



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
Unidad Zacatenco**

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**“Interacción entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Consecuencias morfológicas y en la virulencia”**

TESIS

Que presenta

**QFB. Valerie Joselin Pérez González**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directores de tesis:

**Dra. Patricia Talamás Rohana**

**Dr. Daniel Talamás Lara**

Ciudad de México

Noviembre, 2021

## **ASESORES DE TESIS**

Dr. Adolfo Martínez Palomo (DIPM-CINVESTAV)

Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi (DIPM-CINVESTAV)

## **AGRADECIMIENTOS CONACYT**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1 y laboratorio 9 del Depto. de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), bajo la tutoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana y el Dr.

Daniel Talamás Lara.

**Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo  
brindado para la realización del presente trabajo.**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico principalmente a mi madre por apoyarme y estar junto a mí a lo largo de mi vida, y especialmente durante este lapso para conseguir este logro, por brindarme su amor y cariño incondicional, y enseñarme a nunca rendirme en mis metas.

Agradezco a mis dos grandes amistades, a Fernanda porque siempre me inspiró a dar lo mejor de mí, y a demostrar mi capacidad, siempre orgullosa, siempre para mí para llenarme de risas y aventuras, siempre mi mejor amiga, hermana y elemento vital. A Gabriela mi cómplice y gran amiga durante tantos años, desearía haber compartido más tiempo de esta etapa juntas, y, aun así, siempre fuiste una parte importante para mí durante mi estadía, agradezco mucho tu amistad y que el destino continúe uniéndonos.

Agradezco a Raymundo, mi pareja, por su apoyo durante cada aventura, por los momentos únicos, por dar este paso conmigo, por siempre inspirarme a superarme, y por llenar cada día de amor y felicidad.

Finalmente, le dedico este trabajo a mi director de tesis, el Dr. Daniel Talamás Lara, quien siempre estuvo al pendiente de mí, instruyéndome y ayudando a superarme y lograr este objetivo, por brindarme un increíble apoyo, por su comprensión, y sobre todo por su amistad.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **FAMILIA**

- Miriam Fátima González Salgado

### **AMIGOS**

- Raymundo García Barrera
- Fernanda López González
- Gabriela Hernández Pizano

### **Laboratorio 1 (DIPM)**

- Dr. Adolfo Martínez Palomo
- Dra. Martha Espinosa Cantellano
- Dra. Bibiana Chávez Munguía
- Dr. Daniel Talamás Lara
- M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen
- M. en C. Hugo González
- M. en C. Patricia Pérez
- Aux. Lizbeth Salazar Villatoro

- Aux. Anel Lagunes Guillén
- Téc. Ranferi Andrés Pérez

### **Laboratorio 9 (DIPM)**

- Dra. Patricia Talamás Rohana
- Aux. Dra. Verónica Hernández
- Aux. Carlos Osorio
- Téc. Daniel Morales

### **Laboratorio 2 (DIPM)**

- Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi
- Aux. Karla Gil Becerril

### **Secretarias (DIPM)**

- Judith Escobedo Pineda
- Martha Dueñas Mejía
- Clara Castelán Domínguez

Agradezco a las auxiliares Lizbeth Iliana Salazar Villatoro, Anel Edith Lagunes Guillén y Lidia Baylón Pacheco por su valiosa contribución en el apoyo brindado para realizar ensayos de microscopía electrónica además de su gran amistad durante mi estadía en el laboratorio 1. Un especial agradecimiento a la M en C. Karla Gil Becerril, auxiliar del Laboratorio 2, quien me brindo un apoyo incondicional en mis experimentos en histología, además de una linda amistad.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>Capítulo I</b> .....	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
Amibiasis .....	12
<i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> .....	13
Factores de virulencia.....	15
Infecciones mixtas reportadas / prevalencia .....	19
Absceso hepático amibiano .....	22
Citoesqueleto.....	24
Actina .....	26
Citoesqueleto de actina de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> .....	30
<b>Capítulo II</b> .....	<b>33</b>
<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b> .....	<b>33</b>
<b>Capítulo III</b> .....	<b>34</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>Capítulo IV</b> .....	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
Análisis bioinformático de la proteína de 140 kDa receptor a fibronectina (lectina Gal/GalNAc).....	35
Cultivo de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> .....	35
Estandarización de medio de cultivo adecuado y curva de crecimiento .....	36
Cultivo de trofozoítos de la interacción de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> .....	36
Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer .....	36
Procesamiento de cubreobjetos y cajas Petri.....	37
Purificación de fibronectina .....	37
Procesamiento de cubreobjetos con fibronectina .....	38
Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido .....	38
Inmunofluorescencia.....	38

Determinación de la intensidad de fluorescencia .....	40
Análisis y monitoreo de formación de absceso hepático producido por la inoculación/interacción de <i>E. dispar</i> y <i>E. histolytica</i> en un modelo “ <i>in vivo</i> ” .....	40
Análisis histopatológico.....	41
Análisis estadísticos.....	41
<b>Capítulo V.....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
Diferencias en la formación de estructuras especializadas entre especies.....	42
Evaluación de la expresión de anticuerpo 3C10 en <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> . .....	45
Reestructuración de actina entre especies.....	47
Análisis bioinformático de la lectina Gal/GalNAc en <i>E. histolytica</i> y sus respectivos homólogos en <i>E. dispar</i> . .....	53
Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc (Hgl) .....	53
Subunidad ligera de la lectina Gal/GalNAc (Lgl).....	59
Subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc (Igl1 e Igl2).....	64
Presencia de motivos CXXC en proteínas homólogas a Ehgl en <i>E. dispar</i> .....	74
Análisis macroscópico del daño hepático de la interacción <i>E. histolytica</i> - <i>E. dispar</i> .....	76
Análisis histológico de la interacción <i>E. histolytica</i> - <i>E. dispar</i> durante el desarrollo del absceso hepático. ....	78
<b>Capítulo VI.....</b>	<b>82</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>82</b>
Reestructuración de actina entre especies y formación de estructuras especializadas. ....	82
Expresión de la molécula tipo integrina reconocida por el anticuerpo 3C10 en <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> .....	83
Análisis bioinformático de la lectina Gal/GalNAc en <i>E. histolytica</i> y sus respectivos homólogos en <i>E. dispar</i> . .....	85
Análisis de la interacción <i>E. histolytica</i> - <i>E. dispar</i> y el daño hepático macroscópico. ....	86
<b>Capítulo VII.....</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
<b>Capítulo VIII.....</b>	<b>90</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>90</b>
<b>Capítulo IX.....</b>	<b>91</b>

**REFERENCIAS ..... 91**

## RESUMEN

Debido a que actualmente se ha reportado la presencia de dos especies de amibas del género *Entamoeba* morfológicamente indistinguibles entre si a través de microscopía de luz, y ubicadas en el intestino (*E. histolytica* y *E. dispar*); se ha considerado el posible riesgo de la existencia de ambas especies en un mismo episodio de amibiasis y la posibilidad de que una de ellas pueda dominar a otra en cultivo, condiciones que aún no se han estudiado a profundidad. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue observar los cambios estructurales en la morfología de *E. histolytica* y *E. dispar* cuando éstas se encuentran interactuando en un co-cultivo, así como analizar el comportamiento patogénico de esta interacción durante la formación de absceso hepático amibiano, y de esta manera enriquecer el conocimiento en cuanto a esta enfermedad.

Para lograr este objetivo, inicialmente se realizó la estandarización de un medio en el que ambas pudiesen crecer y co-existir, para posteriormente realizar una interacción entre ambas y visualizar características morfológicas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Los resultados de MEB sugirieron la coexistencia de *E. histolytica* y de *E. dispar* dentro de la interacción, con base en la presencia de filopodios (*E. dispar*) y lamelopodios (*E. histolytica*). Posteriormente, por microscopía confocal se observó la estructuración de actina y la expresión del receptor a fibronectina (correspondiente a la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc), empleando un anticuerpo monoclonal específico para este receptor (3C10), encontrando un aumento de la presencia de este receptor en los trofozoítos de *E. dispar* que se encontraban en co-cultivo con *E. histolytica*;

Por otra parte, debido al aumento de la presencia del receptor a fibronectina observado en los trofozoítos de *E. dispar*, se realizó un análisis bioinformático de las subunidades que componen la lectina Gal/Gal/NAc en ambas especies. Los resultados mostraron que a pesar de que los motivos CXXC concuerdan en posición y presencia entre la subunidad intermedia (Igl1) de *E. histolytica*, la proteína con repeticiones de furina y la subunidad parcial intermedia 1 de *E. dispar*, ninguna reportó un empalme estructural representativo en el modelado tridimensional, por lo que se sugiere que ésta sea la razón

por la que el receptor a fibronectina de *E. dispar* se observa menos expresado en condiciones axénicas.

Finalmente, en el estudio "*in vivo*" de producción de absceso hepático se encontró un aumento en la proporción de la lesión de absceso hepático, así como evidente daño histológico en el grupo de interacción de ambas especies, esto fue observado a los 7 días post-inoculación de los hámsteres mediante la vía intrahepática. Estos resultados sugieren que la interacción entre estas dos especies podría influir en el incremento de virulencia de alguna o de ambas especies (*E. dispar* y *E. histolytica*) para la producción de absceso hepático.

## ABSTRACT

Due to the fact the presence of two species of amoebae of the genus *Entamoeba* morphologically indistinguishable from each other through light microscopy, and located in the intestine (*E. histolytica* and *E. dispar*); The possible risk of the existence of both species in the same episode of amoebiasis and the possibility that one of them may dominate another in cultivation has been considered, conditions that have not yet been studied in depth. Therefore, the objective of this work was to observe the structural changes in the morphology of *E. histolytica* and *E. dispar* when they are interacting in a co-culture, as well as to analyze the pathogenic behavior of this interaction during abscess formation amoebic liver, and in this way enrich the knowledge regarding this disease. To achieve this objective, initially the standardization of a medium in which both could grow and co-exist was carried out, to later carry out an interaction between both and visualize morphological characteristics by scanning electron microscopy (SEM). The SEM results suggested the coexistence of *E. histolytica* and *E. dispar* within the interaction, based on the presence of filopodia (*E. dispar*) and lamelopodia (*E. histolytica*). Subsequently, by confocal microscopy, the structuring of actin and the expression of the fibronectin receptor (corresponding to the intermediate subunit of the lectin Gal / GalNAc) was observed, using a monoclonal antibody specific for this receptor (3C10), finding an increase in the presence of of this receptor in the trophozoites of *E. dispar* that were in co-culture with *E. histolytica*. On the other hand, due to the increased presence of the fibronectin receptor observed in the trophozoites of *E. dispar*, a bioinformatic analysis of the subunits that make up the Gal / Gal / NAc lectin was performed in both species. The results showed that although the CXXC motifs agree in position and presence between the intermediate subunit (Ig1) of *E. histolytica*, the protein with furin repeats and the intermediate partial subunit 1 of *E. dispar*, neither reported a structural splice. representative in three-dimensional modeling, which is why it is suggested that this is the reason why the fibronectin receptor of *E. dispar* is observed less expressed under axenic conditions. Finally, in the “*in vivo*” study of liver abscess production, an increase in the proportion of liver abscess lesions was found, as well as evident histological damage in the interaction group of both species, this was observed

7 days after -inoculation of hamsters through the intrahepatic route. These results suggest that the interaction between these two species could influence the increase in virulence of one or both species (*E. dispar* and *E. histolytica*) for the production of liver abscess.

### ANTECEDENTES

#### Amibiasis

La amibiasis humana es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo patógeno *Entamoeba histolytica*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, y es responsable de la amibiasis intestinal invasiva y absceso hepático amibiano (OMS, OPS 1997; Soares y col. 2019).

Existen cuatro formas clínicas de la amibiasis intestinal invasiva: la disentería o diarrea sanguinolenta, colitis fulminante, apendicitis amibiana y ameboma de colon, las cuales regularmente se presentan de forma aguda. En particular los síndromes disentéricos y diarreicos figuran en el 90% de los casos de amebiasis intestinal invasiva (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000).

En la actualidad, la amibiasis representa una de las causas de muerte más importantes debido a infecciones parasitarias, reportando cerca de 50 millones de casos y aproximadamente 100,000 muertes anuales (OMS, OPS 1997), razón por la que esta enfermedad representa un importante desafío en salud pública en todo el mundo, y principalmente en países en vías de desarrollo (Anonymus 1997). Adicionalmente, esta infección se reporta con una importante prevalencia en trópicos y subtrópicos, debido a que generalmente en estas zonas existe una higiene y sanidad deficiente (OMS, OPS 1997). En México, se reporta una prevalencia de hasta el 42% en algunas áreas rurales (Alvarado-Esquivel, Sánchez-Anguiano, y Hernández-Tinoco 2015; Shirley, Watanabe, y Moonah 2019).

Sin embargo, la infección por amibiasis suele ser complicada de cuantificar en países en desarrollo, debido a que ciertos factores como el diseño del estudio, tamaño de muestra, la región geográfica, el compromiso de los síntomas y sensibilidad del método de

diagnóstico son elementos clave en la detección e informe de la enfermedad (Shirley y col. 2018).

El diagnóstico clínico de amebiasis intestinal invasiva aún en la actualidad está basado en la caracterización microscópica mediante frotis rectales o examen coproparasitológico en heces evacuadas recientemente; desafortunadamente el diagnóstico suele presentar la dificultad de no contar con las herramientas necesarias para la discriminación de la especie causante de la amibiasis.

No obstante, a pesar de la relevancia médica de la amibiasis, aún existe una sobreestimación de la incidencia de esta infección, ya que las estimaciones reportadas cada año podrían presentar un grado importante de sesgo, debido a la inclusión de la especie *Entamoeba dispar*, una amiba morfológicamente idéntica pero conocida como un comensal no invasivo (OMS, OPS 1997).

#### *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Por mucho tiempo *E. histolytica* y *E. dispar* se conceptualizaron como un mismo organismo, esto a causa de las similitudes morfológicas entre ellas; sin embargo, fue Émile Brumpt en 1925, quién propuso la existencia de dos especies morfológicamente idénticas, *E. histolytica*, una especie patógena capaz de causar infecciones, tanto sintomáticas como asintomáticas, y la especie no patogénica *E. dispar*, una amiba morfológicamente indistinguible a la antes mencionada (Chacín-Bonilla 2010; Clark 1995) Esta teoría fue retomada más tarde por Sargeaunt en 1978, al separar a ambas especies como distintas a través de electroforesis de isoenzimas (Sargeaunt, Williams, y Grene 1978). Finalmente, fue mediante biología molecular y estudios bioquímicos que se logró la identificación precisa de ambas especies del género *Entamoeba*, mediante el análisis del ADN genómico (Tannich y col. 1989) quedando separadas en dos especies en 1993 por Diamond y Clark (Diamond y Clark 1993).

El protozoo *E. histolytica* reside principalmente en la luz del colon donde se multiplica y posteriormente altera su morfología hasta diferenciarse en quistes (forma de resistencia al medio ambiente), los cuales son eliminados en las heces y son los principales responsables de la transmisión de la infección; adicionalmente *E. histolytica* es capaz de invadir la mucosa intestinal produciendo infecciones sintomáticas y asintomáticas. *E. histolytica* puede diseminarse a otros órganos, produciendo infecciones extraintestinales, entre éstas, la más relevante es el absceso hepático amibiano, aunque también se ha reportado que puede causar infecciones genitourinarias, respiratorias, cardíacas y cerebrales (Martínez-Palomo 1987).

Con respecto a *E. dispar*, ésta es una amiba morfológicamente similar a *E. histolytica*, que igualmente habita en el intestino humano, la cual como se mencionó anteriormente fue reconocida como una especie independiente en 1993, y se considera un parásito no invasivo del intestino. En 1997, la OMS retomó dicha situación para ejercer la recomendación del desarrollo y aplicación de métodos más adecuados para el diagnóstico específico de la infección (OMS, OPS 1997). *E. dispar* muestra una alta prevalencia mundial, e incluso, en informes sobre ciertas regiones específicas, la prevalencia es mayor a la reportada para *E. histolytica* (Calegar y col. 2016; Rojas y col. 2016; Soares y col. 2019). No obstante en años recientes, numerosas publicaciones, han reportado un importante papel patogénico para *E. dispar*, observando repetidamente su capacidad para producir lesiones en el modelo animal, así como un daño tisular en condiciones experimentales, siendo capaz de inducir síntomas intestinales y extraintestinales en el ser humano (A. Costa y col. 2006; C. Costa y col. 2010; Dolabella y col. 2012; Rojas y col. 2016; Soares y col. 2019; Ximénez y col. 2010). Aunado a esto, con frecuencia se ha relacionado su presencia con infecciones asintomáticas, por lo que su patogenicidad continúa siendo un tema inconcluso (Silva-Oliveira y col. 2015; Ximénez y col. 2010).

En cuanto a la virulencia de estas especies, se han realizado numerosos estudios en relación a la comprensión de su patogénesis, principalmente en el caso de la especie patógena por excelencia, *E. histolytica* (Chávez-Munguía, Tsutsumi, y Martínez-Palomo 2006; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000; Martínez-Palomo 1983; Ravdin 1995;

Talamás-Lara y col. 2014, 2020; Trejos-Suárez y Castaño-Osorio 2009), donde se ha observado que la virulencia depende fundamentalmente de la capacidad infecciosa; dentro de este proceso se conocen distintos factores de virulencia característicos de *E. histolytica*, como la adhesión, la citólisis y la fagocitosis, que intervienen para permitir la invasión (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio 2009). Sin embargo, a pesar de la caracterización de *E. dispar* como un organismo comensal no invasivo, esta especie comparte los mismos factores de virulencia, aun cuando el grado de daño pueda ser variable (Talamás-Lara y col. 2014).

## Factores de virulencia

### **Adhesión**

La adhesión es uno de los procesos más importantes en la amibiasis, ya que es una característica previa para desencadenar procesos biológicos importantes relacionados a la progresión de la enfermedad. Es el primer paso para la colonización e invasión, para lo cual, inicialmente debe provocarse una pérdida del moco (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000) debido a que la capa de mucina que recubre el epitelio del colon ejerce la función de barrera evitando la unión de *E. histolytica* a las células diana. No obstante, las mucinas son altamente glicosiladas, y por lo tanto *E. histolytica* aprovecha sus enzimas con actividad de glucosidasa, galactosidasa, manosidasa, fucosidasa, xilosidasa y N- acetil-D-galactosaminidasa, para alterar esta barrera (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000) y permitir la invasión.

La adherencia de los trofozoítos del género *Entamoeba* esta mediada por diferentes moléculas con las que el parásito cuenta, tales como enzimas proteolíticas (proteasas neutras y colagenasas) (Tanyuksel y Petri 2003), cisteínproteasas, lectinas y ameboporos. Estas moléculas contribuyen a ejercer una acción citolítica determinante para la producción de lesiones invasivas tempranas y ulceración intestinal (McCoy, Mann, y Petri 1994).

En cuanto a las lectinas involucradas en este proceso, una de las más conocidas y de importancia en este trabajo es la lectina Gal/GalNac. Mediante esta lectina se produce principalmente la adhesión del trofozoíto a la célula diana, a través de la unión a los residuos terminales Gal/GalNac de las glicoproteínas (Frederick JR 2005).

La lectina Gal/GalNac se considera una proteína multifuncional, que tiene un papel crítico e importante en la patogenicidad del parásito (Tanyuksel y Petri 2003), y se compone de tres subunidades, una subunidad pesada de 170 kDa (Hgl) codificada por una familia de cinco genes hgl (Ramakrishnan y col. 1996), una intermedia (Igl) codificada por dos genes (Kato y col. 2017) y finalmente una subunidad ligera de 31-35 kDa (Lgl) codificada por una familia de 3 genes localizados en seis loci (Ramakrishnan y col. 1996), siendo esta última, la subunidad involucrada en regular la adherencia del parásito (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000; Laughlin y Temesvari 2005; Tachibana y col. 2004). Asimismo, estudios realizados en relación con esta lectina han demostrado una actividad importante involucrada en la citotoxicidad del patógeno y en la evasión de la respuesta inmune. Además, participa en la formación de una antigenicidad cruzada al ser estructuralmente similar a CD59, el cual al unirse al componente C8 y C9 del complemento inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana (McCoy, Mann, y Petri 1994).

Por otra parte, en *E. histolytica* se han reportado proteínas con capacidad de unirse a fibronectina (FN), componente de la matriz extracelular (Talamás-Rohana y Meza 1988; Vazquez-Prado y Meza 1992). Una de ellas es una proteína de 37 kDa y la otra es una proteína de membrana de 140 kDa; esta última se reportó como una molécula con similitud antigénica con la subunidad  $\beta$  del receptor clásico para fibronectina en mamíferos, conocido como la integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Flores-Robles y col. 2003; Nagae y col. 2012; Schaffner, Ray, y Dontenwill 2013; Talamás-Rohana, Hernández--Ramírez, y Rosales-Encina 1994) A esta molécula amibiana se le denominó  $\beta 1EhFNR$  tipo integrina, y se reportó que posee un 99% de homología con la subunidad Igl1 e Igl2 de la lectina Gal/GalNac (Hernández-Ramírez y col. 2007; Sengupta y col. 2009), de modo que al inhibirse mediante un anticuerpo monoclonal específico (3C10) mostró una importante inhibición de la adhesión a proteínas de la matriz extracelular (Sengupta y col. 2001, 2009). Sin embargo, utilizando el anticuerpo

monoclonal 3C10 no fue posible identificar a esta proteína en las especies *E. invadens* y *E. dispar* (Sengupta y col. 2009).

Al comparar las lectinas Gal/GalNac de *E. histolytica* y de *E. dispar*, éstas resultan un poco parecidas entre sí (Kato y col. 2017; Tachibana y col. 2007). Sin embargo, se ha observado en el caso de *E. dispar*, la presencia de dos genes de subunidades pesadas y cuatro de subunidades ligeras (Pillai y col. 1997), a diferencia de *E. histolytica* que presenta cinco y tres genes respectivamente (Ramakrishnan y col. 1996). A pesar de ello, en experimentos “*in vitro*” *E. dispar* presenta una menor capacidad adherente y citotóxica hacia células diana comparada con la que expresa *E. histolytica* (Dodson y col. 1997; Petri y col. 1989; Tanyuksel y Petri 2003).

Otras lectinas involucradas en este proceso son la lectina de 220 KDa (Meza y col. 1987; Rosales-Encina y col. 1987; Villalobos-Gómez y col. 2018), una adhesina de 112 KDa involucrada en la adhesión de células epiteliales y eritrocitos, además de un lipofosfoglicano de superficie (Stanley, Huizenga, y Li 1992).

La baja expresión de lectinas en *E. dispar*, en comparación con *E. histolytica*, podría relacionarse con el comportamiento menos invasivo de esta especie (Kato y col. 2017).

## **Citólisis**

Una vez que se ha llevado a cabo el proceso de adhesión, se da lugar a un evento citolítico mediante la liberación de proteasas presentes en *E. histolytica* que le proporcionan la capacidad de degradar la matriz extracelular e invadir tejido. Estas proteasas son principalmente cisteín proteasas, las cuales participan activamente en la degradación de componentes de la matriz extracelular, mucina, y componentes del sistema inmune como el complemento e inmunoglobulinas (Que y Reed 2000; Serrano-Luna y col. 2013). Una de las cisteín proteasas más estudiadas es la *EhCP112*, la cual es una molécula

que posee la capacidad de romper las monocapas celulares, así como de digerir proteínas de la matriz extracelular y a la hemoglobina (Ocádiz y col. 2005).

Adicionalmente, durante este evento, y tras el contacto con la célula blanco, se secretan proteínas conocidas como ameboporos, que consisten en péptidos que se insertan en la membrana celular de células eucariotas y bacterias fagocitadas, formando canales iónicos, ocasionando la lisis celular como consecuencia del choque osmótico (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000; Nickel y col. 1999; Tanyuksel y Petri 2003). El ameboporo de *E. histolytica* es un péptido inductor de canales del cual se conoce existen tres isoformas A, B y C, que en conjunto son capaces de eliminar bacterias ingeridas dentro de vacuolas digestivas, así como la inducción de lisis celular tanto de células epiteliales como de leucocitos (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000; Leippe y col. 1994).

Con respecto a *E. dispar*, únicamente se ha identificado un péptido homólogo al ameboporo A de *E. histolytica*, el cual exhibe una menor actividad citolítica específica y se atribuye a una hélice anfipática acortada (Nickel y col. 1999).

### **Fagocitosis**

Una vez que las células blanco se han lisado parcialmente, el parásito comienza a interiorizar y digerir los restos celulares a través de la fagocitosis (Laughlin y Temesvari 2005; Mitra y col. 2005). Esta habilidad de ingerir y eliminar células blanco se ha asociado con el grado de virulencia de las amibas (Galván-Moroyoqui y col. 2008). Este es un proceso complejo, que involucra necesariamente al citoesqueleto de actina y su dinámica, así como proteínas de unión a actina (ABP), proteínas de andamiaje y activación de vías señalización en la célula (Agarwal y col. 2019; G Bailey y col. 1987; Okada y col. 2005).

Durante la invasión al epitelio intestinal, la destrucción de vasos sanguíneos promueve el sangrado típico del cuadro clínico, facilitando y promoviendo a su vez la

fagocitosis tanto de glóbulos rojos como de células del sistema inmune (Tanyuksel y Petri 2003).

Con respecto a *E. histolytica*, numerosos estudios han reportado a la fagocitosis como un factor importante para la absorción de nutrientes y virulencia (Mansuri, Bhattacharya, y Bhattacharya 2014), proceso en el cual se ha identificado a la lectina Gal/GalNac como un receptor fundamental de la célula blanco, previo a la fagocitosis (Petri, Haque, y Mann 2002). En cuanto a *E. dispar*, estudios realizados por Espinosa Cantellano y col. (1998), demostraron una fagocitosis menos evidente, situación retomada por Talamás-Lara y col., donde se reportó una diferencia en cuanto a la capacidad fagocítica entre estas dos especies, además de una diferencia significativa en la producción de especies reactivas de oxígeno notoriamente mayor en *E. histolytica* en contraste con *E. dispar* (Talamás-Lara y col. 2014). No, obstante Tsutsumi y col. demostraron que el índice de eritrofagocitosis no necesariamente es un factor que represente una correlación directa con el tamaño de los abscesos hepáticos producidos; esto observado entre distintas líneas de trofozoítos de *E. histolytica* visto en un modelo experimental (Tsutsumi y col. 1992).

Sin embargo, la capacidad de *E. dispar* para ocasionar daño intestinal en condiciones experimentales, ha indicado que algunas cepas tienen un potencial patógeno considerable cuando éstas se encuentran en presencia de bacterias; a pesar de ello, este potencial patógeno no se ha asociado con una enfermedad invasiva en el humano (Dolabella y col. 2012; Shibayama y col. 2007; Soares y col. 2019; Ximénez y col. 2010).

#### Infecciones mixtas reportadas / prevalencia

Según la organización mundial de la salud, se estima que *E. histolytica* y *E. dispar* son responsables de infectar aproximadamente al 12% de la población en el mundo (OMS, OPS 1997), formando parte de las infecciones más frecuentes, representando al 1% de las infecciones a nivel mundial (Silva-Oliveira y col. 2015).

Pese a la capacidad de realizar la distinción de *E. histolytica* mediante métodos moleculares, la prevalencia reportada en esta enfermedad continúa siendo deficiente, imprecisa y sobreestimada, debido a la presencia de la especie no patógena *E. dispar*, lo cual es resultado del empleo inapropiado de herramientas de vigilancia y diagnóstico (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000). Sin embargo, las encuestas epidemiológicas indican que la mayor parte de los individuos asintomáticos que presentan una infección por alguna de estas especies, se encuentran colonizados naturalmente por *E. dispar* (Gomes y col. 1999; Haque, Duggal, y Ali 2002), mientras que, en algunas regiones particulares, pacientes asintomáticos o con episodios diarreicos también reportan una alta incidencia de *E. histolytica* (Rojas y col. 2016). Es por esta razón que estudios epidemiológicos se han dedicado a correlacionar a estas especies y sus subpoblaciones con el conjunto de las diversas formas clínicas que pueden presentarse durante el curso de la amibiasis: infecciones causadas por *E. histolytica* sintomáticas (amibiasis intestinal o extraintestinal), o asintomáticas, infecciones asintomáticas provocadas por *E. dispar*, y finalmente, infecciones mixtas asintomáticas ocasionadas por *E. histolytica* y *E. dispar* (Silva-Oliveira y col. 2015).

En este último punto, resulta relevante hacer énfasis en la posibilidad de la presencia de ambas especies en un mismo episodio de amibiasis, ya que se sabe que la coinfección con otros patógenos intestinales es una situación que se presenta con frecuencia. Numerosos estudios han reportado el efecto sinérgico de este tipo de asociación inter-especie. Concretamente, se ha reportado la interacción entre *E. histolytica* y otros patógenos, como bacterias. Fernández-López y col., (2019) describieron un efecto sinérgico durante la infección provocada por *E. histolytica*, al encontrarse interactuado con una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*, aumentando la producción de citocinas proinflamatorias y observando la producción de lesiones graves en un modelo “*in vivo*” (Fernández-López y col. 2019). Otro ejemplo relevante en este contexto, fue reportado por Galván-Moroyoki y col. (2008), quienes reportaron un aumento en la virulencia de *E. histolytica* (cepa HMI:IMSS) debido a la presencia de enterobacterias patógenas como *Shigella dysenteriae* y *E. coli*, mostrando un aumento en su actividad de cisteín proteínasa,

así como en la expresión de la Lectina Gal/GalNac; en este punto, los autores propusieron que el contacto de las bacterias con células epiteliales, propició la susceptibilidad de éstas al daño producido por *E. histolytica* (Galván-Moroyoqui y col. 2008).

En el caso de *E. dispar*, diversos grupos de investigación han reportado la potenciación de su virulencia al interactuar con otros organismos; un ejemplo es el estudio realizado por Shibayama y col. (2007), donde se reportó el efecto patológico de una cepa de *E. dispar*, la cual se encontraba interactuando con bacterias intestinales comunes, manifestando un comportamiento patógeno, que demostró un episodio de amibiasis en un paciente brasileño sintomático no disentérico (Dolabella y col. 2012; Shibayama y col. 2007). Otro ejemplo importante, es el estudio realizado por Costa y col. (2006) donde se describió que la interacción entre *E. dispar* y *Critidia fasciculata* en un cultivo monoxénico mostró una menor virulencia de *E. dispar* en comparación con en el cultivo axénico de la misma (A. Costa y col. 2006).

Con todos estos ejemplos, es claro que las interacciones entre patógenos representan un factor crucial dentro del curso y desarrollo de la enfermedad. No obstante, a pesar de haberse registrado en numerosas ocasiones la existencia de infecciones mixtas por *E. histolytica* y *E. dispar* (Al-Hindi y col. 2005; Calegar y col. 2016; Ximénez y col. 2009, 2010), son pocos los estudios realizados en relación a este suceso; a diferencia del grupo de Pysova y col. (2009), quienes retomaron la importancia de la interacción entre las dos especies más frecuentemente reportadas en la amibiasis, resaltando la dificultad y riesgo de que una especie de *Entamoeba* supere a otra en cultivos xénicos durante el diagnóstico. Ellos examinaron la persistencia de cada especie en cocultivos “*in vitro*” conformados por diferentes aislados de *E. histolytica* y *E. dispar*, y finalmente encontraron que dentro de cultivos mixtos, *E. dispar* es capaz de superar rápidamente al número de trofozoítos de *E. histolytica*, proponiendo la posibilidad de que este evento pueda ocurrir en cultivos primarios e “*in vivo*” (Pysova y col. 2009).

Sin embargo, aún se desconoce los mecanismos celulares que se desencadenan como resultado de la interacción mixta entre *E. histolytica* y *E. dispar* y sus efectos a nivel

morfológico, sobre la expresión del receptor a FN, a la capacidad de reestructuración de actina y las consecuencias patológicas tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”.

### Absceso hepático amibiano

El absceso hepático amibiano es la complicación más frecuente y grave de la amibiasis intestinal invasiva, producida por el parásito *E. histolytica*, la cual es resultado de la invasión del hígado por amibas que ingresan a través del sistema portal (Tsutsumi y col. 1984).

La variedad de síntomas clínicos presentados durante la formación del absceso hepático amibiano incluyen pérdida de peso, fiebre, dolor abdominal en el cuadrante superior derecho y hepatomegalia. El diagnóstico se basa en estos síntomas principalmente, además del empleo de imágenes radiológicas y la serología como material de apoyo. Sin embargo, la confirmación de dicho diagnóstico es posible a través de la detección por PCR del ADN de *E. histolytica*, presente en el líquido del absceso obtenido mediante punción (Zurauskas y McBride 2001).

No obstante, el uso de modelos roedores ha sido fundamental para entender la patogenia del absceso hepático amibiano, así como el impacto de distintas moléculas y mecanismos ejercidos por el parásito en el humano (Campos-Rodríguez y col. 2016).

El modelo animal que se ha usado ampliamente para el estudio de esta enfermedad es el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), ya que éste es capaz de presentar una necrosis similar a la observada en abscesos hepáticos amibianos en el humano. En este modelo ha sido posible reportar tres fases consecutivas durante la infección: la inflamación aguda, la formación de granulomas y la necrosis que progresa gradualmente (Tsutsumi y col. 1984).

Las lesiones observadas durante dicha amibiasis extraintestinal, son provocadas por el daño que causan los productos que secretan los trofozoítos y subsecuentemente, los

productos liberados a través de la respuesta inmune inflamatoria (Campos-Rodríguez y col. 2016; Costa C, Brito y Gomes 2010; C. Costa y col. 2010).

Se tiene un amplio conocimiento acerca de la importancia de los factores de virulencia durante una infección amibiana y la invasión extraintestinal, sin embargo, diversos grupos de trabajo han sugerido el papel fundamental de la respuesta inmune del huésped en la producción de lesiones, particularmente se ha reportado que la lisis masiva de neutrófilos provocada por amibas agudiza el daño tisular (Olivos-García y col. 2004; Tsutsumi y col. 1984), así como las lesiones del huésped que son provocadas principalmente por la respuesta inmune durante la fase aguda y crónica del absceso hepático amibiano (Olivos-García y col. 2004).

Durante el contacto con neutrófilos, los receptores de lectina son capaces de promover la expresión de receptor para el fragmento iC3b del complemento, cuya interacción con este provoca la desgranulación de los neutrófilos, los cuales pueden activarse al encontrarse con la molécula de lipopéptidofosfoglicano proveniente de *E. histolytica*, y una vez activados experimentar un aumento en la expresión de superóxido ( $O_2^-$ ), debido al estallido oxidativo; aunado a este suceso se presenta un aumento de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), aumentando la concentración de óxido nítrico en el entorno. También la enzima superóxido dismutasa (SOD) metaboliza el  $O_2^-$  para la producción de un agente oxidante, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), empleado para producir ácido hipocloroso (HOCl) mediante la enzima mieloperoxidasa (MPO). Todas estas sustancias liberadas durante la reacción inflamatoria, propician la formación de lesiones en el huésped (Campos-Rodríguez y col. 2016) (Figura 1).

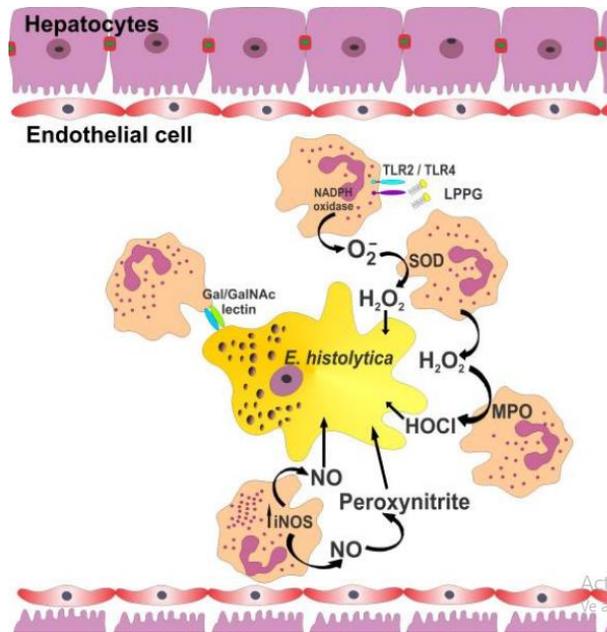


Figura 1. Interacción entre *E. histolytica* y neutrófilos. Tomado de Campos-Rodríguez y col. 2016

Adicionalmente, algunos grupos de investigación cuyos estudios se realizaron en modelos animales, han destacado la importancia de la respuesta inmune innata, al reportar la eliminación de amibas virulentas a pocas horas de ser inoculadas, lo cual se atribuye sobre todo, a la resistencia a la invasión propiciada por una respuesta inmune innata eficaz (Tsutsumi y Shibayama 2006).

En consecuencia, la formación de abscesos hepáticos parecen ser el resultado de la reacción inflamatoria fundamentalmente inducida por el sistema inmune sin prescindir de las moléculas liberadas por los trofozoítos durante la invasión (Campos-Rodríguez y col. 2016).

### Citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura celular tridimensional necesaria para todas las células eucariotas. Se compone de diversas proteínas que ocupan el espacio citoplasmático

y cumple la función de dar forma, soporte, dinámica y capacidad de movimiento a las células. Fundamentalmente está constituido por tres tipos de filamentos: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos (Figura 2). Los microtúbulos se encuentran organizados de manera individual en forma de cilindros huecos y están constituidos por subunidades de tubulina. Estas estructuras se encuentran unidas a un centro organizador de microtúbulos (centrosoma) o distribuidos en el citoplasma, desempeñando diferentes funciones como el transporte, formar parte de cilios y flagelos y en la participación distintiva durante la división celular (Alberts y col. 2009). Hasta la fecha, no se han visualizado microtúbulos citoplasmáticos en *E. histolytica*, sin embargo, sí se han caracterizado dentro del núcleo en el proceso de división utilizando varias técnicas de microscopía (Arguello C, Valenzuela B 1992).

Los filamentos intermedios por lo general tienen un diámetro de 10 nm y se forman por subunidades de proteínas, que varían según el tejido en el que se localicen. Existen varios tipos de filamentos intermedios como los de queratina, los neurofilamentos y los filamentos de vimentina (Alberts y col. 2014) A pesar de ser un elemento fundamental en el citoesqueleto eucariótico, este tipo de filamentos intermedios no se han encontrado en *E. histolytica*.

Los microfilamentos son polímeros lineales de actina que en conjunto con un gran número de proteínas asociadas y de unión a actina constituyen el citoesqueleto de actina. Estas estructuras flexibles de 5-9 nm de diámetro se encuentran organizadas en haces o redes de filamentos por dentro de la membrana plasmática en el citoplasma, o en la porción citoplásmica de las uniones celulares. Sus funciones son proporcionar movimiento, forma, estructura y división a la célula (Alberts y col. 2009).

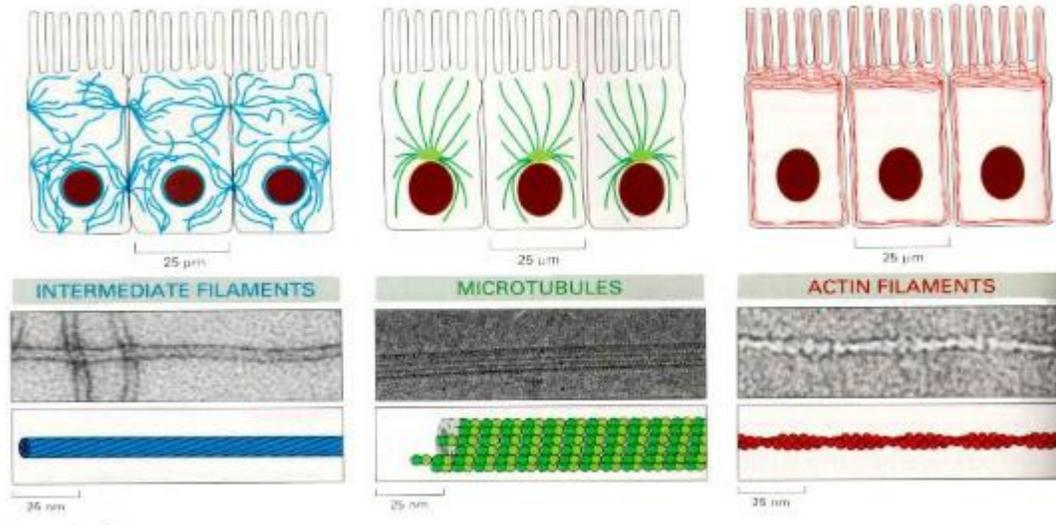


Figura 2. Tipos de filamentos en el citoesqueleto. Tomado de Alberts y col., 2014

## Actina

La actina es una proteína polimerizante de filamentos citoesqueléticos conocida por su función en la producción de fuerzas que impulsan las protuberancias de la membrana celular en el borde de las células, como lamelopodios y filopodios (Blanchoin y col. 2013; Fujiwara y col. 2018).

Es la proteína más abundante en todos los tipos celulares y se encuentra altamente conservada en la escala evolutiva (Sheterline, Clayton, y Sparrow 1995). Está compuesta de 375 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 43 kDa y constituye alrededor del 15% de las proteínas totales en las células eucariotas (Sutherland 1995). La restructuración de filamentos de actina induce la locomoción lenta en células eucariotas, el cual es característico de amibas y las células animales (Pollard y Cooper 2009).

Existen dos tipos de actina, la actina globular (actina-G) y la actina filamentosa (actina-F) la cual es la forma polimérica de la actina-G. La actina se autorregula cuando los niveles de actina-G son bajos debido a la formación de actina dimérica (Lyubimova y Bershadsky 1997).

Para que pueda llevarse a cabo la polimerización de la actina-G se necesitan diversas condiciones como temperatura, presión, proteínas de unión a actina (ABP, por sus siglas en inglés), concentración de sales, concentración de actina-G, ATP y ADP, entre otras, polimerizándose espontáneamente en filamentos largos y estables con una disposición de subunidades en una única hélice helicoidal de doble cadena con giro dextrógiro (actina-F), que se constituye de 13 monómeros de actina-G por cada 6 vueltas, con un ángulo de rotación de 166°; y esta estructura se repite con exactitud por cada 6 vueltas (Dominguez y Holmes, 2011).

Durante el inicio de la polimerización, esta se suscita lentamente, debido a la estabilidad de los oligómeros pequeños (Pollard y Cooper 2009), sin embargo, este proceso se acelera una vez formados los filamentos; la molécula de actina se estructura en dos dominios principales, interno y externo, y dentro de éstos se encuentra situada una molécula de ATP, la cual probablemente se hidroliza debido a un reordenamiento en la estructura que ocurre alrededor del nucleótido provocado por un cambio conformacional de actina-G a actina-F (Fujiwara y col. 2018; Manich y col. 2018).

Igualmente, el monómero de actina se divide en 4 subdominios, este polipéptido se enrolla a si mismo desde el extremo amino en el subdominio 1 hasta el 2, 3 y 4 y nuevamente en el extremo carboxilo al subdominio 1 (Dominguez y Holmes, 2011) (Figura 3).

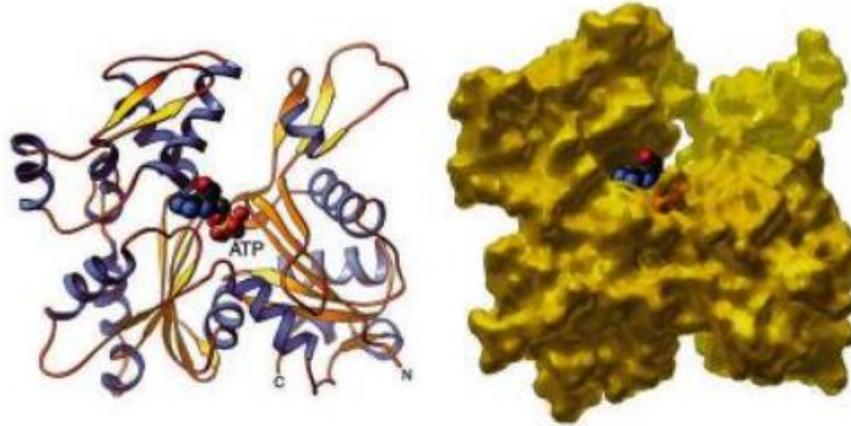


Figura 3. Molécula de actina. Tomado de Pollard y Earnshaw., Cell Biology, WB Saunders, 2007.

Los filamentos de actina son polímeros polares que, debido a su estructura, cuentan con dos extremos dinámicamente distintos conocidos como extremos barbados y extremos puntiagudos. Dentro del filamento de actina el extremo barbado es el que cuenta con más dinámica y puede alargarse 10 veces más rápido que el extremo puntiagudo. Considerando que las concentraciones de monómeros celulares pueden llegar a 300  $\mu\text{M}$ , los extremos barbados pueden llegar a ensamblarse con una velocidad de 3,000 subunidades / s, (Blanchoin y col. 2013).

La etapa de nucleación limita termodinámicamente la cinética de los filamentos de actina, en cuanto son formados los trímeros, estos se prolongan en función de la cantidad disponible de monómeros de actina y la polimerización de ellos que se lleva a cabo en los extremos del filamento es sucesiva a la hidrólisis del ATP y a la disociación de fosfato. Esta molécula de ATP se encuentra unida a las subunidades de actina en el interior de los filamentos. Asimismo, los monómeros de actina pueden unirse a cationes divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ) y dependiendo del catión que se una puede afectarse la dinámica de polimerización. En condiciones fisiológicas, los monómeros de actina están cargados con Mg-ATP (Blanchoin y col. 2013) (Figura 4).

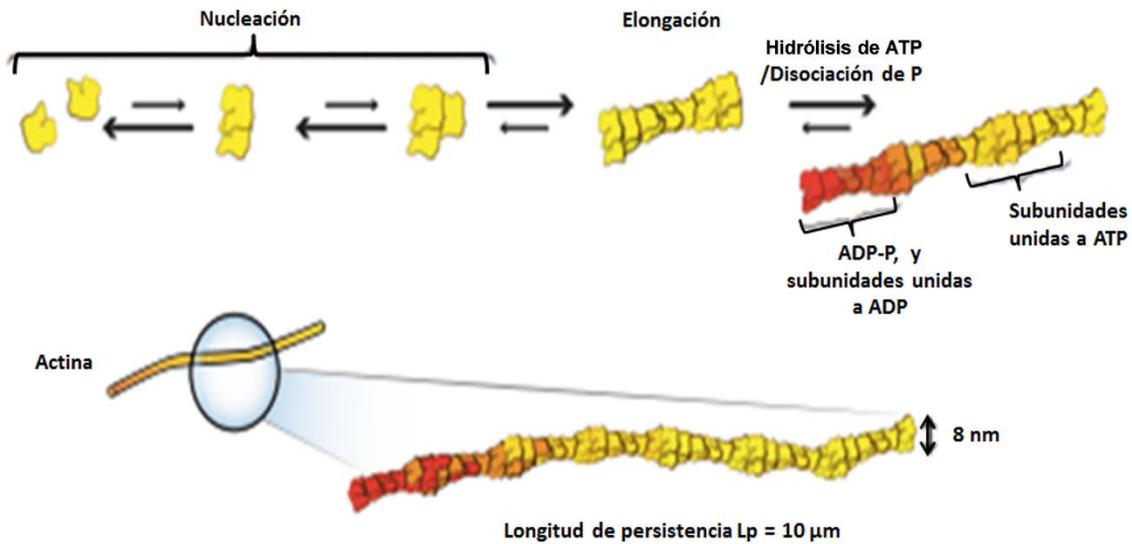


Figura 4. Elongación de filamentos de actina. Tomado de Fujiwara y col. 2018

Los filamentos de actina son polímeros semiflexibles que, en conjunto con miosina, tienen la capacidad de actuar como amortiguadores de choque, ejerciendo o resistiendo a alguna fuerza en su ambiente celular, con el propósito de modular sus propiedades mecánicas.

Dichos filamentos pueden organizarse en diferentes estructuras que originan una variedad de redes celulares y haces paralelos en lamelopodios y filopodios respectivamente o hasta estructuras antiparalelas como fibras contráctiles (Blanchoin y col., 2013) (Figura 5).

Con el propósito de adaptarse a su entorno, todas las células tienen la capacidad de moverse a través de espacios pequeños, llevar a cabo la endocitosis, exocitosis y dividirse. Para que todos estos cambios puedan ocurrir, las células tienen la capacidad de ensamblar distintas proteínas como actina y ABP que dan origen a filamentos de diferentes tipos (Fujiwara y col. 2018).

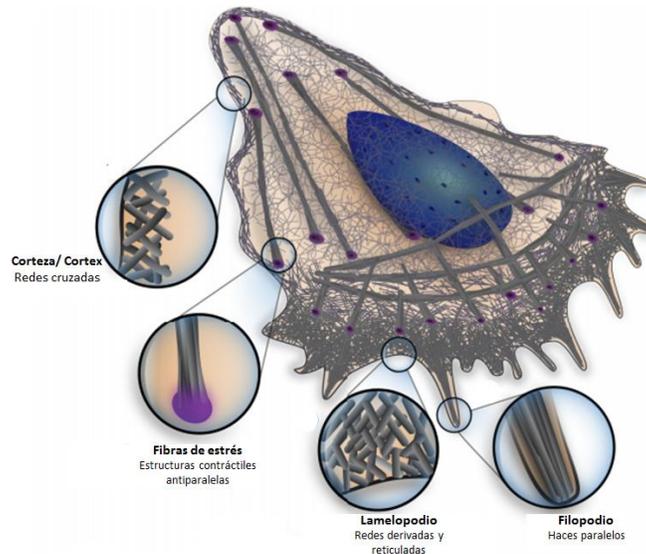


Figura 5. Diferentes estructuras producidas por filamentos de actina. Tomado de Blanchoin y col., 2013.

#### Citoesqueleto de actina de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

La movilidad de *E. histolytica* depende del citoesqueleto, el cual está conformado principalmente por actina. Se ha observado esta proteína concentrada no solo por debajo de la membrana plasmática, sino también en estructuras especializadas como pseudópodos, bocas fagocíticas y asociada a varias proteínas de unión a actina (miosina IB, profilina, paxilina  $\alpha$ -actinina y ARP2/3) (Talamás-Lara y col. 2020). La movilidad de este parásito involucra tres procesos: a) extensión de pseudópodos, b) unión a la superficie mediante una placa adhesiva (principalmente a fibronectina) y c) desplazamiento del resto de la célula hacia la superficie (Tanyuksel y Petri 2003).

La primera vez que la actina fue reconocida en trofozoítos de *E. histolytica* fue mediante inmunofluorescencia a través del empleo de anticuerpos heterólogos formulados contra actina de músculo esquelético (Humano y conejo) (Aus Kettis y Lindman 1977; Sabanero 1982; Meza y col., 1983). Uno de los primeros grupos en aislar y caracterizar la actina de *E. histolytica* fue el de Meza y cols., quienes decoraron filamentos de actina

mediante meromiosina pesada, que se une a falotoxina para inducir actividad ATPasa de miosina de forma similar a la producida por la actina del músculo esquelético de conejo, sin embargo, esta actina en particular no mostró una afinidad por DNasa I (Meza y col., 1983). Más tarde, Vázquez y col., (1995) reportaron el uso de Faloidina rodamina, como un marcador específico para actina polimerizada (Vázquez y col., 1995) el cual resultó de gran utilidad para identificar la formación de estructuras especializadas en el citoesqueleto de trofozoítos cultivados (Bailey y col. 1987; Bailey 1992), ya que la síntesis de actina está vinculada con los cambios de forma de las células, el metabolismo y las respuestas a las señales externas. Desde 1985, se demostró que la interacción de los trofozoítos de *E. histolytica* con las células blanco lograba una rápida polimerización de la actina en sitios de contacto. Sin embargo, la actina polimerizada en *E. histolytica* sólo se había mostrado como un acúmulo en un extremo del trofozoíto (Sabanero y Meza 1982). No fue hasta que se utilizó el modelo de interacción de los trofozoítos con la fibronectina, una proteína de matriz extracelular, que se demostró la formación de filamentos de actina y otras estructuras en estas células (Talamas-Rohana y Rios 2000) Así mismo, la interacción con fibronectina conduce a la secreción de proteasas que degradan este sustrato, e inducen el reordenamiento de la actina del parásito en "placas de adhesión" (Talamás-Rohana y Meza 1988). Talamás-Lara y col., (2015) demostraron mediante Western blot que *E. dispar* posee una mayor cantidad de actina-G en la fracción soluble y actina-F en la fracción insoluble en comparación con *E. histolytica*.

La organización del citoesqueleto de actina se encuentra regulada por el ensamble y desensamble de los filamentos de actina, incitada por estímulos externos, como la adhesión a la matriz extracelular o a las células vecinas, o bien por factores de crecimiento y citocinas. Los cambios rápidos en la estructura de microfilamentos en respuesta a tales estímulos son posibles debido a una gran cantidad de actina no polimerizada que coexiste en la célula con la actina polimerizada (Meza, 2000).

Finalmente, estudios recientes reportan diferencias morfológicas importantes durante el cultivo "*in vitro*" de *E. histolytica* y *E. dispar*, ya que se ha demostrado la formación visible de diferentes estructuras especializadas en cada una de ellas; las cuales

guardan una relación especie específica. La más relevante entre éstas, es la formación de lamelopodios en *E. histolytica* y numerosos filopodios en cultivos confluentes de *E. dispar* lo cual es concordante con el patrón de polimerización de actina cortical en esta especie (Pérez-González 2020; Talamás-Lara y col. 2020).

### JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La amibiasis es la tercera causa de muerte por parasitosis a nivel mundial después de la malaria y la esquistosomiasis, por lo cual, esta enfermedad resulta relevante desde el punto de vista de la salud pública. A la fecha el diagnóstico para la amibiasis es complicado debido a la presencia de dos entidades del género *Entamoeba*, que se caracterizan por alojarse en el colon, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. A pesar de que éstas se encuentran interactuando en el intestino, y que pueden ser causantes de episodios amibianos sintomáticos, aún se desconoce la relación inter-especie que presentan entre ellas. Por lo tanto, un estudio detallado de los eventos estructurales y consecuencias patológicas resultado de la interacción entre ambas especies ayudará a comprender mejor la patogénesis de la amibiasis.

### HIPÓTESIS

La presencia de *E. histolytica* y *E. dispar* dentro de un mismo ambiente en el que ambas puedan coexistir, provoca una alteración en su morfología, así como un aumento en la virulencia al ser inoculadas en un modelo “*in vivo*”.

### OBJETIVOS

#### *General*

Observar los cambios morfológicos en la interacción entre *E. histolytica* y *E. dispar* y analizar la formación del absceso hepático.

#### *Particulares*

1. Analizar el efecto de la interacción entre *E. histolytica* y *E. dispar* a nivel morfológico.
2. Realizar un análisis bioinformático comparativo de la lectina Gal/GalNAc presente en *E. histolytica* y *E. dispar*.
3. Analizar la formación del absceso hepático producido por la interacción entre *E. histolytica* y *E. dispar*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis bioinformático de la proteína de 140 kDa receptor a fibronectina (lectina Gal/GalNAc).

Se utilizaron distintas bases de datos (KEGG, NCBI, EuPathDB, AmoebaDB) para la obtención de secuencias de la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* y *E. dispar*. Posteriormente se realizó la obtención de función molecular el servidor Uniprot, para el análisis de la vía de interacción molecular, se buscaron las proteínas de ambas especies en el servidor KEGG. La predicción de estructuras terciarias se realizó mediante el servidor RaptorX y USCF Chimera, y para la comparación de éstas se empleó el software USCF Chimera, a partir de estructuras obtenidas en formato PDB.

Las secuencias obtenidas de *E. histolytica* y *E. dispar* fueron alineadas mediante los programas Muscle y Needle. Asimismo, finalmente, la predicción de los interactomas se realizó mediante el servidor STRING 2.0.

#### Cultivo de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

Trofozoítos de *E. histolytica* (cepa HM1: IMSS) y de *E. dispar* (cepa SAW 760 RR clona A) en fase logarítmica de crecimiento, se cultivaron en condiciones axénicas a 37 °C durante 3 días en tubos de borosilicato estériles de 16 x 125 mm, conteniendo medio TYI-S-33 para *E. histolytica*, LYI para *E. dispar* y medio TYI-S-33/LYI (50:50) para cultivos en interacción, suplementado con 10% de suero bovino adulto previamente inactivado por calor a 56 °C durante 30 min, 2% de la mezcla de vitaminas de Diamond y 1% de penicilina y estreptomina.

## Estandarización de medio de cultivo adecuado y curva de crecimiento

Se analizó el crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* empleando 100,000 amibas como inóculo inicial. Los cultivos se realizaron con medio LYI y la mezcla 50:50 de medio TYI/LYI por duplicado.

Posteriormente se monitoreó el crecimiento a las 24, 48 y 72 h por conteos en cámara de Neubauer para determinar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento óptimo de la interacción de ambas especies para posteriormente llevar a cabo los siguientes experimentos.

## Cultivo de trofozoítos de la interacción de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

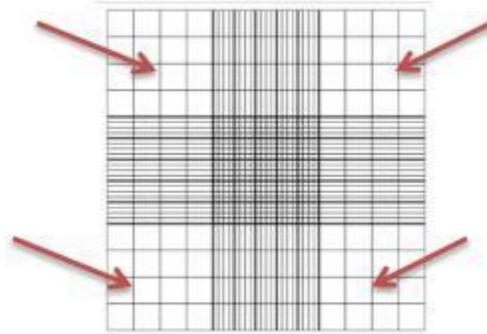
Se tomaron 50,000 trofozoítos de *E. histolytica* y de *E. dispar* en fase logarítmica de crecimiento, los cuales se cultivaron juntos con un inóculo inicial de 100,000 mil trofozoítos totales en medio TYI/LYI (50:50), en las mismas condiciones antes mencionadas.

## Cuantificación de amibas en cámara de Neubauer

Las amibas se recolectaron de los tubos de cultivo y se incubaron en hielo durante 5 min, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en la cantidad necesaria de medio de cultivo sin suero para obtener la cantidad de trofozoítos deseados por mililitro. Se colocaron 10  $\mu$ l de esta suspensión en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo del número de células en los cuatro cuadrantes ubicados en las esquinas, se obtuvo un promedio, se multiplicó por 10,000 (factor de dilución de la cámara) y por el volumen del tubo en donde crecieron las amibas.

$$\frac{X+X+X+X}{4} = \bar{X}$$

$$\bar{X} \times 10,000 \times \text{volumen de medio en tubo} = \# \text{ de Amibas}$$



### Procesamiento de cubreobjetos y cajas Petri

Los cubreobjetos y cajas Petri se lavaron con agua y jabón para eliminar cualquier residuo de grasa que pudiera interferir en la observación. Una vez secos y limpios se colocaron en cajas Petri de 3.5 cm. Los cubreobjetos y cajas Petri se secaron y se esterilizaron por irradiación con luz ultravioleta durante toda la noche y se almacenaron a 4 °C.

### Purificación de fibronectina

La fibronectina fue purificada tomando inicialmente plasma humano fresco (en 5% de EDTA) mediante el método de cromatografía de afinidad con gelatina-sepharosa (Ruoslahti y col. 1982). El plasma se diluyó en urea 4 M y se dializó contra NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.05 M pH 7.4. La concentración de la fibronectina fue determinada empleando el coeficiente de extinción de 1.28 mg/ml cm, a 280 nm. Finalmente se almacenó a 4 °C hasta su uso.

## Procesamiento de cubreobjetos con fibronectina

Los cubreobjetos se lavaron con agua y jabón para eliminar residuos de grasa que pudieran afectar la observación. Una vez secos y limpios se colocaron en cajas de Petri de 3.5 cm. A los cubreobjetos que llevarían el sustrato biológico, se les agregaron 100 µg de fibronectina. Se secaron al aire, y se esterilizaron por irradiación mediante luz ultravioleta durante toda la noche.

## Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido

Trofozoítos previamente adheridos (en cubreobjetos limpios y estériles conteniendo 300 mil trofozoítos para cada una de las especies de amibas y para la interacción) se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 h. Después de lavar con el mismo amortiguador, la muestra se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100 %) por 10 min cada una. Las muestras se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub> y se metalizaron con oro para cubrirlas. Finalmente se realizó la observación en el microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-7100-F).

Se observaron un total de 300 amibas en cada condición cuantificando el número de estructuras (filopodios y lamelopodios) observadas en ellas. Finalmente, estas fueron empleadas para obtener un porcentaje de presencia de cada estructura tomando como 100% el número total de amibas analizadas (300).

## Inmunofluorescencia

### *Vybrant Dio*

Únicamente trofozoítos de *E. dispar* (para ser diferenciados de *E. histolytica*) se resuspendieron a una densidad de  $1 \times 10^6$  / ml en el medio de cultivo sin suero y

posteriormente se añadieron 5  $\mu$ l de la solución de marcaje de células Vybrant Dio cell labeling (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, V22886, EEUU), pipeteando suavemente, la suspensión se incubó durante 25 minutos a 37 °C; pasado este tiempo el tubo eppendorf se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas suavemente en medio atemperado (37 °C), se repitió dos veces más el lavado con medio para eliminar los residuos de la solución de marcaje que no se incorporó a las células. Una vez marcados los trofozoítos de *E. dispar*, se utilizaron para ser mezclados con trofozoítos de *E. histolytica* y poder diferenciar, por inmunofluorescencia, a las dos especies durante la interacción.

#### *Anticuerpo monoclonal 3C10*

La tinción de inmunofluorescencia se realizó en  $3 \times 10^5$  trofozoítos para cada una de las especies e interacción. Posteriormente las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución buffer de fosfatos (PBS) durante 1 hora a 37 °C. Una vez fijados, la muestra se lavó tres veces con PBS. Posteriormente se bloqueó con suero bovino al 10% en PBS durante 1 hora (37 °C), y se lavó tres veces más con PBS. Las muestras se incubaron con 1.5  $\mu$ g / ml de anticuerpo monoclonal 3C10 en PBS durante 1 h a 37 °C. Después del lavado, las células se incubaron con IgG de cabra anti IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 647 (1:100, Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, EEUU) durante 1 hora a temperatura ambiente.

#### *Re-estructuración de actina.*

Previamente fijados los trofozoítos y posterior al marcaje con Dio cell labeling y 3C10, se añadieron 50  $\mu$ l de faloidina rodaminada (No.Cat. R415, Invitrogen, dilución 1:50) durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda, y enseguida se lavaron tres veces con PBS. Adicionalmente se añadieron 100  $\mu$ l de Hoechst (dilución 1:1000) durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Las muestras se montaron en portaobjetos con 10 µl de Vecta Shield (Vector Laboratories, EE. UU.), y se sellaron los bordes con barniz transparente para preservar la humedad de la muestra. Las preparaciones se guardaron a -20 °C bajo protección de luz hasta llevar las muestras al microscopio confocal ZEISS LSM 700.

#### Determinación de la intensidad de fluorescencia

El procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía confocal para medir la intensidad de fluorescencia, fue realizado empleando el software Zen Blue Edition, utilizando una imagen de foco extendido que vincula un conjunto de imágenes obtenidas en los diferentes cortes ópticos. Para ello se delimitaron 300 amibas de cada grupo de estudio para cuantificar la intensidad de fluorescencia del anticuerpo 3C10, Vybrant Dio Cell, y la actina polimerizada. Finalmente fueron recopilados los datos para realizar el análisis estadístico (ANOVA de una vía  $P=0.05$ ).

#### Análisis y monitoreo de formación de absceso hepático producido por la inoculación/interacción de *E. dispar* y *E. histolytica* en un modelo “*in vivo*”

Se realizaron experimentos con animales proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL-CINVESTAV) siguiendo las especificaciones de la Norma Nacional Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) versión de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 2011. Se utilizaron cuatro grupos de 5 hámsteres machos *Mesocricetus auratus* de 60 días de edad, con un peso entre 80-100 g con previo ayuno de un mínimo de 12 horas para su utilización.

La inoculación de los trofozoítos de *E. histolytica* y de *E. dispar* ( $1 \times 10^6$ ), y de *E. histolytica/E. dispar* ( $5 \times 10^5$  de cada especie) colectados en fase logarítmica y resuspendidos en medio fresco sin suero, se realizó en el lóbulo hepático izquierdo. Todos los protocolos

experimentales se realizaron de acuerdo con las pautas para el uso humano de animales de laboratorio aprobados por autoridades locales.

La eutanasia y extracción del órgano fue realizada a los 7 días post-inoculación; una vez extraído, tanto el órgano como la sección de lesión fueron pesados para obtener el porcentaje de lesión.

### Análisis histopatológico

Siete días posteriores a la inoculación, los cuatro grupos de animales fueron sacrificados por medio de la inyección intraperitoneal de Pentobarbital/PBS pH 7 (dil 1:10). Posterior a ello, se procedió a remover el hígado, con previa punción cardiaca para extracción de sangre. Los lóbulos izquierdos de los hígados fueron fijados en 10% de formaldehído amortiguado pH 7.2. Después de procesar en alcohol y xileno, fragmentos representativas del tejido fueron incluidas en parafina, y se obtuvieron cortes de 4  $\mu$ m de espesor para ser procesadas por la técnica de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) (Fernández-López y col. 2019; Tsutsumi y Shibayama 2006).

### Análisis estadísticos

Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 20 para los análisis estadísticos: t- student, ANOVA de un factor, tuckey, tamhame, utilizando un valor de significancia de 0.05 para todas ellas.

### RESULTADOS

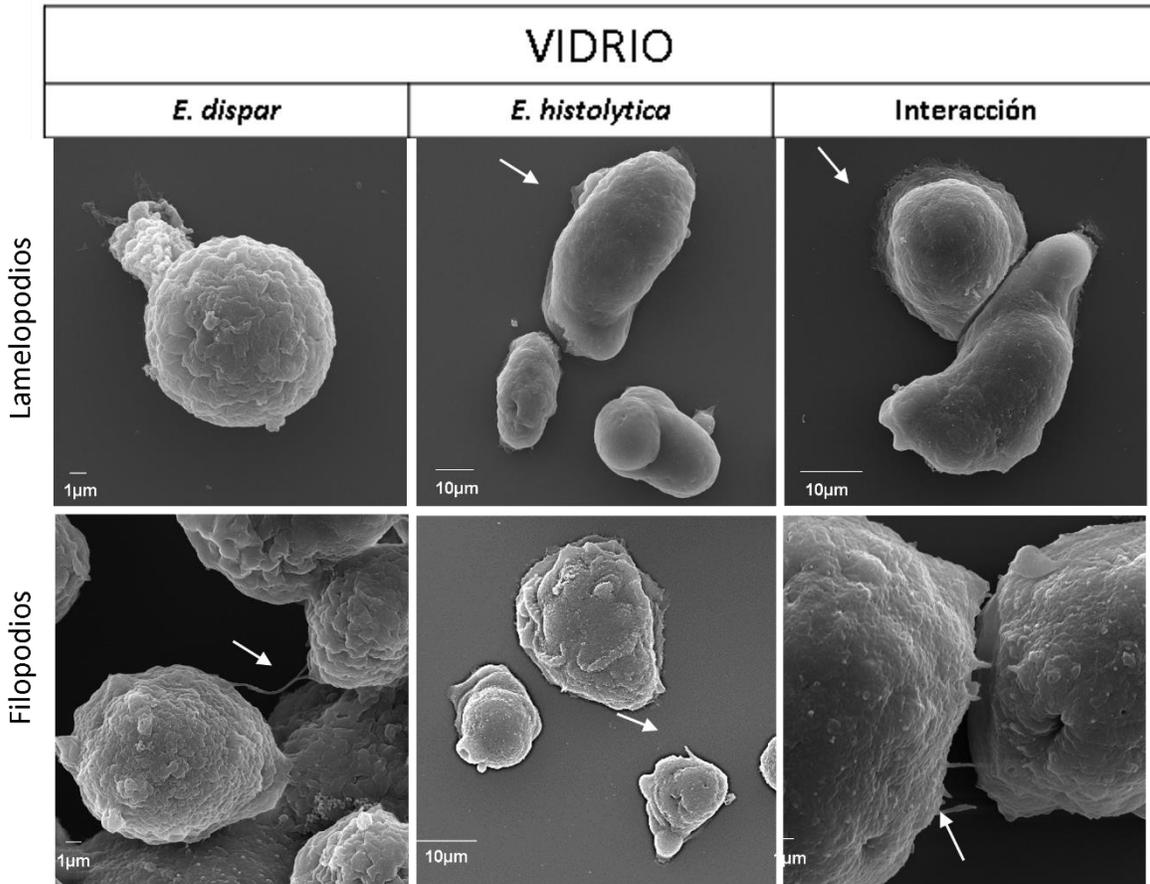
#### Diferencias en la formación de estructuras especializadas entre especies

Para el monitoreo de la morfología ocasionada por la interacción entre *E. histolytica* y *E. dispar* a nivel estructural, se realizó la cuantificación de estructuras por grupos de aproximadamente 200 trofozoítos por condición, para analizar el patrón de formación diferencial de cada especie. Se tomaron en cuenta dos estructuras: lamelopodios y filopodios (señalados con flechas).

Una vez realizada esta cuantificación, los valores obtenidos de cada grupo fueron representados mediante porcentaje tanto en condiciones de vidrio como en fibronectina. Los datos y las imágenes observadas se muestran en las Figuras 6 y 7.

Los valores obtenidos para cada uno de los grupos se muestran a continuación en la Figura 8.

**A**



**B**

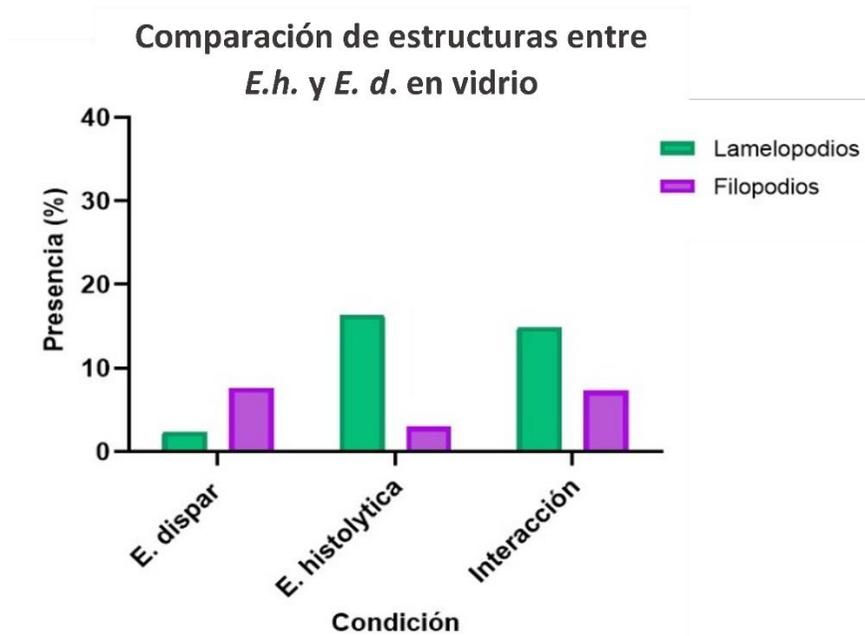
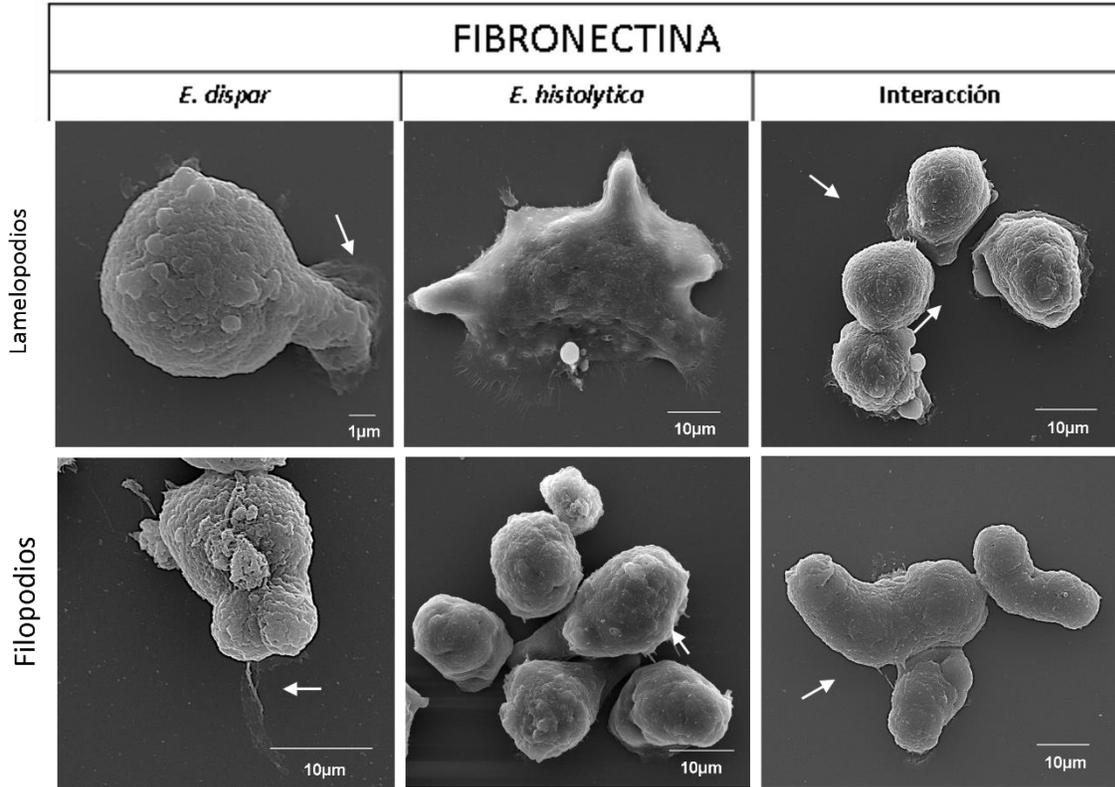


Figura 6. (A) Ejemplos de estructuras de interés observadas en cada grupo en condiciones de vidrio. (B) Comparación de la frecuencia de cada estructura observada por grupo.

**A**



**B**

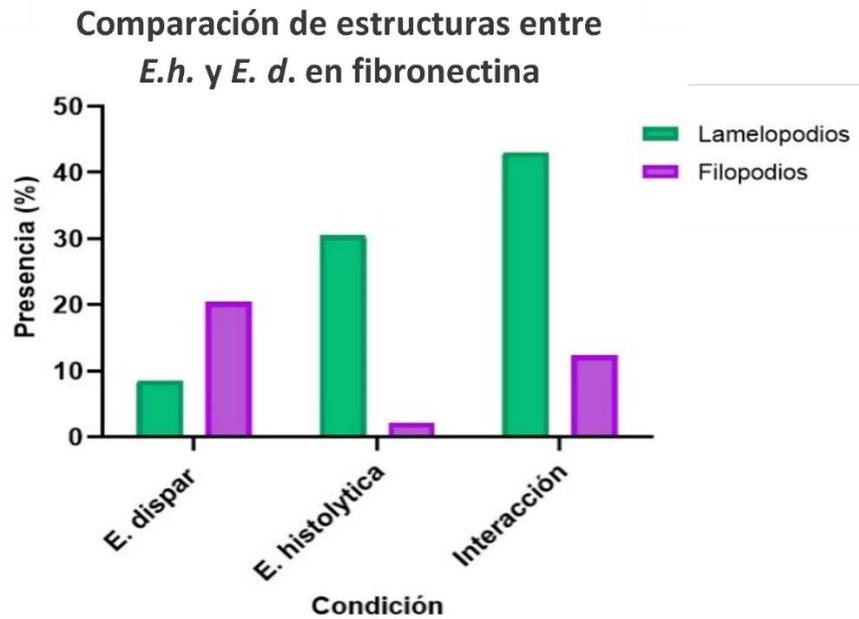


Figura 7. (A) Ejemplos de estructuras de interés observadas en cada grupo en condiciones de fibronectina. (B) Comparación de la frecuencia de cada estructura observada por grupo

VIDRIO			FIBRONECTINA		
	Lamelopodios	Filopodios		Lamelopodios	Filopodios
<i>E. histolytica</i>	16.34%	2.94%	<i>E. histolytica</i>	30.5%	2.1%
<i>E. dispar</i>	2.35%	7.64%	<i>E. dispar</i>	8.47%	20.33%
Interacción	14.9%	7.28%	Interacción	43%	12.33%

Figura 8. Porcentajes de la cuantificación de filopodios y lamelopodios presentes en los grupos *E. histolytica*, *E. dispar* e Interacción en condiciones de vidrio y fibronectina; el porcentaje representa el número de trofozoítos que presentan la estructura con respecto al total. N=200.

Evaluación de la expresión de anticuerpo 3C10 en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*.

Trabajos previos han reportado la importancia del proceso de adhesión en la amibiasis durante la invasión, evento en el que se encuentran involucradas diversas lectinas; entre ellas, la lectina Gal/GalNac (Petri, Haque, y Mann 2002), la cual se compone de tres subunidades: Hgl, Lgl e Igl. Esta última subunidad está identificada como el receptor a fibronectina tipo integrina  $\beta 1$  en *E. histolytica* ( $\beta 1EhFNR$ ), receptor no reconocido en las especies *E. dispar*, *E. invadens* y *Laredo* (Sengupta y col. 2009).

Tomando en cuenta esta información, se decidió emplear el anticuerpo monoclonal 3C10 específico para este receptor (Sengupta y col. 2009), con el fin de observar la presencia/ausencia de este componente en *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente así como en la interacción.

Adicionalmente, se realizó un marcaje celular con la solución Vybrant Dio Cell, únicamente en trofozoítos de *E. dispar* y previo a la interacción con *E. histolytica*, a fin de diferenciar los trofozoítos de cada especie una vez realizada la interacción. Este mismo proceso fue realizado únicamente en trofozoítos de *E. dispar* que posteriormente serían empleados en muestras en contacto con fibronectina.

Finalmente se realizó un análisis cuantitativo del promedio de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la presencia del anticuerpo 3C10 emitida por pixel de 300 trofozoítos de cada grupo mediante el software Zen Blue Edition.

Los resultados mostraron una clara luminiscencia del receptor a fibronectina en el caso de *E. histolytica* (color blanco), y una marca menos abundante en *E. dispar*. Particularmente dentro del grupo de interacción se observó una población con marca homogénea del anticuerpo 3C10 en todos los trofozoítos observados, incluyendo trofozoítos marcados con la solución de tinte Vybrant Dio Cell, correspondientes a la especie *E. dispar* (Figura 9A; Flechas blancas). Dicho marcaje fue observado tanto en la membrana celular de los trofozoítos, como en vesículas en el interior de éstos (color verde).

Así mismo, en las muestras que fueron tratadas con fibronectina, se observó el mismo fenómeno. En el grupo control de *E. histolytica* se observó un marcaje visible del anticuerpo 3C10 observado en la membrana plasmática de cada uno de los trofozoítos, así como en vesículas bien delimitadas por este anticuerpo, observadas dentro del citoplasma; La intensidad de la marca fue más evidente en presencia de FN en comparación con la condición de vidrio.

Caso contrario con el grupo control de *E. dispar*, el cual mostró una presencia difusa del anticuerpo 3C10 a pesar de encontrarse en contacto con el sustrato antes mencionado. Adicionalmente, en el grupo de interacción en contacto con fibronectina fue apreciada la presencia del marcaje del receptor a Fibronectina tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de todos los trofozoítos observados en el campo, incluyendo trofozoítos marcados con el reactivo Vybrant Dio cell (color verde) correspondientes a *E. dispar*, que además de mostrar una notable presencia del receptor a fibronectina (color blanco), también se observaron con un incremento de tamaño incluso más que algunos trofozoítos de *E. histolytica* (Figura 9B; flechas blancas).

Asimismo, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la marca del anticuerpo 3C10 (dirigido al receptor a fibronectina) en donde se reportó una evidente diferencia de la expresión entre los tres grupos de estudio

en condiciones de vidrio; obteniendo una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) en la expresión del receptor a fibronectina en el grupo de *E. dispar* con respecto a los grupos *E. histolytica* e Interacción; asimismo también se observó diferencia significativa entre estos dos últimos grupos ( $P < 0.001$ ), siendo el grupo control de *E. histolytica* el que presentó una cuantificación más alta de la presencia de este receptor, no obstante se sugiere que el grupo de interacción alcanzó una homogeneidad de intensidad de fluorescencia para llegar a un equilibrio en la expresión de este receptor en ambas especies. (Figura 10A).

Dentro de la cuantificación realizada a los grupos de estudio en la condición de fibronectina, nuevamente se reportó una mayor intensidad en el grupo control *E. histolytica* en comparación con los otros grupos, no obstante, el grupo de interacción reportó un notable aumento en la cuantificación de la presencia de este receptor en contraste con la condición de vidrio, debido a que los niveles de intensidad de fluorescencia se reportaron casi tan altos con lo reportado por el grupo control *E. histolytica* siendo tal que entre estos dos grupos no se reportó una diferencia estadísticamente significativa (condición fibronectina); Figura 10B.

#### Reestructuración de actina entre especies

Trabajos previos en nuestro laboratorio han reportado que la adhesión de trofozoítos de *E. histolytica* al sustrato de la matriz extracelular, fibronectina, es capaz de desencadenar vías de señalización que ocasionan una reestructuración del citoesqueleto de actina originando la degradación de esta proteína (Talamás-Rohana y Meza 1988).

Anteriormente trabajos realizados por Talamás-Lara y col., 2015, reportan que *E. histolytica* presenta una polimerización de actina orientada hacia el sustrato al que se adhiere, esto debido a su característica naturaleza invasiva, mientras que *E. dispar* muestra una mayor polimerización de actina, sin embargo esta se observa distribuida en el volumen citoplasmático; ya que de igual manera, se ha reportado que esta especie posee una menor

capacidad de adhesión (Talamás-Lara y col. 2020), además de la ausencia del receptor a fibronectina (Sengupta y col. 2009).

Considerando todo lo anterior se realizó un marcaje de la polimerización de actina de cada uno de los grupos anteriormente mencionados (*E. histolytica*, *E. dispar* e Interacción) en condiciones de vidrio y fibronectina; nuevamente realizando el marcaje previo de trofozoítos de *E. dispar* mediante Vybrant Dio Cell.

Finalmente se realizó un análisis cuantitativo del promedio de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la polimerización de actina emitida por píxel de 300 trofozoítos de cada grupo mediante el software Zen Blue Edition.

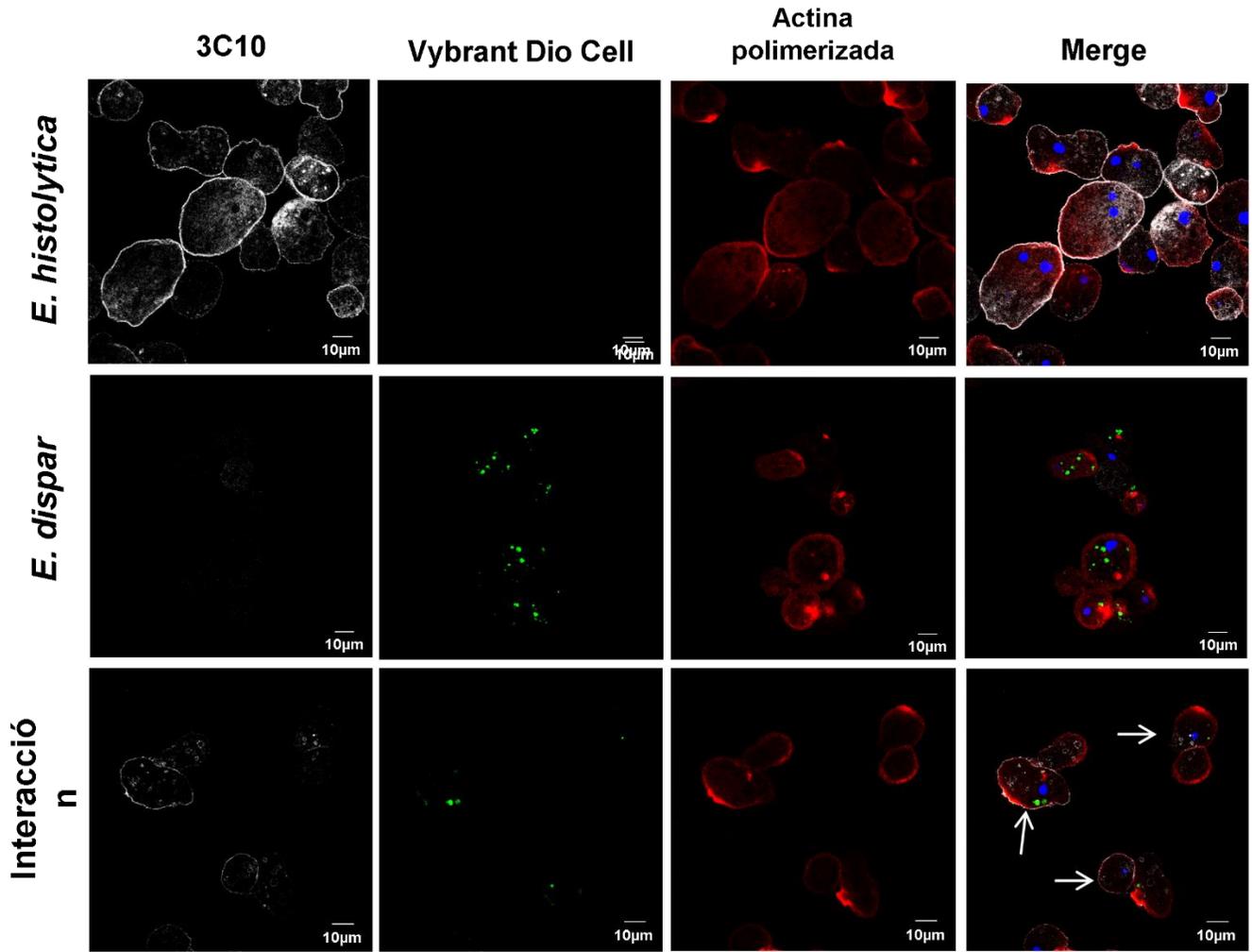
En condiciones de vidrio fueron observadas diferencias en la organización del citoesqueleto de actina. *E. histolytica* mostró una polimerización de forma definida, en evidentes estructuras como bocas fagocíticas, placas de adhesión, fibras de estrés y puntos de nucleación, mientras que *E. dispar* mostró una polimerización principalmente citoplasmática. Finalmente, el grupo de Interacción evidenció una polimerización tanto citoplasmática, como en estructuras especializadas como placas de adhesión (Figura 9A-Actina polimerizada).

Adicionalmente se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la actina polimerizada de cada grupo, en donde se observó una mayor polimerización de actina en el grupo de *E. dispar* en comparación con el grupo de *E. histolytica*, reportando una significancia de  $P < 0.001$ ; y una significancia de  $P < 0.01$  respecto *E. histolytica* con el grupo de interacción. Datos reportados en la figura 11.

Con respecto a los grupos expuestos a la condición de fibronectina, fue evidente una mayor polimerización de actina tanto en el grupo de interacción, como en el grupo control *E. histolytica*, sin embargo, esta se observó con mayor definición en estructuras especializadas orientadas hacia el sustrato; en el grupo de *E. dispar* nuevamente se observó una clara polimerización de actina de forma citoplasmática cortical, (Figura 9B-Actina polimerizada).

En cuanto a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia, se observó un aumento en la polimerización de actina de ambos grupos control, no obstante, el grupo de interacción mostró una disminución en la cantidad de actina polimerizada en contraste con este mismo grupo en la condición de vidrio; Figura 11.

A



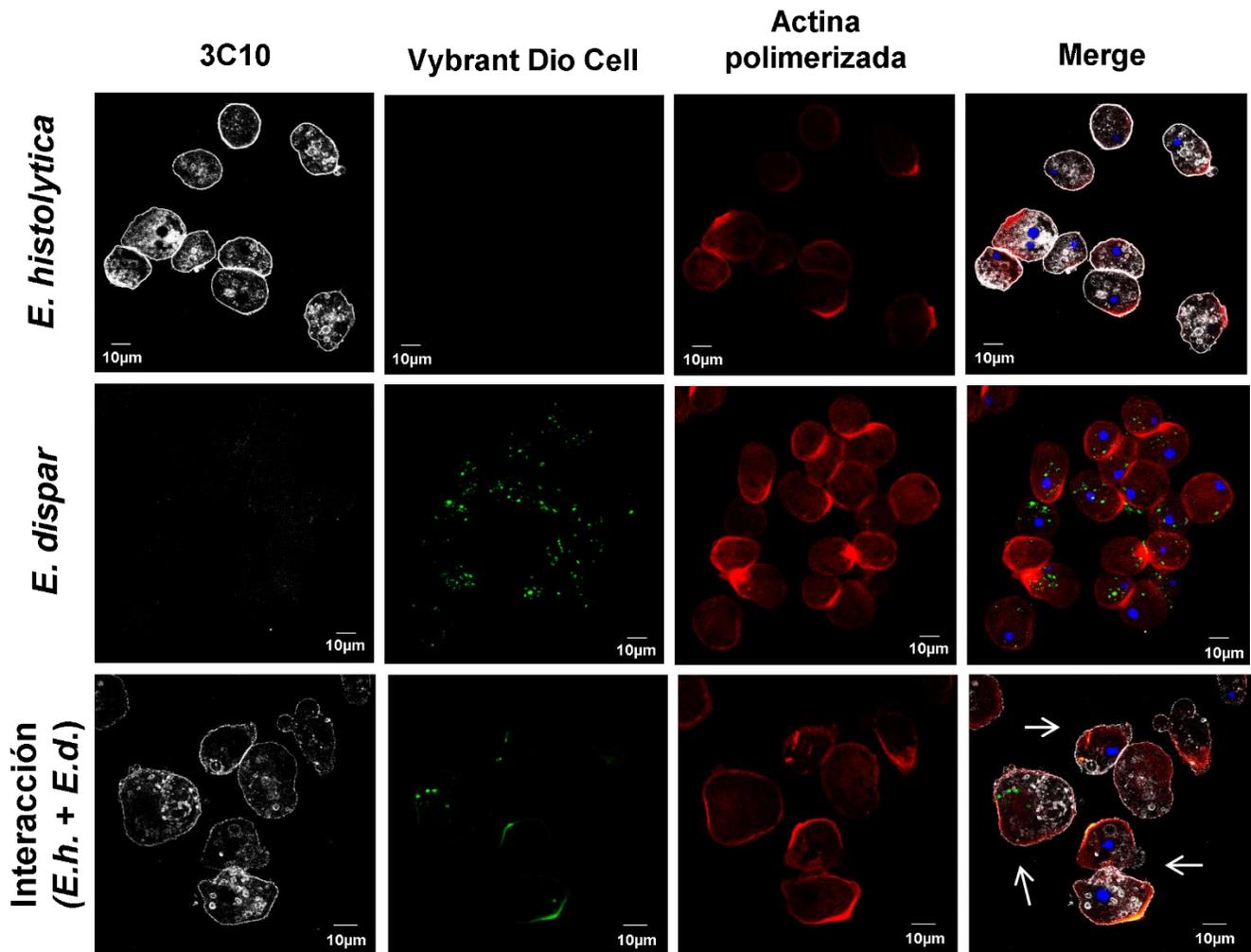
**B**

Figura 9. Grupos control (*E. dispar* y *E. histolytica*) y grupo problema (Interacción) en condiciones de vidrio (A) fibronectina (B). Se inmunomarcó al  $\beta 1EhFNR$  (blanco) con suero anti- $\beta 1EhFNR$  (1:50) y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 647 (1: 100). Marcador de membrana Vybrant Dio cell empleado únicamente para la tinción de *E. dispar* (verde); actina polimerizada (rojo), núcleos celulares marcados con Hoechst (azul) El grupo problema de Interacción muestra trofozoítos marcados con Vybrant Dio Cell que a su vez presentan un evidente inmunomarcaje de  $\beta 1EhFNR$  a diferencia del grupo control (flechas blancas). Barra de escala = 10 µm.

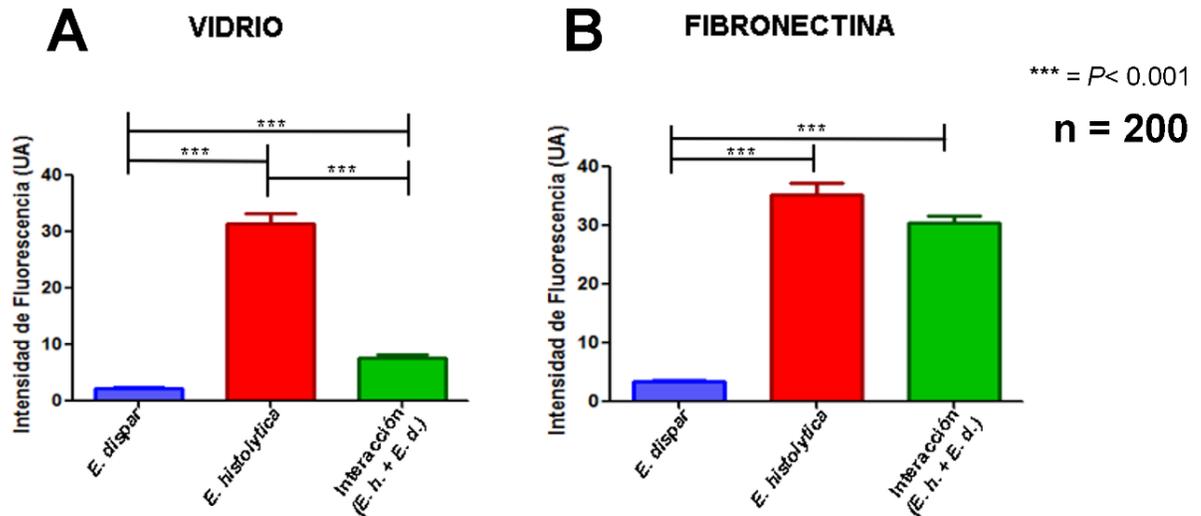


Figura 10. Cuantificación de intensidad de fluorescencia del  $\beta 1EhFNR$  en condiciones de vidrio (A) y fibronectina(B). UA = Unidades arbitrarias.

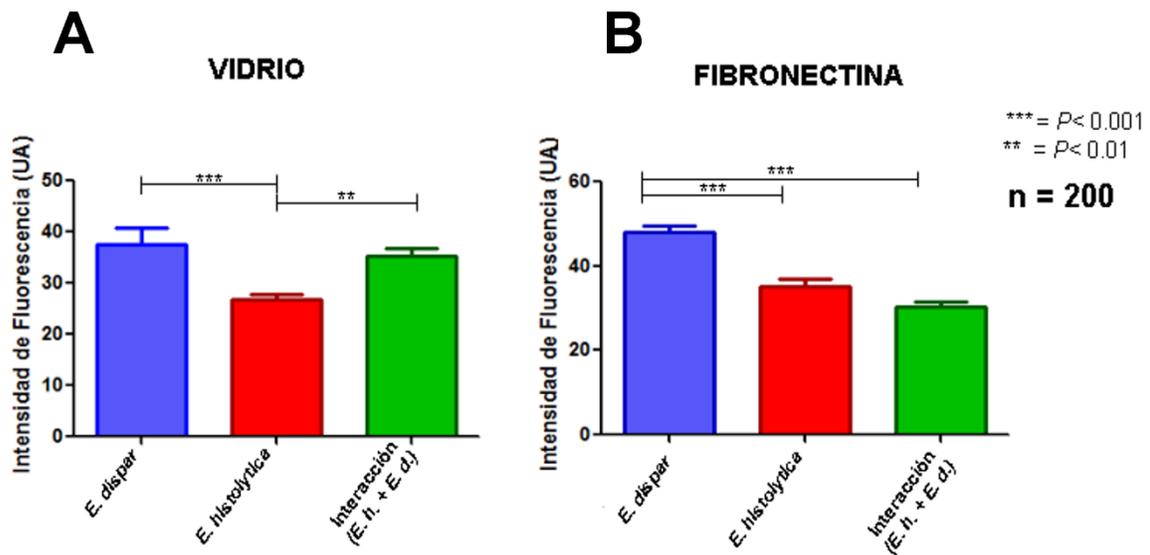


Figura 11. Cuantificación de intensidad de fluorescencia correspondiente a la polimerización de actina en condiciones de vidrio (A) y fibronectina (B). UA = Unidades arbitrarias.

Análisis bioinformático de la lectina Gal/GalNAc en *E. histolytica* y sus respectivos homólogos en *E. dispar*.

La Bioinformática es una herramienta que emplea diferentes técnicas, tanto computacionales, estadísticas y matemáticas para el análisis y generación de datos biológicos. A continuación, se describe el análisis “*in silico*” de las subunidades que componen la lectina Gal/Gal/NAc.

#### Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc (Hgl)

De la base de datos NCBI, se obtuvo la secuencia de esta subunidad identificada en la especie *E. histolytica* (Secuencia de referencia NCBI: XP\_656181.1), y posteriormente, mediante el uso de BLAST fueron seleccionadas diversas proteínas candidatas a proteínas homólogas en la especie *E. dispar*; dichas secuencias se analizaron en diferentes programas online, obteniendo el alineamiento pareado y múltiple de las secuencias, identificación de dominios conservados y funcionales, predicción de estructuras terciarias, así como el análisis de interactomas.

Al realizar el BLAST se seleccionaron dos proteínas debido a su porcentaje de identidad y cobertura de secuencia: una proteína precursora de lectina de superficie de 170 kDa (Secuencia de referencia NCBI: XP\_001734535.1), y la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc (GenBank: AAB50229.1), ambas en *E. dispar*.

Posteriormente se realizó un alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle entre la secuencia de *E. histolytica* y su respectivo homólogo en *E. dispar*, mostrándose el porcentaje de similitud e identidad de ambas secuencias en la Figura 14 y sus respectivos alineamientos en las figuras subsecuentes (Fig. 15).

<b>Organismo</b>	<b>Nombre</b>	<b>% identidad</b>	<b>% similitud</b>
<i>E. dispar</i>	Precursor de lectina de superficie de 170 kDa	88.0 %	92.8%
<i>E. dispar</i>	Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc	76.0 %	80.5 %

**Figura 14.** Porcentaje de identidad y similitud obtenida a través del servidor EMBOSS Needle de Hgl de *E. dispar* con respecto a Hgl de *E. histolytica*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.



Figura 15. Alineamiento pareado de las proteínas Hgl en MUSCLE. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en la cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amino. El símbolo “\*” indica la posición de aminoácidos conservados, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Posteriormente se realizó la predicción de estructuras terciarias de cada una de las proteínas para ambas especies (Figura 16).

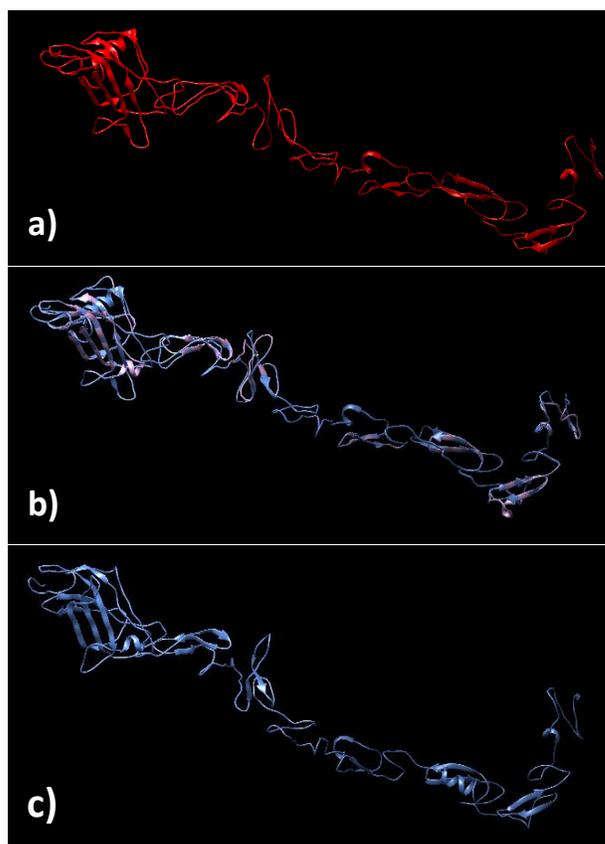


Figura 16. Predicción de las estructuras terciarias de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc. a) subunidad pesada de lectina Gal / GalNAc (*E. histolytica*), b) Precursor de

lectina de superficie de 170 kDa (*E. dispar*), c) Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc (*E. dispar*).

Estas secuencias fueron empleadas en un formato PDB para realizar la superposición de estructuras en el software USCF Chimera. Los resultados reportaron un alineamiento tridimensional más adecuado entre la subunidad pesada de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* y la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc *E. dispar*; Figura 16 b.

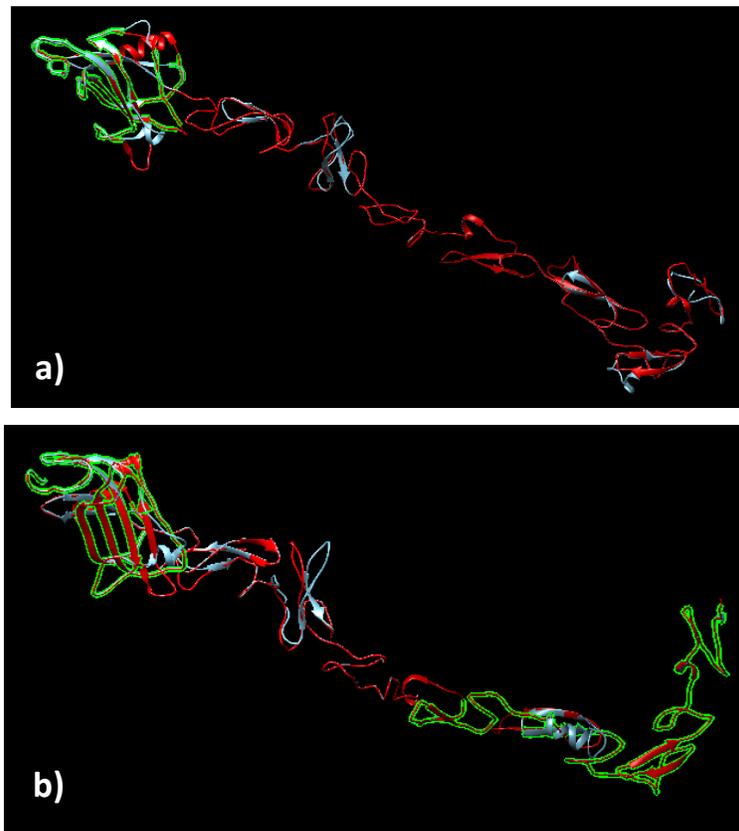
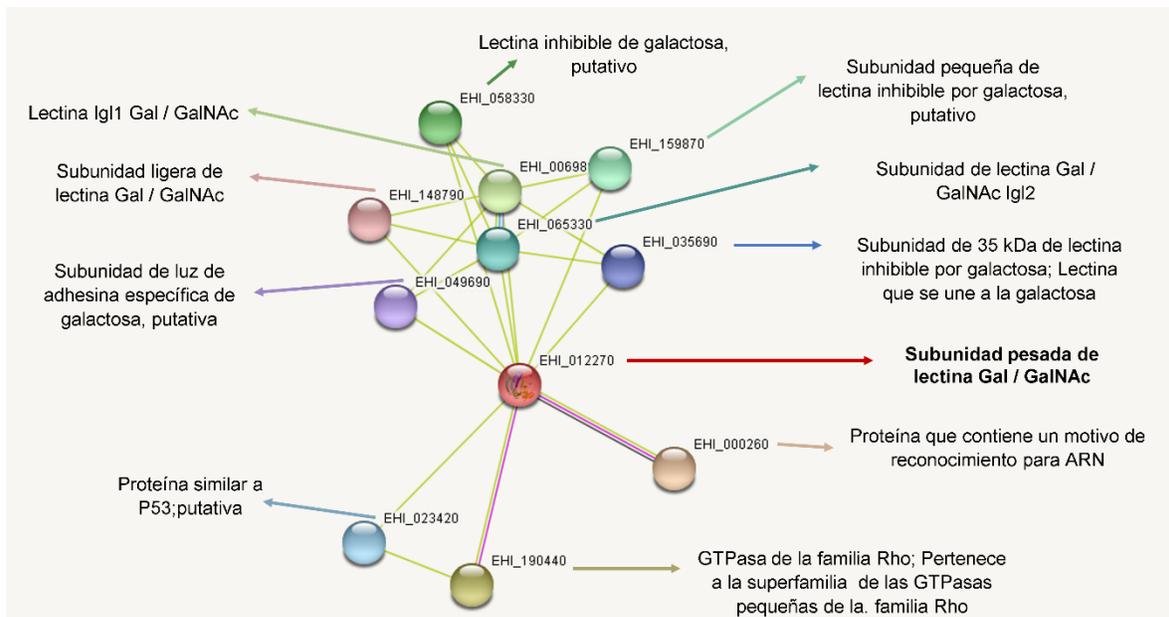
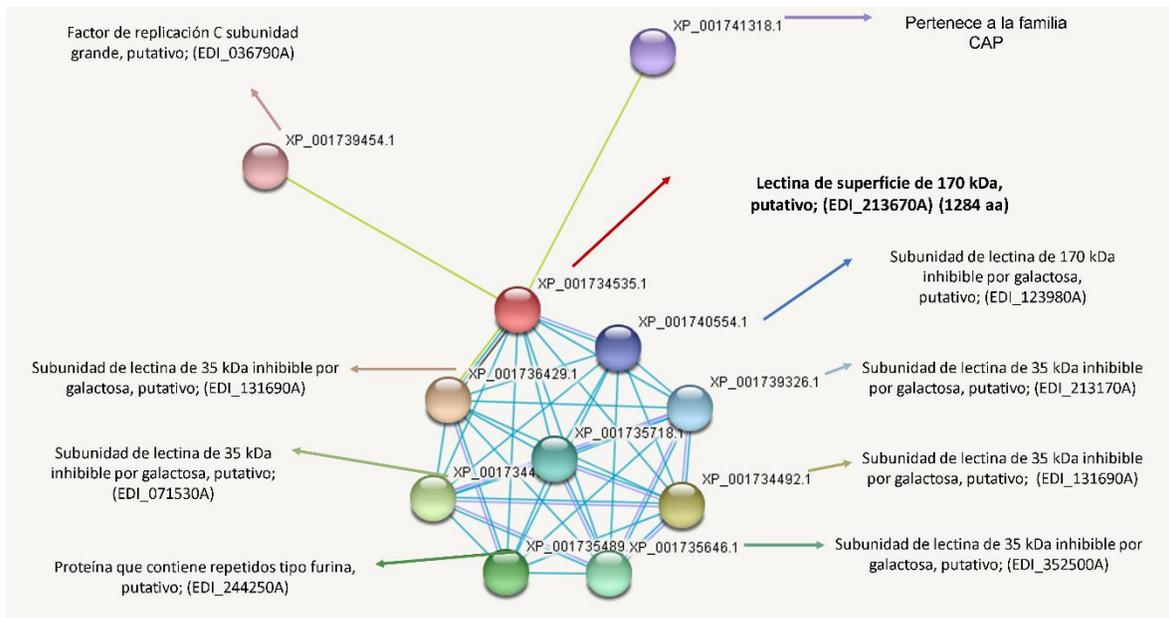


Figura 16. Superposición en USCF Chimera de las Hgl: a) Subunidad pesada de lectina Gal / GalNAc -*E. histolytica* (rojo) y precursor de la lectina de superficie de 170 kDa-*E. dispar* (azul), b) Subunidad pesada de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* (rojo) y Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc -*E. dispar* (azul). En la imagen se observa en color verde la región en donde ambas proteínas se superponen.

Finalmente, se generó el interactoma de cada una de las proteínas mediante el programa String 2.0, donde se observó a la subunidad pesada de *E. histolytica* interactuando tanto con la subunidad ligera, como con la subunidad intermedia 1 y 2 (Fig. 17). Por otro lado, en el interactoma de la subunidad pesada de *E. dispar*, se observó que ésta interacciona con proteínas putativas de la subunidad ligera y algunas proteínas con repetidos tipo furina (Fig. 18). Los repetidos de furina son homólogos a la superfamilia de dominios ricos en cisteína del receptor del factor de crecimiento; la región rica en cisteína similar a la furina se ha encontrado en una variedad de proteínas de eucariotas que están involucradas en el mecanismo de transducción de señales por los receptores tirosina quinasa, que implica la agregación del receptor (Raz, Schetjter, y Shilo 1991; Wang y col. 2013; Xu y col. 2015).



**Figura 17. Interactoma de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* en STRING 2.0**



**Figura 18. Interactoma del precursor de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc de *E. dispar* en STRING 2.0.**

#### Subunidad ligera de la lectina Gal/GalNAc (Lgl)

En cuanto al análisis de la Subunidad ligera de lectina Gal / GalNAc de *E. histolytica* (GenBank: EAL52074.1). Al realizar el BLAST se seleccionó una proteína debido a su porcentaje de identidad y cobertura de secuencia: una proteína precursora de la subunidad de 35 kDa de la lectina de superficie en *E. dispar* (Secuencia de referencia NCBI: XP\_001739326.1).

Posteriormente se realizó un alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle entre la secuencia de *E. histolytica* y su respectivo homólogo en *E. dispar*, mostrándose el porcentaje de similitud e identidad en la Figura 19 y su respectivo alineamiento en la figura siguiente (Fig. 20).

Organismo	Nombre	% identidad	% similitud
<i>E. dispar</i>	Precursor de lectina de superficie de 35 kDa	78.3%	85.7%

Figura 19. Porcentaje de identidad y similitud obtenido a través del servidor EMBOSS Needle de Lgl de *E. dispar* con respecto a Lgl de *E. histolytica*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.

Lgl (*E. histolytica*) vs Precursor a la lectina de 35 kDa (*E. dispar*)

```

Subunidad
XP_001739326.1  MITLFLLIIVYSIADTSDGRNQLEKYPYGMNRTKFDHDFTSVNSYQIQKFAESGVFS
MISLFLLIIVAFVNAATDSSQGV-ENYPYGKVNKQANFGKAFDSSYNSYQVQRYAESGVFS
*:***** :.:*: : : *:*:* *.:*:*: * * *:*:*:*:*:*

Subunidad
XP_001739326.1  ANQENYVRAKCKTCCRVIASDYNYEYTKQFTTDDVKGTTRYWMDMEFDDKRSVRFYQG
ANQENYVRAKCKTCCRVIASDYNYEYTKQFTNADDVRGDTRYWMDMEFDDKRSVRYQG
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Subunidad
XP_001739326.1  NYEQNILLRPLKMGNELQFFEFAPYKMYTSFAIPRRVHDIRGGAIRGATLIIMKKAPLD
QYEQNILLRPLKMGNELQFFEFAPYKMYTSFSIPRRVHDIRGGANRGATLIIMKKAPLD
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

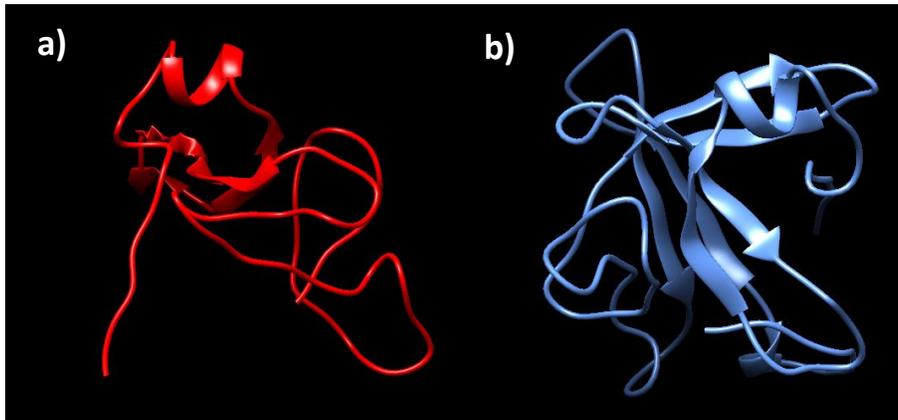
Subunidad
XP_001739326.1  PGTNNQRFVYVHPYPTSY--QNSNQNKWKDYPKHFYLPFSNNLCYQAKSEGEERSTWTG
PGTNNQRFVYVHPYKTEWYLEYSKTKWPSYSKHFYLPFSNNLCYQAKSEGQQRSTWTG
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Subunidad
XP_001739326.1  NAHLKLAN-SYQIEAASCVANEPKQIFIPVFA
NAHLTTTSTSYQIEAASCVANEPKQIFIPVFA
**** :. *****

```

Figura 20. Alineamiento pareado de las proteínas Lgl en MUSCLE. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en la cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amino. El símbolo “\*” indica la posición de aminoácidos conservados, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Consecutivamente se realizó la predicción de estructuras terciarias de las proteínas en ambas especies (Figura 21).



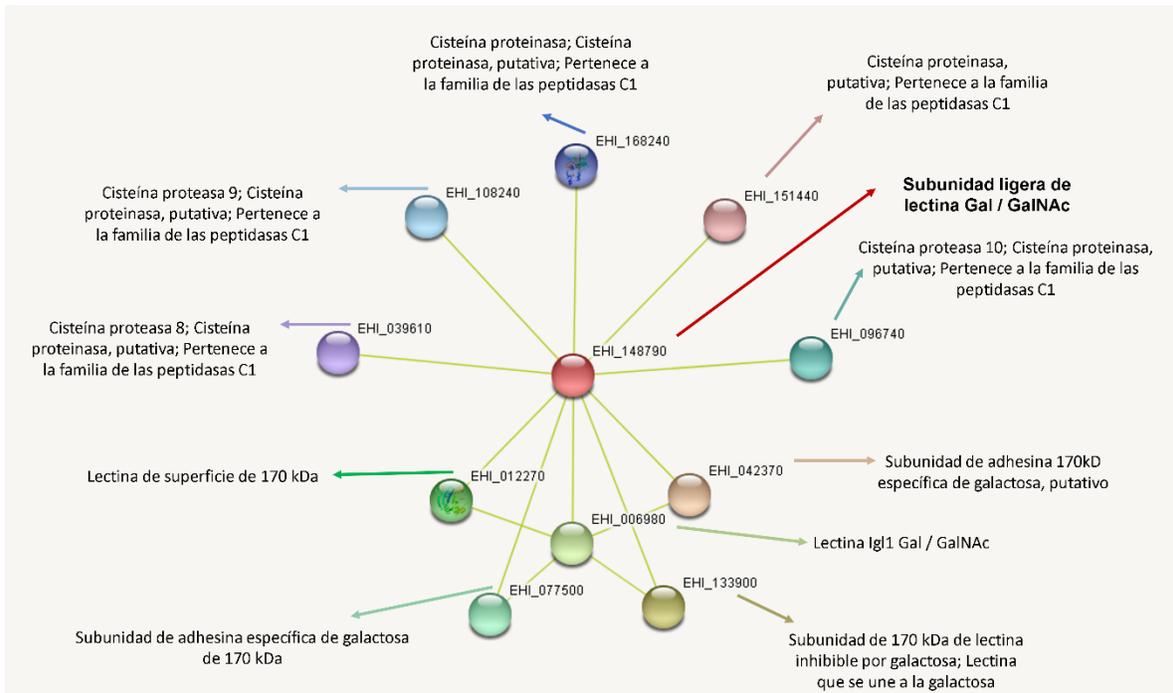
**Figura 21.** Predicción de las estructuras terciarias de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc. a) subunidad ligera de lectina Gal / GalNAc (*E. histolytica*), b) precursor de la subunidad de 35 kDa de la lectina de superficie (*dispar*).

Finalmente se realizó la superposición de estructuras en el software USCF Chimera. Los resultados demostraron que, a pesar de ser proteínas con un moderado porcentaje de similitud, dentro de la superposición en arreglo tridimensional ambas proteínas no coinciden a lo largo de la secuencia (Figura 22).

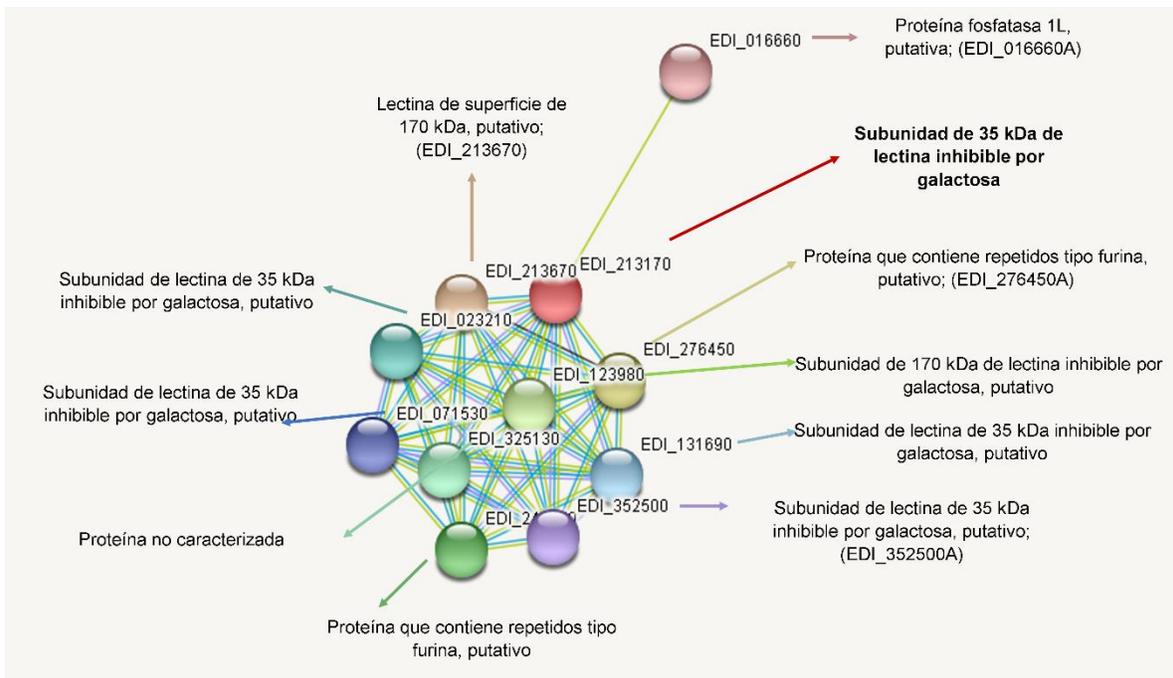


**Figura 22. Superposición en USCF Chimera de Lgl subunidad pesada de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* (rojo) y el precursor de la subunidad de 35 kDa de la lectina de superficie *E. dispar* (azul). Se observa en color verde la región en donde ambas proteínas se superponen.**

Por último, se generó el interactoma de las proteínas mediante el programa String 2.0. Se identificó al igual que la subunidad ligera de 35 kDa de *E. histolytica* (Fig. 23), que el precursor de la subunidad ligera de 35 kDa de *E. dispar*, también interactúa con la subunidad pesada de la misma lectina correspondiente a la estructuración reportada de la lectina Gal/GalNAc; asimismo se encontró que tiene la capacidad de interactuar con una proteína que contiene repetidos tipo furina (Fig.24).



**Figura 23. Interactoma de la subunidad ligera de la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* en STRING 2.0**



**Figura 24. Interactoma de la subunidad ligera de la lectina Gal/GalNAc de *E. dispar* en STRING 2.0**

## Subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc (Igl1 e Igl2)

### *Subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc (Igl1)*

Una vez localizada la secuencia de la Subunidad Intermedia 1 en *E. histolytica* (GenBank: GAT94658.1). Al realizar el BLAST se seleccionó una proteína debido a su porcentaje de identidad y cobertura de secuencia. Se seleccionó una proteína que contiene repetidos tipo furina (Secuencia de referencia NCBI: XP\_001736429.1) y la subunidad intermedia parcial de la lectina inhibible por galactosa 1 (*E. dispar*) (GenBank: BAF93873.1).

Posteriormente se realizó un alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle entre la secuencia de *E. histolytica* y su respectivo homólogo en *E. dispar*, mostrándose los porcentajes de similitud e identidad en la Figura 25 y sus respectivos alineamientos en las figuras siguientes (Fig. 26)

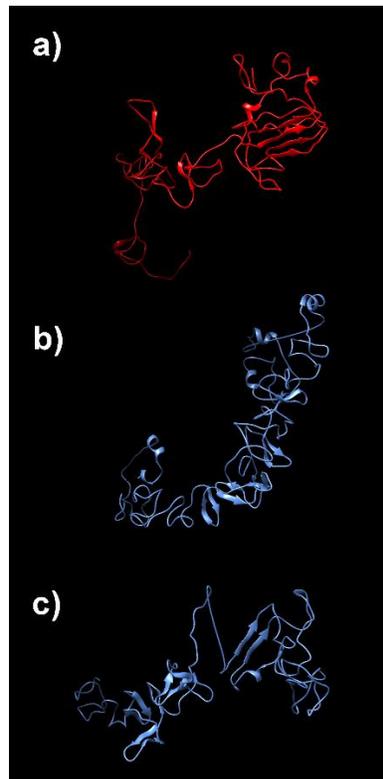
<b>Organismo</b>	<b>Nombre</b>	<b>% identidad</b>	<b>% similitud</b>
<i>E. dispar</i>	Proteína que contiene repetidos tipo furina	76.5 %	87.0 %
<i>E. dispar</i>	Subunidad intermedia parcial de la lectina inhibible por galactosa 1	75.0 %	84.9 %

**Figura 25** Porcentaje de identidad y similitud obtenida a través del servidor EMBOSS Needle de Igl1 de *E. dispar* con respecto a Igl1 parcial y proteína que contiene repetidos tipo furina de *E. histolytica*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.



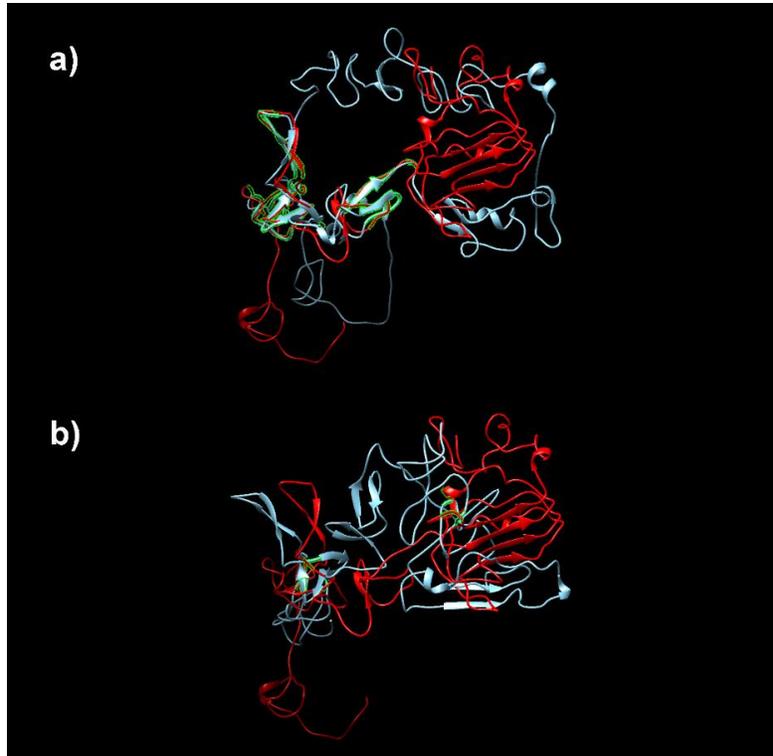
Figura 26. Alineamiento pareado de las proteínas Igl1 en MUSCLE. A) Alineamiento de Igl1 de *E. histolytica* vs Proteína que contiene repetidos tipo furina de *E. dispar*. B) Alineamiento de Igl1 de *E. histolytica* vs Igl1 parcial *E. dispar*. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en la cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amino. El símbolo “\*” indica la posición de aminoácidos conservados, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Posteriormente se realizó la predicción de estructuras terciarias de cada una de las proteínas para ambas especies (Figura 27).



**Figura 27. Predicción de las estructuras terciarias de la subunidad intermedia 1 de la lectina Gal/GalNAc. a) Subunidad intermedia 1 de lectina Gal / GalNAc (*E. histolytica*), b) Proteína que contiene repetidos tipo furina (*E. dispar*), c) Subunidad intermedia parcial de la lectina Gal/GalNAc (*E. dispar*).**

Posteriormente se realizó la superposición de estructuras en el software USCF Chimera (Figura 28).



**Figura 28. Superposición en UCSF Chimera de las Igl: a) Subunidad intermedia 1 de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* (rojo) y proteína que contiene repetidos tipo furina *E. dispar* (azul), b) Subunidad intermedia 1 de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* (rojo) y precursor de la subunidad intermedia 1 de la lectina Gal/GalNAc -*E. dispar* (azul). En la imagen se observa en color verde la región en donde ambas proteínas se superponen.**

Finalmente, se generó el interactoma de cada una de las proteínas mediante el programa String 2.0. Se encontró que la Igl1 de *E. histolytica* posee la capacidad de interactuar con las demás subunidades que conforman a la lectina Gal/GalNAc (Fig. 29), mientras que en la Igl de *E. dispar* no se encontró un interactoma ya reportado, sin embargo, para el caso de la proteína con repetidos tipo furina si fue posible generar un interactoma, reportando la capacidad de interactuar tanto con proteínas putativas de la subunidad pesada, ligera, así como con otra proteína que contiene repetidos tipo furina (Fig. 30).



### Subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc (Igl2)

Una vez encontrada la secuencia de la Subunidad Intermedia 2 en *E. histolytica* (GenBank: EAL47008.1). Al realizar el BLAST se seleccionó una proteína debido a su porcentaje de identidad y cobertura de secuencia que contiene repetidos tipo furina (Secuencia de referencia NCBI: XP\_001736429.1) y la subunidad intermedia parcial de la lectina inhibible por galactosa 2 (*E. dispar*) (GenBank: BAF93872.1).

Posteriormente se realizó un alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle entre la secuencia de *E. histolytica* y su respectivo homólogo en *E. dispar*, mostrándose los porcentajes de similitud e identidad en la Figura 31 y sus respectivos alineamientos en las figuras siguientes (Fig. 32).

<b>Organismo</b>	<b>Nombre</b>	<b>% identidad</b>	<b>% similitud</b>
<i>E. dispar</i>	Proteína que contiene repetidos tipo furina	75.7 %	86.2 %
<i>E. dispar</i>	Subunidad intermedia parcial de la lectina inhibible por galactosa 2	75.7 %	86.2 %

**Figura 31** Porcentaje de identidad y similitud de Igl2 obtenido a través de EMBOSS Needle de *E. dispar* con respecto a Igl2 parcial y proteína que contiene repetidos tipo furina de *E. histolytica*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.

**A** Proteína que contiene repetidos tipo Furina (*E. dispar*).

```

EAL47008.1 MFILLLFISISLGDYADKILINQEPRTAVPHCASVSNAGACASCDGVEYELKTESGGSGTQ
XP_001736429.1 MFILLLFISISLGEYADKILKQEPRTAVPHCASVSNAGACTSCDGYVELSSD--SSNTQ
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KCTLKEETCKSAFYYDGDSDSNSPKCVYCENGHESDT--SSSNNEIKCKKNGVDTCECLSL
XP_001736429.1 KCTLQDICKITTFSYDMSASSPKCVYCENGEIMATPPNSSEIKCTKNGVDTCDCLSL
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KDND-KCGECVIGMSTTTNGGKLDCTVTDEHAENKGLTANLSSSKQCDKCFGMYSLQ
XP_001736429.1 KDSGTKCEECIIGMSTTTNGSSKGCNATTDHAENKIGLLASTTSSKTCDFGMYTLE
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 SGQCTKRNKIEKCIQVLESSNQCADGYYINTEKTKTYPDHCSPKSNKNGKMEGYY
XP_001736429.1 NGKCTKRNKIEKCIQVLESSNQCADGYYINAEKTKTYPDHCSPKSNKNGKMEGYY
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 LNGTECKVCTIDNSKDLSEGNCSYNAEHCESNKRCTVSDGVCKNHNKRLFSPTENK
XP_001736429.1 LKDSKCNVCTIDNPNLSEGNCSYNAEHCESNKRCTVSDGFCNKHKRLFSLTENK
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 CTKCDGDFYLTGAGKCSPLNDGFKTSAKTECGIYGLERDGRKRCSLCPDPFTECLTS
XP_001736429.1 CAKCDGDFYLTGAGKCSPLNDGFKTSAKTECGIYGLERDGRKRCSLCPDPFTECLTS
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 QTPVPGKLNLRSAHLTSDGPKLPGCLLCSDDDTICYKCNGLTLNGTHYVDFKIKVL
XP_001736429.1 KTPVPGKLNLRSSHLTSDGPKLPGCLLCSDDDTICYKCNGLTLNGTHYVDFKIKVL
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GTSGNHHQVCKWRGYDQYEQYLNAFKASDNTYYCLKDLPLYPYFVTKGSDN--KITIG
XP_001736429.1 GISGKHNKVKWRGYDQYEQYLNAFKASDNTYYCLKDLPLYPYFVTKGSDN--KITIG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 CNGKDRDVKNDCECDKIKYIPKSVDFASDCVSKTKLPSERAAENICITQCPVSHVSDN
XP_001736429.1 CNGKSRDVKNDCECDKIKYIPKSVDFASDCVSKTKLPSERAAENICITQCPVSHVSDN
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GKCSGDHAFYDQNNKQCEPASCSSCSYDSSKSKVVCSECYENIQGVSTRDKNECAKCK
XP_001736429.1 GKCSGDHAFYDQNNKQCEPASCSSCSYDSSKSKVVCSECYENIQGVSTRDKNECAKCK
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KDTPEYKGLNAEDKIKSCAQLNHNKKEEGHYKISDGFITCLEDDSAIVSDQTECAQCA
XP_001736429.1 SN--DYKEGPNEDKIKSCAQLNHNKKEEGHYKISDGFITCLEDDSAIVSDQTECAQCA
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 CASNAFDENNIKQLCSTKDKYGHGCSACSATACIICEDTNLVAASGSMNAQCTVCKDGF
XP_001736429.1 CSPNAYRN--GNECVLCTIQAGFHGCSACSATACIICEDTNLVAASGSMNAQCTVCKDGF
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 YQIESPTDGVYCSPCPAKCKTKRYSDAKKIECVCTDQSSVDIKPPTCACTGLTWQLENGT
XP_001736429.1 YENPDTGVYCSPCPAKCKTKRYSDAKKIECVCTDQSSVDIKPPTCACTGLTWQLENGT
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GTCQSCDLKSYGCKTTDTCNVDSRGTGYIATECSDGFSGRSPYSNCTTCEISNYPKEGE
XP_001736429.1 GKCSCELSKYEKCTTDTCNVDAKGTGYIATECSEFNAGRSYPYSNCTACTLSNYPKIEG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GEK-----NGCAKDDKCATCSDDKDTCLCTDPLKIGSKCDECKTGYMNSGECPCPTNH
XP_001736429.1 GEKGGNNNGCAKNPEGCTCSDDKDTCLCTDPLKIGSKCDECKTGYMNSGECPCPTNH
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 HCSECSAAECTVCESDTYKVISGNGCNACVDFYDFEIKGCIPTSPCTKIGVWKKDC
XP_001736429.1 HCSECSAAECTVCESDTYKVISGNGCNACVDFYDFEIKGCIPTSPCTKIGVWKKDC
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 EEQETGCNSEKIKVIEECTKSTKDHIAEVPVNGACVAYGVEGTSTEDNKIECQSKAKV
XP_001736429.1 EEGSGCNSEKIKVIEECTKSTKDHIAEVPVNGACVAYGVEGTSTEDNKIECQSKAKV
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KVNFPDSCNSKDLCKNAEYLEAKGGECCVCEGYYTSSAGSCIPCRRHMPHCTKCTGEG
XP_001736429.1 KVNFPDSCNSKDLCKNAEYLEAKGGECCVCEGYYTSSAGSCIPCRRHMPHCTKCTGEG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 ECTTEDGWLKDGKCNKAGKIFIPWVWVWLFAMF
XP_001736429.1 ICTSEEGWLEEGNCKGKIFIPWVWVWLFAMF
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

**B** Subunidad parcial intermedia de la lectina inhibible por galactosa 2 (*E. dispar*).

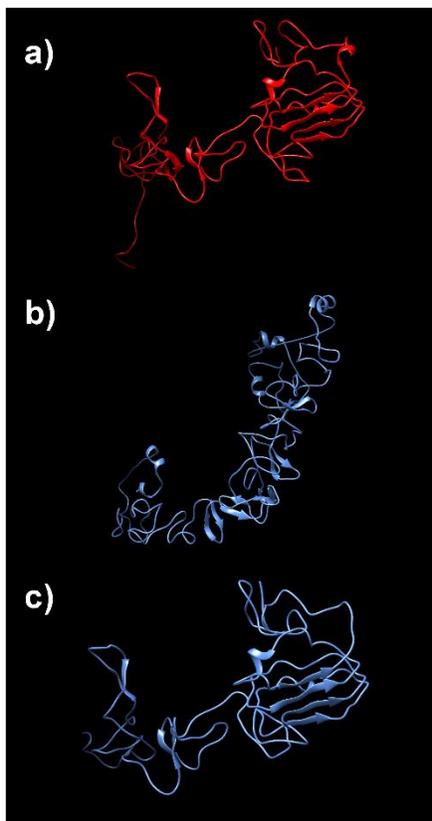
```

EAL47008.1 MFILLLFISISLGDYADKILINQEPRTAVPHCASVSNAGACASCDGVEYELKTESGGSGTQ
BAF93872.1 MFILLLFISISLGEYADKILKQEPRTAVPHCASVSNAGACTSCDGYVELSSD--SSN
*****
EAL47008.1 KCTLKEETCKSAFYYDGDSDSNSPKCVYCENGHESDT--SSSNNEIKCKKNGVDTCECLSL
BAF93872.1 KCTLQDICKITTFSYDMSASSPKCVYCENGEIMATPPNSSEIKCTKNGVDTCDCLSL
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KDND-KCGECVIGMSTTTNGGKLDCTVTDEHAENKGLTANLSSSKQCDKCFGMYSLQ
BAF93872.1 KDND-KCGECVIGMSTTTNGGKLDCTVTDEHAENKGLTANLSSSKQCDKCFGMYSLQ
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 SGQCTKRNKIEKCIQVLESSNQCADGYYINTEKTKTYPDHCSPKSNKNGKMEGYY
BAF93872.1 SGQCTKRNKIEKCIQVLESSNQCADGYYINTEKTKTYPDHCSPKSNKNGKMEGYY
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 LNGTECKVCTIDNSKDLSEGNCSYNAEHCESNKRCTVSDGVCKNHNKRLFSPTENK
BAF93872.1 LKDSKCNVCTIDNPNLSEGNCSYNAEHCESNKRCTVSDGFCNKHKRLFSLTENK
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 CTKCDGDFYLTGAGKCSPLNDGFKTSAKTECGIYGLERDGRKRCSLCPDPFTECLTS
BAF93872.1 CTKCDGDFYLTGAGKCSPLNDGFKTSAKTECGIYGLERDGRKRCSLCPDPFTECLTS
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 QTPVPGKLNLRSAHLTSDGPKLPGCLLCSDDDTICYKCNGLTLNGTHYVDFKIKVL
BAF93872.1 KTPVPGKLNLRSSHLTSDGPKLPGCLLCSDDDTICYKCNGLTLNGTHYVDFKIKVL
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GTSGNHHQVCKWRGYDQYEQYLNAFKASDNTYYCLKDLPLYPYFVTKGSDN--KITIG
BAF93872.1 GISGKHNKVKWRGYDQYEQYLNAFKASDNTYYCLKDLPLYPYFVTKGSDN--KITIG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 CNGKDRDVKNDCECDKIKYIPKSVDFASDCVSKTKLPSERAAENICITQCPVSHVSDN
BAF93872.1 CNGKSRDVKNDCECDKIKYIPKSVDFASDCVSKTKLPSERAAENICITQCPVSHVSDN
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GKCSGDHAFYDQNNKQCEPASCSSCSYDSSKSKVVCSECYENIQGVSTRDKNECAKCK
BAF93872.1 GKCSGDHAFYDQNNKQCEPASCSSCSYDSSKSKVVCSECYENIQGVSTRDKNECAKCK
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KDTPEYKGLNAEDKIKSCAQLNHNKKEEGHYKISDGFITCLEDDSAIVSDQTECAQCA
BAF93872.1 SN--DYKEGPNEDKIKSCAQLNHNKKEEGHYKISDGFITCLEDDSAIVSDQTECAQCA
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 CASNAFDENNIKQLCSTKDKYGHGCSACSATACIICEDTNLVAASGSMNAQCTVCKDGF
BAF93872.1 CSPNAYRN--GNECVLCTIQAGFHGCSACSATACIICEDTNLVAASGSMNAQCTVCKDGF
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 YQIESPTDGVYCSPCPAKCKTKRYSDAKKIECVCTDQSSVDIKPPTCACTGLTWQLENGT
BAF93872.1 YENPDTGVYCSPCPAKCKTKRYSDAKKIECVCTDQSSVDIKPPTCACTGLTWQLENGT
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GTCQSCDLKSYGCKTTDTCNVDSRGTGYIATECSDGFSGRSPYSNCTTCEISNYPKEGE
BAF93872.1 GKCSCELSKYEKCTTDTCNVDAKGTGYIATECSEFNAGRSYPYSNCTACTLSNYPKIEG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 GEK-----NGCAKDDKCATCSDDKDTCLCTDPLKIGSKCDECKTGYMNSGECPCPTNH
BAF93872.1 GEKGGNNNGCAKNPEGCTCSDDKDTCLCTDPLKIGSKCDECKTGYMNSGECPCPTNH
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 HCSECSAAECTVCESDTYKVISGNGCNACVDFYDFEIKGCIPTSPCTKIGVWKKDC
BAF93872.1 HCSECSAAECTVCESDTYKVISGNGCNACVDFYDFEIKGCIPTSPCTKIGVWKKDC
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 EEQETGCNSEKIKVIEECTKSTKDHIAEVPVNGACVAYGVEGTSTEDNKIECQSKAKV
BAF93872.1 EEGSGCNSEKIKVIEECTKSTKDHIAEVPVNGACVAYGVEGTSTEDNKIECQSKAKV
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 KVNFPDSCNSKDLCKNAEYLEAKGGECCVCEGYYTSSAGSCIPCRRHMPHCTKCTGEG
BAF93872.1 KVNFPDSCNSKDLCKNAEYLEAKGGECCVCEGYYTSSAGSCIPCRRHMPHCTKCTGEG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
EAL47008.1 ECTTEDGWLKDGKCNKAGKIFIPWVWVWLFAMF
BAF93872.1 ICTSEEGWLEEGNCKGKIFIPWVWVWLFAMF
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

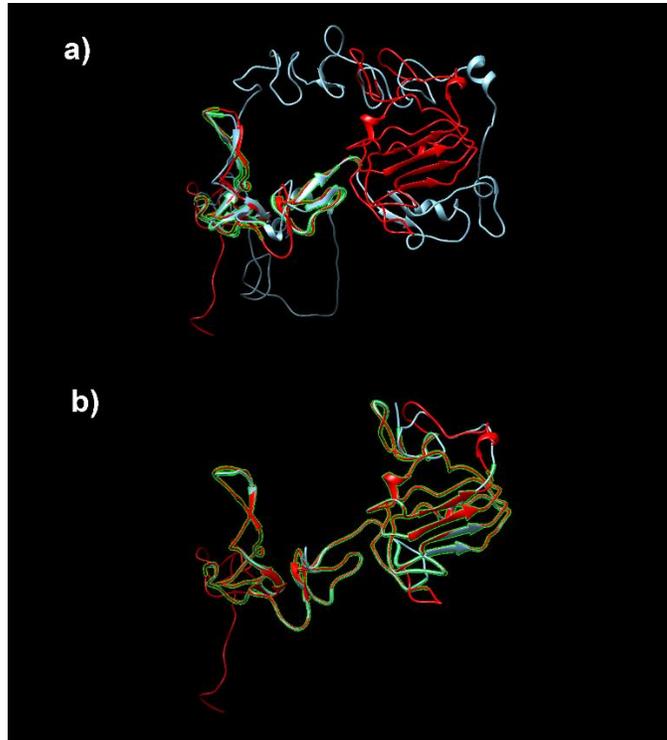
Figura 32. Alineamiento pareado de las proteínas Igl2 en MUSCLE. A) Alineamiento de Igl2 de *E. histolytica* vs Proteína que contiene repetidos tipo furina *E. dispar*. B) Alineamiento de Igl2 de *E. histolytica* vs Igl2 parcial *E. dispar*. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en la cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrido o amino. El símbolo "\*" indica la posición de aminoácidos conservados, ":" indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último "." se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Posteriormente se realizó la predicción de estructuras terciarias de cada una de las proteínas para ambas especies (Fig. 33).



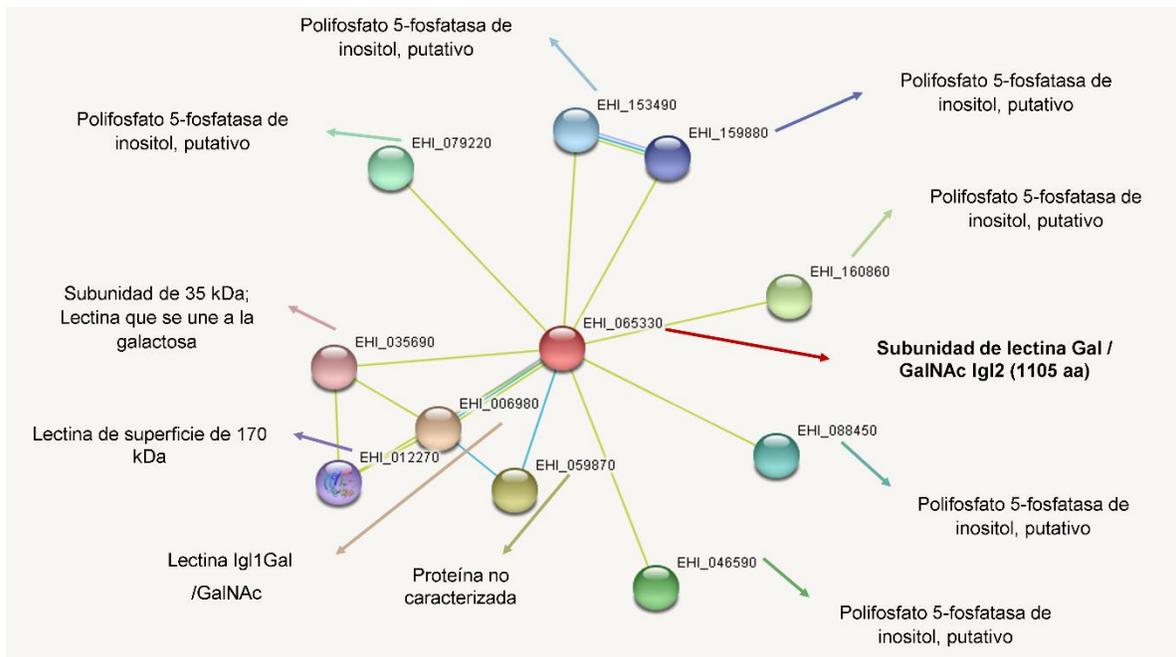
**Figura 33. Predicción de las estructuras terciarias de la subunidad intermedia 2 de la lectina Gal/GalNAc. a) Subunidad intermedia 2 de lectina Gal / GalNAc (*E. histolytica*), b) Proteína que contiene repetidos tipo furina (*E. dispar*), c) Subunidad intermedia parcial 2 de la lectina Gal/GalNAc (*E. dispar*).**

Posteriormente se realizó la superposición de estructuras en el software USCf Chimera (Fig. 34).

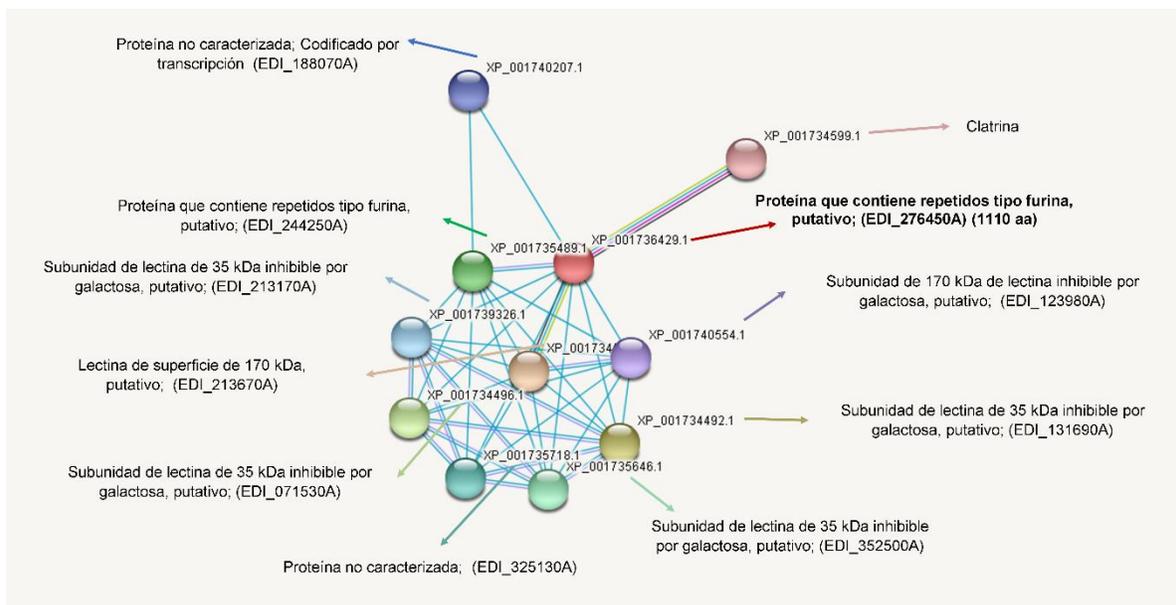


**Figura 34. Superposición en UCSF Chimera de las Igl2: a) Subunidad intermedia 2 de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* (rojo) y proteína que contiene repetidos tipo furina *E. dispar* (azul), b) Subunidad intermedia 2 de lectina Gal / GalNAc *E. histolytica* (rojo) y precursor de la subunidad intermedia 2 de la lectina Gal/GalNAc -*E. dispar* (azul). En la imagen se observa en color verde la región en donde ambas proteínas se superponen.**

Finalmente, se generó el interactoma de cada una de las proteínas mediante el programa String 2.0 (Fig. 35). Al analizar los interactomas se encontró que la Igl2 de *E. histolytica* presenta una interacción con Hgl, Lgl e Igl 1 de la lectina Gal/GalNAc; mientras que no fue posible encontrar en la base de datos de STRING 2.0 el interactoma de la subunidad Igl2 en *E. dispar*, únicamente se reportó el interactoma de la proteína que contiene repetidos tipo furina, la cual nuevamente se observó interactuando con Hgl, Lgl y otra proteína que contiene repetidos tipo furina (Fig. 36).



**Figura 35. Interactoma de la subunidad intermedia 2 de la lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica* en STRING 2.0**



**Figura 36. Interactoma de la proteína que contiene repetidos tipo furina de *E. dispar* en STRING 2.0**

Sin embargo, debido a lo observado durante los experimentos “in vitro” se procedió a realizar un análisis más profundo en cuestión a la estructura primaria de la subunidad intermedia que corresponde al receptor a fibronectina en *E. histolytica*.

#### Presencia de motivos CXXC en proteínas homólogas a Ehlg1 en *E. dispar*

Al ser tan parecidas entre sí como se vio en las tablas 3 y 4 se procedió a buscar en las secuencias los conocidos motivos CXXC repetidos en las subunidades Igl 1 e Igl 2 de *E. histolytica*, los cuales resultan relevantes dentro del proceso de adhesión celular por parte del trofozoito (Cheng y col. 2001).

Encontrando que, en éstas destaca y concuerda la presencia del motivo CXXC repetido en la proteína con repetidos de furina, y en las subunidades parciales Igl 1e Igl 2 (Fig.37).

## A) Igl1

```

Igl1 E.h.           MFTLLLEFISLIGDTTADLIGGKPEEAVPHCAVSUNGAQTSQDTGYELTTGNNKT-C
Prote/Fur E.d.    MFTLLLEFISLIGDTTADLIGGKPEEAVPHCAVSUNGAQTSQDTGYELSSDSNTQRC
Igl1 parcial E.d. -----GTYADLIGKPEEAVPHCAVSUNGAQTSQDTGYELSSDSNTQRC
* * * * *

Igl1 E.h.           TLNEMKCHAEFYVDKNTNPKHTYCVNGEKVNTSNGSNDKCVQNRVIVGSELNMLK
Prote/Fur E.d.    TLNEMKCHAEFYVDKNTNPKHTYCVNGEKVNTSNGSNDKCVQNRVIVGSELNMLK
Igl1 parcial E.d. TLNEMKCHAEFYVDKNTNPKHTYCVNGEKVNTSNGSNDKCVQNRVIVGSELNMLK
* * * * *

Igl1 E.h.           D-SKGEKIIHGHTTVDG-SHLCDNATTDNDRHRCVGLLASSTSSTGDTGDFGHTSLVGG
Prote/Fur E.d.    D-SKGEKIIHGHTTVDG-SHLCDNATTDNDRHRCVGLLASSTSSTGDTGDFGHTSLVGG
Igl1 parcial E.d. D-SKGEKIIHGHTTVDG-SHLCDNATTDNDRHRCVGLLASSTSSTGDTGDFGHTSLVGG
* * * * *

Igl1 E.h.           KCTQNDKIKKICLIVENSCHQCDGYSLSTKSGSCKPFRKSGKNGKQGLTSGEYLL
Prote/Fur E.d.    KCTQNDKIKKICLIVENSCHQCDGYSLSTKSGSCKPFRKSGKNGKQGLTSGEYLL
Igl1 parcial E.d. KCTQNDKIKKICLIVENSCHQCDGYSLSTKSGSCKPFRKSGKNGKQGLTSGEYLL
* * * * *

Igl1 E.h.           SKTDSCITGIVDHPNHLSEGNESLIYKAKTSCNRCQTVSDGVGVNHCLELSPTEEM
Prote/Fur E.d.    SKTDSCITGIVDHPNHLSEGNESLIYKAKTSCNRCQTVSDGVGVNHCLELSPTEEM
Igl1 parcial E.d. SKTDSCITGIVDHPNHLSEGNESLIYKAKTSCNRCQTVSDGVGVNHCLELSPTEEM
* * * * *

Igl1 E.h.           KCTKQNGYELTTSQTCSPNLYDGFATKTECENGYLRKDGKRCGLSDPPPECLIT
Prote/Fur E.d.    KCTKQNGYELTTSQTCSPNLYDGFATKTECENGYLRKDGKRCGLSDPPPECLIT
Igl1 parcial E.d. KCTKQNGYELTTSQTCSPNLYDGFATKTECENGYLRKDGKRCGLSDPPPECLIT
* * * * *

Igl1 E.h.           SKTFPFGKLNLSRLTSTGQCDLPGLLSCDDDTIYKRCNGLLGTGHCNMTDTSV
Prote/Fur E.d.    SKTFPFGKLNLSRLTSTGQCDLPGLLSCDDDTIYKRCNGLLGTGHCNMTDTSV
Igl1 parcial E.d. SKTFPFGKLNLSRLTSTGQCDLPGLLSCDDDTIYKRCNGLLGTGHCNMTDTSV
* * * * *

Igl1 E.h.           LGSQRNHCYKCHGKYDQYGLNAPKASDNTFYCPLKDLVLPYFVSHTGSD-NTIIG
Prote/Fur E.d.    LGSQRNHCYKCHGKYDQYGLNAPKASDNTFYCPLKDLVLPYFVSHTGSD-NTIIG
Igl1 parcial E.d. LGSQRNHCYKCHGKYDQYGLNAPKASDNTFYCPLKDLVLPYFVSHTGSD-NTIIG
* * * * *

Igl1 E.h.           GCVGELRVNSDCECHDHPITSDIKSDCVSHTTLPSCSTANHGCTQCPVGSNVC
Prote/Fur E.d.    GCVGELRVNSDCECHDHPITSDIKSDCVSHTTLPSCSTANHGCTQCPVGSNVC
Igl1 parcial E.d. GCVGELRVNSDCECHDHPITSDIKSDCVSHTTLPSCSTANHGCTQCPVGSNVC
* * * * *

Igl1 E.h.           DKGSCDHRFYDDNVCHGCPASCSGSDYSSKRVVCSGEGYKIGVTTREHEDECAK
Prote/Fur E.d.    DKGSCDHRFYDDNVCHGCPASCSGSDYSSKRVVCSGEGYKIGVTTREHEDECAK
Igl1 parcial E.d. DKGSCDHRFYDDNVCHGCPASCSGSDYSSKRVVCSGEGYKIGVTTREHEDECAK
* * * * *

Igl1 E.h.           IHDYFEGPHEDEKSCQALNHCHEGKVEYLSGDTGDLDDGAYVUSGVAQCQEG
Prote/Fur E.d.    IHDYFEGPHEDEKSCQALNHCHEGKVEYLSGDTGDLDDGAYVUSGVAQCQEG
Igl1 parcial E.d. IHDYFEGPHEDEKSCQALNHCHEGKVEYLSGDTGDLDDGAYVUSGVAQCQEG
* * * * *

Igl1 E.h.           SPNAPFDNRKCGDSTWQSYGKSCASATAGITCEDIMLLITGKPF---GTVGCDGFY
Prote/Fur E.d.    SPNAPFDNRKCGDSTWQSYGKSCASATAGITCEDIMLLITGKPF---GTVGCDGFY
Igl1 parcial E.d. SPNAPFDNRKCGDSTWQSYGKSCASATAGITCEDIMLLITGKPF---GTVGCDGFY
* * * * *

Igl1 E.h.           QLENDGDVYVSPGPAKCTCYNTTSGQVECVTEQLELDIKAFKCACTGTVQLENG
Prote/Fur E.d.    QLENDGDVYVSPGPAKCTCYNTTSGQVECVTEQLELDIKAFKCACTGTVQLENG
Igl1 parcial E.d. QLENDGDVYVSPGPAKCTCYNTTSGQVECVTEQLELDIKAFKCACTGTVQLENG
* * * * *

Igl1 E.h.           TQGSCLSKYFGGCTTTDQVNAKTYIYATECSDFSGSSEPSYNTACTLSNYPYFEG
Prote/Fur E.d.    TQGSCLSKYFGGCTTTDQVNAKTYIYATECSDFSGSSEPSYNTACTLSNYPYFEG
Igl1 parcial E.d. TQGSCLSKYFGGCTTTDQVNAKTYIYATECSDFSGSSEPSYNTACTLSNYPYFEG
* * * * *

Igl1 E.h.           EK-----NGKRCDDIKCATCSMDTCLTCDLKVSGKDDGCKTGYHNSGECQPCTRN
Prote/Fur E.d.    EK-----NGKRCDDIKCATCSMDTCLTCDLKVSGKDDGCKTGYHNSGECQPCTRN
Igl1 parcial E.d. EK-----NGKRCDDIKCATCSMDTCLTCDLKVSGKDDGCKTGYHNSGECQPCTRN
* * * * *

Igl1 E.h.           CSEGSAAEIVCESDYVIVSISGEGNSCVDGVEYDEIKGTEIPCTSPCTGVGKDDCE
Prote/Fur E.d.    CSEGSAAEIVCESDYVIVSISGEGNSCVDGVEYDEIKGTEIPCTSPCTGVGKDDCE
Igl1 parcial E.d. CSEGSAAEIVCESDYVIVSISGEGNSCVDGVEYDEIKGTEIPCTSPCTGVGKDDCE
* * * * *

Igl1 E.h.           EORTGNSKGGKVECTGCTDHDHREVPVWAGVYVGTSTEDNKICDQGLQAK
Prote/Fur E.d.    EORTGNSKGGKVECTGCTDHDHREVPVWAGVYVGTSTEDNKICDQGLQAK
Igl1 parcial E.d. EORTGNSKGGKVECTGCTDHDHREVPVWAGVYVGTSTEDNKICDQGLQAK
* * * * *

Igl1 E.h.           VNEFDSCNSKCLCHREYLEKSGEVCVYVYTSVWGSSEKSGHGHGHTCTGSE
Prote/Fur E.d.    VNEFDSCNSKCLCHREYLEKSGEVCVYVYTSVWGSSEKSGHGHGHTCTGSE
Igl1 parcial E.d. VNEFDSCNSKCLCHREYLEKSGEVCVYVYTSVWGSSEKSGHGHGHTCTGSE
* * * * *

Igl1 E.h.           CTTCEDGWLKDGKNGKGFIFGIDQVHLAFNE
Prote/Fur E.d.    CTTCEDGWLKDGKNGKGFIFGIDQVHLAFNE
Igl1 parcial E.d. CTTCEDGWLKDGKNGKGFIFGIDQVHLAFNE
* * * * *

```

## B) Igl2

```

Igl2 E.h.           MFTLLLEFISLIGDTTADLIGGKPEEAVPHCAVSUNGAQTSQDTGYELTSSGSGSTQ
Prote/Fur E.d.    MFTLLLEFISLIGDTTADLIGGKPEEAVPHCAVSUNGAQTSQDTGYELSSDSNTQRC
Igl2 parcial E.d. -----GTYADLIGKPEEAVPHCAVSUNGAQTSQDTGYELSSDSNTQRC-SG-SN
* * * * *

Igl2 E.h.           KCTLBERTGKSAFYVDKNSDQKQVYVNGEKVNTSNGSNDKCVQNRVIVGSELNMLK
Prote/Fur E.d.    KCTLBERTGKSAFYVDKNSDQKQVYVNGEKVNTSNGSNDKCVQNRVIVGSELNMLK
Igl2 parcial E.d. KCTLBERTGKSAFYVDKNSDQKQVYVNGEKVNTSNGSNDKCVQNRVIVGSELNMLK
* * * * *

Igl2 E.h.           KDND-KCGEKGVIHGHTTVDG-SHLCDNATTDNDRHRCVGLLASSTSSTGDTGDFGHTSLVGG
Prote/Fur E.d.    KDND-KCGEKGVIHGHTTVDG-SHLCDNATTDNDRHRCVGLLASSTSSTGDTGDFGHTSLVGG
Igl2 parcial E.d. KDND-KCGEKGVIHGHTTVDG-SHLCDNATTDNDRHRCVGLLASSTSSTGDTGDFGHTSLVGG
* * * * *

Igl2 E.h.           SGGCTKQNDKIKKICLIVENSCHQCDGYSLSTKSGSCKPFRKSGKNGKQGLTSGEYLL
Prote/Fur E.d.    SGGCTKQNDKIKKICLIVENSCHQCDGYSLSTKSGSCKPFRKSGKNGKQGLTSGEYLL
Igl2 parcial E.d. SGGCTKQNDKIKKICLIVENSCHQCDGYSLSTKSGSCKPFRKSGKNGKQGLTSGEYLL
* * * * *

Igl2 E.h.           LNTGECRVCIDNNDLSEGNESLIYKAKTSCNRCQTVSDGVGVNHCLELSPTEEMK
Prote/Fur E.d.    LNTGECRVCIDNNDLSEGNESLIYKAKTSCNRCQTVSDGVGVNHCLELSPTEEMK
Igl2 parcial E.d. LNTGECRVCIDNNDLSEGNESLIYKAKTSCNRCQTVSDGVGVNHCLELSPTEEMK
* * * * *

Igl2 E.h.           CTKQNGYELTTSQTCSPNLYDGFATKTECENGYLRKDGKRCGLSDPPPECLIT
Prote/Fur E.d.    CTKQNGYELTTSQTCSPNLYDGFATKTECENGYLRKDGKRCGLSDPPPECLIT
Igl2 parcial E.d. CTKQNGYELTTSQTCSPNLYDGFATKTECENGYLRKDGKRCGLSDPPPECLIT
* * * * *

Igl2 E.h.           QTFPFGKLNLSRLTSTGQCDLPGLLSCDDDTIYKRCNGLLGTGHCNMTDTSV
Prote/Fur E.d.    QTFPFGKLNLSRLTSTGQCDLPGLLSCDDDTIYKRCNGLLGTGHCNMTDTSV
Igl2 parcial E.d. QTFPFGKLNLSRLTSTGQCDLPGLLSCDDDTIYKRCNGLLGTGHCNMTDTSV
* * * * *

Igl2 E.h.           GTSQRNHCYKCHGKYDQYGLNAPKASDNTFYCPLKDLVLPYFVSHTGSD-NTIIG
Prote/Fur E.d.    GTSQRNHCYKCHGKYDQYGLNAPKASDNTFYCPLKDLVLPYFVSHTGSD-NTIIG
Igl2 parcial E.d. GTSQRNHCYKCHGKYDQYGLNAPKASDNTFYCPLKDLVLPYFVSHTGSD-NTIIG
* * * * *

Igl2 E.h.           GCVGELRVNSDCECHDHPITSDIKSDCVSHTTLPSCSTANHGCTQCPVGSNVC
Prote/Fur E.d.    GCVGELRVNSDCECHDHPITSDIKSDCVSHTTLPSCSTANHGCTQCPVGSNVC
Igl2 parcial E.d. GCVGELRVNSDCECHDHPITSDIKSDCVSHTTLPSCSTANHGCTQCPVGSNVC
* * * * *

Igl2 E.h.           DKGSCDHRFYDDNVCHGCPASCSGSDYSSKRVVCSGEGYKIGVTTREHEDECAK
Prote/Fur E.d.    DKGSCDHRFYDDNVCHGCPASCSGSDYSSKRVVCSGEGYKIGVTTREHEDECAK
Igl2 parcial E.d. DKGSCDHRFYDDNVCHGCPASCSGSDYSSKRVVCSGEGYKIGVTTREHEDECAK
* * * * *

Igl2 E.h.           IHDYFEGPHEDEKSCQALNHCHEGKVEYLSGDTGDLDDGAYVUSGVAQCQEG
Prote/Fur E.d.    IHDYFEGPHEDEKSCQALNHCHEGKVEYLSGDTGDLDDGAYVUSGVAQCQEG
Igl2 parcial E.d. IHDYFEGPHEDEKSCQALNHCHEGKVEYLSGDTGDLDDGAYVUSGVAQCQEG
* * * * *

Igl2 E.h.           SPNAPFDNRKCGDSTWQSYGKSCASATAGITCEDIMLLITGKPF---GTVGCDGFY
Prote/Fur E.d.    SPNAPFDNRKCGDSTWQSYGKSCASATAGITCEDIMLLITGKPF---GTVGCDGFY
Igl2 parcial E.d. SPNAPFDNRKCGDSTWQSYGKSCASATAGITCEDIMLLITGKPF---GTVGCDGFY
* * * * *

Igl2 E.h.           QLENDGDVYVSPGPAKCTCYNTTSGQVECVTEQLELDIKAFKCACTGTVQLENG
Prote/Fur E.d.    QLENDGDVYVSPGPAKCTCYNTTSGQVECVTEQLELDIKAFKCACTGTVQLENG
Igl2 parcial E.d. QLENDGDVYVSPGPAKCTCYNTTSGQVECVTEQLELDIKAFKCACTGTVQLENG
* * * * *

Igl2 E.h.           TQGSCLSKYFGGCTTTDQVNAKTYIYATECSDFSGSSEPSYNTACTLSNYPYFEG
Prote/Fur E.d.    TQGSCLSKYFGGCTTTDQVNAKTYIYATECSDFSGSSEPSYNTACTLSNYPYFEG
Igl2 parcial E.d. TQGSCLSKYFGGCTTTDQVNAKTYIYATECSDFSGSSEPSYNTACTLSNYPYFEG
* * * * *

Igl2 E.h.           EK-----NGKRCDDIKCATCSMDTCLTCDLKVSGKDDGCKTGYHNSGECQPCTRN
Prote/Fur E.d.    EK-----NGKRCDDIKCATCSMDTCLTCDLKVSGKDDGCKTGYHNSGECQPCTRN
Igl2 parcial E.d. EK-----NGKRCDDIKCATCSMDTCLTCDLKVSGKDDGCKTGYHNSGECQPCTRN
* * * * *

Igl2 E.h.           CSEGSAAEIVCESDYVIVSISGEGNSCVDGVEYDEIKGTEIPCTSPCTGVGKDDCE
Prote/Fur E.d.    CSEGSAAEIVCESDYVIVSISGEGNSCVDGVEYDEIKGTEIPCTSPCTGVGKDDCE
Igl2 parcial E.d. CSEGSAAEIVCESDYVIVSISGEGNSCVDGVEYDEIKGTEIPCTSPCTGVGKDDCE
* * * * *

Igl2 E.h.           EORTGNSKGGKVECTGCTDHDHREVPVWAGVYVGTSTEDNKICDQGLQAK
Prote/Fur E.d.    EORTGNSKGGKVECTGCTDHDHREVPVWAGVYVGTSTEDNKICDQGLQAK
Igl2 parcial E.d. EORTGNSKGGKVECTGCTDHDHREVPVWAGVYVGTSTEDNKICDQGLQAK
* * * * *

Igl2 E.h.           VNEFDSCNSKCLCHREYLEKSGEVCVYVYTSVWGSSEKSGHGHGHTCTGSE
Prote/Fur E.d.    VNEFDSCNSKCLCHREYLEKSGEVCVYVYTSVWGSSEKSGHGHGHTCTGSE
Igl2 parcial E.d. VNEFDSCNSKCLCHREYLEKSGEVCVYVYTSVWGSSEKSGHGHGHTCTGSE
* * * * *

Igl2 E.h.           CTTCEDGWLKDGKNGKGFIFGIDQVHLAFNE
Prote/Fur E.d.    CTTCEDGWLKDGKNGKGFIFGIDQVHLAFNE
Igl2 parcial E.d. CTTCEDGWLKDGKNGKGFIFGIDQVHLAFNE
* * * * *

```

Figura 37. Motivos CXXC presentes en proteínas Igl1 (A) e Igl2 (B). A) Las secuencias de aminoácidos de Igl1 se alinearon con la proteína con repetidos tipo furina y la subunidad intermedia parcial 1 de la lectina Gal/GalNAc, ambas de *E. dispar*, utilizando el servidor "MUSCLE". B) Las secuencias de aminoácidos de Igl2 se alinearon con la proteína con repetidos tipo furina y la subunidad intermedia parcial 2 de la lectina Gal/GalNAc, ambas de *E. dispar*, utilizando el servidor "MUSCLE". Los motivos CXXC están resaltados en gris.

### Análisis macroscópico del daño hepático de la interacción *E. histolytica*-*E. dispar*

Los hámsteres inoculados con *E. histolytica* y *E. histolytica*-*E. dispar* (interaccionadas durante 72 h previas a la inoculación) mostraron del 10 al 23% de daño hepático a los 7 días posteriores a la inoculación (pi) (Figura 12A). Tanto el grupo que fue inoculado con medio (LYI/TYI 50:50) como el grupo inoculado con *E. dispar* no presentaron una lesión macroscópica visible, ni similar al desarrollo de absceso hepático; caso contrario con respecto al grupo de animales inoculados únicamente con trofozoitos de *E. histolytica*, en donde se reportó la producción de lesiones correspondientes al absceso hepático amibiano alrededor del 10- 20%. Dentro del grupo de animales inoculados con *E. histolytica*-*E. dispar* se observó que las lesiones producidas mostraron una morfología consistente con el progreso normal de absceso hepático amibiano, el cual se reportó similar a lo observado en el grupo inoculado únicamente con *E. histolytica*, también se observaron pequeñas lesiones continuas anatómicamente irregulares y blanquecinas. El porcentaje de daño producido por los grupos *E. histolytica* y *E. histolytica*-*E. dispar* fueron comparables y no presentaron diferencias estadísticamente significativas, esto a pesar de que el grupo problema contaba con la mitad de cantidad de trofozoitos patógenos (*E. histolytica*) y en su lugar lo complementaban  $1 \times 10^5$  trofozoitos no patógenos (*E. dispar*). Sin embargo, a pesar de no existir diferencia significativa, el grupo de interacción mostró un incremento en daño del 3% con respecto al de *E. histolytica*. El porcentaje de las lesiones del daño hepático producido por cada uno de los grupos experimentales se reflejan en la figura 12- Gráfica B.

Los animales inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* y *E. histolytica*-*E. dispar* mostraron una disminución en el aumento de peso corporal a través de los días, mientras que el peso corporal de los animales inoculados únicamente con trofozoitos de *E. dispar* y medio, no disminuyeron en su peso corporal al final de los 7 días pi, sino que mostraron un aumento de peso corporal similar (Figura 11- Grafica C).

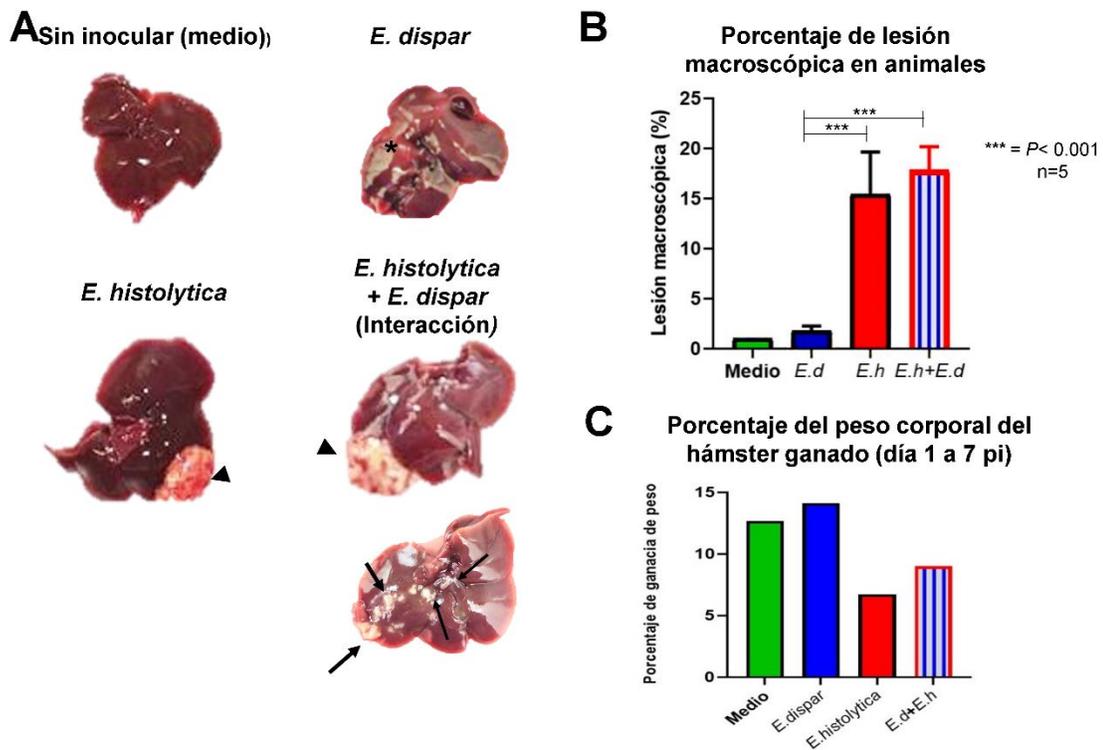


Figura 12. Lesión macroscópica en hámsteres. (A) Lesiones macroscópicas observadas en cada uno de los diferentes grupos 7 días pi, se observa absceso hepático inducido por *E. histolytica* y *E. histolytica* + *E. dispar* (cabezas de flecha) lesiones irregulares observadas atravesando los lóbulos del órgano (flechas), En el grupo de *E. dispar* únicamente se observó una pequeña inflamación en la zona de punción (asterisco) y finalmente el grupo inoculado con medio no se observó ninguna lesión. (B) Porcentaje de lesión macroscópica en hámsteres; no se observó diferencia significativa en el porcentaje de daño ocasionado en los hígados de animales inoculados solo con *E. histolytica* y con *E. histolytica* + *E. dispar*. El valor de  $p$  se calculó mediante la prueba ANOVA \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) Promedio del porcentaje de ganancia de peso de los hámsteres (entre los días 1 a 7 pi) de cada uno de los grupos. Los animales inoculados con *E. histolytica* + *E. dispar* (Interacción) únicamente presentaron cambios en el peso corporal similares a los observados al grupo *E. histolytica*.

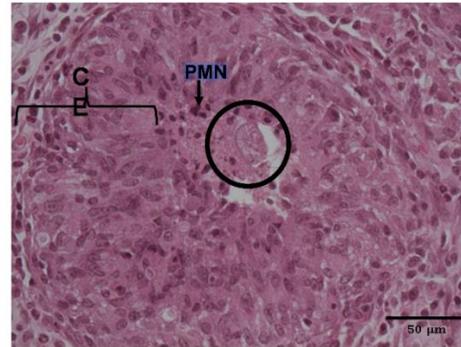
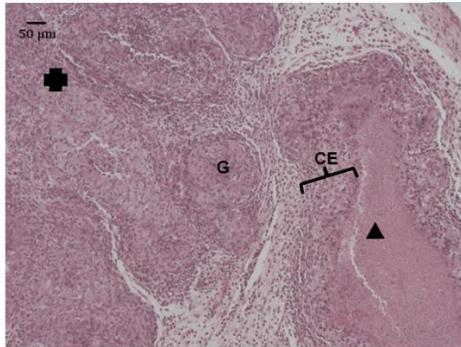
## Análisis histológico de la interacción *E. histolytica*-*E. dispar* durante el desarrollo del absceso hepático.

Pese a la evidente diferencia anatómica en el desarrollo de absceso hepático amibiano entre grupos, durante el análisis histológico resultaron claras las diferencias histopatológicas entre los grupos (Figura 13). Los animales inoculados con *E. histolytica* y *E. histolytica* + *E. dispar* mostraron focos inflamatorios con una infiltración densa de leucocitos polimorfonucleares (PMN), hemorragia, granulomas amibianos típicos de gran tamaño (G), en fusión compuestos por células epitelioides (CE) en el límite externo y extensas áreas necróticas (cabeza de flecha) o infiltrado inflamatorio (IF) crónico en su interior donde fue posible observar trofozoítos (Figura 13 A y B; círculos). Además, se observó proliferación de los conductos biliares (cruz) y pérdida de la organización del parénquima hepático; asimismo fue posible observar en el grupo *E. histolytica* + *E. dispar* extensas lesiones perivasculares y cercanos a estas células, macrófagos hipertróficos (Figura 13B-Elipse). No obstante, el grupo inoculado únicamente con *E. dispar* mostró la presencia de hepatocitos eosinofílicos (HE) e infiltrado inflamatorio perivascular, indicando sufrimiento hepático (Figura 13C-HE).

Finalmente, en hámsteres inoculados solamente con medio TYI/LYI (50:50) se observó la constitución normal del parénquima hepático sin alteración evidente (Figura 13D).

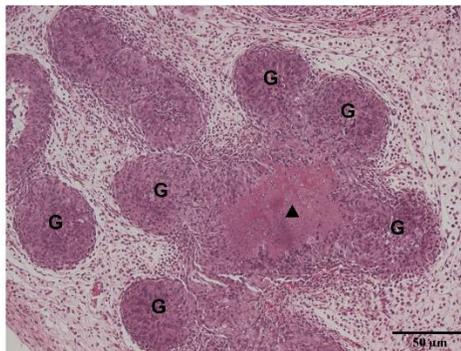
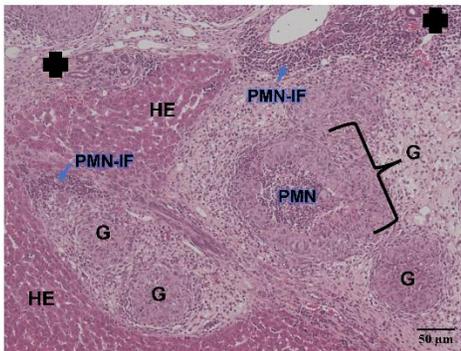
**A**

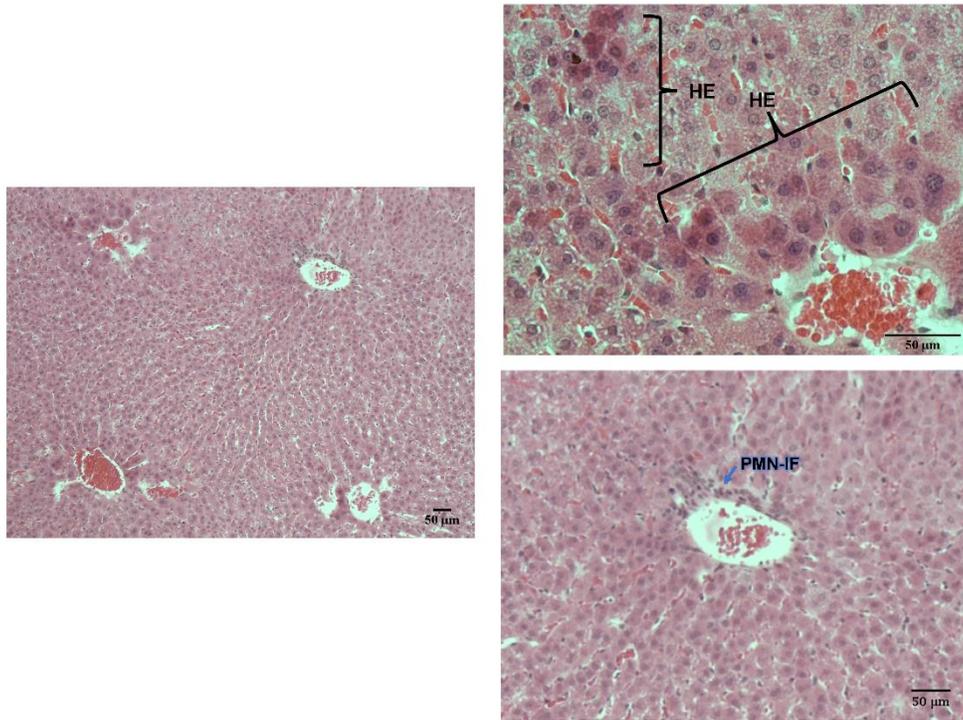
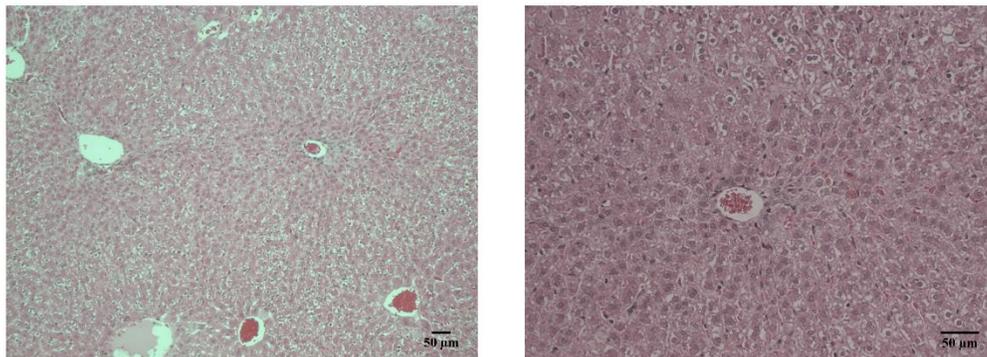
Grupo control : Inoculación con *E. h.* 7 días pi



**B**

Inoculación con *E. h.* + *E. d.* (Interacción) 7 días pi



**C****Grupo control : Inoculación con *E. d.* 7 días pi****D****Grupo control: Sin inocular (medio) 7 días pi**

**Figura 13. Histología del hígado de hámsteres inoculados vía intrahepática con Medio TYI/LYI, *E. dispar*, *E. histolytica* y *E. histolytica* + *E. dispar* 7 días pi. (A) Lesión producida tras la inoculación de *E. histolytica*, se observa al parásito (círculo) dentro del granuloma inflamatorio rodeado de PMN y granuloma irregular con tejido necrosado (cabeza de flecha). (B) Lesión producida por la interacción de *E.h* + *E.d* ( $5 \times 10^5$  trofozoítos de cada**

especie) Granulomas irregulares resultado de la fusión de granulomas inflamatorios y tejido necrótico en su interior (Cabeza de flecha); lesión perivascular con extenso infiltrado inflamatorio (PMN-IF), macrófagos hipertróficos (Elipse) cercanos a trofozoítos (círculo) adyacente a vena. (C) Inoculación con *E. dispar*; se observan Hepatocitos eosinofílicos (HE) e infiltrado inflamatorio perivascular (PMN-IF) (D) Inoculación con medio; parénquima hepático sin lesión evidente. Tinción con hematoxilina-eosina. Escala micrométrica = 50  $\mu\text{m}$ .

### DISCUSIÓN

La infección amibiana causada por *E. histolytica* es un problema de salud pública (OMS, OPS 1997). La presencia de otra especie de amiba no patógena morfológicamente indistinguible *E. dispar* en la luz del intestino, ha ocasionado la sobreestimación del agente responsable de un episodio amibiano (Rojas y col. 2016; Soares y col. 2019) ya que, estudios recientes han reportado un importante potencial patogénico en *E. dispar*, esto en condiciones experimentales, y principalmente cubando esta especie se encuentra en co-cultivo con alguna otra (Fernández-López y col. 2019; Soares y col. 2019). Por otra parte, el riesgo de co-infección y la existencia de infecciones mixtas producidas por *E. histolytica* y *E. dispar* se han reportado alrededor del mundo (Acuna-Soto y col. 1993; Al-Hindi y col. 2005; Khairnar y Parija 2007; Pysova y col. 2009; Rojas y col. 2016).

#### Reestructuración de actina entre especies y formación de estructuras especializadas.

La polimerización de actina durante la colonización e invasión de células es un evento muy importante durante el proceso de adhesión (Manich y col. 2018), al llevarse a cabo la nucleación de monómeros de actina G a fibras de actina F. Esta polimerización resulta fundamental para el movimiento de la célula, a través de la formación de diferentes estructuras especializadas (Blanchoin y col. 2013). A su vez, la organización del citoesqueleto genera una variedad de procesos biológicos y activación de vías de señalización, todos ellos incluidos durante la patogénesis de la amibiasis. Por esta razón fue indispensable realizar un estudio sobre las diferencias morfológicas observadas entre *E. histolytica* y *E. dispar*, así como en la interacción de ambas, a través de la reestructuración del citoesqueleto de actina. Los resultados de nuestro estudio reportaron diferencias entre la polimerización de actina de cada grupo, sin embargo, en el grupo problema de interacción destaca una mayor polimerización de actina con respecto a *E. histolytica* en condiciones de vidrio; en condiciones de FN se reduce esta diferencia, lo que sugiere una interacción

óptima de ambas especies en un mismo cultivo. Estos resultados correlacionan con el comportamiento de la polimerización de actina de cada especie donde la expresión de actina es menor en FN, pero aparecen estructuras más especializadas adheridas hacia el sustrato (Talamás-Lara y col., 2015). Probablemente esto indique que el cultivo de interacción tiene un re-arreglo de citoesqueleto específico dependiendo del sustrato en el que esté interaccionando y que la población de ambas mixtas tenga una regulación específica. De igual manera, dentro del análisis morfológico, se observó un incremento en la formación de lamelopodios y filopodios en mayor porcentaje en la condición de interacción de ambas especies con respecto a cada organismo independiente. Este hallazgo corresponde con lo reportado en nuestro grupo de trabajo donde la activación significativamente mayor de GTPasas pequeñas como Cdc42 en *E. dispar* y Rac1 en *E. histolytica* activan la vía de señalización que origina la formación de filopodios y lamelopodios respectivamente. (Talamás-Lara y col. 2020) sugiriendo un equilibrio e integración de ambas cepas en un mismo cultivo. Al respecto, es relevante señalar que algunas células tumorales humanas procedentes de diversos tipos de cáncer han reportado una expresión elevada de genes pertenecientes a la familia Rho de GTP-asas, dicha expresión ha sido relacionada con un aumento del fenotipo invasivo y metastásico de estas células (Karlsson y col. 2009; Raquel, Haga, y Ridley 2016) lo cual en nuestro modelo de estudio relaciona con la expresión de estas estructuras y probablemente sugiera un incremento en la virulencia de un co-cultivo de *E. histolytica* con *E. dispar* debido a que la presencia de otra especie podría ocasionar un fenómeno de competencia (Gao y col. 2020) así como transferencia horizontal (Virolle y col. 2020).

#### Expresión de la molécula tipo integrina reconocida por el anticuerpo 3C10 en *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

El grupo control *E. histolytica* (Figura 9A) presentó una clara marca del anticuerpo 3C10 en la periferia de la membrana, tales observaciones coinciden con lo reportado por (Sengupta y col. 2001; Tachibana y col. 2007). Además fue posible apreciar en este grupo la presencia del anticuerpo 3C10 con una intensidad ligeramente distinta en vacuolas dentro

del trofozoíto, los cuales corresponden a fagosomas que transportan al receptor a fibronectina de 140 kDa en el interior, y la cantidad de éste varía durante la maduración del fagosoma (Okada y col. 2005); este receptor corresponde a la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc, principalmente a la IgI2 (Talamas-Rohana y col. 1992; Tachibana y col. 2007) que continuamente se recicla del interior de la célula al exterior de la membrana (Sengupta y col. 2001). Sin embargo, este no fue el único grupo que presentó una evidente presencia de la marca de este anticuerpo. El grupo problema de interacción en vidrio también presentó el reconocimiento por parte del anticuerpo contra el receptor a fibronectina, incluyendo trofozoítos de *E. dispar* marcados con Vybrant Dio Cell, e incluso se vio más acentuado este fenómeno en FN sugiriendo una importante interacción entre dicha población donde se sugiere que posiblemente se llevó a cabo una transferencia horizontal de genes o una competencia de factores de virulencia, como ocurriría con algunas bacterias, las cuales realizan dicha conjugación a través del pillis (Virolle y col. 2020). Otro ejemplo de dicho fenómeno son las células cancerígenas, las cuales se ha demostrado que son capaces de externar nanotubos de túnel (TNT) hacia otras células a los cuales se les atribuyen diversas funciones como comunicación celular, transferencia intracelular, y en el caso de células cancerígenas, propagación de patógenos, organelos o partículas virales (Austefjord, Gerdes, y Wang 2014; X. Wang, Bukoreshtliev, y Gerdes 2012); estas estructuras ricas en actina (filopodios observados con mayor frecuencia en la interacción de ambas especies en sustrato de FN) forman un puente, el cual puede originarse de distintas maneras; entre ellas, mediante la interacción filopoidal, ya que pueden derivarse de la formación e interacción de filopodios (Austefjord, Gerdes, y Wang 2014), tal y como fue observado por Talamás-Lara y col, (2020), quienes observaron una relación morfológica y diferencias en el comportamiento de *E. dispar* a través de la activación de diversas GTPasas como las GTPasas de la familia Rho, Cdc42 en conjunto con ARP 2/3, dando como resultado la formación mayoritaria de filopodios al someterse al estímulo de fibronectina (Pérez-González 2020; Talamás-Lara y col. 2020), de la misma manera en la que se observó durante nuestro estudio, al realizar un análisis morfológico a través de MEB (Fig. 6 y 7).

## Análisis bioinformático de la lectina Gal/GalNAc en *E. histolytica* y sus respectivos homólogos en *E. dispar*.

Al presente, la accesibilidad a las secuencias de proteínas y genomas de *E. histolytica* y de *E. dispar* ha permitido realizar análisis complejos y ha apoyado de una manera importante a la comprensión acerca de diversos procesos sobre divergencia genética interacción de proteínas y expresión de genes. Particularmente en nuestro estudio se realizó una comparación de las proteínas que integran a la lectina Gal/GalNAc tanto en *E. histolytica* como en *E. dispar*, esta comparación con el fin de profundizar en los mecanismos de patogenicidad de las amibas y debido también a los resultados mostrados por microscopía confocal.

Durante el análisis de cada una de las proteínas en ambas especies fue clara que las diferencias más evidentes se observan en la subunidad intermedia, además de que como ya se mencionó, esta proteína está implicada en la adherencia del trofozoíto mediante el receptor a fibronectina. Por lo tanto se decidió enfocarse en el análisis de esta molécula, ya que la capacidad de adhesión es una de las principales diferencias entre *E. dispar* y *E. histolytica* (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo 2000; Talamás-Lara y col. 2015).

La determinación de la estructura primaria de Igl es importante dentro del conocimiento de su función. Adicionalmente dentro de la interacción que se conoce, esta subunidad interacciona con las subunidades Hgl y Lgl en la membrana plasmática de *E. histolytica*. Esto propone un papel cooperativo en la interacción huésped-parásito (Cheng y col. 2001). En nuestro análisis se encontró que la mayoría de los motivos CXXC se conservaron en las proteínas *EhIgl* con respecto a los dos homólogos analizados en *E. dispar*, sugiriendo de esta forma que el pliegue otorgado por este motivo es importante para la función de adhesión (Tachibana y col. 2007); asimismo se sugiere que la proteína con repetidos de furina podría estar realizando una función similar a la de la Igl dentro de la interacción huésped-parásito, ya que como se observó, en el caso de Igl1 (Fig 28) no se reportó una coincidencia representativa en el modelado tridimensional, con la subunidad intermedia 1 de *E. histolytica*; se sugiere que esto podría ser una de las razones por las que

en la adhesión de *E. dispar* se observe una menor eficiencia que en la de *E. histolytica* (Sengupta y col. 2001; Talamás-Lara y col. 2015). Por esta misma razón así como la Hgl, la Igl es una molécula clave para fines de diagnóstico (Tachibana y col. 1997) tal cual han demostrado Tachibana y col., (2004) al emplear una Igl reconocida por sueros de pacientes con amibiasis (Tachibana y col. 2004) y que por lo tanto se puede considerar como una interesante candidata para vacuna (Tachibana H, Cheng XJ, Masuda G, Horiki N, y col. 2004).

#### Análisis de la interacción *E. histolytica*-*E. dispar* y el daño hepático macroscópico.

Debido a lo observado durante el análisis de la presencia del receptor a fibronectina, resultó de nuestro interés analizar qué consecuencias podría ocasionar la co-existencia de *E. histolytica* y *E. dispar* en un modelo animal. Los resultados de nuestro estudio mostraron un hallazgo importante, ya que a pesar de que el grupo de interacción contaba con la mitad de los trofozoítos de la especie patógena (*E. histolytica*), el daño observado fue ligeramente mayor (3%, aunque sin diferencia estadísticamente significativa) al que se observó solamente con *E. histolytica*, siendo esta especie el agente etiológico de la amibiasis y organismo responsable de originar la complicación extraintestinal de absceso hepático amibiano. La reducción en el aumento normal del peso de los animales y el análisis histológico de las lesiones hepáticas sugirió una progresión de las lesiones muy similar a la ocurrida por la presencia del patógeno *E. histolytica*. Tal y como se ha observado en otros estudios, en donde la presencia de otro organismo en co-cultivo ocasiona el aumento en la virulencia y en la gravedad de lesiones producidas al inocular las amibas en el hígado de un modelo animal (Dolabella y col. 2012; Fernández-López y col. 2019; Kobayashi y col. 1998). Este fenómeno sugiere que podría haber sido provocado debido a la co-existencia de ambas especies dentro del modelo, ya sea por competencia natural, variación del genotipo (Ximénez y col. 2010), transferencia intracelular como se ha observado en una variedad de modelos, células de cáncer de mama y otras líneas celulares como PC12, HEK 293, ARPE-19-etc., a través de filopodios y TNT (Austefjord, Gerdes, y Wang 2014). Esta situación podría explicar la presencia de *E. dispar* en muestras obtenidas de lesiones graves de absceso

hepático (Costa y col. 2010; Ximénez y col. 2010; Dolabella y col. 2012; Costa y col. 2010) y sin duda constituye un primer dato de la importancia de la investigación de la naturaleza de las infecciones intestinales mixtas por parte de *E. histolytica* y *E. dispar*, así como la relevancia de la realización de un diagnóstico adecuado para infecciones mixtas.

## CONCLUSIÓN

La interacción de ambas especies en un medio en el que ambas pudiesen coexistir mostró:

1. Coexistencia de ambas con base en la presencia de filopodios (*E. dispar*) y lamelopodios (*E. histolytica*).
2. Aumento en la expresión del  $\beta 1EhFNR$  en trofozoítos de *E. dispar* cuando se encontraban en interacción con *E. histolytica* (principalmente al interactuar con fibronectina).
3. Re-arreglo de localización estructural en la polimerización de actina en vidrio y en fibronectina.

La comparación de cada una de las subunidades de la lectina Gal/GalNAc en *E. histolytica* y *E. dispar* mostró que:

1. La proteína que contiene repetidos de furina de *E. dispar* a pesar de reportar una similitud de 87% y una identidad de 76.5%, no coincide en el modelado tridimensional con la subunidad intermedia 1 de *E. histolytica*.
2. En el caso de la subunidad intermedia 2, se reporta 86.2 % de similitud y 75.7 % de identidad y coincidencia a lo largo de la secuencia en el modelado tridimensional entre ambas especies.
3. Estudios experimentales más profundos y específicos serán necesarios para encontrar una respuesta en el comportamiento diferencial del receptor a fibronectina en ambas especies.

La coexistencia de ambas especies al ser inoculadas intrahepáticamente dentro de un modelo animal sugiere que:

1. La interacción entre las dos especies podría influir en el incremento de virulencia de alguna o ambas especies para la producción de absceso hepático.

## PERSPECTIVAS

1. Realizar el marcaje genético de cada una de las especies mediante GFP y RFP con el fin de discernir entre ellas durante la realización de experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*”.
2. Realizar una cinética de la curva de crecimiento dentro de las primeras 96 horas de interacción, cuantificando la población de cada una de las especies mediante citometría de flujo.
3. Realizar un seguimiento de la cinética de la infección “*in vivo*” en hámsteres a los 1, 3 y 5 días post-inoculación.
4. Reproducir el objetivo “*in vivo*” aumentando el número de hámsteres de cada uno de los grupos y añadiendo un grupo control al que únicamente se le inoculen  $5 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica*.
5. Realizar la cuantificación de citocinas proinflamatorias en el tejido de la muestra histológica.
6. Realizar estudios bioinformáticos más profundos acerca de las características estructurales y funcionales del receptor a fibronectina en ambas especies.

## REFERENCIAS

- Acuna-Soto, R. y col. 1993. "Application of the Polymerase Chain Reaction to the Epidemiology of Pathogenic and Nonpathogenic *Entamoeba Histolytica*." In *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, , 58–70.
- Agarwal, Shalini y col. 2019. "EhP3, a Homolog of 14-3-3 Family of Protein Participates in Actin Reorganization and Phagocytosis in *Entamoeba Histolytica*." *PLoS Pathogens* 15(5): 1–25.
- Al-Hindi, A y col. 2005. "*Entamoeba Histolytica* or *Entamoeba Dispar* among Children in Gaza, Gaza Strip?" *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 35(1): 59–68.
- Alberts, B y col. 2009. *Archives of Biochemistry and Biophysics Essential Cell Biology*.
- . 2014. "The Cytoskeleton." In *Molecular Biology of the Cell*, ed. Omega. , 787–847.
- Alvarado-Esquivel, Cosme, Luis Francisco Sánchez-Anguiano, y Jesús Hernández-Tinoco. 2015. "Seroepidemiology of *Entamoeba Histolytica* Infection in General Population in Rural Durango, Mexico." *Clinical Medical Research* 2015(6): 435–39.
- Anonymus. 1997. "Amoebiasis." *Wkly Epidemiol Rec.* 72(14): 97–100.
- Arguello C, Valenzuela B, Rangel E. 1992. "Structural Organization of Chromatin during the Cell Cycle of *Entamoeba Histolytica* Trophozoites." *Arch Med Res.*
- Aus Kettis A, Lindman K, Fagraeus A. 1977. "Actin in *Entamoeba Histolytica* Trophozoites Revealed by Human Actin Antibodies." *Journal of Parasitology* 63: 581–583.
- Austefjord, MW, H Gerdes, y X Wang. 2014. "Tunneling Nanotubes: Diversity in Morphology and Structure." *Communicative and Integrative Biology* 7(2).
- Bailey, G, D Day, C Nokkaew, y C Harper. 1987. "Stimulation by Target Cell Membrane

- Lipid of Actin Polymerization and Phagocytosis by *Entamoeba Histolytica*." *Infection and Immunity* 55(8): 1848–53.
- Bailey, GB. 1992. "Entamoeba Motility: Cytoplasmic Current Dynamics, Locomotion and Organization of the Actin Cytoskeleton in *Entamoeba Invadens*." *J Protozool* 39: J Protozool.
- Blanchoin, L, R Boujemaa-Paterski, C Sykes, y J Plastino. 2013. "Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility." *American Physiological Society* 94: 235–63.
- Calegar, D y col. 2016. "Frequency and Molecular Characterisation of *Entamoeba Histolytica*, *Entamoeba Dispar*, *Entamoeba Moshkovskii*, and *Entamoeba Hartmanni* in the Context of Water Scarcity in Northeastern Brazil." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 111(2): 114–19.
- Campos-Rodríguez, R y col. 2016. "A Review of the Proposed Role of Neutrophils in Rodent Amebic Liver Abscess Models." *Parasite* 23.
- Chacín-Bonilla, L. 2010. "Amibiasis: Implicaciones Del Reconocimiento de *Entamoeba Dispar* e Identificación de *Entamoeba Moshkovskii* En Humanos." *Investigacion Clinica*.
- Chávez-Munguía, B, V Tsutsumi, y A Martínez-Palomo. 2006. "Entamoeba Histolytica: Ultrastructure of the Chromosomes and the Mitotic Spindle." *Experimental Parasitology* 114(3): 235–39.
- Cheng, XJ y col. 2001. "Intermediate Subunit of the Gal/GalNAc Lectin of *Entamoeba Histolytica* Is a Member of a Gene Family Containing Multiple CXXC Sequence Motifs." *Infection and Immunity* 69(9): 5892–98.
- Clark, C. Graham. 1995. "Axenic Cultivation of *Entamoeba Dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba Insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba Ranarum* Grassi 1879." *Journal of Eukaryotic Microbiology*.

- Costa, A, M Aparecida-Gomes, O Rocha, y E Silva. 2006. "Pathogenicity of *Entamoeba Dispar* under Xenic and Monoxenic Cultivation Compared to a Virulent *E. Histolytica*." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 48(5): 245–50.
- Costa C, Brito K, Gomes M, Caliar M. 2010. "Histopathological and Immunohistochemical Study of the Hepatic Lesions Experimentally Induced by *Entamoeba Dispar*." *European Journal of Histochemistry* 54(3): 170–74.
- Costa, C y col. 2010. "*Entamoeba Histolytica* and *E. Dispar* Trophozoites in the Liver of Hamsters: In Vivo Binding of Antibodies and Complement." *Parasites and Vectors* 3(1).
- Diamond, Louis S., y C. Graham Clark. 1993. "A Redescription of *Entamoeba Histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It From *Entamoeba Dispar* Brumpt, 1925." *Journal of Eukaryotic Microbiology*.
- Dodson, J. y col. 1997. "Comparison of Adherence, Cytotoxicity, and Gal/GalNAc Lectin Gene Structure in *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar*." *Parasitology International* 46(3): 225–35.
- Dolabella, S y col. 2012. "Amoebic Liver Abscess *Entamoeba Dispar* Production by." *Annals of Hepatology* 11(1): 107–17.
- Dominguez, R, y K Holmes. 2011. "Actin Structure and Function." *Annual Review of Biophysics* 40(1): 169–86.
- Espinosa-Cantellano, M, y A Martínez-Palomo. 2000. "Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease." *Clinical Microbiology Reviews* 13(2): 318–31.
- Fernández-López, L. y col. 2019. "*Entamoeba Histolytica* Interaction with Enteropathogenic *Escherichia Coli* Increases Parasite Virulence and Inflammation in Amebiasis." *Infection and Immunity* 87(12): 1–15.
- Flores-Robles, D, C Rosales, JL Rosales-Encina, y P Talamás-Rohana. 2003. "*Entamoeba Histolytica*: A B1 Integrin-like Fibronectin Receptor Assembles a Signaling Complex

- Similar to Those of Mammalian Cells." *Experimental Parasitology* 103(1–2): 8–15.
- Frederick JR, Petri WA. 2005. "Roles for the Galactose-/N-Acetylgalactosamine-Binding Lectin of *Entamoeba* in Parasite Virulence and Differentiation." *Glycobiology*.
- Fujiwara, I y col. 2018. "Polymerization and Depolymerization of Actin with Nucleotide States at Filament Ends." *Biophysical Reviews* (Wegner 1976): 1–7.  
<http://link.springer.com/10.1007/s12551-018-0483-7>.
- Galván-Moroyoqui, JM, M Domínguez-Robles, E Franco, y I Meza. 2008. "The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(7).
- Gao, VD y col. 2020. "Resource Competition Shapes Biological Rhythms and Promotes Temporal Niche Differentiation in a Community Simulation." *Ecology and Evolution* 10(20): 11322–34.
- Gomes, MA. y col. 1999. "An Improved Method to Distinguish *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar*." *Parasitology* 119(4): 359–62.
- Haque, R, P Duggal, y IM Ali. 2002. "Resistencia Innata y Adquirida a La Amebiasis En Niños de Bangladesh." *J Infect Dis* 86: 547–52.
- Hernández-Ramírez, V y col. 2007. "Subcellular Distribution of the *Entamoeba Histolytica* 140 KDa FN-Binding Molecule during Host-Parasite Interaction." *Parasitology*.
- Karlsson, R, ED Pedersen, Z Wang, y C Brakebusch. 2009. "Rho GTPase Function in Tumorigenesis." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1796(2): 91–98.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.003>.
- Kato, K, T Makiuchi, X Cheng, y H Tachibana. 2017. "Comparison of Hemolytic Activity of the Intermediate Subunit of *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar* Lectins." *PLoS ONE* 12(7): 1–16.
- Khairnar, K, y SC Parija. 2007. "A Novel Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Differential Detection of *Entamoeba Histolytica*, *E. Moshkovskii* and *E.*

- Dispar* DNA in Stool Samples." *BMC Microbiology* 7: 1–9.
- Kobayashi, S y col. 1998. "Entamoeba Dispar: Cultivation with Sterilized *Crithidia Fasciculata*." In *Journal of Eukaryotic Microbiology*,.
- Laughlin, R., y L. Temesvari. 2005. "Cellular and Molecular Mechanisms That Underlie *Entamoeba Histolytica* Pathogenesis: Prospects for Intervention." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7(13): 1–19.
- Leippe, M y col. 1994. "Amoebapores, a Family of Membranolytic Peptides from Cytoplasmic Granules of *Entamoeba Histolytica*: Isolation, Primary Structure, and Pore Bacterial Cytoplasmic Membranes." *Molecular Microbiology* 14(5): 895–904.
- Lyubimova A, Bershadsky AD, Ben-Ze'ev A. 1997. "Autoregulation of Actin Synthesis Responds to Monomeric Actin Levels." *J Cell Biochem* 65(4): 469-478,.
- Manich, M y col. 2018. "Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in *Entamoeba Histolytica*." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8(May): 1–16.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00179/full>.
- Mansuri, M, S Bhattacharya, y A Bhattacharya. 2014. "A Novel Alpha Kinase EhAK1 Phosphorylates Actin and Regulates Phagocytosis in *Entamoeba Histolytica*." *PLoS Pathogens* 10(10).
- Martínez-Palomo, A. 1987. "The Pathogenesis of Amoebiasis." *Parasitology Today* 3(4): 111–1118.
- Martinez-Palomo, A. 1983. "The Biology of *Entamoeba Histolytica*." *Research Studies Press* 87(3): 539.
- McCoy, JJ, BJ Mann, y WA Petri. 1994. "Erratum: Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba Histolytica* or How Lectins Let Parasites Stick Around." *Infection and Immunity* 62(8): 3045–50.
- Meza, I y col. 1987. "Use of Antibodies to Characterize a 220-Kilodalton Surface Protein from *Entamoeba Histolytica*." *Journal of Infectious Diseases* 156(5): 798–805.

- . 2000. "Extracellular Matrix-Induced Signaling in *Entamoeba Histolytica*: Its Role in Invasiveness." *Parasitology Today* 16(1): 23–28.
- Meza, I, M Sabanero, F Cazares, y J Bryanf. 1983. "Isolation and Characterization of Actin from *Entamoeba Histolytica*." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 258(6): 3936–41.
- Mitra, BN y col. 2005. "Differences in Morphology of Phagosomes and Kinetics of Acidification and Degradation in Phagosomes between the Pathogenic *Entamoeba Histolytica* and the Non-Pathogenic *Entamoeba Dispar*." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 62(2): 84–99.
- Nagae, M y col. 2012. "Crystal Structure of A5 $\beta$ 1 Integrin Ectodomain: Atomic Details of the Fibronectin Receptor." *Journal of Cell Biology* 197(1): 131–40.
- Nickel, R, C Ott, T Dandekar, y M Leippe. 1999. "Pore-Forming Peptides of *Entamoeba Dispar*. Similarity and Divergence to Amoebapores in Structure, Expression and Activity." *European Journal of Biochemistry* 265(3): 1002–7.
- Ocádiz, R y col. 2005. "EhCP112 Is an *Entamoeba Histolytica* Secreted Cysteine Protease That May Be Involved in the Parasite-Virulence." *Cellular Microbiology* 7(2): 221–32.
- Okada, M y col. 2005. "Proteomic Analysis of Phagocytosis in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba Histolytica*." *Eukaryotic Cell* 4(4): 827–31.
- Olivos-García, A y col. 2004. "Inflammation, Complement, Ischemia and Amoebic Survival in Acute Experimental Amoebic Liver Abscesses in Hamsters." *Experimental and Molecular Pathology* 77(1): 66–71.
- OMS, OPS, UNESCO. 1997. "Informe de La OMS/OPS/UNESCO: Consulta Con Expertos En Amibiasis (Ciudad de México)." *Boletín Epidemiológico* 18: 13–14.
- Pérez-González, V. 2020. "Determinación de Crecimiento Óptimo, Análisis Morfológico y de Estructuración de Actina En *Entamoeba Dispar*."
- Petri, WA y col. 1989. "Subunit Structure of the Galactose and N-Acetyl-D-Galactosamine-

- Inhibitable Adherence Lectin in *Entamoeba Histolytica*." *Journal of Biological Chemistry* 264(5): 3007–12.
- Petri, WA, R Haque, y B Mann. 2002. "The Bittersweet Interface of Parasite and Host: Lectin-Carbohydrate Interactions during Human Invasion by the Parasite *Entamoeba Histolytica*." *Annual Review of Microbiology* 56: 39–64.
- Pillai, D y col. 1997. "A Gene Homologous to Hgl2 of *Entamoeba Histolytica* Is Present and Expressed in *Entamoeba Dispar*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 87(1): 101–5.
- Pollard, TD, y J Cooper. 2009. "Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement." *Science* 326(5957): 1208–12.
- Pysova, I, P Tumova, V Tolarova, y E Nohynkova. 2009. "Nonpathogenic *Entamoeba Dispar* Quickly Outgrows Pathogenic *Entamoeba Histolytica* in Mixed Xenic Cultures." *Letters in Applied Microbiology* 48(4): 500–503.
- Que, X, y S Reed. 2000. "Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis." *Clinical Microbiology Reviews* 13(2): 196–206.
- Ramakrishnan, G, B Ragland, J Purdy, y B Mann. 1996. "Physical Mapping and Expression of Gene Families Encoding the N-Acetyl D-Galactosamine Adherence Lectin of *Entamoeba Histolytica*." *Molecular Microbiology* 19(1): 91–100.
- Raquel, B., Haga, y A and Ridley. 2016. "Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology." *Small GTPases* 7(4): 207–21.  
<http://dx.doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
- Ravdin, Jonathan I. 1995. "Amebiasis." *Clinical Infectious Diseases*.
- Raz, E, E Schetjer, y B Shilo. 1991. "Interallelic Complementation among DER/F1b Alleles: Implications for the Mechanism of Signal Transduction by Receptor-Tyrosine Kinases." *Genetics* 129(1): 191–201.
- Rojas, L y col. 2016. "*Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar* Infection in Mexican

- School Children: Genotyping and Phylogenetic Relationship." *BMC Infectious Diseases* 16(1): 1–12. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1812-8>.
- Rosales-Encina, JL y col. 1987. "Isolation of a 220-Kilodalton Protein with Lectin Properties from a Virulent Strain of *Entamoeba Histolytica*." *Journal of Infectious Diseases* 156(5): 790–97.
- Ruoslahti, E, E Hayman, M Pierschbacher, y E Engvall. 1982. "Fibronectin: Purification, Immunochemical Properties, and Biological Activities." *Methods in Enzymology* 82(C): 803–31.
- Sabanero, M, y I Meza. 1982. "Localization of Actin in Trophozoites of *Entamoeba Histolytica* HM1." *Arch Invest Med (Mex)* 13((Suppl. 3)): 37–42.
- Sargeant, P, J Williams, y J. Grene. 1978. *The Differentiation of Invasive and Non-Invasive Entamoeba Histolytica by Isoenzyme Electrophoresis*. Volume 72,. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90174-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90174-8).
- Schaffner, F, AM Ray, y M Dontenwill. 2013. "Integrin A5 $\beta$ 1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors." *Cancers* 5(1): 27–47.
- Sengupta, K y col. 2001. "Entamoeba Histolytica: Monoclonal Antibody against the B1 Integrin-like Molecule (140 KDa) Inhibits Cell Adhesion to Extracellular Matrix Components." *Experimental Parasitology* 98(2): 83–89.
- . 2009. "Physical, Structural, and Functional Properties of the B1 Integrin-like Fibronectin Receptor (B1EhFNR) in *Entamoeba Histolytica*." *Infection, Genetics and Evolution* 9(5): 962–70.
- Serrano-Luna, J y col. 2013. "Proteases from *Entamoeba Spp.* and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors." *Journal of Tropical Medicine* 2013: 1–32.
- Sheterline, P, J Clayton, y J Sparrow. 1995. "Actin. In: Protein Profile ." *Academic* 2(1): 1–103.
- Shibayama, M, S Dolabella, E Silva, y V Tsutsumi. 2007. "A Brazilian Species of *Entamoeba*

- Dispar* (ADO) Produces Amoebic Liver Abscess in Hamsters." *Annals of Hepatology* 6(2): 117–18. [http://dx.doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31943-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31943-X).
- Shirley, D, L Farr, K Watanabe, y S Moonah. 2018. "A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis." *Open Forum Infectious Diseases* 5(7): 1–9.
- Shirley, D, K Watanabe, y S Moonah. 2019. "Significance of Amebiasis: 10 Reasons Why Neglecting Amebiasis Might Come Back to Bite Us in the Gut." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(11): 1–11.
- Silva-Oliveira, F, E Neumann, M Aparecida-Gómes, y M Vidigal-Caliari. 2015. "*Entamoeba Dispar*: Could It Be Pathogenic." *Tropical Parasitology* 5(1): 9.
- Soares, N y col. 2019. "A Cross-Sectional Study of *Entamoeba Histolytica/Dispar/Moshkovskii* Complex in Salvador, Bahia, Brazil." *BioMed Research International* 2019.
- Stanley, SL, H Huizenga, y E Li. 1992. "Isolation and Partial Characterization of a Surface Glycoconjugate of *Entamoeba Histolytica*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 50(1): 127–38.
- Sutherland, M. 1995. "Microfilament Organization and Actin-Binding Proteins." *The Cytoskeleton Structure and assembly*. 1: 1–45.
- Tachibana, H y col. 2004. "Evaluation of Recombinant Fragments of *Entamoeba Histolytica* Gal/GalNAc Lectin Intermediate Subunit for Serodiagnosis of Amebiasis." *J Clin Microbiol.* 42(3): 1069–74.
- — —. 2007. "Primary Structure, Expression and Localization of Two Intermediate Subunit Lectins of *Entamoeba Dispar* That Contain Multiple CXXC Motifs." *Parasitology* 134(14): 1989–99.
- Tachibana, H, S Kobayashi, XJ Cheng, y E Hiwatashi. 1997. "Differentiation of *Entamoeba Histolytica* from *E. Dispar* Facilitated by Monoclonal Antibodies against a 150-KDa

- Surface Antigen." *Parasitology Research* 83(5): 435–39.
- Talamás-Lara, D y col. 2014. "Erythrophagocytosis in *Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar*: A Comparative Study." *BioMed Research International* 2014: 1–10.
- . 2015. "Cell-Matrix Interactions of *Entamoeba Histolytica* and *E. Dispar*. A Comparative Study by Electron-, Atomic Force- and Confocal Microscopy." *Experimental Cell Research* 337(2): 226–33.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.030>.
- . 2020. "*Entamoeba Histolytica* and *Entamoeba Dispar*: Morphological and Behavioral Differences Induced by Fibronectin through GTPases Activation and Actin-Binding Proteins." *Journal of Eukaryotic Microbiology*: 491–504.
- Talamás-Rohana, P, V Hernández--Ramírez, y JL Rosales-Encina. 1994. "A $\beta$ 1 Integrin-like Molecule in-*Entamoeba Histolytica*." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88(5): 596–99.
- Talamás-Rohana, P, y I Meza. 1988. "Interaction between Pathogenic Amebas and Fibronectin: Substrate Degradation and Changes in Cytoskeleton Organization." *Journal of Cell Biology* 106(5): 787–1794.
- Talamas-Rohana, P, y A Rios. 2000. "Actin Stress Fibers in *Entamoeba Histolytica* Induced by Fibronectin." *Archives of Medical Research* 31(4 SUPPL. 1): 131–33.
- Talamás-Rohana, P, JL Rosales-Encina, MC Gutierrez, y V Hernandez. 1992. "Identification and Partial Purification of an *Entamoeba Histolytica* Membrane Protein That Binds Fibronectin." *Archives of Medical Research* 23(2): 119–23.
- Tannich, E, RD Horstmann, J Knobloch, y HH Arnold. 1989. "Genomic DNA Differences between Pathogenic and Nonpathogenic *Entamoeba Histolytica*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(13): 5118–22.
- Tanyuksel, M, y WA Petri. 2003. "Laboratory Diagnosis of Amebiasis." *Clinical Microbiology*

*Reviews* 16(4): 713–29.

Trejos-Suárez, J, y J Castaño-Osorio. 2009. “Factores de Virulencia Del Patógeno Intestinal *Entamoeba Histolytica*.” *Infectio* 13(2): 100–110.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123939209707313>.

Tsutsumi, V y col. 1992. “*Entamoeba Histolytica*: Erythrophagocytosis, Collagenolysis, and Liver Abscess Production as Virulence Markers.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86(2): 170–72.

Tsutsumi, V, R Mena-Lopez, F Anaya-Velazquez, y A Martinez-Palomo. 1984. “Cellular Bases of Experimental Amebic Liver Abscess Formation.” *American Journal of Pathology* 117(1): 81–91.

Tsutsumi, V, y M Shibayama. 2006. “Experimental Amebiasis: A Selected Review of Some in Vivo Models.” *Archives of Medical Research*.

Vazquez-Prado, J, y I Meza. 1992. “Fibronectin ‘receptor’ in *Entamoeba Histolytica*: Purification and Association with the Cytoskeleton.” *Archives of Medical Research* 23(2): 125–28.

Vázquez, J, E Franco, G Reyes, y I Meza. 1995. “Characterization of Adhesion Plates Induced by the Interaction of *Entamoeba Histolytica* Trophozoites with Fibronectin.” *Cell Motility and the Cytoskeleton* 32(1): 37–45.

Villalobos-Gómez, F y col. 2018. “*Entamoeba Histolytica* L220 Induces the in Vitro Activation of Macrophages and Neutrophils and Is Modulated by Neurotransmitters.” *Acta Parasitologica* 63(2): 270–79.

Virolle, C y col. 2020. “Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level.” *Genes* 11(11): 1–33.

Wang, D y col. 2013. “Structural Basis for R-Spondin Recognition by LGR4/5/6 Receptors.” *Genes and Development* 27(12): 1339–44.

Wang, X, Ni Bukoreshtliev, and HH Gerdes. 2012. “Developing Neurons Form Transient

Nanotubes Facilitating Electrical Coupling and Calcium Signaling with Distant Astrocytes." *PLoS ONE* 7(10): 1–9.

Ximénez, C y col. 2009. "Reassessment of the Epidemiology of Amebiasis: State of the Art." *Infection, Genetics and Evolution* 9(6): 1023–32.

———. 2010. "Human Amebiasis: Breaking the Paradigm?" *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(3): 1105–20.

Xu, J y col. 2015. "Crystal Structure of LGR4-Rspo1 Complex: Insights into the Divergent Mechanisms of Ligand Recognition by Leucine-Rich Repeat G-Protein-Coupled Receptors (LGRs)." *Journal of Biological Chemistry* 290(4): 2455–65.

Zurauskas, JP, y W McBride. 2001. "Case of Amoebic Liver Abscess: Prolonged Latency or Acquired in Australia?" *Internal Medicine Journal* 31(9): 565–66.