrana del endosoma para formar parte de las vesículas intraluminales, así, las proteínas que estaban fuera de la membrana del endosoma, quedan dentro de las vesículas. Como se mencionó antes, el proceso de formación de vesículas puede ser dependiente o independiente de las proteínas de la maquinaria ESCRT, por lo que la biogénesis y los mecanismos de secreción se clasificarían en dos vías: las dependientes de la maquinaria ESCRT y las independientes de este mecanismo.

IV) Finalmente, los MVBs pueden fusionarse con lisosomas para llevar las moléculas cargo a degradación o también pueden seguir la vía endocítica en la

cual, las membranas de los MVBs se fusionan con la membrana celular y las ILVs que llevan moléculas cargo dentro de ellas son liberadas al medio extracelular teniendo el nombre ahora de exosomas (Jadli *et al.*, 2020) (Figura 4).

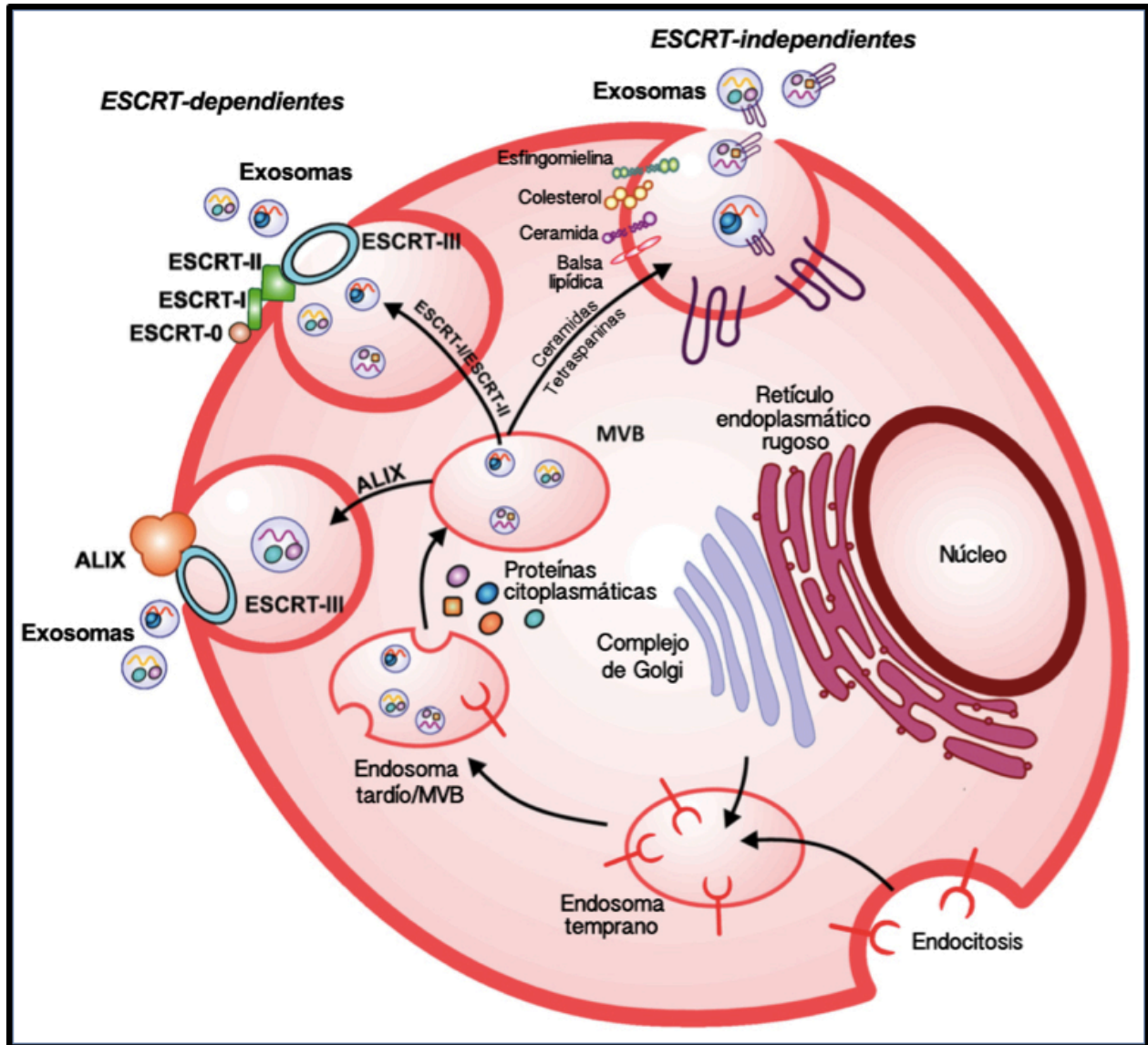


Figura 4. Etapas en la biogénesis de exosomas. La formación de exosomas se inicia con: la endocitosis de la membrana celular y la formación del endosoma temprano, seguido de la formación de vesículas intraluminales (ILVs), formando el endosoma tardío o cuerpo multivesicular (MVB), en la cual se da la asignación de moléculas cargo dentro de estas vesículas, lo cual es mediado por proteínas de la maquinaria ESCRT (vía dependiente de ESCRT) o por ceramidas o tetraspaninas (vía independiente de ESCRT), en la cual tienen un papel importante distintos lípidos como esfingomielinas, colesterol o las balsas lipídicas. Finalmente los exosomas son las vesículas que se formaron dentro de estos MVB y se liberan al medio extracelular. (Esquema tomado y modificado de Jadli *et al.*, 2020).

En general la producción de exosomas puede darse de manera constitutiva o ser inducida por factores como pH bajo, daño al ADN, trombina, ATP extracelular, incremento de Ca⁺ intracelular, hipoxia y estimulación con LPS (Jadli *et al.*, 2020). En algunos experimentos se ha visto que el colesterol unido a ciclodextrinas en distintas líneas celulares de mamífero también favorece la producción de exosomas, mientras que en otros la impide, por lo que el efecto puede variar dependiendo la línea celular (Pfrieger y Vitale, 2018). Todos estos trabajos resaltan la necesidad de realizar más estudios relacionados con la secreción de exosomas tanto en la vía dependiente de ESCRT como en las vías independientes ya que los mecanismos implicados en la biogénesis de exosomas, la designación de moléculas cargo y los efectos que éstas puedan tener en las células receptoras temas que aún faltan por esclarecer.

1.7. Maquinaria ESCRT

La maquinaria ESCRT (del inglés “Endosomal Sorting Complexes Required for Transport” o su traducción “Complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte”) está constituida por cuatro complejos multiméricos que son ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III junto con proteínas accesorias como la ATPasa Vps4, las proteínas CHMP y miembros de la familia Bro1 como las proteínas ALIX. Los complejos ESCRT están altamente estudiados en mamíferos, se encuentran en el citoplasma y participan en muchos procesos como pueden ser: La formación de MVBs (donde participa ESCRT-0, I, II y III), el sellado y remodelado de la envoltura nuclear después de distintos eventos celulares (en estos, participa el complejo ESCRT-III junto con CHMP7 entre otras proteínas) y la reparación o remodelado de la membrana plasmática (donde ALG-2/ALIX es pieza clave para reclutar a TSG101, junto con la maquinaria de ESCRT-III y ESCRT-I). En todos estos eventos es requerido principalmente ESCRT-III y la proteína Vps4 ATPasa (Radulovic y Stenmark, 2018) (**Figura 5**). Por otro lado la maquinaria ESCRT también participa en la reparación de daños en membranas lisosomales (Skowrya *et al.*, 2018).

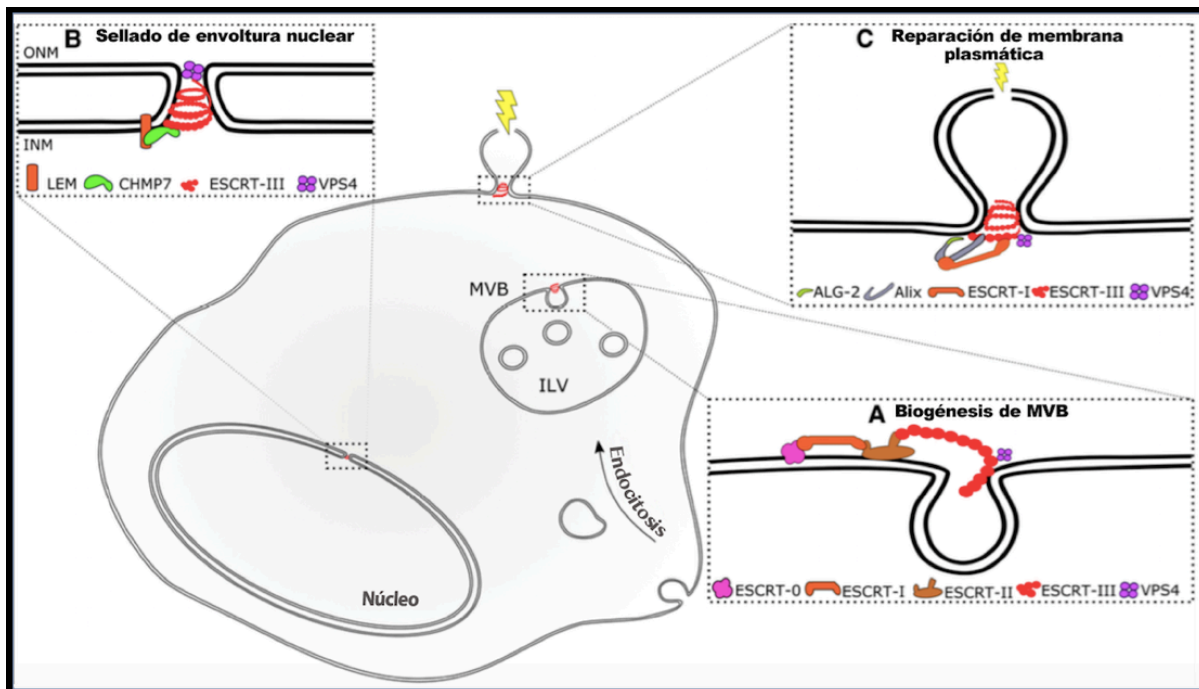


Figura 5. Procesos que involucran la participación de la maquinaria ESCRT. A) Formación de vesículas intraluminales (ILVs) dentro de endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVBs), donde ESCRT-0 captura moléculas cargo ubiquitinadas en la membrana endosomal y recluta a ESCRT-I, II y III, participando también VPS4. B) El sellado y remodelado de la membrana nuclear durante el cual CHMP7 interacciona con proteínas con dominio LEM y reclutan al complejo ESCRT-III. C) Eventos de reparación de la membrana plasmática, siendo ALG-2/ALIX junto con ESCRT-I, quienes reclutan a ESCRT-III y a VPS4. **ONM:** Membrana nuclear externa (Outer nuclear membrane). **INM:** Membrana nuclear interna (Inner nuclear membrane). (Esquema e información tomada de Radulovic y Stenmark, 2018).

1.8. Vía dependiente de ESCRT

En la biogénesis de exosomas por la vía dependiente de la maquinaria ESCRT descrita por Jadli y colaboradores (2020), ESCRT-0 a través de sus dominios de interacción con ubiquitina, permite la agrupación de moléculas cargo y el reclutamiento en la membrana endosomal de los complejos ESCRT-I, II y III, siendo ESCRT-I y II los responsables de la gemación de la membrana endosomal mientras que ESCRT-III facilita la invaginación y fisión de las ILVs por medio de la formación de filamentos poliméricos y, finalmente, las proteínas accesorias como VPS4 ATPasa, participan en la disociación y reciclamiento de la maquinaria ESCRT. Los estudios sobre esta vía han confirmado la participación de TSG101 y ALIX en líneas celulares de mamíferos, ya que en algunos estudios el

silenciamiento de genes como *Hgs* y *Stam1* de la maquinaria ESCRT-0 y *Tsg101* de ESCRT-I han mostrado una disminución en la secreción de exosomas en células HeLa-CIITA (Colombo *et al.*, 2013). Sin embargo, en proteínas como ALIX los resultados son bastante heterogéneos, por ejemplo, algunos investigadores han demostrado que el silenciamiento del gen *Pdcd61p* provoca la reducción de ALIX y la disminución de exosomas secretados en células dendríticas y de cáncer de mama MCF7 pero no en células HeLa (Baietti *et al.*, 2012; Colombo *et al.*, 2013), mientras que en otros estudios con líneas celulares de músculo esquelético la disminución de ALIX ha inducido el aumento de proteínas como HSC70 que están asociadas a VE (Buschow *et al.*, 2009).

1.9. Vías independientes de ESCRT

La producción de exosomas por mecanismos independientes a la maquinaria ESCRT, también ha sido dilucidada a través de experimentos donde la sobreexpresión o la inhibición de algún componente ajeno a la maquinaria ESCRT produce respectivamente un incremento o una disminución en la formación de ILVs (Jadli *et al.*, 2020). Ejemplos de esto son estudios que sugieren la participación de ceramidas, lo cual se ha confirmado por medio del tratamiento en células tumorales con el fármaco GW4869, el cual inhibe la generación de exosoma al bloquear la producción de ceramidas y evitar la formación de vesículas (Hoshino *et al.*, 2013). También se encuentran mecanismos asociados a tetraspaninas como lo ha reportado Verweij y colaboradores (2011), quienes observaron que bloqueando la tetraspanina CD63 se altera el tráfico, señalización y secreción de proteínas dentro de los exosomas.

1.10. Estudios de VE en parásitos

Como puede observarse, la mayoría de los estudios que se han hecho sobre VE han estado enfocados en líneas celulares humanas, sin embargo algunos otros se han encargado de estudiar algunos organismos patógenos y la interacción con las células del hospedero produciendo la consecuente liberación de VE. Desde

hace algunos años, estas investigaciones han utilizado modelos de helmintos como *Heligmosomoides polygyrus*, el cual secreta vesículas con miRNAs para suprimir la respuesta inflamatoria del hospedero y promover su supervivencia como parásito (Buck *et al.*, 2014). Otros estudios han utilizado hongos como *Cryptococcus neoformans* que secreta exosomas con factores de virulencia que promueven su colonización en los tejidos del hospedero infectado (Rodrigues *et al.*, 2008). En el caso de protozoarios, se ha visto que *Leishmania donovani*, *L. major* y *L. mexicana*, producen exosomas para modular la respuesta inmune en macrófagos del hospedero y promover su virulencia y sobrevivencia (Silverman *et al.*, 2010; Silverman *et al.*, 2011; Hassani y Olivier, 2013; Hassani *et al.*, 2014). *Plasmodium falciparum* también utiliza vesículas para modular la respuesta inmune en macrófagos y neutrófilos del hospedero y promover la invasión dentro de las células sanguíneas (Mantel *et al.*, 2013), mientras que en la infección con *P. vivax* las plaquetas, eritrocitos y leucocitos del hospedero producen por su parte micropartículas a causa de la infección, las cuales incrementan los síntomas de inflamación aguda (Campos *et al.*, 2010). En algunos trabajos se han aislado VE producidas por parásitos cultivados *in vitro* y se han administrado en animales para ver su efecto, tal es el caso de *Trypanosoma cruzi*, cuyas VE se administraron en ratones BALB/c como tratamiento previo a una infección con el mismo parásito, el resultado fue una disminución en la tasa de supervivencia de los mamíferos, ya que este tratamiento llevó al incremento de IL-4 e IL-10, la reducción en la producción de isoformas de óxido nítrico sintasa y la diferenciación de células T CD4⁺ a Th2, que favoreció la diseminación y supervivencia de los parásitos dentro de los hospederos (Trocoli *et al.*, 2009). Finalmente, estudios encargados de la caracterización de proteínas secretadas a través de exosomas de *T. brucei gambiense* y *T. brucei brecei* han encontrado dentro de estas partículas una abundancia de proteínas implicadas en el proceso de infección y obtención de nutrientes (Atyame Nten *et al.*, 2010).

Se considera que la mayoría de los organismos patógenos en algún momento de su ciclo de vida utilizan las VE para modular la respuesta inmune del hospedero y

promover la expresión o el empleo de factores de virulencia. El estudio de estos mecanismos podría brindar claves importantes para posibles usos terapéuticos, de diagnóstico o incluso para caracterizar distintos procesos celulares (Coakley *et al.*, 2015). Un ejemplo de esto último es la investigación de Moyano y colaboradores (2019), quienes trabajaron con *Giardia lamblia*; sólo se han identificado algunos miembros de la maquinaria ESCRT como son Vps27 de ESCRT-0, Vps22 y Vps25 de ESCRT-II, Vps2 y Vps24 de ESCRT-III y algunas de las proteínas asociadas a ESCRT-III como Vps4a, Vps4b, Vps4c, Vps46a y Vps46b, por lo que aún no se conocen completamente los mecanismos implicados en la biogénesis de sus vesículas. Otra característica es que no presenta endosomas tempranos pero tiene vacuolas periféricas (PVs) debajo de la membrana plasmática con funciones parecidas a los endosomas y lisosomas. Dentro de estas vacuolas periféricas se ha visto la producción de ILVs formando un equivalente a los MVBs. Con ayuda de la sobreexpresión e inhibición de los genes *glvps4a* y *glrab11*, ellos descubrieron que este parásito libera vesículas parecidas a exosomas y que la proteína Rab11 es necesaria para la biogénesis de ILVs dentro de las vacuolas periféricas. Por lo tanto, esta proteína juega un papel importante en la comunicación entre el retículo endoplásmico y las vacuolas periféricas, logrando entender mejor a través de su trabajo, cómo éstas tienen funciones parecidas a los MVBs que se encuentran en el resto de los protozoarios.

Estudios en parásitos protozoarios como el mencionado en *G. lamblia* son pocos a pesar de su importancia, otro ejemplo se tiene con el parásito intestinal *Entamoeba histolytica* cuya relevancia como patógeno ha sido considerablemente demostrada y a pesar de ellos no hay suficientes estudios relacionados con vesículas extracelulares y su contenido.

1.11. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903

Entamoeba histolytica es un parásito obligado cuyo principal hospedero y reservorio es el ser humano. Este protozooario presenta dos forma, el quiste y el trofozoíto (**Figura 6**). El parásito se transmite por la vía fecal-oral, causando

amebiasis (también llamada disentería amebiana) que puede ser asintomática o presentar síntomas como diarrea intermitente con dolor abdominal, invadiendo la mucosa del colon produciendo ulceraciones e incluso puede llegar a diseminarse a otras partes del cuerpo como el hígado y producir abscesos hepáticos (Plorde, 2004).

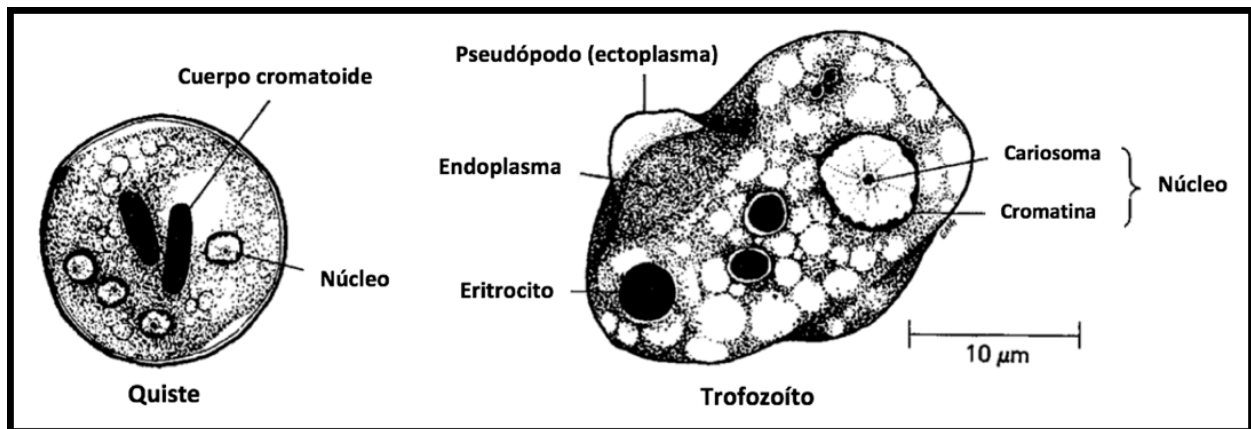


Figura 6. Morfología de *E. histolytica*. A) Quiste de *E. histolytica*, inician con un núcleo pero cuando madura se presenta de forma cuadrinucleado y con cuerpos cromatoidales. B) El trofozoíto es la forma móvil del parásito, utiliza pseudópodos, tiene citoplasma vacuolado y se observa un solo núcleo con un cariosoma central rodeado de cromatina, puede llegar a observarse ingestión de eritrocitos (**esquema tomado y traducido de Plorde, 2004**).

1.12. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

En la clasificación taxonómica tradicional, *E. histolytica* pertenece al Dominio: Eukarya; Reino: PROTOZOA; Filo: PROTOZOA; Subfilo: SARCODINA; Super clase: Rhizopoda; Clase: Lobosea; Orden: Amoebida y Familia: Entamoebidae (Levine *et al.*, 1980). Sin embargo en la nueva clasificación taxonómica propuesta por Adl y colaboradores del 2019, *E. histolytica*, se encuentra en el dominio AMORPHEA, Clado Evosea y grupo Archamoebae; este último se caracteriza por que sus miembros no presentan mitocondrias típicas; dentro del grupo Archamoebae, se encuentra finalmente el género *Entamoeba*, en donde los miembros de este grupo presentan ausencia de peroxisomas, mitosis cerrada con formación de huso, centrosomas endonucleares, dictosomas (los sáculos que

forman el aparato de Golgi) reducidos y mitosomas en lugar de mitocondrias (Adl *et al.*, 2019).

1.13. Ciclo de vida de *E. histolytica*

La infección comienza cuando se ingieren los quistes maduros, ya sea a través de agua, comida o las manos contaminada con materia fecal de una persona infectada, o incluso por contacto sexual directo vía boca-ano. Después de la ingestión y de pasar por el estómago, el quiste cuadrinucleado llega eventualmente al intestino delgado distal donde se desenquista y se divide en ocho pequeños trofozoítos que miden entre 12 a 20 μm , los cuales se dirigen al colon, invadiéndolo y colonizándolo, especialmente al colon sigmoide y al ciego (Plorde, 2004). Los trofozoítos finalmente se multiplican por fisión binaria y producen los quistes, ambas formas se dispersan por las heces pero los quistes son los que logran resistir las condiciones ambientales por varios días o semanas hasta llegar a otro huésped. En la infección no invasiva los trofozoítos permanecen y los huéspedes se convierten en portadores asintomáticos dispersando los quistes a través de las heces, mientras que en la infección invasiva los trofozoítos invaden la mucosa intestinal llegando incluso a los vasos sanguíneos logrando llegar a sitios extraintestinales como el hígado, los pulmones o incluso el cerebro (Centers for Disease Control and Prevention, [CDC], 2019) (**Figura 7**).

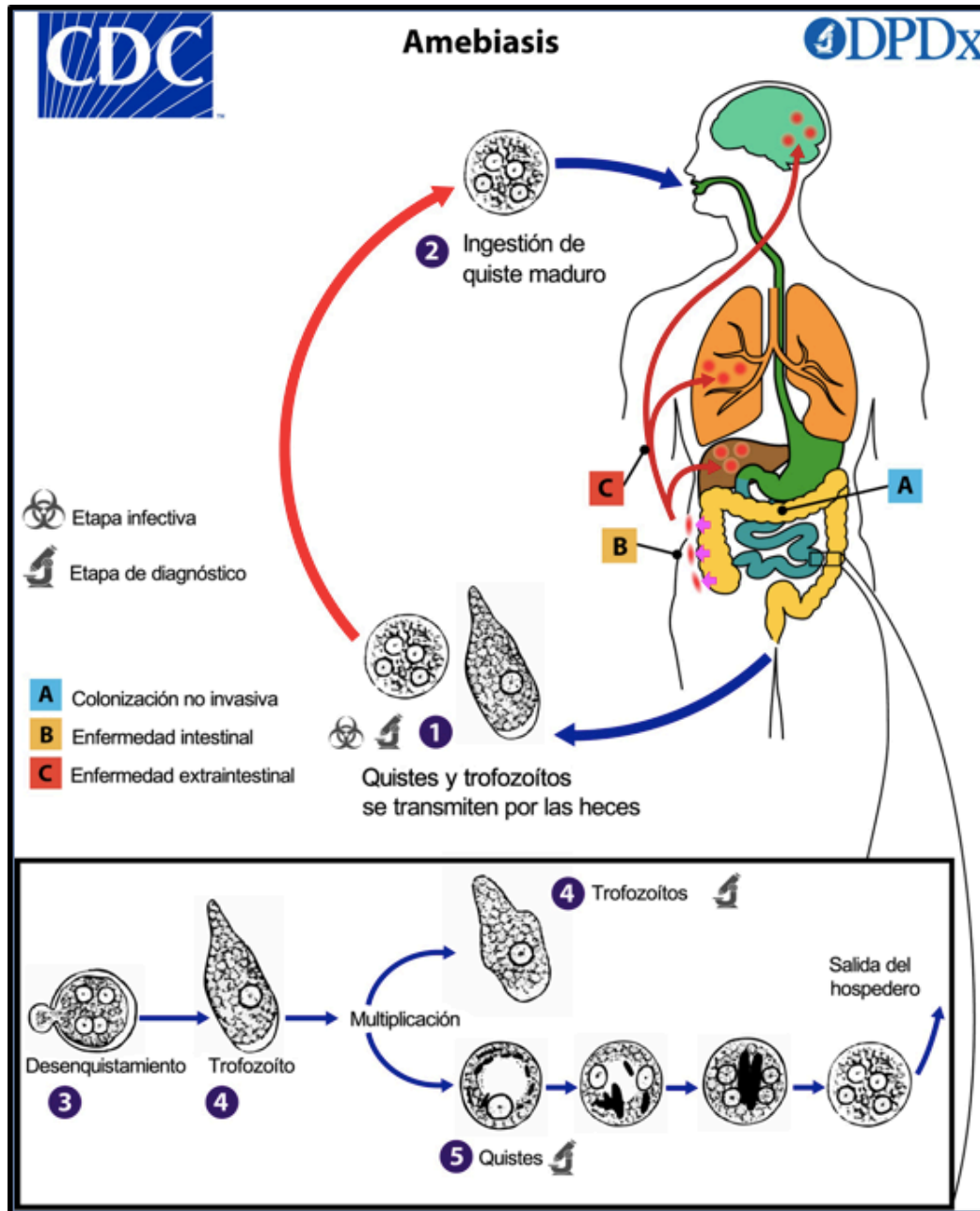


Figura 7. Ciclo de vida de *E. histolytica*. 1) Una persona infectada arroja quistes a través de las heces. 2) Los quistes maduros son ingeridos por un nuevo hospedero a través de alimentos o agua contaminados, mano sucias o contacto con materia fecal durante prácticas sexuales boca-año. 3) Los quistes maduros desenquistan en el intestino delgado del hospedero 4) Se liberan varios trofozoitos que se multiplican y forman nuevos quistes. 5) Finalmente los quistes maduran en el hospedero y son liberados de nuevo al medio externo. Cuando los trofozoitos migran al intestino, pueden permanecer en el intestino liberando más quistes en la colonización no invasiva (A) o invadir la mucosa intestinal causando la enfermedad intestinal (B) e incluso invadir los vasos sanguíneos y alcanzar otros órganos como el hígado, los pulmones o el cerebro provocando la enfermedad extraintestinal (C) (Diagrama tomado de la página del CDC, 2019).

1.14. Epidemiología de *E. histolytica*

Desde hace más de diez años se ha tenido la estimación de que más de 50 millones de personas en todo el mundo están infectadas por este parásito y alrededor de 100, 000 personas mueren al año, principalmente en países en vías de desarrollo, algunos lugares con registros de infecciones son la África, América centra y del Sur, la India y México (Kantor *et al.*, 2018). Aunque se usan fármacos como la paromomicina para eliminar los quistes intraluminales o algunos nitroimidazoles como el metronidazol para combatir la enfermedad extra intestinal, este parásito sigue siendo la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias y la amebiasis la segunda enfermedad parasitaria más letal después de la malaria, por lo que las investigaciones para desarrollar compuestos alternativos que inhiban al parásito o una posible vacuna siguen llevándose a cabo, especialmente al considerar que los fármacos actuales como el metronidazol han tenido reportes de ser potencialmente carcinogénico y *E. histolytica* al igual que muchos otros parásitos, ha mostrado la capacidad de desarrollar mecanismos de evasión ante ciertas drogas (Cuellar-Guevara *et al.*, 2019).

1.15. Factores de virulencia de *E. histolytica*

Durante la patogénesis de este parásito se han descrito ciertos eventos clave en la interacción de la amiba con las células del hospedero. Primero se da el proceso de colonización y disrupción de la mucosa intestinal en donde el trofozoíto destruye por proteólisis la mucina que cubre el epitelio intestinal, después se lleva a cabo la adherencia del parásito a las células donde participan importantes factores de virulencia como la lectina Gal/GalNac que se une a las glucoproteínas de la mucosa intestinal. En la adherencia también participa la proteína EhADH y CP112, estas glucoproteínas están involucradas en la ingestión de las células diana. Posteriormente se llevan a cabo eventos de citólisis donde participan proteasas de cisteínas que degradan componentes de la matriz extracelular y finalmente la fagocitosis donde se da la ingesta de células muertas o de eritrocitos

(eritrofagocitosis) (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009). Algunas de estas proteínas consideradas factores de virulencia han sido encontrados en VE liberadas por el parásito como se describirá en la siguiente sección.

1.16. VE producidas por *E. histolytica*

Uno de los pocos estudios realizados en VE de *E. histolytica* es el de Sharma y colaboradores (2020), quienes caracterizaron el contenido de las VE que producían los trofozoítos amibianos. Encontraron principalmente proteínas del complejo de cubierta vesicular I (COPI), proteínas del complejo Arp2/3 y otras proteínas que se han encontrado comúnmente en VE de eucariontes como son la proteína de choque-térmico de 70 kDa, factores de alargamiento y el factor de ADP ribosilación. También reportaron la presencia de 40 marcadores de exosomas ortólogos a otros organismos eucariontes. Cabe destacar que identificaron ARNs de transferencia, ARNs ribosomales, pequeños ARNs antisentido y proteínas Argonauta. Es posible que algunas de estas proteínas sean utilizadas por el parásito como un mecanismo de regulación en cultivos de trofozoítos y algunos de estos factores, por su naturaleza, podrían participar en el control de la expresión genética de otros trofozoítos del mismo cultivo. Sin embargo, faltan muchos estudios para definir con precisión el destino de las moléculas que cargan las VE de *E. histolytica*.

En este mismo trabajo de Sharma y colaboradores (2020), utilizando espectrometría de masas encontraron 719 proteínas diferentes en las VE producidas *E. histolytica*, entre estas proteínas se encuentran seis proteínas relacionadas con la maquinaria ESCRT, que son EhVps23, EhVps26, EhVps29, EhVps35 y la proteína accesoria EhADH, sin embargo, entre todas las proteínas que encontraron, solo realizaron la confirmación de algunas por ensayos de Western-blot, entre ellas, una lectina de unión a galactosa -/N-acetilgalactosamina de la superficie celular (Lgl), una proteína con dominio tudor y una helicasa con caja DEAD/DEAH. En el caso de las proteínas ESCRT no se realizó una descripción profunda de las mismas y algunas de ellas fueron reportadas sólo como proteínas

hipotéticas (**Tabla 1**). El hallazgo más importante de este grupo fue elucidar que la función de las VE podría ser la comunicación parásito-parásito. Para esto obtuvieron dos tipos de VE provenientes de cultivos de *E. invadens*, el primer tipo de VE se obtuvo de trofozoítos que fueron sometidos a tratamientos para inducir su enquistamiento, el otro tipo de VE provenían de trofozoítos cultivados en condiciones óptimas de crecimiento. Al utilizar estas VE como tratamiento previo en cultivos que también fueron sometidos a enquistamiento, se observó que este evento aumentaba en aquellos cultivos que recibieron las VE provenientes de trofozoítos sometidos a estrés.

ID del gen	Identificación de Sharma y colaboradores, 2020	Frecuencia	Proteína
EHI_002990	Proteína 35 asociada a las proteínas de clasificación vacuolar, putativa	5/5	EhVps35
EHI_041950	Proteína 35 asociada a las proteínas de clasificación vacuolar, putativa	4/5	EhVps35
EHI_025270	Proteína de clasificación vacuolar no. 29	4/5	EhVps29
EHI_135460	Proteína hipotética	3/5	EhVps23
EHI_010730	Proteína de clasificación vacuolar no. 26, putativa	2/5	EhVps26
EHI_062490	Proteína de clasificación vacuolar no. 26, putativa	2/5	EhVps26
EHI_181220	Adhesina 112 (EhADH112)	1/5	EhADH

Tabla 1. Proteínas ESCRT encontradas previamente en VE producidas por *E. histolytica*

Dentro de las 719 proteínas reportadas por Sharma y colaboradores (2020) utilizando espectrometría de masas, siete pertenecen a proteínas de la maquinaria ESCRT y del retrómero. De izquierda a derecha: en la primera columna está el número de ID del gen, en la siguiente columna se escribe la forma en que los autores reportaron las proteínas en su trabajo, en la tercera columna, el número de veces que apareció la proteína dentro de los cinco análisis de espectrometría de masas que realizaron y en la cuarta columna el nombre con el que las llamaremos en este trabajo.

1.17. Proteínas ESCRT de *E. histolytica*

La maquinaria ESCRT en *E. histolytica* ha sido ampliamente estudiada por diversos autores. Desde el 2010, López-Reyes y colaboradores estudiaron la presencia y expresión de genes de la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*,

reportando 19 proteínas putativas representantes de ESCRT-0 al III y proteínas asociadas, así como la caracterización de la proteína accesoria EhVps4, demostrando su participación en la eritrofagocitosis. En 2011 López-Reyes y colaboradores realizaron un análisis genómico comparativo de las secuencias de proteínas putativas de la maquinaria ESCRT de *E. histolytica* y otros patógenos entre los que se encontraban *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*, en los resultados de su análisis *in silico* encontraron que *E. histolytica* y *L. major* eran los organismos que mayor número de proteínas putativas de la maquinaria ESCRT presentaban entre todos los parásitos. También encontraron que las proteínas EhVps24 y EhVps32 son dos de los miembros de ESCRT-III que más se presentaron en los genomas analizados (Vps24 se presentó en todos los organismos y Vps32 en casi todos excepto en *G. lamblia*), esto concuerda con Williams y Urbé (2007) quienes mencionan que las subunidades del complejo ESCRT-III están representadas en todos los taxa de eucariontes. Tiempo después, Avalos-Padilla y colaboradores (2018), describieron la participación de la maquinaria ESCRT-III en la generación de MVBs en donde EhVps20 se une a las membranas de los MVBs para reclutar a EhVps32 y promover la invaginación de ILVs, permitiendo que EhVps24 separe las vesículas nacientes, mientras que EhVps2 modula su tamaño y resaltan el importante papel que tiene EhVps32 junto con la proteína accesoria EhADH en la maduración de fagosomas, siendo estas proteínas importantes factores de virulencia (**Figura 8**).

Muchas de las proteínas ESCRT podrían ser candidatos para analizar en la comunicación parásito-parásito a través de exosomas. Sin embargo, para delimitar este estudio, nos enfocamos en algunas de las proteínas ESCRT que previamente fueron encontradas en el reporte de Sharma y colaboradores del 2020, como son EhVps23, EhADH, EhVps26, EhVps35 y en EhCP112 cuya secreción también ha sido reportada en otros previos (Ocadiz *et al.*, 2005).

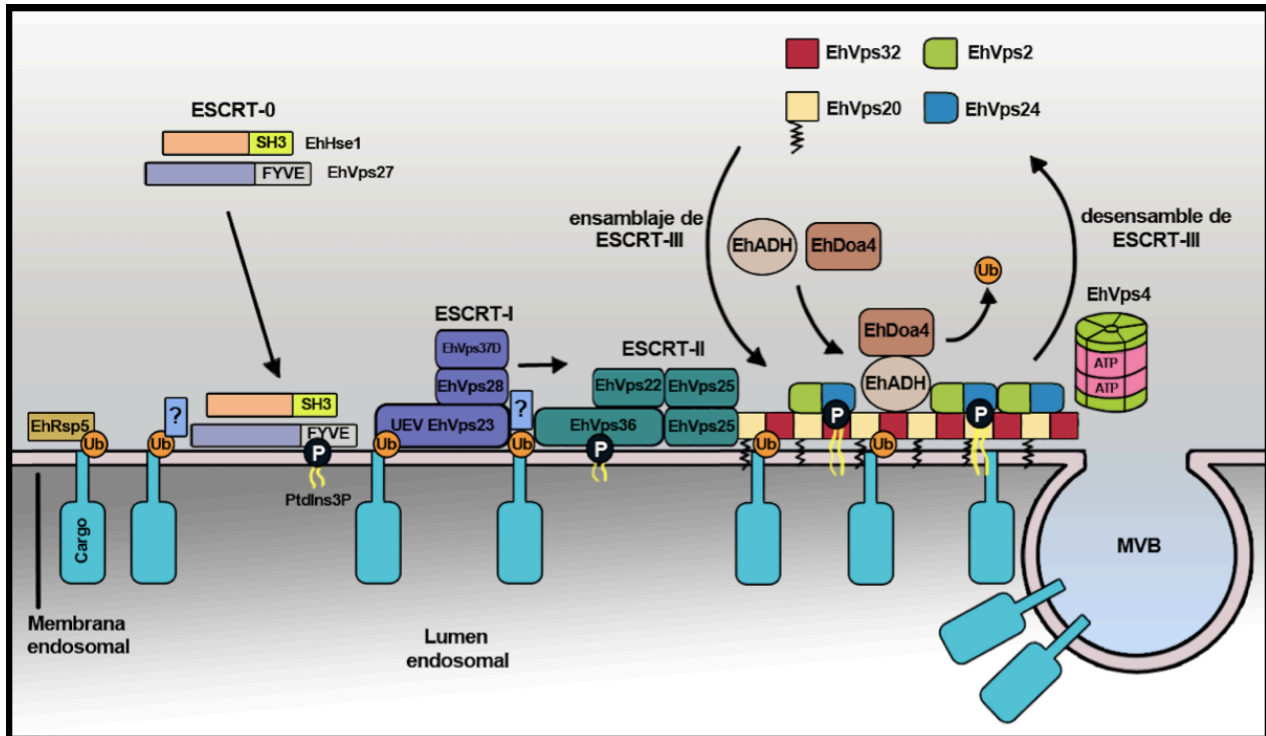


Figura 8. Maquinaria ESCRT en *E. histolytica*. Varias proteínas de la maquinaria ESCRT se han encontrado y estudiado en *E. histolytica*, para la incorporación de moléculas cargo dentro de las vesículas de los cuerpos multivesiculares (MVB). El proceso inicia cuando EhRsp5 reconoce las moléculas cargo ubiquitinadas, después la proteína EhVps27 se une a los lípidos de la membrana endosomal por su dominio FYVE y se asocia con EhHse1 para formar el complejo ESCRT-0, esto permite el reclutamiento del complejo ESCRT-I formado por EhVps37, EhVps28 y EhVps23 el cual a través de su dominio UEV también reconoce y se une a las moléculas cargo ubiquitinadas, este complejo se une al complejo ESCRT-II, el cual está formado por EhVps22, EhVps25 y EhVps36 que se une a la membrana endosomal por su alta afinidad a fosoinositidos. ESCRT-II se une a ESCRT-III que está formado por EhVps32, EhVps2, EhVps20 y EhVps24. Este último permitirá la concentración de las moléculas cargo dentro de la parte interna de la membrana endosomal. Vps32 se asocia con el dominio Bro1 de la proteína accesoria EhADH, permitiendo la reclutación EhDoa4, quien remueve la ubiquitina de las moléculas cargo. Finalmente, la ATPasa EhVps4 es reclutada para desensamblar el complejo ESCRT. (Esquema tomado y traducido de López-Reyes, 2011).

1.18. Proteína EhVps23

En mamíferos y levaduras la maquinaria ESCRT-I está formada por Vps23, Vps28 y Vps37, sin embargo, en *E. histolytica* sólo se ha localizado EhVps23 (López-Reyes, 2011). Este complejo está altamente estudiado en mamíferos y levaduras y es el encargado de reconocer moléculas cargo ubiquitinadas, para su designación dentro de las vesículas de los MVBs, para esto la proteína Vps23

contiene un dominio UBCc responsable de llevar a cabo la interacción del complejo con las moléculas cargo ubiquitinadas (**Figura 9**), (Katzmann *et al.*, 2001). En el caso de *E. histolytica*, Galindo en el 2016, durante su tesis de maestría, comparó las secuencias, los dominios y las estructuras secundarias y terciarias de la proteína Vps23 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína HsVps23 de humano y la proteína EhVps23 de *E. histolytica*, reportando que EhVps23 es homóloga a éstas. Considerando estos hallazgos sobre la homología de EhVps23 y que la proteína Tsg101 de humano es también ortóloga a la proteína Vps23 de levaduras (Pornillos *et al.*, 2002), podríamos considerar que la proteína EhVps23 es un posible marcador exosomal en el caso de *E. histolytica* al igual que su homólogo TSG101 lo es en células de mamífero (Pegtel y Gould, 2019). Por otro lado, es importante considerar que EhVps23 también podría tener un papel clave en la comunicación parásito-parásito, ya que López-Reyes y colaboradores (2010) reportaron que los niveles de expresión del mensajero del gen *Ehvps23* aumentan hasta el doble durante la eritrofagocitosis.

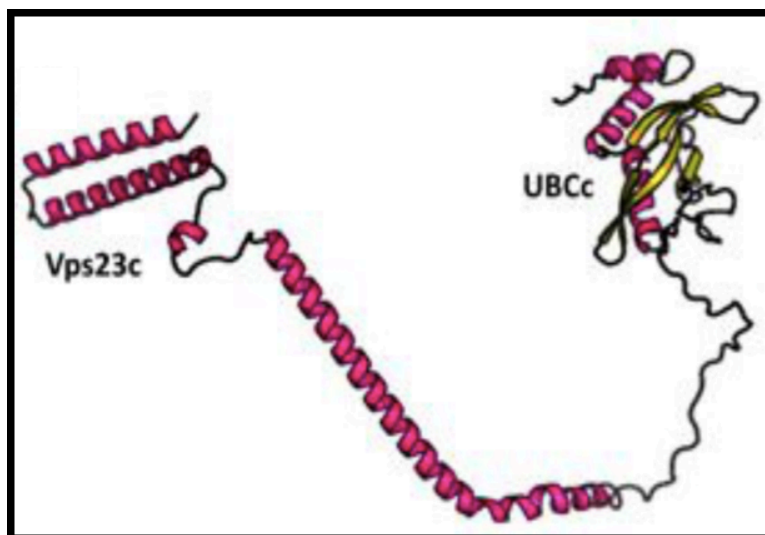


Figura 9. Estructura terciaria de EhVps23. La proteína EhVps23 forma parte del complejo ESCRT-I, contiene los dominios UBCc que permite la interacción con moléculas cargo ubiquitinadas y el dominio Vps23 core (Vps23c) que permite que EhVps23 interactúe con otros elementos del complejo ESCRT-I. (Imagen e información tomada de la tesis de maestría de Galindo, 2016).

1.19. Proteína accesoria EhCP112

Desde 1987 Arroyo y Orozco habían estudiado la adherencia de *E. histolytica* en células blanco encontrando una adhesina de 112 kDa que participaba en los eventos de fagocitosis y efecto citopático. Posteriormente García-Rivera y colaboradores en 1999 describieron que bajo condiciones extremas de pH, esta adhesina de 112 kDa se rompía en dos péptidos los cuales nombraron EhADH112 que pesaba entre 70-72 kDa con dominios de adherencia a células blanco y EhCP112 con un peso molecular entre 50-56 kDa que era una cisteína proteasa. Esto lo confirmaron al obtener anticuerpos monoclonales y policlonales contra el complejo llamado ahora EhCPADH que reconocen tanto al complejo completo como a las proteínas recombinantes EhCP112 y EhADH112 por separado, junto a esto, en la cromatografía de afinidad obtuvieron 3 bandas, la de 112 kDa (del complejo), la de 75 kDa (del péptido EhADH112) y la de 50 kDa (del péptido EhCP112). Tiempo después, en el 2005 Ocadiz y colaboradores, del mismo grupo de investigadores describieron que el polipéptido completo de EhCP112, que en realidad pesa 54 kDa esta formado por tres fragmentos, una péptido señal, un pro-péptido y la parte madura que queda de la enzima; ellos lograron expresar en bacterias el polipéptido completo de 54 kDa con las tres partes y a parte, el polipéptido de la enzima madura con el pro-péptido, los cuales pesan 52 kDa juntos, siendo 46.9 kDa los pertenecientes a la CP, esta ultima combinación fue la única que mostró actividad de proteasa, cabe resaltar que ellos mencionan que la proteína purificada es difícil de trabajar debido a la fácil degradación que presenta y la interpretación en geles puede ser complicada. Entre los hallazgos más relevantes para este trabajo se encuentra el hecho de que ellos reportaron que EhCP112 era secretada al medio a través del complejo EhCPADH por *E. histolytica* a través de vesículas.

La secreción de EhCP112 se analizó a mayor profundidad cuando Montañó y colaboradores (2017) lograron evidenciarla a través de microscopía electrónica de transmisión (MET), no sólo para EhCP112, sino también para la ahora llamada EhADH. En este trabajo demostraron la distribución de ambas proteínas en el

citoplasma, mientras que el complejo completo EhCPADH se concentraba mayormente en la membrana plasmática con la forma madura de EhCP112. También encontraron asociaciones de EhADH con EhCP112 en su forma inactiva con el pro-péptido. Ellos modelaron la estructura tridimensional de ambas proteínas por separado y describen que son proteínas periféricas de membrana con forma globular, siendo CP112 un miembro de la familia de las catepsinas que presenta un dominio RGD, el cual le permite interactuar con integrinas celulares (**Figura 10**).

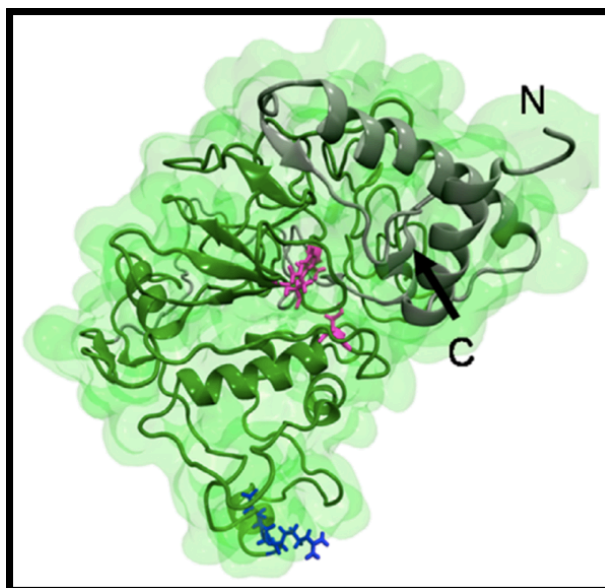


Figura 10. Estructura terciaria de EhCP112. Modelo de la proteína EhCP112 inmadura realizado por Montañó y colaboradores (2017), en la cual se muestra una proteína globular inmadura formada por el pro-péptido (gris) con su extremo amino terminal (N), mientras que la parte madura de la enzima (verde) tiene un extremo terminal carboxilo (C). El dominio RGD se muestra en azul y en magenta las triadas catalíticas que ayudarán a provocar cambios conformacionales para que la proteína madure.

1.20. Proteína accesoria EhADH

La proteína EhADH esta estructuralmente relacionada con la proteína ALIX que se encuentra ubicuamente en mamíferos y desde hace algunos años se ha comprobado experimentalmente que juega un papel central en la eritrofagocitosis de *E. histolytica* (García-Rivera *et al.*, 1999; Bañuelos *et al.*, 2005). Desde 2012 Bañuelos y colaboradores, en un análisis *in silico* reportaron como EhADH tiene un domino Bro1 el cual contribuye a la adherencia y fagocitosis y le permite reclutar

proteínas a la membrana endosomal para formar los MVBs. Esto se corroboró posteriormente con los experimentos de Avalos-Padilla y colaboradores en 2015, quienes reportaron el papel de EhADH como receptor de eritrocitos durante la fagocitosis. En el modelo tridimensional más reciente de Montaño y colaboradores (2017), se observa la proteína con su extremo amino-terminal donde se encuentra el dominio Bro1 que le permite reclutar proteínas como EhVps32 de ESCRT-III y una sección formada por dos brazos llamada “región V” que contiene los dominios de adherencia y un extremo carboxilo terminal (**Figura 11**).

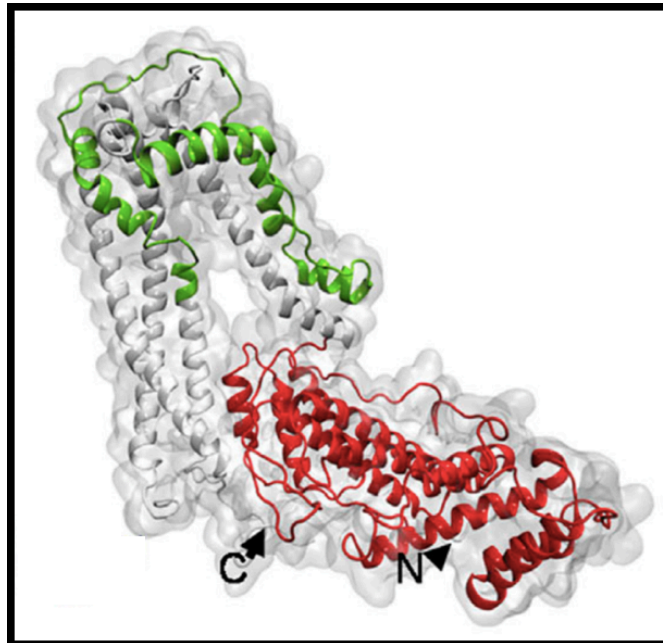


Figura 11. Estructura terciaria de EhADH. En el modelo tridimensional de Montaño y colaboradores (2017), se observa la proteína EhADH con el dominio Bro1 (rojo), que le permite interactuar con las subunidades de la maquinaria ESCRT-III el cual tiene un amino terminal (N). También se presentan los brazos (gris) que forman la región V que le dan una alta movilidad a la proteína, con un carboxilo terminal (C) y una región de adherencia (verde) que es característica de las proteínas ALIX donde se encuentra el dominio de adherencia.

1.21. Proteínas EhVps26 y EhVps35

Las proteínas EhVps26 y EhVps35 que reportaron también Sharma y colaboradores (2020) en VE de *E. histolytica* pertenecen al complejo del retrómero, el cual, en eucariontes participa en el transporte retrógrado desde los endosomas al *trans*-Golgi con el fin de recuperar de forma eficiente proteínas de membrana. El

retrómero ha sido estudiado en levaduras y en células de mamífero y lo componen distintas proteínas; en las levaduras las proteínas que forman el complejo son Vps5, Vps17, Vps26, Vps29 y Vps35. Este complejo a su vez se divide en dos subcomplejos, el primero es el subcomplejo para la deformación de membranas (Membrane deformation subcomplex) y esta formado por Vps5 y Vps17 (en levaduras) o proteínas SNXs (Sorting nexins) en mamíferos y se unen en un dímero para promover el reclutamiento del retrómero en los endosomas, asociándose a su cara citosólica e induciendo la formación de un complejo tubular en sus membranas. En mamíferos, el complejo es similar solo que existen varias proteínas SNXs que se combinan de distintas formas (Trousdale y Kim; 2015). El segundo subcomplejo que está formado por las proteínas Vps26, Vps29 y Vps35, se llama “complejo de reconocimiento de carga” CRC (Cargo recognition complex) (Cargo recognition complex) o subcomplejo selectivo de cargos (Cargo-selective subcomplex) y esta encargado del reconocimiento de las moléculas cargo (Bonifacino y Hurley; 2008) (**Figura 12**).

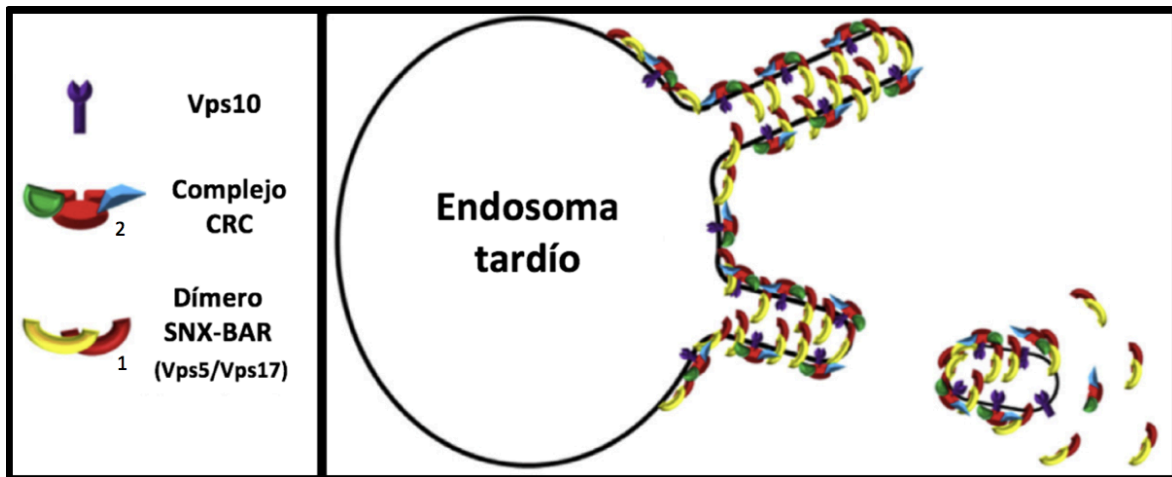


Figura 12. Formación de estructuras tubulares por el complejo del retrómero. Las proteínas SNX que son Vps5 (rojo 1) y Vps17(amarillo) que tienen dominios BAR forman el heterodímero que se une a la membrana del endosoma tardío y permite su remodelación, al mismo tiempo el dímero SNX permite el reclutamiento del “complejo de reconocimiento de carga” (CRC) que está formado por Vps26 (verde), Vps29 (azul) y Vps35 (rojo 2). La proteína Vps35 reconoce la molécula cargo que será llevada al complejo Golgi como por ejemplo Vps10 (morado). Después de formarse el complejo tubular e ir separándose en pequeñas vesículas, el complejo del retrómero regresa a la membrana endosomal para unirse a más moléculas cargo. (Imagen tomada y traducida de Trousdale y Kim; 2015).

Hierro y colaboradores (2007) elucidaron la estructura terciaria de las proteínas del CRC de levadura derivadas de las estructuras cristalizadas, microscopía electrónica y estudios bioinformáticos, describiendo como las proteínas Vps26, Vps29 y Vps35 se unen entre ellas y se alinean de manera paralela a la membrana endosomal. En algunos otros estudios como el de Kovtun y colaboradores (2018), incluso se han producido *in vitro* los túbulos de membrana cubiertos con el homodímero Vps5 y los heterodímeros Vps35, Vps26 y Vps29 co-expresadas en bacterias *Chaetomium thermophilum* a través de criotomografías confirmando la estructura del complejo del retrómero (**Figura 13**).

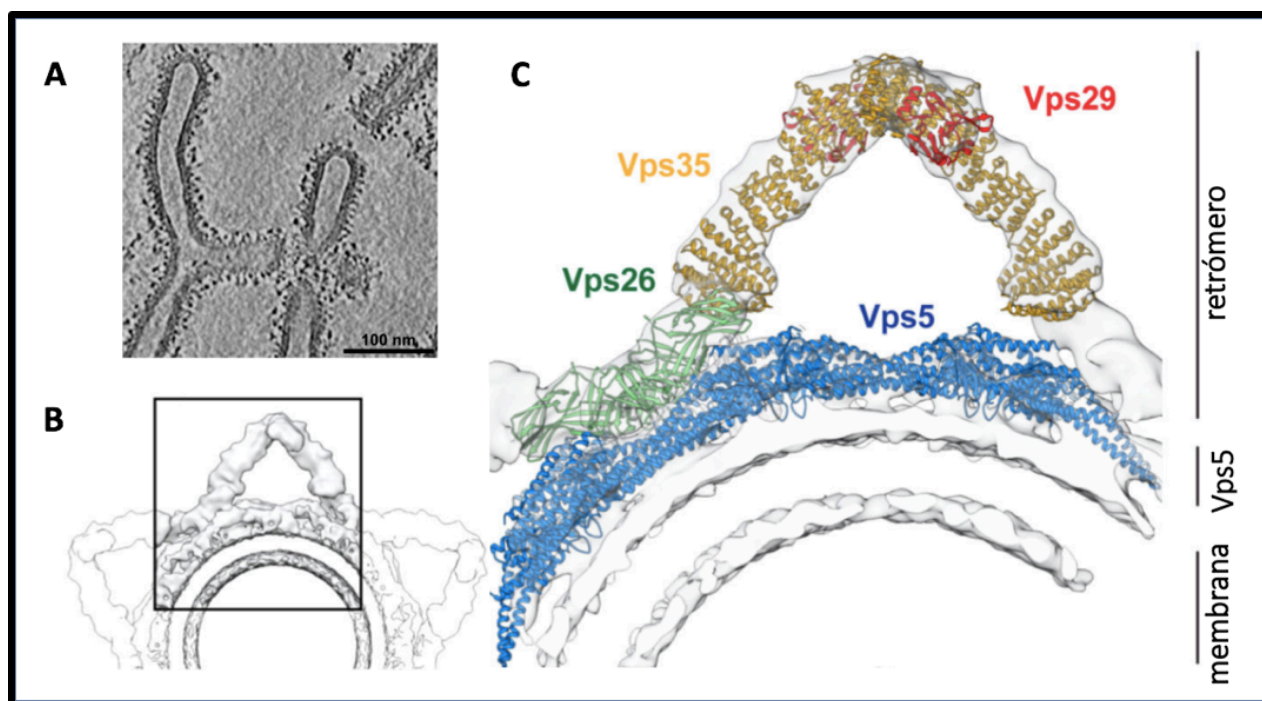


Figura 13. Modelaje de las proteínas del retrómero. Kovtun y colaboradores (2018), demostraron *in vitro* la forma en que la estructura del complejo del retrómero se ensambla para formar túbulos en las membranas endosomales. **A)** Criotomografía de túbulos de membrana cubiertos del retrómero (Vps26-Vps29-Vps35) y Vps5. **B)** En un mapa de densidad electrónica de baja resolución se ilustra la forma en que el retrómero se extiende por los túbulos formando interfaces. **C)** En un acercamiento a una de las tres interfaces se aprecia Vps5 (azul) cubriendo el túbulo y la interface dimérica de Vps35 (amarilla) unida con Vps29, posicionada entre proteínas Vps26 (verde) (**Esquema modificado de Kovtun et al., 2018**).

En el caso de *E. histolytica*, Nakada-Tsuki y colaboradores (2005) describieron el complejo del retrómero formado por EhVps26, EhVps29 y EhVps35, parecido al

retrómero de levaduras y células de mamífero, sin embargo, en ese entonces ellos no encontraron en las bases de datos del genoma de la ameba proteínas SNX, Vps5, Vps17 o proteínas que tuvieran tanto el dominio BAR como el PX por lo que llamaron al retrómero de *E. histolytica* “retrómero-like”. En ese trabajo ellos evidenciaron por inmunoprecipitación que EhVps26, EhVps29 y EhVps35 forman el complejo *in vivo* y describieron como la proteína EhRab7A, una de las tantas GTPasas de la ameba que tiene un papel en la regulación del tráfico intracelular de membrana, recluta al CRC al unirse al carboxilo terminal de EhVps26. Ambas proteínas (EhRab7A y EhVps26) se observaron por inmunofluorescencia en pequeñas vesículas y se co-localizaron en vacuolas prefagosomales y fagosomas durante eventos de eritrofagocitosis por lo que infirieron que el transporte de cisteínas proteasas (CPs) a los fagosomas es regulado por el complejo del retrómero, siendo esto importante para el mantenimiento de la reserva de cisteínas proteasas del parásito.

En años más recientes, Watanabe y colaboradores (2020), lograron identificar dos potenciales proteínas SNX en el genoma de la ameba que son EhSNX1 y EhSNX2. En este trabajo demostraron que EhSNX1 participa en el reclutamiento de EhVps26 durante la trogocitosis, que es la ingestión por pedazos de células vivas. Este grupo describió que el proceso se lleva a cabo en el sitio de inicio de la trogocitosis donde se da la síntesis de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), el cual es reconocido por los dominios PX de EhSNX1; esta proteína interactúa con EhVps26 para reclutar el complejo del retrómero, el cual llevará a cabo la recuperación y reciclaje de receptores. Finalmente, cuando la copa trogocítica se cierra, EhSNX2 se recluta para disociar a EhSNX1, regulando de manera negativa la trogocitosis. A pesar de que ellos encontraron la participación de EhSNX1 en el reclutamiento del retrómero, al silenciar el gen de esta proteína no hubo una inhibición completa, por lo que mencionan que posiblemente el reclutamiento del retrómero se lleve a cabo principalmente por EhRab7A como ya lo había reportado Nakada-Tsuki y colaboradores en el 2005.

En cuanto a la proteína EhVps35 específicamente, Díaz en el 2018, en su tesis de maestría, obtuvo anticuerpos α -EhVps35, detectando la proteína en extractos totales con un peso de 71 kDa a través de análisis de inmunoprecipitación en SDS-PAGE; esto difiere un poco con autores como Watanabe y colaboradores (2020), que la reportan en pesos mayores a 75 kDa, sin embargo, Díaz explica que las posibles variaciones del peso podrían deberse a la degradación de su extremo amino. En ese mismo trabajo se reportó que durante los eventos de eritrofagocitosis, EhVps35 pasa de localizarse en el citoplasma a relocalizarse en vesículas alrededor de los fagosomas, sin embargo, las cantidades de proteína EhVps35 no variaron significativamente después de estos eventos aunque los niveles de ARN mensajero sí cambiaron significativamente.

Como puede apreciarse, son varias las proteínas tanto de la maquinaria ESCRT como del complejo del retrómero que han sido estudiadas en *E. histolytica*, identificándolas como importantes factores de virulencia al ser encontradas en procesos de eritrofagocitosis, sin embargo, son pocos los estudios enfocados en la presencia de estos factores de virulencia en las VE secretadas por la amiba.

2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de VE han ido cobrando importancia en años recientes debido al papel tan importante que han demostrado tener. Sin embargo, muchos estudios han sido enfocados principalmente en células de mamífero. En el caso de parásitos como *E. histolytica*, son pocos los estudios que se han realizado enfocados en VE. Sharma y colaboradores (2020), reportaron en su análisis de espectrometría de masas una gran cantidad de proteínas presentes en las VE, sin embargo, no analizaron por Western-blot las proteínas de la maquinaria ESCRT y del retrómero. Considerando la importancia de estas proteínas como factores de virulencia del parásito, es necesario realizar más análisis sobre las concentraciones de estas proteínas en las VE de *E. histolytica*.

3. HIPÓTESIS

Las proteínas de la maquinaria ESCRT como EhVps23, EhADH, y EhCP112, y proteínas del retrómero como EhVps26 y EhVps35, se encuentran en VE liberadas por *E. histolytica*, por lo que se podrá detectar su presencia por ensayos de inmunoprecipitación. Al ser importantes factores de virulencia en la comunicación parásito-parásito las concentraciones de cada una de ellas podrían variar en las VE liberadas por el parásito.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la presencia y la abundancia de proteínas de la maquinaria ESCRT y del retrómero en VE producidas por *E. histolytica*.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Establecer un método de aislamiento de VE de *E. histolytica* en condiciones estándar de crecimiento.

- 2) Confirmar la presencia y abundancia de las proteínas EhVps23, EhADH, EhVps26, EhVps35, y EhCP112 en las VE producidas por los trofozoítos de *E. histolytica*.

- 3) Determinar el tipo de VE producidas por *E. histolytica*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

La estrategia experimental se realizó de la siguiente manera. Primero se obtuvieron los cultivos de *E. histolytica*, los cuales se mantuvieron en condiciones basales en medio de cultivo, se hicieron lavados con PBS y los trofozoítos se colectaron para realizar experimentos para la inducción y aislamiento de VE y se escogió el mejor método de acuerdo a las condiciones y posibilidades que se disponían en el laboratorio, mientras que los controles fueron muestras de extractos totales de proteínas procedentes de amibas a las que no se les indujo la secreción de VE. Tanto los controles como los ensayos de secreción de VE se sometieron a experimentos SDS-PAGE para la separación de las proteínas. La presencia de las proteínas en las muestras se analizó por tinción con azul de Coomassie. Por inmunomarcaje en ensayos de Western-blot se observó el peso de las proteínas EhVps23, EhADH, EhCP112, EhVps26 y EhVps345 para comparar su presencia dentro de las amibas (control de extractos totales) contra las VE (ensayos de secreción) liberadas. En el Western-blot se utilizó como control negativo la detección de actina, la cual Sharma y colaboradores (2020) aclaran que no se presenta en VE de *E. histolytica*, pero sí en los trofozoítos lisados (extractos totales), por lo que sirvió para corroborar que los ensayos de secreción tuvieran sólo VE y no fragmentos de membrana de trofozoítos. Finalmente, sólo las muestras de ensayos de secreción fueron analizadas con tinción negativa en microscopía electrónica de transmisión (TEM) para la medición de algunas VE y tener un acercamiento sobre los tipos de VE que se liberaron (**Figura 14**).

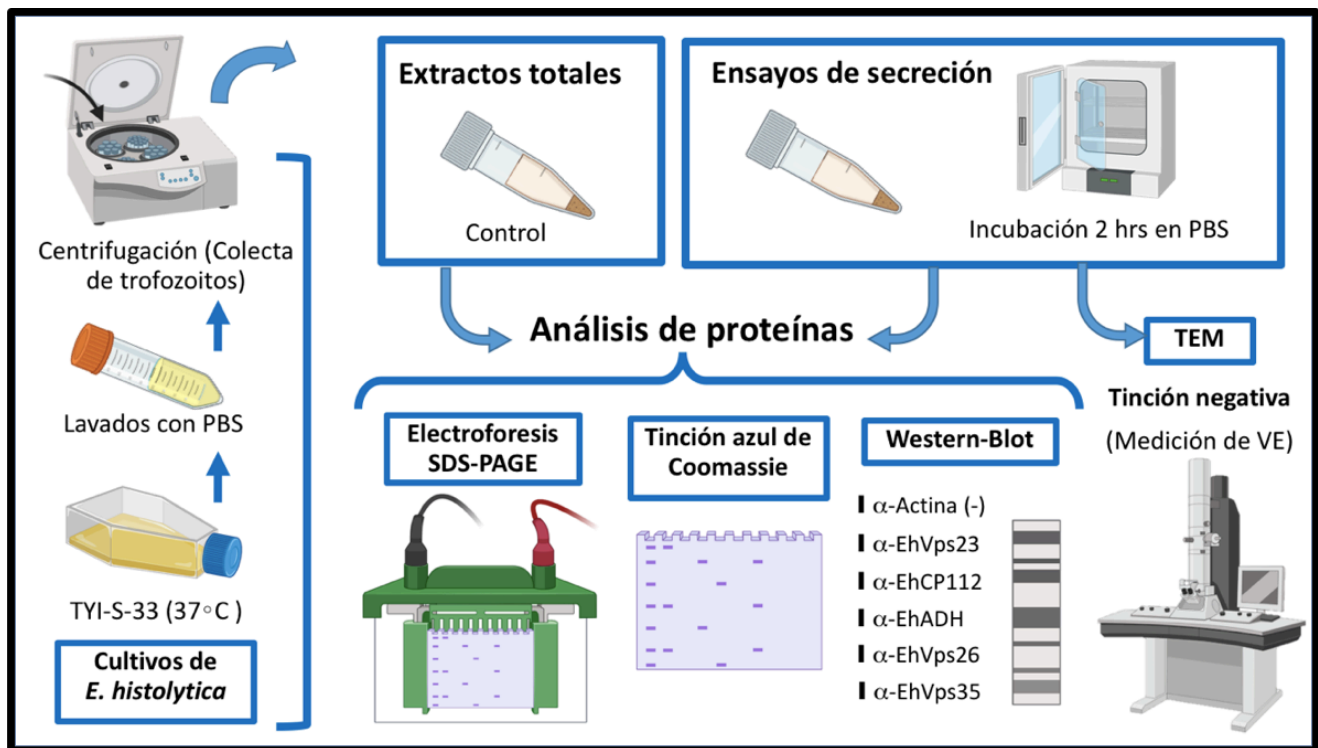


Figura 14. Estrategia experimental. A partir de cultivos de *E. histolytica* en medio TYI-S-33 a 37°C, se realizaron lavados con PBS para limpiar las células y se separaron los trofozoitos por centrifugación. A partir de estos pasos se obtenían dos tipos de muestras, las del control para el análisis de extractos totales o las de los ensayos de secreción que se incubaron dos horas en PBS para la liberación de VE y su posterior colecta. En ambos tipos de muestra se realizó el análisis de proteínas, separando éstas por electroforesis, para analizar su concentración tiñendo los geles con azul de Coomassie o usando los geles en pruebas de Western-blot para el análisis de las proteínas de interés con los anticuerpos: α -EhVps23, α -EhADH, α -EhCP112, α -EhVps26 y α -EhVps35 usando como control negativo α -actina. Finalmente, los ensayos de secreción se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa para observar las VE.

5.2. Etapas experimentales

Obtención de anticuerpos

En este trabajo se utilizaron los anticuerpos α -EhVps23, α -EhADH, α -EhCP112, α -EhVps26 y α -EhCP35, que previamente han sido obtenido a través de las investigaciones realizadas por el laboratorio. Cada una de estas proteínas ha sido investigada en trabajos previos, obteniéndose los péptidos específicos para la obtención de los anticuerpos, éstos se han diseñado por distintos autores en las bases de datos ABCpred y BCPred y se han inmunizado distintos organismos de la

siguiente forma: para el caso de α -EhVps23 se utilizaron ratas de la cepa Wistar, para α -actina y α -EhVps35 se inmunizaron ratones BALB/c y para el caso de α -EhADH, α -EhCP112 y α -EhVps26 se trabajó con conejos New Zealand White. Posteriormente, se obtuvieron los sueros inmunes después de 15 días, se centrifugaron a 3,000 rpm/20 min y se recuperó el suero el cual se encuentra almacenado a -20°C. Todos los anticuerpos han sido previamente titulados en el laboratorio.

Sitio web de ABCpre: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/>

Sitio web de BCPred: <http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>

Cultivo de *E. histolytica*

Se utilizaron cultivos axénicos de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* aislada por Orozco y colaboradores, desde 1983, los cuales fueron cultivados en frascos T25 con medio TYI-S-33 a una temperatura de 37°C (Diamond *et al.*, 1978), con 10% de suero bovino, 6% de vitaminas, 1.2 U/mL de penicilina y 1.4 mg/mL de estreptomycin para evitar contaminación por bacterias. Para todas las pruebas tanto de extractos totales y las pruebas de aislamiento de VE, se tomaron entre 2 y 3 frascos con trofozoítos en confluencia (Díaz, 2017). Se cosecharon incubándolos en hielo por 15 minutos para separar las amibas adheridas a las cajas. Se juntó el medio de cultivo con las amibas en tubos cónicos de 50 mL bajo esterilidad y se tomaron 10 μ L para realizar el conteo en cámara de Neubauer (por triplicado). El conteo se realizó de la siguiente forma:

$$\frac{\text{No. total de amibas contadas}}{\text{No. de cuadrantes utilizados}} \times 10,000 = \text{No. de amibas en 1 mL}$$

Para saber el número total que se tenía en todo el cultivo se multiplicó el número de amibas en 1 mL por el número de mililitros de medio colectados en el tubo cónico.

Técnica de obtención de extractos totales

Como control se utilizó la técnica de extractos totales que extraen las proteínas presentes dentro de las amibas. Para esta técnica, se utilizaron de dos a tres frascos de cultivo T25 en confluencia, el medio con las amibas se colectó en un tubo cónico de 50 mL y se tomó una muestra para conteo en cámara de Neubauer como se describió en la sección anterior. En cada repetición se utilizó de 5 a 6 millones de células en un volumen entre 30 - 40 mL de medio. La muestra se centrifugó a 650 xg por 7 min a 4°C para juntar las amibas en una pastilla y se desechó el sobrenadante sustituyéndolo con PBS frío para lavar las células. Este lavado se repitió dos veces pasando la pastilla en un tubo de microcentrifuga. Después de la última centrifugación del segundo lavado, se le agregó a la pastilla una mezcla de inhibidores de proteasas calculados para el número de células que tenía el cultivo de acuerdo a la **Tabla 2**. En este paso se tomó 1 μ L de muestra y se diluyó en PBS para cuantificar la cantidad de proteínas en μ g por μ L de muestra con ayuda el espectrofotómetro NanoDrop lite de la marca Thermo Scientific™. El resto de muestra se congeló en nitrógeno líquido por unos minutos para romper las células y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Cálculo para 1 millón de células

Inhibidor	Cantidad (μL)
PHMB	33
E64	4
Cocktail de inhibidores	5
Total	42 μ L

Tabla 2. Preparación estándar de la mezcla de inhibidores.

Para evitar la degradación de las proteínas de interés se preparó una mezcla de inhibidores calculada para el número de células que se tenían en el cultivo usando la referencia del cálculo para 1 millón de células, por ejemplo si se tienen 1.5 millones, se tienen que ajustar los datos de la tabla. *El cocktail de inhibidores es otra mezcla de PHMB y E64.

Las técnicas analizadas en este trabajo para el aislamiento de VE son variaciones de la técnica de extractos totales, las cuales se describen en la sección de resultados ya que uno de los objetivos era analizar cual técnica era más eficiente. Sin embargo, para los ensayos de secreción de VE se usó una variación de la mezcla de inhibidores llamada “mezcla para secreción” cuya preparación se describe en la **Tabla 3**.

Mezcla para secreción

Inhibidor	Cantidad (μL)
PBS	179
E64	5
Cocktail de inhibidores	6
cOmplete 20x	10
Total	200 μL

Tabla 3. Mezcla para secreción.

Antes de la incubación en PBS de los ensayos de secreción, se agregó a las células esta mezcla de inhibidores modificada a partir de la mezcla estándar que se calcula dependiendo el número de células de la muestra, con el fin de agregar una cantidad menor de inhibidores y alterar lo menos posible la cantidad de proteínas que es expulsada por las amibas a través de las VE. *Del mismo modo que en la mezcla estándar, el cocktail de inhibidores es otra mezcla de PHMB y E64.

Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Para analizar los niveles de proteínas totales de los controles de extractos totales y de secreciones de VE, se realizaron geles al 12% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se usaron las muestras que estaban congeladas a -70°C . Para prepararlas se descongelaron a temperatura ambiente, se les adicionó buffer de carga 2X e inmediatamente se incubaron por tres minutos a 100°C . Después de este tiempo se atemperaron con hielo nuevamente y se utilizaron para cargar los carriles con concentraciones de 25, 30 o 50 μg , calculando la cantidad de microlitros necesarios dependiendo la cantidad de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ que tuviera cada muestra. Las electroforesis se corrieron los primeros 20 minutos a 60 volts y después se subió el voltaje a 130 volts durante una 1 hora aproximadamente. Como

referencia de los pesos moleculares se utilizó el marcador molecular Dual color™ del kit “Precision Plus Protein Standards BIORAD™”. Estos geles se hicieron por duplicado para realizar dos pruebas por separado, la primera era la tinción del gel con Azul de Coomassie y la otra era la técnica de Western-blot.

Tinción con azul de Coomassie

Se preparó azul de Coomassie al 0.05%, para teñir los geles después de la electroforesis, para esto, se dejaban en la solución teñidora durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente, se destiñeron con solución decolorante (5% metanol con 7% de ácido acético) (Díaz, 2017). Para acelerar la tinción con azul de Coomassie se calentó el gel con la solución durante 10 segundos en microondas (una vez) y para desteñirlo también se calentó el gel con la solución 10 segundos, esta vez en dos ocasiones con una pausa entre cada una para dejar que se enfriara a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó una toalla de papel sobre el gel para dejarlo destiñendo en agitación toda la noche.

Western-blot

Después de la electroforesis, se montó cada gel en una cámara de electrotransferencia de la marca BIORAD™, procurando que la membrana de nitrocelulosa y el gel quedaran cara a cara y se sumergieron en un tanque de electroforesis usando amortiguador de transferencia 1X frío. La cámara de electrotransferencia se sumergió en hielo y se realizó la transferencia primero a 20 volts o 70 miliamperes por 20 min, y después se subió la intensidad de corriente a 400 miliamperes por 1 hora 30 minutos. Después de la transferencia se desmontó la cámara y las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo de Ponceau durante 15 min, seguido de un lavado con agua destilada para quitar el exceso de solución y verificar la correcta transferencia. Una vez verificada, se quitó todo el rojo de Ponceau con amortiguador de transferencia 1X y se bloquearon las membranas con solución bloqueadora (leche baja en grasa al 5% diluida en PBS 1X) durante 1 hora en agitación. Posteriormente, se cortaron las membranas en tiras con el ancho

de un carril y se incubaron las tiras con anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios se prepararon previamente diluyéndolos en PBS 1X con las siguientes proporciones: α -actina (1:2000), α -EhVps23 (1:500), α -EhADH (1:1000), α -EhCP112 (1:700), α -EhVps26 (1:1000) y α -EhVps35 (1:500). Después de la incubación con los anticuerpos primarios se hicieron tres lavados de cinco minutos en agitación con PBS-Tween (1% de PBS-Tween 20 diluido en PBS 1X) y en seguida se incubaron las tiras dos horas a 4°C, con sus respectivos anticuerpos secundarios anti-IgG etiquetados con peroxidasa HRP y diluidos en solución bloqueadora de la siguiente forma: **α -rata (1:10,000)** para detectar α -EhVps23; **α -ratón (1:10,000)** para α -actina y α -EhVps35 y **α -conejo (1:10,000)** para α -EhCP112, α -EhVps26 y α -EhADH. Finalmente, se hicieron cinco lavados de cinco minutos en agitación con PBS-Tween y se revelaron las tiras con el kit Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection, marca GE-Healthcare en un equipo MicroChemi de la marca DNR Bio-Imaging Systems™.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras con VE de los ensayos de secreción que se almacenaron a -70 °C se descongelaron y se tomaron 10 μ L, a los cuales se les agregaron 5 μ L de glutaraldehído al 2.5% diluido con un amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 para fijarlas. Después se volvieron a fijar con tetraóxido de sodio 1% (diluido en el mismo amortiguador de cacodilato de sodio) durante 60 min. Se realizó una tinción negativa para lo cual se utilizaron rejillas de níquel revestidas de carbón y Formvar a las cuales se les colocaron 5 μ L de la muestra de VE que se dejó absorber durante 5 minutos en la gradilla, el exceso fue removido con papel filtro. Posteriormente, se colocó acetato de uranilo al 2.5% para la tinción negativa, dejando que las muestras secan completamente, realizando finalmente un baño con carbono (Sharma *et al.*, 2020). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Joel JEM-1011 (Ávalos-Padilla, 2016).

6. RESULTADOS

6.1. Selección del método para aislar VE de *E. histolytica*

Uno de los primeros objetivos de este trabajo fue establecer un método de obtención de VE a partir de cultivos de *E. histolytica*, para esto, se utilizaron dos técnicas. La primera fue el “ensayo de secreción” que consistió en el lavado de los cultivos con PBS y la incubación por 2 horas para que las amibas liberen las vesículas, seguida de una centrifugación que permitiera limpiar la muestra y obtener todos los tipos de VE (**Figura 15**).

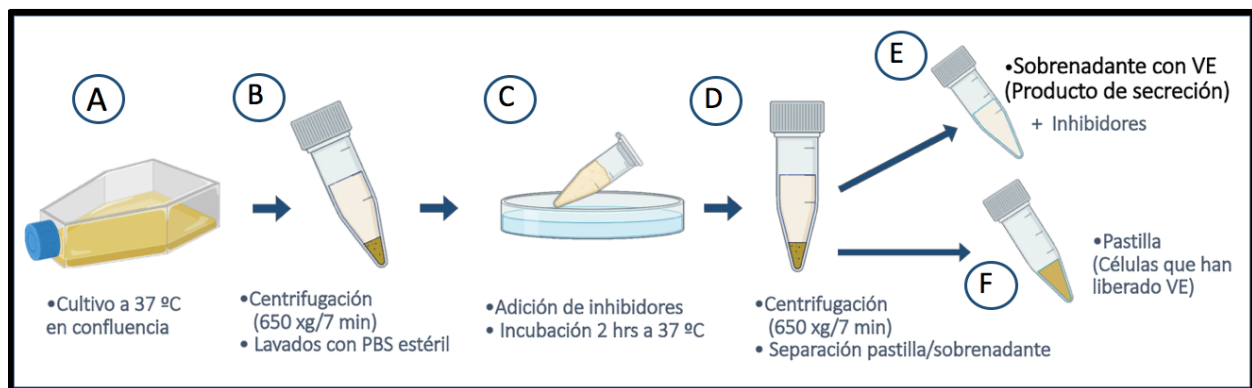


Figura 15. Obtención de VE por ensayo de secreción. **A)** Se inicia con cultivos confluentes de *E. histolytica* en frascos de cultivo T25, se necesitan aprox. 6 millones de células para un buen resultado. **B)** En esterilidad se colectan las amibas en tubos cónicos de 50 mL, se toma una muestra para conteo en la cámara de Neubauer y se centrifugan a 650 xg por 7 min a 4°C para separar las células del medio, la pastilla se resuspende en PBS y se pasa a tubos de microcentrífuga, este paso de centrifugar, tirar el medio y poner nuevo PBS se repite dos veces para limpiar bien las amibas de los residuos del medio de cultivo. **C)** En la última centrifugación la pastilla de células se resuspende en una mezcla de inhibidores de proteasas (mezcla para secreción) y se incuba máximo 2 horas. **D)** Después de las 2 horas de incubación en que las amibas secretaron partículas al medio, se centrifuga nuevamente a 650 xg por 7 min a 4°C o incluso hasta 2000 xg para asegurar que se remuevan los residuos del medio. Finalmente se separan el sobrenadante y la pastilla en tubos de microcentrífuga. **E)** El sobrenadante que contiene las VE debe tratarse con inhibidores calculados para 1.5 millones de células y conservarse en ultracongelación a -70 °C. **F)** Si se desea analizar las células que ya liberaron VE como control para comprobar los niveles de proteína que quedaron en las amibas después de la secreción deben adicionarse inhibidores a la pastilla calculados para el número original de amibas de la muestra y conservarse en ultracongelación a -70°C. (Los iconos que forman esta figura se tomaron de la página de internet de BioRender).

La segunda técnica consistió en una modificación de la protocolo de Chiou y Ansel del 2016 que esta enfocada en el aislamiento de exosomas utilizando un gradiente de sacarosa a través de ultracentrifugaciones; debido a que en este trabajo se consideraban todos los tipos de VE y no exclusivamente los exosomas, se descartó el uso del gradiente de sacarosa y se utilizó la ultracentrifugación para coleccionar tanto las microvesículas como los exosomas (**Figura 16**).

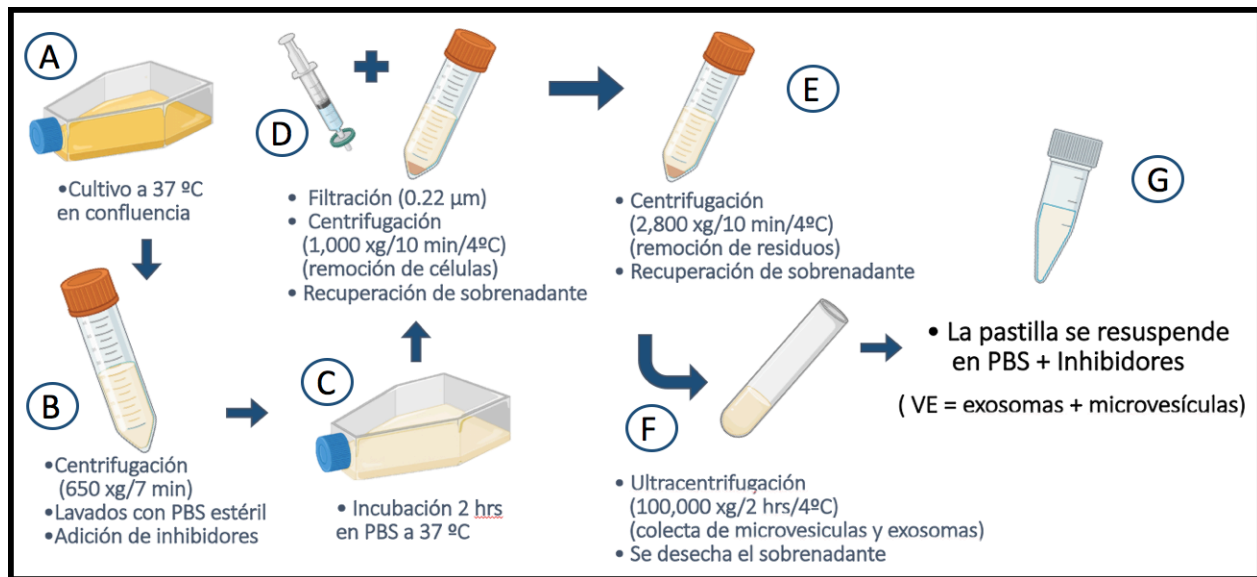


Figura 16. Obtención de VE por la técnica de Chiou y Ansel (2016) modificada. Los primeros tres pasos son iguales que en el ensayo de secreción. **A)** Se inicia con cultivos confluentes de *E. histolytica*. **B)** Se coleccionan en esterilidad las amibas en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugan a 650 xg por 7 min a 4°C para hacer lavados con PBS recuperando la pastilla y desechando el sobrenadante. **C)** Se añaden inhibidores calculados para el número de células del cultivo y se incuban 2 hrs a 37 °C, a diferencia del ensayo de secreción, en este caso se utilizan frascos de cultivo T25. **D)** Después de la incubación, se colecta el material, se pasa por un filtro Whatman™ de 0.22μm para eliminar cualquier contaminante y se centrifuga a 1000 xg por 10 min a 4°C para eliminar las células del medio. **E)** Se recupera el sobrenadante y se vuelve a centrifugar, esta vez a 2,800 xg por 10 min a 4°C para remover fracciones membranales de células muertas, quedando en el sobrenadante las VE. **F)** Para poder trabajar con la muestra de VE se ultracentrifuga en tubos Beckman a 100,000 xg por 2 hrs a 4°C para poder concentrar los exosomas y las microvesículas en una pequeña pastilla. **G)** La pastilla de VE se recupera y se pasa a un tubo pequeño de microcentrífuga, resuspendiéndola con inhibidores de proteasas calculados para 4 millones de células. (Los iconos que forman esta figura se tomaron de la página de internet de BioRender)

Para comprobar que ambas técnicas permiten la separación de las proteínas sin que éstas se degraden para los posteriores análisis y que el uso de inhibidores fue correcto, se compararon con un control que consistió en la obtención de extractos totales, una técnica ya estandarizada en el laboratorio en la cual no hay un periodo de secreción, obteniéndose una imagen que permite ver el patrón de proteínas que las amibas tienen antes de liberar las VE.

Se realizó la electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Tanto en la técnica de extractos totales, como en ambas técnicas de aislamiento de VE que fueron el ensayo de secreción y la técnica modificada de Chio y Ansel del 2016, se pudo ver claramente el patrón de proteínas. También se analizó un segundo control que fue la pastilla de amibas que quedó después de la secreción (control de amibas), la cual representa las proteínas que se quedaron en las amibas después de la liberación de VE, en esta fracción no se pudo observar un patrón claro (**Figura 17**). Con ayuda de la técnica de extractos totales, también se analizó cual sería la concentración más adecuada de carga de proteínas por carril para los siguientes experimentos, encontrando más eficiente la cantidad de 50 µg de proteínas. Para comprobar si efectivamente eran VE las que se obtuvieron de las técnicas de aislamiento de VE se procedió a realizar la técnica de Western-blot que se explicará en el siguiente apartado. Para eso se seleccionó solo una de las dos técnicas de aislamiento de VE, por lo que entre el ensayo de secreción y la técnica modificada de Chio y Ansel del 2016, se escogió utilizar el ensayo de secreción, ya que permite obtener las VE en menor tiempo y cumplía con el objetivo de la investigación que eran trabajar con todos los tipos de VE que se secretaran, sin separar las microvesículas y los exosomas. Sin embargo, cabe resaltar que la técnica modificada a partir de Chiou y Ansel del 2016, puede asegurar una mejor purificación de las VE, ya que presenta un mayor número de centrifugaciones y pasos para asegurar que las muestras no contengan residuos celulares, por ejemplo, pedazos de membranas pertenecientes a células muertas que podrían afectar los resultados.

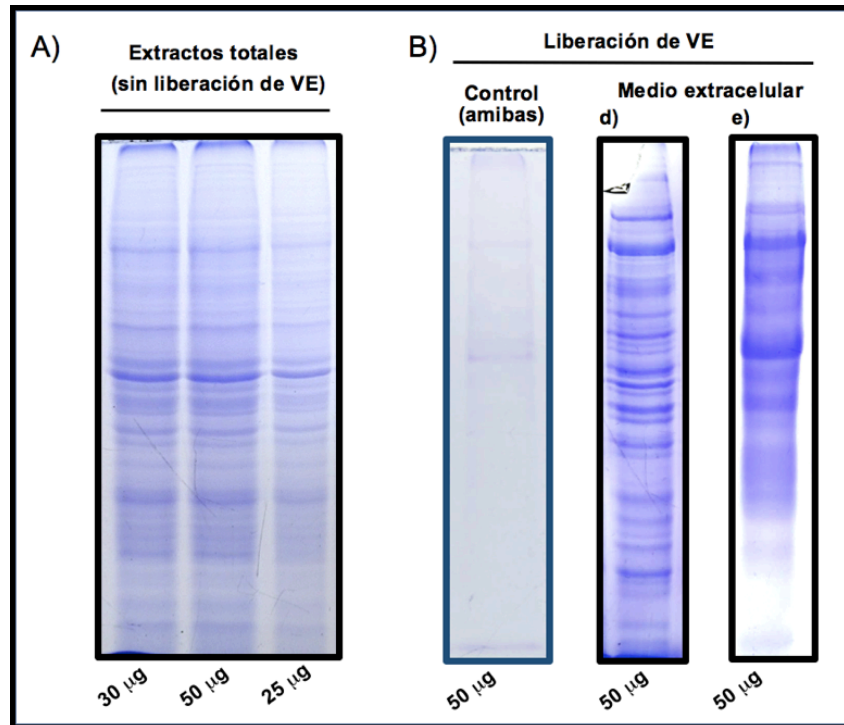


Figura 17. Patrón proteico de las distintas técnicas utilizadas para aislamiento de VE. En geles al 12% teñidos con azul de Coomassie, se comparó el patrón proteico de la técnica de extractos totales y de las dos técnicas de aislamiento de VE analizadas en este trabajo. **A)** Técnica de extractos totales, se utilizaron distintas concentraciones de carga en cada carril, seleccionando la de 50 µg por carril para realizar los posteriores experimentos del trabajo, la muestra contiene las proteínas totales que se encuentran dentro de la amiba, antes de la liberación de VE. **B)** Técnicas de aislamiento de VE, el control de amibas muestra muy pocos niveles de proteínas dentro de las células, después de la liberación de VE mientras que en el ensayo de secreción (d) y en la técnica modificada de Chiou y Ansel (e) se ven enriquecidos los niveles de proteínas dentro de las VE.

6.2. Detección de las proteínas de interés en las VE

El segundo objetivo de esta investigación fue confirmar la presencia de las proteínas EhVps23, EhADH, EhCP112, EhVps26 y EhVps35 en las VE que producían los trofozoítos de *E. histolytica*, para esto, se realizaron pruebas de Western-blot con las muestras de los ensayos de secreción que contenían las VE liberadas por las amibas. La **figura 18** muestra la comparación entre las muestras de extractos totales que son los que contienen las proteínas dentro de las amibas antes de la secreción y a lado las muestras de los ensayos de secreción que contienen las VE liberadas, para la detección de las proteínas EhVps23 del

complejo ESCRT-I y las proteínas accesorias EhADH y CP112. Para corroborar que los productos de secreción fueran VE y no restos de membranas celulares de trofozoítos muertos, se utilizó como control la detección de actina ya que Sharma y colaboradores (2020), reportaron la ausencia de esta proteína dentro de las VE, a diferencia de las muestras de restos de amibas donde generalmente sí se encuentra presente. De igual forma, la actina se presentó solo en las muestras de extractos totales y no en los ensayos de secreción de este trabajo. Para la proteína EhVps23, la banda de 54 kDa mostrada en trabajos como el de Galindo (2016), se pudo observar en las VE después de la secreción, cuya concentración fue muy baja o cualitativamente se puede ver disminución de ésta. Por su parte las proteínas accesorias EhADH y EhCP112 también se observaron en menor proporción. Cabe resaltar que la proteína EhADH resultó ser muy lábil ya que tiende a degradarse fácilmente en las muestras, por lo que los niveles de inhibidores tuvieron que aumentarse constantemente y el hecho de establecer tiempos muy cortos en que la muestra estuviera por arriba de temperaturas mayores a 4 °C fueron cruciales para evitar la degradación de la proteína, especialmente en los ensayos de secreción. Del mismo modo sucedió con la proteína EhCP112 que en los experimentos se degradaba rápidamente, en este caso en las muestras de extractos totales, se observó al igual que en los experimentos de Ocádiz y colaboradores del 2005, la banda característica del pro-peptido junto con la enzima madura, pesando en conjunto 52 kDa aproximadamente junto con una de 40 kDa también reportada en ese trabajo perteneciente solo a la forma madura de la enzima. Sin embargo en las VE dejó de ser visible la de 52 kDa y se observó una banda de 49 kDa posiblemente como una forma degradada de la enzima de 52 kDa.

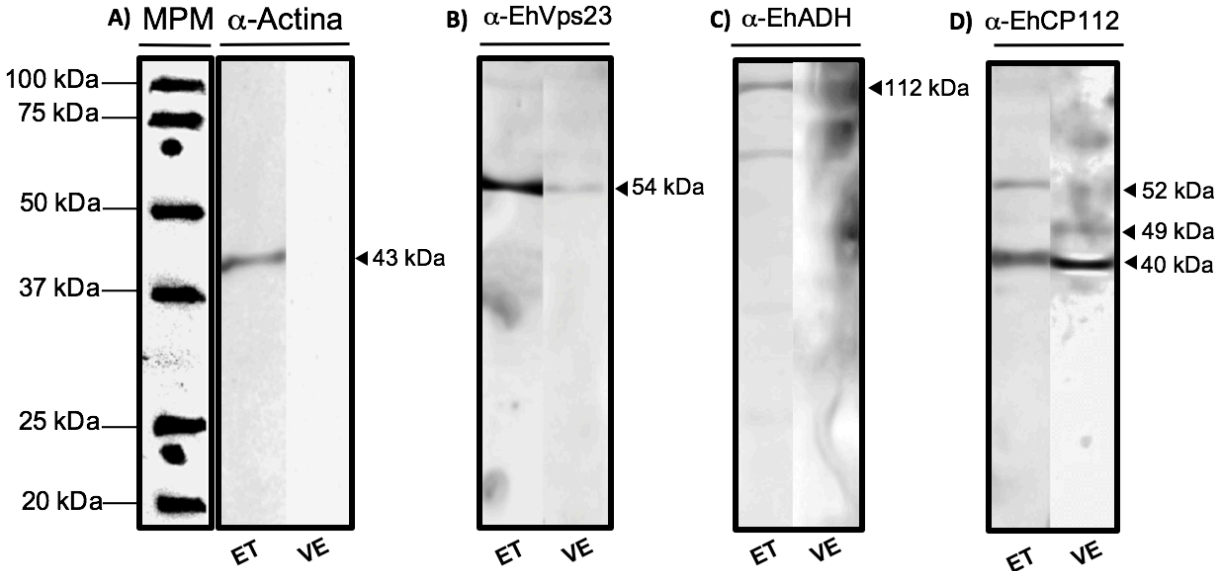


Figura 18. Detección de las proteínas EhVps23, EhADH y EhCP112 en VE. Con la técnica de Western-blot se detectó la presencia de las proteínas de interés con los anticuerpos α -actina, α -EhVps23, α -EhADH y α -EhCP112. **A)** El control consistió en la detección de actina sólo en los extractos totales, pero no en las VE liberadas durante el ensayo de secreción. **B)** La proteína EhVps23 de 54 kDa fue encontrada de manera disminuida en la VE secretadas por la ameba a comparación de los niveles basales en la técnica de extractos totales. **C)** La proteína EhADH de 112 kDa se percibe ligeramente en las VE después de la secreción posiblemente por degradación de la misma proteína. **D)** Finalmente la proteína EhCP112 mostró la banda de 52 kDa en los extractos totales, característica del pro-péptido junto con la enzima madura de 40 kDa, mientras que en las VE esa banda posiblemente se degradó hasta los 49 kDa. En ambas muestras la banda 40 kDa perteneciente a la enzima madura se presentó. **MPM:** Marcador de peso molecular. **ET:** Extractos totales. **VE:** Vesículas extracelulares obtenidas con el ensayo de secreción.

Durante el mismo experimento de Western-blot se buscó la detección de las proteínas EhVps26 y EhVps35 del retrómero (**Figura 19**). En este caso, la proteína EhVps26 se encontró con una doble marca alrededor de un peso de 52 kDa en las VE secretadas y posiblemente haya un enriquecimiento dentro de éstas al comparar su presencia con las muestras antes de las dos horas del ensayo de secreción. Mientras tanto, la proteína EhVps35 también se detectó en las VE secretadas por los trofozoítos, ésta mostró un peso de 71 kDa como ha sido reportado antes por Díaz (2018). Sin embargo, a diferencia de las otras proteínas estudiadas, parece ser la única proteína que mostró los mismos niveles tanto en

las amibas antes de la secreción como en las VE secretadas. No se puede asegurar si tenían la misma concentración sin pruebas de densitometría que midan los niveles de concentración de las proteínas.

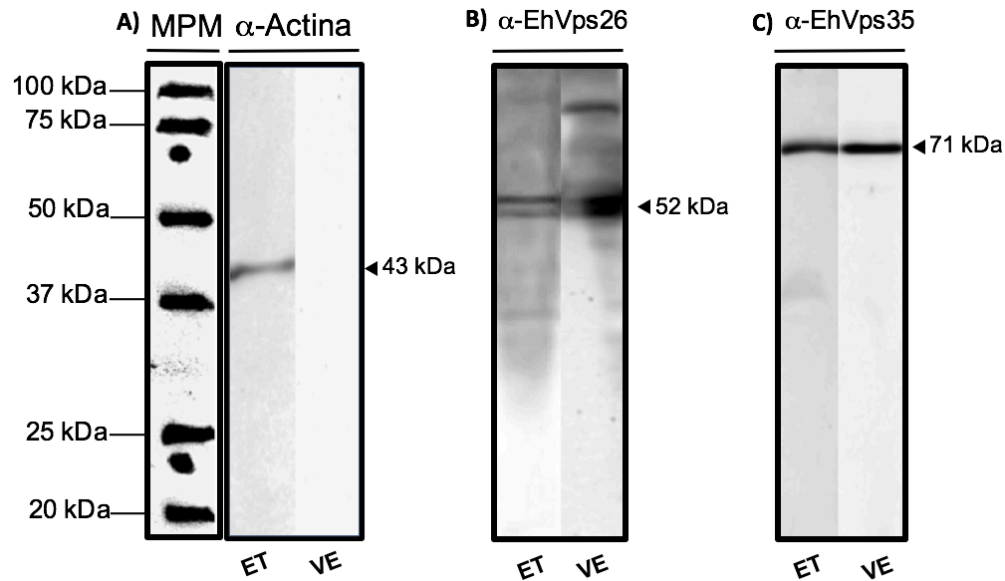


Figura 19. Detección de las proteínas EhVps26, EhVps35 en VE. Por Western-blot se detectaron las proteínas del retrómero con los anticuerpos α -EhVps26 y α -EhVps35, ambas pertenecientes al CRC del retrómero. **A)** Del mismo modo que en la figura 18, la falta de detección de actina en las VE permitió asegurar que las muestras contenían productos de secreción y no de restos de membrana celulares u otros contaminantes. **B)** La proteína EhVps26 de 52 kDa fue detectada en las VE y parece tener un enriquecimiento en las VE comparado con los niveles basales de la ameba. **C)** Por su parte la proteína Vps35 de 71 kDa se encontró en las mismas concentraciones tanto en las VE como en los niveles basales dentro de la ameba. **MPM:** Marcador de peso molecular. **ET:** Extractos totales. **VE:** Vesículas extracelulares obtenidas con el ensayo de secreción.

6.3. Determinación del tipo de VE producidas por *E. histolytica*

El tercer objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de VE que se liberaron en los ensayos de secreción. Para esto, se realizaron observaciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa en el laboratorio 1 con ayuda de la Dra. Bibiana Chávez Munguía y la Biol. Lizbeth Iliana Salazar. Utilizando acetato de uranilo al 2.5% y se midieron algunas cuantas de las VE encontradas en los ensayos de secreción para tener un pequeño panorama de los

posibles tipos de VE liberadas con esta técnica. En estas mediciones el tamaño más pequeño que se observó fue de 78 nm considerando este tipo de VE como exosomas siguiendo las clasificaciones por tamaño mencionadas por Pegtel y Goul (2019) y Matarredona y Pastor (2020) que engloban a los exosomas en rangos entre 30-100 nm. Por otro lado, también se encontraron VE de tamaños de 137 nm y 134 nm, mayores a los 100 nm, considerando estas como microvesículas, ya que estos mismos autores las clasifican entre 100-1000 nm (**Figura 20**). Estos datos sugieren que los ensayos de secreción permitieron obtener VE tanto del tipo de exosomas, como del tipo de las microvesículas.

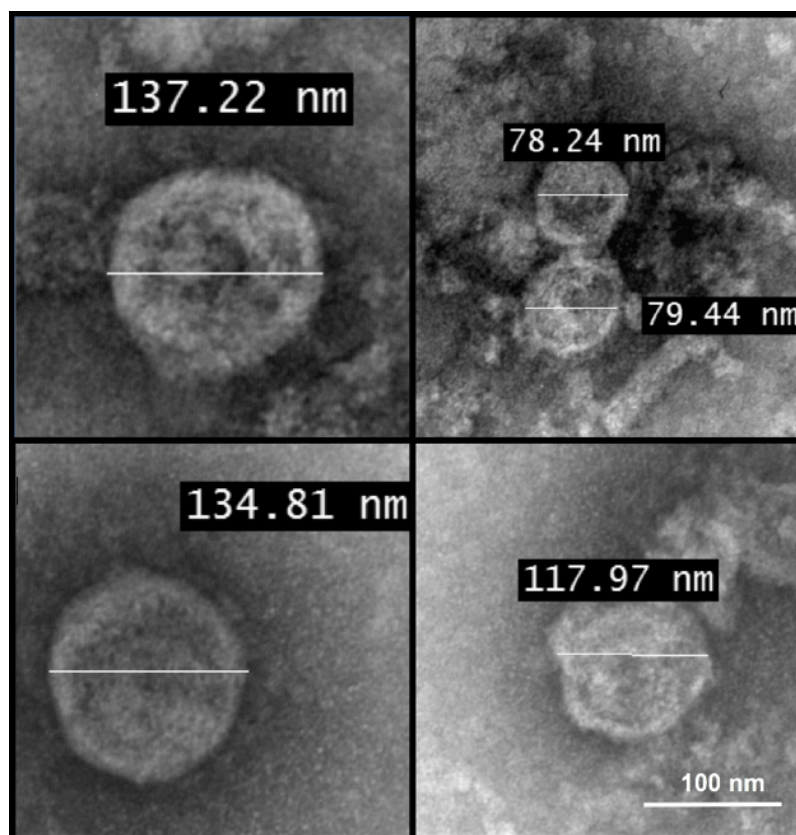


Figura 20. Fotografías de VE secretadas por *E. histolytica*. A través de la técnica de tinción negativa se observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) las VE que secretaron al medio de PBS las amibas de los ensayos de secreción. A pesar de ser pocas las VE que se midieron, se pudieron encontrar VE de tamaños menores a los 1000 nm, que entrar en el rango de exosomas y otras VE mayores a los 1000 nm que se podrían considerar microvesículas, siguiendo las clasificaciones de autores como Pegtel y Goul (2019) y Matarredona y Pastor (2020).

7. DISCUSIÓN

Los estudios en VE, especialmente aquellos enfocados en exosomas, han cobrado importancia hoy en día debido a la gran cantidad de moléculas que contienen en su interior. En el área de la parasitología, estos estudios han permitido considerar nuevos tratamientos enfocados en la disminución de los daños producidos en los hospederos. Sin embargo una de las grandes limitantes de trabajar con VE es la dificultad en su obtención y aislamiento, especialmente si se desea trabajar sólo con exosomas o con microvesículas. Pegtel y Goul (2019) mencionan que, dentro de las técnicas establecidas hoy en día, no hay ninguna que permita de manera infalible el aislamiento puro de las VE, especialmente de exosomas por ser partículas tan pequeñas. Por estas razones, en este trabajo se consideró trabajar con todos los tipos de VE, especialmente microvesículas y exosomas que produjeran los trofozoítos de *E. histolytica*.

Se describieron dos técnicas para el aislamiento de las VE, el “ensayo de secreción” y una modificación de la “técnica de Chiou y Ansel del 2016”. Ambas técnicas permitieron la obtención de las VE, sin embargo, a pesar de que la modificación de Chiou y Ansel consideraba un número mayor de centrifugaciones, ultracentrifugación y posiblemente una purificación más completa, se optó por utilizar el ensayo de secreción debido a que permitió con mayor rapidez cumplir con el objetivo general del trabajo, el cual era la obtención de VE sin separar los exosomas de las microvesículas. Cabe mencionar que en este trabajo también se probó el kit de aislamiento de exosomas ExoFast™ para medios de cultivo, de la marca ABP Biosciences™, sin embargo no se obtuvo el aislamiento con este método (resultados no mostrados) por lo que se descartó su uso para este trabajo.

Una vez realizada la separación de las VE, se analizó el contenido proteico de éstas, especialmente enfocándonos en las proteínas de interés. En el caso de la proteína EhVps23, se esperaba que ésta se encontrara en los VE de *E. histolytica*, ya que como reportó Galindo en el 2016, esta proteína es homóloga a la proteína TSG101 de mamíferos, la cual Petgel y Gould (2019) mencionan que es un

marcador exosomal de mamíferos. En un gran número de estudios sobre exosomas de mamífero, se ha encontrado a la proteína TSG101, sin embargo, a pesar de que la proteína EhVps23 sí se encontró en los análisis de Western-blot de las VE de este trabajo, su concentración se vio posiblemente disminuida, al menos al compararlo con los niveles basales en la ameba antes de la liberación de VE. EhVps23 podría no ser un buen candidato para ser un marcador molecular de VE en *E. histolytica*, sin embargo, aun necesitan hacerse más estudios. En este trabajo se utilizaron VE de *E. histolytica* teniendo mezclados exosomas y microvesículas en las muestras, por lo que no se sabe si la proteína se encontraba sólo en los exosomas o en las microvesículas o en ambas. Si existiera la posibilidad de que la proteína se presentara sólo en una de los dos, por ejemplo en exosomas, esto indicaría que su baja concentración en las VE sería debido a que la mayoría de las VE en las muestras eran microvesículas o viceversa. Sin embargo, esto solo es una teoría, por lo que se sugieren futuros estudios donde se analice si esta proteína se presenta sólo en exosomas y finalmente ser un candidato confiable como marcador exosomal al igual que su homóloga TSG101. Otra característica que sería interesante analizar en estudios futuros, son los niveles de la proteína en VE en distintas condiciones, ya que en este caso se trabajaron con niveles basales, sin embargo, como López-Reyes y colaboradores (2010) reportaron que la expresión del gen de *EhVps23* aumenta durante procesos de eritrofagocitosis por lo que los niveles de proteína de ésta proteína podrían verse aumentados también en las VE que secreta la ameba después de un evento como éste.

La proteína EhCP112 ya había sido reportada por Ocadiz y colaboradores, en el 2005 en vesículas secretadas al medio por parte de *E. histolytica*. Al igual que ellos, también encontramos dos bandas en el experimento de Western-blot, la de 52 kDa que corresponden al pro-peptido junto con la enzima madura CP (la cual pesa 46.9 kDa) y otra banda de 40 kDa perteneciente a la forma madura de la enzima sin el pro-peptido. Sin embargo, en las muestras de VE la banda de 52 kDa desapareció y se observó otra de 49 kDa posiblemente como una forma degradada de la enzima. Es importante enfatizar que Ocadiz y colaboradores (2005) mencionan que la

proteína purificada EhCP112 de 52 kDa es muy lábil por lo que se degrada con cierta facilidad en poco tiempo, esto posiblemente sea por procesos de autoproteólisis que le permiten madurar, por lo que pueden llegar a detectarse en las bandas del gel productos de degradación y las proteínas podrían no migrar de manera fiable de acuerdo al peso molecular.

Por su parte, la proteína EhADH es homologa a la proteína ALIX de mamíferos y al igual que EhCP112, se ha evidenciado su secreción al medio extracelular por Montaña y colaboradores (2017), por lo que se esperaba la presencia de ésta proteína en los análisis de Western-blot de las muestras de VE de *E. histolytica*. En el análisis de la proteína EhADH, el anticuerpo detectó la banda de 112 kDa que pertenecería al complejo EhCPADH, el cual mostró una posible disminución en VE principalmente por la degradación de la proteína. Sin embargo, recordando que no hay forma de discriminar si la presencia del complejo se encontraba sólo en microvesículas, en exosomas o en ambas como sucedió con el resto de las proteínas, no podemos más que plantear nuevas hipótesis para futuros trabajos. Considerando que Montaña y colaboradores (2017) encontraron una baja presencia de EhADH en vesículas lumbales y una alta presencia del complejo EhCPADH en la membrana plasmática, podría pensarse que EhADH mayormente se encontraba en microvesículas que se forman a partir de la membrana plasmática y no tanto en exosomas que son los que provienen de las ILVs de los cuerpos multivesiculares. Este análisis es sólo teórico y necesitarían separarse los exosomas, las microvesículas y analizar la presencia de la proteína EhADH en cada una de ellas.

La teoría de que las proteínas EhCP112 y EhADH, se encuentran principalmente en microvesículas formando el complejo EhCPADH y no tanto en exosomas podría explicar porque Sharma y colaboradores (2020) sólo reportaron la presencia de EhADH en uno de los cinco análisis de espectrometría de masas que realizaron, ya que a pesar de tener en promedio VE mayores a los 100 nm (entrando en el rango de las microvesículas), estos autores utilizaron un kit de aislamiento de exosomas

por lo que una gran parte de su muestra podría haberse tratado de exosomas. Hay que considerar también que otra de las causas posibles por las que EhADH sea difícil de detectar en muestras de VE sea su alta labilidad. En este trabajo fue difícil realizar los análisis porque constantemente la proteína sufría degradación en especial después de las 2 horas de secreción. Por lo que a diferencia de ALIX que es un marcador de exosomas, EhADH podría también ser muy buen candidato para considerarse un marcador de VE de *E. histolytica*. A pesar de lo difícil que es trabajar experimentalmente con EhADH, se entiende el hecho de que esta proteína sea secretada ya que permite el reclutamiento de las proteínas ESCRT-III en las membranas de los MVB. Debido a su participación en la eritrofagocitosis reportado por Bañuelos y colaboradores en el 2012, se podría considerar evaluar su presencia en las VE que secreta la amiba después de algún evento de fagocitosis y analizar si los niveles aumentan o disminuyen en comparación con los niveles en estado basal.

Para las proteínas EhVps26 y EhVps35 del retrómero, ambas se detectaron en las VE secretadas. Para la proteína EhVps26, Nakada-Tsuki y colaboradores (2005) predijeron una masa molecular de 48 kDa, sin embargo, en los datos aquí presentes se detectó un doble bandeo en los análisis de Western-blot, con un peso cercano a los 51 kDa. Esto concuerda con las pruebas de Western-blot realizadas por Watanabe y colaboradores del 2020 donde también se presenta el doble bandeo y pesos arriba de los 50 kDa. Nakada-Tsuki y colaboradores en el 2005 hablaron sobre la unión de ésta proteína con la GTPasa EhRab7A, mientras que Watanabe y colaboradores en el 2019 describieron su unión con la proteína EhSNX1, ambas autoras mencionan que esto contribuye al reclutamiento del retrómero en los endosomas tardíos. Esto sugiere que la proteína tiene una participación crucial en el reciclamiento de proteínas como cisteínas proteasas, del mismo modo ambos autores reportaron la localización de EhVps26 en eventos de eritrofagocitosis y de trogocitosis por lo que esta proteína también participa en estos procesos de manera significativa. Ya que en este trabajo se encontraron aumentados sus niveles de concentración en los análisis de Wester-blot, podríamos pensar que su papel

durante la secreción de VE es igual de importante que en los eventos de eritrofagocitos y trogocitosis, ya que en las VE de *E. histolytica* Sharma y colaboradores (2020) han reportado un aumento de proteínas propias de la ameba. Por lo que el reciclaje de materiales debe ser sumamente activo en este evento para que la ameba pueda compensar la pérdida de algunos materiales. El hecho de encontrar aumentados los niveles dentro de las VE, podría indicarnos también que esta proteína participa en la comunicación parásito-parásito, por lo que sería ideal hacer pruebas futuras donde se midieran los niveles de ésta proteína en *E. histolytica* en dos fases, una en niveles basales y otra después de que un grupo de amibas recibiera un tratamiento con VE provenientes de otras amibas que han sufrido algún estrés como lo hicieron Sharma y colaboradores (2020). De este modo saber si las amibas pueden recibir e incorporar estas proteínas por parte de otras que previamente la han producido y observar si las amibas receptoras pueden aumentar los niveles de EhVps26 y obtener alguna ventaja.

En cuanto a la proteína EhVps35, Trousdale y Kim en el 2015 describieron en levaduras como esta proteína participa en el reconocimiento de moléculas cargo que serán llevadas al complejo de Golgi durante el transporte retrógrado. Ya que Díaz en el 2018 reportó la localización de esta proteína en vesículas alrededor de los fagosomas, se puede considerar que tiene un papel importante durante este evento. En este caso Díaz también reportó que los niveles de la proteína no aumentan, sólo lo hace la concentración de ARN mensajero, lo que concuerda en este trabajo en el hecho de que la concentración de la proteína en las VE secretadas por la ameba tampoco aumentó, esto podría deberse a que la proteína posiblemente participa sólo en la unión de moléculas cargo pero no necesita tener un aumento en sus niveles para llevar a cabo esta tarea. Sin embargo, una propuesta a futuro sería analizar ahora los niveles de ARN mensajero de la proteína dentro de las VE secretadas tanto en condiciones basales como en momentos posteriores a un evento de eritrofagocitosis, para ver si lo que se transporta en mayores cantidades dentro de las VE sean más bien moléculas de ARN mensajero de la proteína EhVps35 más que la propia proteína.

Todas las proteínas consideradas en este trabajo se encontraron en las VE obtenidas en los ensayos de secreción. Las cuales entraron en las categorías de microvesículas y exosomas, siguiendo los criterios de clasificación por tamaño mencionados por autores como Pegtel y Goul del 2019 y Matarredona y Pastor del 2020 que son de 30 a 100 nm para los exosomas y 100 a 1000 nm para las microvesículas. A pesar de que la VE encontradas en este trabajo también podrían entrar en el rango de 50 a 2000 nm considerados para cuerpos apoptóticos, se descartó esta posibilidad debido a que las VE no mostraron presencia de actina en los ensayos de Western-blot, eliminando la posibilidad de que fueran restos de amibas en proceso de muerte celular. Las observaciones por TEM permitieron confirmar que los ensayos de secreción realizados en este trabajo sí pudieron permitir el aislamiento de exosomas y microvesículas, sin embargo, para futuros trabajos se sugiere realizar la medición y cuantificación de un número mayor de VE, para poder tener datos suficientes y determinar cual es de estas dos poblaciones de VE se encuentra en mayor proporción y poder sacar un promedio de tamaño de cada una de ellas. Del mismo modo se sugiere hacer pruebas para la separación de exosomas y microvesículas y poder analizar por separado el contenido proteico de ambas y compararlas, así como pruebas para realizar la cuantificación de las proteínas para confirmar si realmente hay aumento o disminución en las concentraciones de éstas, especialmente para aquellas que han sido reportadas previamente dentro de VE de *E. histolytica*. Por lo que este trabajo abre la posibilidad a un gran número de propuestas para futuras investigaciones en relación proteínas de la maquinaria ESCRT y del retrómero en VE liberadas por *E. histolytica*.

8. CONCLUSIONES

- EL ensayo de secreción y la técnica modificada de Chiou y Ansel, permitieron la obtención de VE de *E. histolytica*, siendo el ensayo de secreción más sencillo y rápido.
- Las proteínas EhVps23, EhADH, EhCP112, EhVps26 y EhVps35 se encontraron en las VE liberadas por *E. histolytica*.
- La proteína EhVps23 de la maquinaria ESCRT-I y las proteínas accesorias EhADH y EhCP112 se encontraron posiblemente disminuidas en las VE secretadas por *E. histolytica* al comparar su presencia en extractos totales. Se necesitan futuros análisis para cuantificar la concentración de las mismas.
- En cuanto a las proteínas del retrómero, EhVps26 mostró un posible enriquecimiento en las VE secretadas por las amibas, mientras que EhVps35 se observó de igual forma tanto en los extractos totales como en las VE. En este caso también se necesitan futuros análisis para la cuantificación de sus concentraciones.
- La ausencia de actina en las VE de *E. histolytica*, permitió confirmar que los ensayos de secreción contenían VE y no restos de células muertas.
- En los ensayos de secreción se presentaron tanto micovesículas como exosomas siguiendo los criterios de clasificación por tamaño de algunos autores.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo generaron nuevas ideas a explorar para futuras investigaciones, las cuales se enlistan en las siguientes propuestas:

- Improvisar la separación de exosomas y microvesículas de las muestras generadas en los análisis de secreción y comparar la concentración de las proteínas EhVps23, EhADH, EhCP112, EhVps26 y EhVps35 en ambos tipos de VE con técnicas que permitan cuantificar la concentración de proteínas como por ejemplo, los análisis de densitometría.
- Analizar si las concentraciones de las proteínas EhVps23, EhADH, EhCP112 cambian en VE provenientes de amibas que han tenido un estímulo previo, como son los eventos de eritrofagocitosis donde se ha visto que estas proteínas participan y comparar sus concentraciones con cultivos en condiciones estándar.
- Cultivar trofozoítos de *E. histolytica* con VE provenientes de otros cultivos de la amiba y observar si en las células receptoras hay cambios en las proteínas ESCRT y del retrómero.
- Evaluar no solo los niveles de proteínas, sino también los niveles de ARN mensajero especialmente en casos como EhVps35 cuyos niveles proteicos posiblemente fueron los mismos tanto en los extractos totales como en las VE.
- Realizar la medición y cuantificación de una muestra considerable de VE y determinar las proporciones de microvesículas y exosomas liberadas por *E. histolytica* en condiciones de cultivo estándar y bajo estímulos.

10. REFERENCIAS

- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A. A., Hoppenrath, M., James, T. Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D. J. G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., Mann, D. G., Massana, R., Mitchell, E. A. D., Morrow, C., Park, J. S., Pawlowski, J. W., Powell, M. J., Richter, D. J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F. W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., & Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119.
- Anderson, H. C. (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *The Journal of Cell Biology*, 41(1), 59–72.
- Arroyo, R., & Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 23(2), 151–158.
- Atyame Nten, C. M., Sommerer, N., Rofidal, V., Hirtz, C., Rossignol, M., Cuny, G., Peltier, J.-B., & Geiger, A. (2010). Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 212817.
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., Ortega, J., & Orozco, E. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens*, 11(7), e1005079.
- Avalos-Padilla, Y., Knorr, R., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Lipowsky, R., Dimova, R., & Orozco, E. (2018). The Conserved ESCRT-III Machinery Participates in the Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8.
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677–685.
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., & Orozco, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental Parasitology*, 110(3), 292–297.
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., Vincent, O., & Orozco, E. (2012). EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 657942.
- Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2008). Retromer. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 427–436.

- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S. A., Blaxter, M., Ivens, A., & Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, *5*, 5488.
- Buschow, S. I., Nolte-'t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(10), 1528–1542.
- Campos, F. M. F., Franklin, B. S., Teixeira-Carvalho, A., Filho, A. L. S., de Paula, S. C. O., Fontes, C. J., Brito, C. F., & Carvalho, L. H. (2010). Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*, *9*, 327.
- Centers for Disease Control and Prevention (15 de octubre de 2019). *Amebiasis [Entamoeba histolytica]*. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
- Chiou, N.-T., & Ansel, K. M. (2016). Improved exosome isolation by sucrose gradient fractionation of ultracentrifuged crude exosome pellets. *Protocol Exchange*. 1-5.
- Coakley, G., Maizels, R. M., & Buck, A. H. (2015). Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in Parasitology*, *31*(10), 477–489.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 24), 5553–5565.
- Cuellar-Guevara, Fabiola L., Barrón-González, María P., & Menchaca-Arredondo, Jorge L. (2019). Effect of *Lactobacillus* Postbiotics on *Entamoeba histolytica* Trophozoites. *Revista de investigación clínica*, *71*(6), 402-407.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., & Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *72*(4), 431–432.
- Díaz H., M. C. (2017). *Las proteínas del complejo ESCRT-II: Identificación y participación durante la eritrofagocitosis en Entamoeba histolytica* (tesis de maestría). Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Díaz V., J. (2018). *La proteína EhVps35 durante la eritrofagocitosis en Entamoeba histolytica* (tesis de maestría). Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Fordjour, F. K., Daaboul, G. G., & Gould, S. J. (2019). A shared pathway of exosome biogenesis operates at plasma and endosome membranes. *BioRxiv*, 545228.

- Galindo O., A. (2016). *Identificación de las proteínas Tom1 y Vps23 en Entamoeba histolytica* (tesis de maestría). Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocadiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., & Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*, 33(3), 556–568.
- Ha, D., Yang, N., & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 6(4), 287–296.
- Hassani, K., & Olivier, M. (2013). Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2185.
- Hassani, K., Shio, M. T., Martel, C., Faubert, D., & Olivier, M. (2014). Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes. *PloS One*, 9(4), e95007.
- Hierro, A., Rojas, A. L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A. V., Steven, A. C., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature*, 449(7165), 1063–1067.
- Hoshino, D., Kirkbride, K. C., Costello, K., Clark, E. S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M. J., & Weaver, A. M. (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Reports*, 5(5), 1159–1168.
- Jadli, A. S., Ballasy, N., Edalat, P., & Patel, V. B. (2020). Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467(1–2), 77–94.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412–9420.
- Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., & Ochner, C. (2018). *Entamoeba histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2018, 4601420.
- Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), 145–155.
- Khosravi, M., Mirsamadi, E. S., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2020). Isolation and Functions of Extracellular Vesicles Derived from Parasites: The Promise of a New Era in

Immunotherapy, Vaccination, and Diagnosis. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2957–2969.

- Kovtun, O., Leneva, N., Bykov, Y. S., Ariotti, N., Teasdale, R. D., Schaffer, M., Engel, B. D., Owen, D. J., Briggs, J. A. G., & Collins, B. M. (2018). Structure of the membrane-assembled retromer coat determined by cryo-electron tomography. *Nature*, 561(7724), 561–564.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R. 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., & Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1), 37–58.
- López-Reyes, I., Bañuelos, C., Betanzos, A., & Orozco, E. (2011). A Bioinformatical Approach to Study the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) Machinery in Protozoan Parasites: The *Entamoeba histolytica* Case. *Bioinformatics – Trends and Methodologies*, Dr. Mahmood A. Mahdavi (Ed.), InTech, 289–312.
- López-Reyes, I., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Herranz, S., Vincent, O., López-Camarillo, C., Marchat, L. A., & Orozco, E. (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 890674.
- Mantel, P.-Y., Hoang, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A. R., Barteneva, N., & Marti, M. (2013). Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host & Microbe*, 13(5), 521–534.
- Margolis, L., & Sadovsky, Y. (2019). The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS Biology*, 17(7), e3000363–e3000363.
- Matarredona, E. R., & Pastor, A. M. (2019). Extracellular Vesicle-Mediated Communication between the Glioblastoma and Its Microenvironment. *Cells*, 9(1).
- Montaño, S., Orozco, E., Correa-Basurto, J., Bello, M., Chávez-Munguía, B., & Betanzos, A. (2017). Heterodimerization of the *Entamoeba histolytica* EhCPADH virulence complex through molecular dynamics and protein-protein docking. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 35(3), 486–503.
- Moyano, S., Musso, J., Feliziani, C., Zamponi, N., Frontera, L. S., Ropolo, A. S., Lanfredi-Rangel, A., Lalle, M., & Touz, M. (2019). Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite *Giardia lamblia*: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk. *Cells*, 8(12), 1–20.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., & Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5294–5303.

- Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-López, J., García-Pérez, R. M., Sánchez, T., Castillo-Juárez, B. A., García-Rivera, G., & Rodríguez, M. A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology*, 7(2), 221–232.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., & Sánchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 158(5), 1511–1521.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., & Fais, S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34211–34222.
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 487–514.
- Pfriege, F. W., & Vitale, N. (2018). Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. *Journal of Lipid Research*, 59(12), 2255–2261.
- Plorde, J. J. (2004). Rhizopods. In K. J. Ryan, & C. G. Ray (Eds.), *Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases* (4th ed., pp. 733-740). United States: McGraw Hill.
- Pornillos, O., Alam, S. L., Rich, R. L., Myszka, D. G., Davis, D. R., & Sundquist, W. I. (2002). Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *The EMBO Journal*, 21(10), 2397–2406.
- Radulovic, M., & Stenmark, H. (2018). ESCRTs in membrane sealing. *Biochemical Society Transactions*, 46(4), 773–778.
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., & Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67.
- Sharma, M., Morgado, P., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Manna, D., & Singh, U. (2020). Characterization of extracellular vesicles from *Entamoeba histolytica* identifies roles in intercellular communication that regulates parasites growth and development. *Infection and Immunity*, 88(10), e00349-20.
- Silverman, J. M., Clos, J., de'Oliveira, C. C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L. J., & Reiner, N. E. (2010). An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 6), 842–852.
- Silverman, J. M., & Reiner, N. E. (2011). *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1, 26.

- Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30–41.
- Skowrya, M. L., Schlesinger, P. H., Naismith, T. V., & Hanson, P. I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6384).
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N. J., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 645(1), 63–70.
- Trejos-Suárez, J., & Castaño-Osorio, J. C. (2009). Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio*, 13, 100–110.
- Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., E Silva, N. C., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W., & Manso Alves, M. J. (2009). Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, 11(1), 29–39.
- Trousdale, C., & Kim, K. (2015). Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *European Journal of Cell Biology*, 94(11), 513–521.
- Verweij, F. J., van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Vendrig, T., Wurdinger, T., Cahir-McFarland, E., Kieff, E., Geerts, D., van der Kant, R., Neefjes, J., Middeldorp, J. M., & Pegtel, D. M. (2011). LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF- κ B activation. *The EMBO Journal*, 30(11), 2115–2129.
- Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2020). Two isoforms of phosphatidylinositol 3-phosphate-binding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 22(3), e13144.
- Williams, R. L., & Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(5), 355–368.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), 269–288.