



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Caracterización funcional de los dominios de EhADH de  
*Entamoeba histolytica*”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M. EN C. DXINEGUEELA YOLANDA ZANATTA GARCÍA**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**Directoras de la Tesis:**

Dra. María Esther Orozco Orozco

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Ciudad de México

Julio, 2024



Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco y de la Dra. Abigail Betanzos Fernández.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, becario No. 709088).



## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. Antecedentes .....	3
1.1 Amibiasis .....	3
1.2 Epidemiología de la amibiasis .....	4
1.3 <i>E. histolytica</i> .....	4
1.4 Morfología de <i>E. histolytica</i> .....	5
1.4.1 Trofozoíto .....	5
1.4.2 Quiste .....	5
1.5 Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .....	7
1.6 Mecanismos de patogenicidad de <i>E. histolytica</i> .....	9
1.6.1 Adhesión .....	9
1.6.2 Citólisis .....	10
1.6.3 Fagocitosis y trogocitosis .....	11
1.6.4 Evasión de la respuesta inmune .....	12
1.7 Complejo EhCPADH .....	13
1.7.1 EhCP112 .....	15
1.7.2 EhADH .....	16
2. Justificación .....	20
3. Hipótesis .....	20
4. Objetivos .....	21
4.1 Objetivo general .....	21
4.2 Objetivos particulares .....	21
5. Estrategia experimental .....	22

Figura 6. Estrategia experimental general. ....	22
6. Materiales y métodos.....	23
6.1 Generación de la estructura secundaria y terciaria de EhADH y sus dominios Bro1, Linker y Adh .....	23
6.2 Diseño de péptidos específicos de los dominios Bro1, Linker y Adh .....	23
6.3 Obtención de anticuerpos policlonales .....	24
6.4 Cultivos celulares.....	25
6.5 Cuantificación de células en cámara de Neubauer .....	25
6.6 Extracción de ARN total de <i>E. histolytica</i> .....	26
6.7 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	26
6.8 Diseño de oligonucleótidos específicos.....	27
6.9 Amplificación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh.....	30
6.10 Electroforesis en geles de agarosa .....	30
6.11 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa .....	31
6.12 Clonación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh en el vector de tránsito <i>pJET1.2/blunt</i> .....	31
6.13 Preparación de bacterias competentes .....	34
6.14 Transformación de bacterias competentes.....	34
6.15 Conservación de bacterias transformadas .....	35
6.16 Purificación de plásmidos .....	35
6.17 Secuenciación de construcciones .....	36
6.18 Clonación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh en el vector de transfección <i>pEhHYG-tetR-O-CAT</i> .....	37
6.19 Sobreexpresión de los dominios Bro1, Linker y Adh en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	38
6.20 Ensayo de Inmunofluorescencia (IF).....	39

6.21 Obtención de eritrocitos humanos.....	39
6.22 Ensayo de adhesión de eritrocitos .....	39
6.23 Ensayo de eritrofagocitosis .....	40
6.24 Efecto citopático de trofozoítos mutantes sobre cultivos celulares .....	40
6.25 Efecto citotóxico de trofozoítos mutantes sobre cultivos celulares .....	41
6.26 Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET).....	42
6.27 Ensayo de flujo de dextrán.....	42
6.28 Permeabilidad epitelial en colon de ratón.....	43
6.29 Formación del Absceso Hepático Amibiano (AHA) en hámsteres .....	43
6.30 Manejo ético de animales de laboratorio .....	44
6.31 Clonación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh en los vectores de expresión en bacterias <i>E. coli</i> DH5α .....	44
6.32 Inducción de las proteínas recombinantes GST-EhADH y de los dominios recombinantes His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh .....	48
6.33 Solubilización de las proteínas recombinantes.....	48
6.34 Purificación de las proteínas recombinantes .....	49
6.35 Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> .....	50
6.36 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	50
6.37 Ensayo de Western Blot (WB).....	51
6.38 Ensayo de <i>pull-down</i> .....	52
6.39 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas .....	54
6.40 Análisis estadístico .....	54
7. Resultados .....	55
7.1 Análisis <i>in silico</i> de EhADH .....	55
7.2 Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EhADH.....	57

7.3 EhADH interactúa con proteínas implicadas en el tráfico vesicular y la endocitosis.....	58
7.4 Generación de trofozoítos que sobreexpresan los diferentes dominios de la EhADH.....	63
7.5 El dominio Adh influye en la adhesión y fagocitosis de los trofozoítos .....	69
7.6 El dominio Bro1 potencia el efecto citopático y citotóxico producido por los trofozoítos .....	71
7.7 Los dominios Bro1 y Adh alteran las funciones de la barrera epitelial <i>in vitro</i> .....	73
7.8 El dominio Bro1 promueve el daño al epitelio colónico de ratones.....	75
7.9 Los trofozoítos que sobreexpresaban el dominio Adh produjeron abscesos hepáticos más grandes .....	78
7.10 Clonación de los dominios recombinantes His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh .....	81
7.11 Los dominios recombinantes Bro1, Linker y Adh interactúan con proteínas del citoesqueleto y proteínas relacionadas con la virulencia .....	87
7.12 Interacción de los dominios Bro1, Linker y Adh con proteínas del hospedero .....	92
8. Discusión.....	94
9. Conclusión.....	102
10. Perspectivas.....	103
11. Artículos .....	104
12. Ponencias .....	105
13. Bibliografía .....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>E. histolytica</i> . .....	6
Figura 2. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> . .....	8
Figura 3. Localización de las proteínas EhCP112 y EhADH en amibas. ....	13
Figura 4. Estructura tridimensional predicha <i>in silico</i> del complejo EhCPADH. ....	14
Figura 5. Dominios proteicos y estructura terciaria de EhADH predichos <i>in silico</i> . 17	
Figura 6. Estrategia experimental general.....	22
Figura 7. Distribución de los dominios Bro1, Linker y Adh dentro de la secuencia de EhADH.....	28
Figura 8. Vector de tránsito <i>pJET1.2/blunt</i> .....	33
Figura 9. Vector de expresión inducible <i>pTet</i> .....	37
Figura 10. Vector de expresión <i>pColdI</i> .....	46
Figura 11. Vector de expresión <i>pGEX-6P-1</i> .....	47
Figura 12. Comparación estructural de las proteínas Alix y Bro1 con EhADH.....	56
Figura 13. Comparación de los dominios Bro1 en las proteínas EhADH, Alix y Bro1 .....	56
Figura 14. Inducción y purificación de GST-EhADH.....	58
Figura 15. Esquema de las funciones de EhADH.....	59
Figura 16. Interactoma de EhADH .....	60
Figura 17. Ensayos de WB de las interacciones establecidas entre la proteína recombinante GST-EHADH y algunas proteínas de <i>E. histolytica</i> .....	63
Figura 18. Clonación de los dominios Bro1, Linker y Adh en el vector de transfección <i>pTet</i> .....	64
Figura 19. Generación de anticuerpos específicos contra los dominios EhADH... 65	
Figura 20. Especificidad de los anticuerpos $\alpha$ -Bro1, $\alpha$ -Linker y $\alpha$ -Adh.....	65

Figura 21. Expresión de los dominios EhADH en trofozoítos transfectados .....	66
Figura 22. Localización celular de los dominios Bro1, Linker y Adh en trofozoítos transfectados .....	68
Figura 23. Adhesión y fagocitosis de eritrocitos por trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH .....	70
Figura 24. Efecto citopático y citotóxico de trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH sobre células epiteliales .....	72
Figura 25. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH sobre la RET de monocapas MDCK .....	74
Figura 26. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresaban a los dominios de EhADH sobre el flujo de macromoléculas a través de la ruta paracelular .....	75
Figura 27. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresaban a los dominios de EhADH sobre la permeabilidad epitelial del colon murino .....	77
Figura 28. AHA en hámsteres inoculados con trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH.....	80
Figura 29. Clonación de los dominios Bro1, Linker y Adh en los vectores de expresión .....	82
Figura 30. Inducción y purificación del dominio His-Bro1 recombinante .....	84
Figura 31. Inducción y purificación del dominio GST-Linker recombinante.....	85
Figura 32. Inducción y purificación del dominio GST-Adh recombinante.....	86
Figura 33. Generación de los dominios recombinantes de EhADH .....	88
Figura 34. Modelo de posibles funciones para cada dominio de EhADH y moléculas reclutadas involucradas en eventos de virulencia .....	101

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos específicos diseñados para la obtención de anticuerpos policlonales. ....	24
Tabla 2. Oligonucleótidos específicos que se utilizaron para amplificar los fragmentos Bro1, Linker y Adh de EhADH de <i>E. histolytica</i> .....	29
Tabla 3. Construcciones y vectores de expresión que se utilizaron para subclonar los fragmentos Bro1, Linker y Adh de EhADH de <i>E. histolytica</i> .....	45
Tabla 4. Comparación de las proteínas homólogas Alix y Bro1 con EhADH .....	55
Tabla 5. Comparación de los dominios Bro1 en las proteínas homólogas Alix y Bro1 con EhADH .....	57
Tabla 6. Análisis de espectrometría de masas de las proteínas de <i>E. histolytica</i> que interactuaron con GST-EhADH .....	61
Tabla 7. Proteínas de <i>E. histolytica</i> que interactúan con el dominio His-Bro1, identificadas por ensayos de <i>pull-down</i> y espectrometría de masas .....	88
Tabla 8. Proteínas de <i>E. histolytica</i> que interactúan con la región GST-Linker, identificadas por ensayos de <i>pull-down</i> y espectrometría de masas .....	90
Tabla 9. Proteínas de <i>E. histolytica</i> que interactúan con el dominio GST-Adh, identificadas por ensayos de <i>pull-down</i> y espectrometría de masas .....	91
Tabla 10. Proteínas de células epiteliales humanas Caco-2 que interactúan con GST-EhADH, identificadas por ensayos de <i>pull-down</i> y espectrometría de masas .....	93



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**aa:** Aminoácidos.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**AHA:** Absceso hepático amibiano.

**CP:** Cisteína proteasa.

**DA:** Dominio de adhesión.

**DAB:** Diaminobencidina.

**DEPC:** Dietilpirocarbonato.

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato.

**DSM:** Desmosoma.

**DTT:** Ditioneitol.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético (por sus siglas en inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*).

**ESCRT:** Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (por sus siglas en inglés, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*).

**GST:** Glutatión S-transferasa.

**GUVs:** Vesículas Unilamelares Gigantes (por sus siglas en inglés, *Giant Unilamellar Vesicles*).

**His:** Histidinas.

**IF:** Inmunofluorescencia.

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

**kDa:** Kilodaltones.

**LB:** Medio Luria Bertani.

**M:** Molar.

**mM:** Milimolar.

**MVB:** Cuerpos multivesiculares (por sus siglas en inglés, *multivesicular bodies*).

**N:** Normal.

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (por sus siglas en inglés, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*).

**NO:** Óxido nitroso.

**ON:** Durante toda la noche (por sus siglas en inglés, *Over Night*).

**pb:** Pares de bases.

**PBS:** Tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*).

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

**PHMB:** p-hidroximercuribenzoato.

**PSA:** Persulfato de amonio.

**RET:** Resistencia eléctrica transepitelial.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*).

**RT-PCR:** Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*).

**SADER:** Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

**SENASICA:** Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

**SBA:** Suero Bovino Adulto.

**SFB:** Suero Fetal Bovino.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

**SOD:** Superóxido dismutasa.

**SP:** Serina proteasa.

**Tm:** Temperatura de alineamiento.

**UA:** Unión adherente.

**UE:** Unión estrecha.

**UICs:** Uniones intercelulares.

**UPEAL:** Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio.

**WB:** Inmunodetección (por sus siglas en inglés, *Western blot*).

**°C:** Grado centígrado.

**µg:** Microgramos.

## RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es el protozoo causante de la amibiasis humana. La adhesina EhADH (687 aa) es una proteína implicada en la invasión de tejidos, la fagocitosis y la lisis de las células huésped. EhADH sigue a las proteínas ingeridas desde el primer contacto hasta su llegada a los cuerpos multivesiculares, ya que es una proteína accesoria de la maquinaria ESCRT. En esta tesis, generamos trofozoítos que sobreexpresan los dominios Bro1 (1-400 aa), Linker (246-446 aa) y Adh (444-687 aa) para definir su papel en la virulencia. Los trofozoítos que sobreexpresan el dominio Bro1 aumentaron ligeramente su adherencia y la fagocitosis, además mostraron una mayor capacidad para destruir monocapas celulares, y un aumento en la permeabilidad de las células epiteliales cultivadas y del colon de ratón, además de que produjeron daño en el hígado de hámster. Los trofozoítos Linker también aumentaron las propiedades de virulencia, pero con menor efecto que los parásitos Bro1. Curiosamente, el dominio Adh produjo el mayor efecto sobre la adherencia y la fagocitosis, pero influyó poco en la destrucción de las monocapas; sin embargo, aumentó el daño al colon y al hígado. Para identificar las proteínas asociadas de cada dominio, utilizamos péptidos recombinantes. Los ensayos de *pull-down* y la espectrometría de masas mostraron que el dominio Bro1 interactúa con EhADH, la lectina Gal/GalNAc, EhCPs, componentes de maquinaria ESCRT y proteínas del citoesqueleto. Además, este fragmento participa en el transporte de colesterol y en la unión de GTPasas. Mientras que EhADH, ubiquitina, EhRabB, EhNPC1 y EhHSP70 se asociaron al dominio Linker; y EhADH, EhHSP70, EhPrx y enzimas metabólicas al dominio Adh. La diversa asociación de proteínas confirma que EhADH es una molécula versátil, con múltiples funciones, probablemente dadas por su capacidad para formar distintos complejos moleculares.

## ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is the protozoan causative of human amoebiasis. The EhADH adhesin (687 aa) is a protein involved in tissue invasion, phagocytosis and host-cell lysis. EhADH follows the ingested prey since the first contact until its arrival to the multivesicular bodies, because it is an accessory protein of the ESCRT machinery. In this thesis, we generated trophozoites overexpressing Bro1 (1-400 aa), Linker (246-446 aa) and Adh (444-687 aa) domains to define their role in virulence. Trophozoites overexpressing the Bro1 domain slightly increased their adhesion and phagocytosis, showed a higher ability to destroy cell monolayers, and an augment in the permeability of cultured epithelial cells and mouse colon, in addition to produce damage to hamster livers. The Linker-trophozoites also increased the virulence properties, but with lower effect than the Bro1-parasites. Interestingly, the Adh domain produced the highest effect on adherence and phagocytosis, but it poorly influenced the monolayers destruction; nevertheless, they augmented the colon and liver damage. To identify the protein partners of each domain, we used recombinant peptides. Pull-down assays and mass spectrometry showed that Bro1 domain interplays with EhADH, Gal/GalNAc lectin, EhCPs, ESCRT machinery components and cytoskeleton proteins. In addition, this fragment participates in cholesterol transport and GTPases binding. While EhADH, ubiquitin, EhRabB, EhNPC1 and EhHSP70 associated to the Linker domain; and EhADH, EhHSP70, EhPrx and metabolic enzymes to the Adh domain. The diverse protein association confirms that EhADH is a versatile molecule with multiple functions probably given by its capacity to form distinct molecular complexes.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Amibiasis

La amibiasis es una infección gastrointestinal causada por el parásito protozoo *Entamoeba histolytica*, que se transmite por la ruta fecal-oral, ya sea directamente por contacto de persona a persona, o indirectamente por la ingesta de alimentos o bebidas contaminados con materia fecal. También es posible la transmisión por prácticas sexuales orales-anales (Ralston y Petri, 2011b).

Esta enfermedad generalmente es asintomática, pero en algunos casos (aproximadamente el 10% de ellos) puede generar manifestaciones clínicas, que aparecen tras un periodo de incubación de 2 a 4 semanas. Durante este periodo, los parásitos invaden la mucosa intestinal, dando lugar a la colitis invasiva aguda o disentería amibiana, que consiste en una diarrea con moco y sangre, y dolor abdominal (Baxt y Singh, 2008; Bercu *et al.*, 2007). Cabe destacar que la colitis amibiana es la principal causa de diarrea severa a nivel mundial (Stanley, 2003).

La enfermedad puede evolucionar a una forma crónica o presentar complicaciones, como colitis fulminante (úlceras, necrosis y perforación del colon), ameboma (formación de masas granulomatosas en la pared intestinal), peritonitis y amibiasis extraintestinal. Esta última surge cuando el parásito alcanza la circulación sanguínea y se disemina a otros órganos, principalmente el hígado, donde puede generar un absceso hepático amibiano (AHA) (Stanley, 2003). El AHA es diez veces más común en hombres que en mujeres y por lo regular afecta a individuos de entre 18 y 50 años (Kantor *et al.*, 2018).

Uno de los mayores inconvenientes de esta infección es que cuenta con una sola línea de tratamiento basada en la administración de nitroimidazoles, los cuales son eficaces, pero presentan alta toxicidad y la posibilidad de desarrollar resistencia en el parásito, por lo cual se requieren nuevas terapias, o una vacuna para prevenir la enfermedad (Shirley *et al.*, 2018; Stanley, 2003).

## 1.2 Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis es un problema de salud pública. Se estima que alrededor de 450 millones de personas (aproximadamente 5.81% de la población mundial) está infectada con *E. histolytica*, aunque no necesariamente presenten síntomas. Anualmente, se reportan entre 35 y 50 millones de casos nuevos de infección, generando la muerte de aproximadamente 55,000 personas (Mi-ichi *et al.*, 2016; Morán *et al.*, 2023).

La infección suele afectar principalmente a individuos en condiciones socioeconómicas y sanitarias pobres, en países en vías de desarrollo, y en lugares con climas calurosos y húmedos como los trópicos (González-Vázquez *et al.*, 2012). Debido al incremento de la emigración y los viajes desde las áreas endémicas, la infección ha comenzado a ser latente en países desarrollados (Kantor *et al.*, 2018).

Algunos factores de riesgo que podrían favorecer el desarrollo de la enfermedad son: embarazo, inmunocompromiso, consumo de corticosteroides, consumo de alcohol y diabetes (Showler y Boggild, 2013).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reporta cada semana en su Boletín Epidemiológico nuevos casos de amibiasis intestinal y AHA en todo el país (<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>). Las tasas de mortalidad debido a complicaciones severas de la amibiasis han disminuido considerablemente en los últimos años, pero a pesar de esto, la enfermedad es aún la quinta o sexta causa de enfermedad más común entre la población mexicana (Ximénez *et al.*, 2009).

## 1.3 *E. histolytica*

*E. histolytica* es un parásito extracelular, microaerófilico, no flagelado de forma ameboide, como su nombre lo indica. Se le denominó "*histolytica*" por su capacidad para destruir los tejidos del huésped. También se le denomina amiba y es un patógeno para los humanos y los cánidos. Presenta dos estadios morfológicos, el trofozoíto invasivo y el quiste infectivo. Dichos

estadios le permiten al parásito adaptarse a diferentes ambientes y llevar a cabo su ciclo biológico (González-Vázquez *et al.*, 2012).

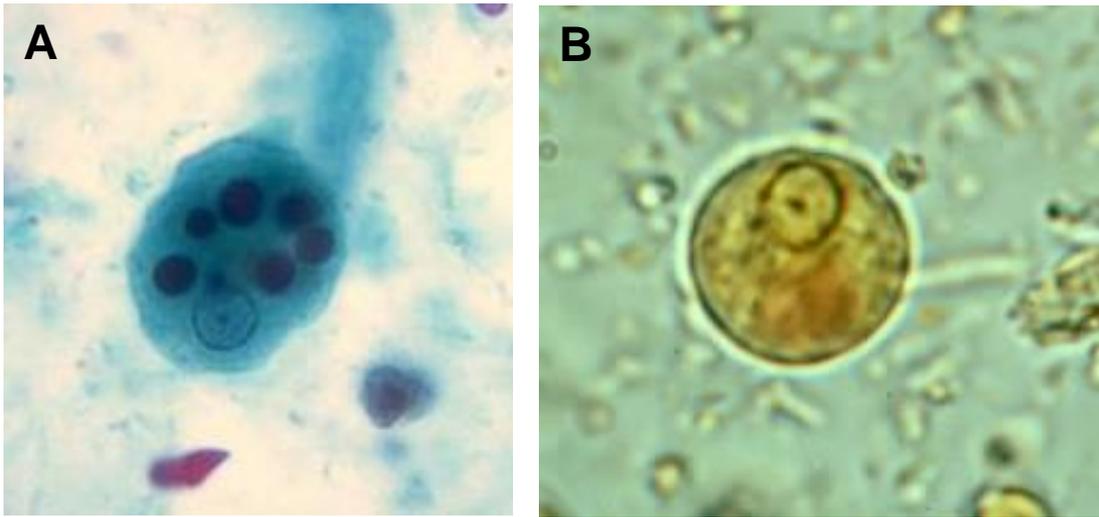
## **1.4 Morfología de *E. histolytica***

### **1.4.1 Trofozoíto**

El trofozoíto se caracteriza por tener una forma ameboide que puede medir de 10 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque el tamaño más habitual es de 12 a 15  $\mu\text{m}$ . Tiene un núcleo esférico con un cariosoma central y cromatina distribuida en la periferia de la membrana nuclear interna. En su citoplasma, los trofozoítos presentan vacuolas que pueden contener los eritrocitos fagocitados del hospedero. A partir del citoplasma se forman prolongaciones o pseudópodos con los que la amiba se puede desplazar, por lo cual se le considera como la forma móvil e invasiva del parásito (CDC, 2019) (**Figura 1A**).

### **1.4.2 Quiste**

El quiste es de forma esférica u oval, con una pared resistente de quitina y mide de 10 a 15  $\mu\text{m}$ . En el citoplasma presenta cuerpos cromatoides alargados de bordes curvos (menos de 10) y vacuolas de glucógeno cuando el quiste es inmaduro. Se divide por mitosis sucesivas por lo que al alcanzar la madurez tiene cuatro núcleos de cariosoma pequeño. Cabe destacar que el quiste es la forma de resistencia del parásito (CDC, 2019; Stanley, 2003; Ximénez *et al.*, 2009) (**Figura 1B**).

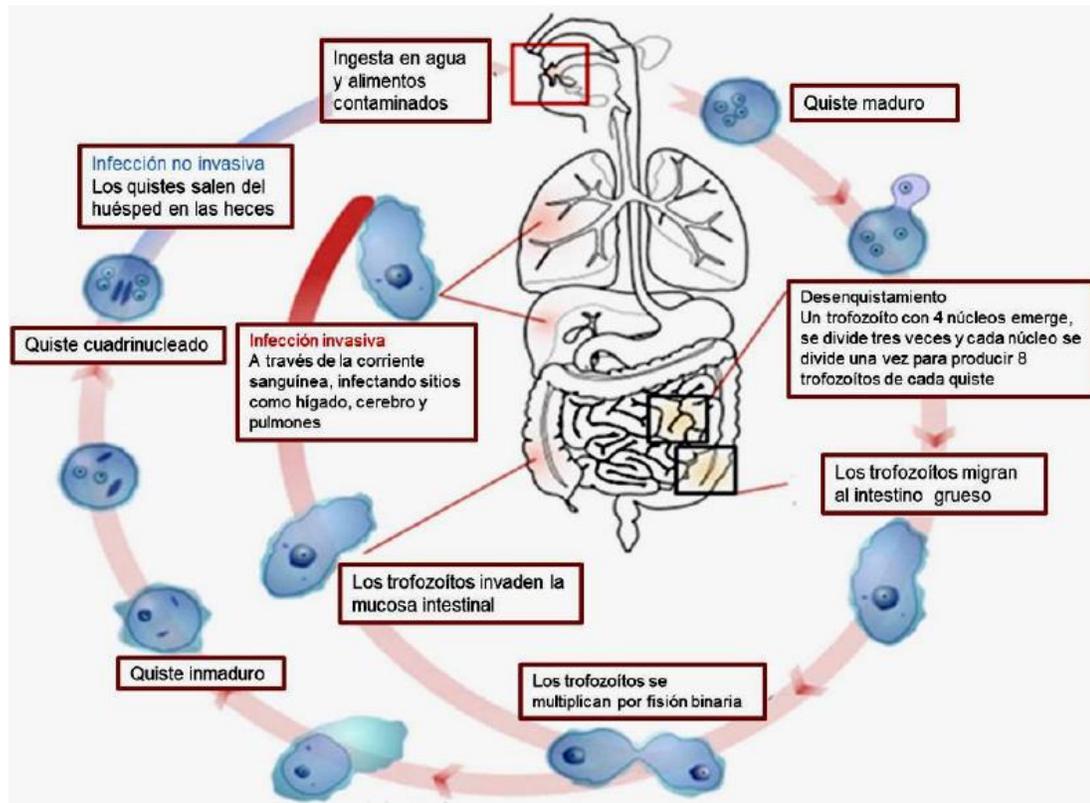


**Figura 1. Morfología de *E. histolytica*.** **A)** Trofozoíto sometido a tinción tricrómica, donde se aprecia un solo núcleo y eritrocitos fagocitados en su citoplasma (de color más oscuro). Es notable la forma amebode del parásito en dicho estadio. **B)** Quiste inmaduro en una preparación fresca de yodo, donde se observa un solo núcleo. Imágenes tomadas de CDC, 2019.

### 1.5 Ciclo biológico de *E. histolytica*

El ciclo biológico de *E. histolytica* no requiere de vectores ni reservorios temporales. Este ciclo comienza con la ingestión de quistes maduros (fase infectiva del parásito) encontrados en alimentos, agua o manos contaminadas con materia fecal. El quiste es capaz de tolerar las secreciones gástricas del estómago y las secreciones pancreáticas en el duodeno, pero los cambios de pH permiten el reblandecimiento de su pared de quitina, lo que provoca que la ameba se desenquiste para originar trofozoítos activos (fase invasiva del parásito) en el intestino delgado, que luego migran al intestino grueso, en donde proliferan. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y causan daños al tejido donde se localizan, originando la patogénesis y las manifestaciones clínicas asociadas a la infección. Algunos trofozoítos se diferencian a quistes, que pueden ser expulsados en las heces y replican el ciclo biológico. También los trofozoítos pueden ser excretados, sin embargo, son una forma lábil a las condiciones ambientales y por ello, generalmente perecen. En la mayoría de los pacientes, los trofozoítos sólo invaden la mucosa intestinal, pero en otros pacientes, logran atravesar la barrera intestinal y a través del torrente sanguíneo llegan a sitios extraintestinales como el hígado, el cerebro y los pulmones, generando así una infección extraintestinal (Carrero *et al.*, 2020; CDC, 2021; S. Ghosh *et al.*, 2019) (**Figura 2**).

Es de notar que, en promedio, un portador de *E. histolytica* puede excretar hasta 45 millones de quistes infectivos diariamente, lo cual evidencia lo efectiva que puede ser la transmisión de la infección (Cornick y Chadee, 2017).



**Figura 2. Ciclo biológico de *E. histolytica*.** La infección amibiana es iniciada por la ingestión oral de quistes maduros. Después, los quistes son reblandecidos por la acción de los jugos gástricos en el estómago, lo que permite su desquistamiento en el intestino delgado, dando origen al trofozoito. Los trofozoitos pueden vivir y multiplicarse dentro del intestino grueso, invadiendo ciertas regiones del colon y formando quistes nuevos, los cuales son liberados en las heces de los individuos parasitados. El trofozoito puede colonizar a nivel intestinal y también puede diseminarse e invadir otros órganos vitales, principalmente el hígado, aunque también puede llegar al cerebro o los pulmones. Imagen tomada de Mahon y Manuselis, 2000.

## 1.6 Mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*

La potente actividad citotóxica de *E. histolytica* parece ser el factor fundamental de la patogénesis del parásito, aunado a su capacidad de evadir la respuesta inmune, destruir los tejidos a través de la adherencia a las células blanco, citólisis y fagocitosis de estas (Chacín-Bonilla, 2013).

### 1.6.1 Adhesión

La adhesión de *E. histolytica* a las células epiteliales es un paso fundamental para que ocurra la destrucción celular. Por ello, los trofozoítos expresan en su superficie varias moléculas que les permiten adherirse a los tejidos (Arroyo y Orozco, 1987).

La molécula de adhesión más estudiada en este parásito es una lectina de 260 kDa llamada Gal/GalNAc. Esta lectina media la unión del parásito a los residuos de galactosa (Gal) y la N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) de glicoproteínas presentes en la superficie de las células blanco, que pueden ser eritrocitos, neutrófilos, bacterias, células epiteliales y a sus mucinas (Ralston y Petri, 2011a, 2011b). Su participación en la adhesión se demostró cuando se adicionó GalNAc a las amibas, lo cual inhibió la adherencia de los trofozoítos a las células diana, y también evitó la citólisis. En estudios recientes, se ha dado a conocer la participación de la lectina Gal/GalNAc no sólo en procesos de adhesión, sino también en la transducción de señales, fagocitosis, evasión del complemento, activación de macrófagos y células dendríticas, y posiblemente, en el enquistamiento del parásito (Carrero *et al.*, 2020; García *et al.*, 2015).

Además de esta lectina, los trofozoítos cuentan con otra lectina de 220 kDa, rica en residuos hidrofóbicos, que está implicada en la adhesión del parásito a células epiteliales y eritrocitos. Se observó que al utilizar anticuerpos mono- y policlonales contra esta lectina, se puede inhibir la adhesión de trofozoítos a monocapas de células MDCK y eritrocitos. La lectina de 220 kDa también puede adherirse a ácido hialurónico, quitina, quitotriosa, N-acetil-D-galactosamina y galactosa (García *et al.*, 2015).

Hay otras moléculas que se han asociado al proceso de adhesión de los trofozoítos a los epitelios, como el complejo EhCPADH. Este complejo formado por dos proteínas (la cisteína proteasa EhCP112 y la adhesina EhADH) puede ser bloqueado con anticuerpos monoclonales, provocando así una disminución de diferentes eventos de virulencia, como son la adhesión, eritrofagocitosis, efecto citopático y citotóxico (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera *et al.*, 1999). Más adelante se abordará a detalle el complejo EhCPADH y las proteínas que lo conforman.

### 1.6.2 Citólisis

Luego de que las amibas establecen contacto con las células, ocurre el proceso de citólisis. En este proceso, intervienen varios factores y mecanismos, citados a continuación:

- Los amebaporos son proteínas líticas con la capacidad de inducir la formación de poros en bicapas lipídicas. Dichas proteínas pertenecen a una familia de tres miembros denominados A, B y C. Las isoformas se componen de 77 aa y se expresan en una proporción de 35:10:1, respectivamente. La identidad de sus secuencias de aa es de 35-57%. Los amebaporos son liberados al espacio intercelular e insertados en las membranas de las células blanco donde forman canales iónicos, de modo que producen lisis celular, permiten el paso de agua, iones y pequeñas moléculas; generando así la muerte celular por choque osmótico (Bruhn y Leippe, 2001; Ralston y Petri, 2011a; Stanley, 2003).

- Las cisteína proteasas (CPs) son enzimas hidrolíticas que actúan sobre varios sustratos del hospedero y son muy abundantes. Se reportan aproximadamente 50 de ellas en el genoma de *E. histolytica* (Tillack *et al.*, 2007). Las CPs han demostrado tener un papel importante en la invasión, degradación de la mucina y la matriz extracelular, digestión del material fagocitado y en el proceso inflamatorio *in vitro* (Chacín-Bonilla, 2013; Ralston y Petri, 2011a; Stanley, 2003). Ejemplos de estas proteasas son EhCP1, EhCP2, EhCP5 y EhCP112. Se ha comprobado que EhCP1, EhCP2 y EhCP5

representan el 90% de todas las actividades de CP durante la infección, siendo EhCP5 la más predominante en la degradación de la capa mucosa epitelial, aunque la EhCP112 posee mayor capacidad proteolítica (Cornick *et al.*, 2016; Cuellar *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2010; Ocádiz *et al.*, 2005; Que y Reed, 2000). Además de CPs, hay otras proteasas que colaboran en la patogénesis, como son las serina proteasas (SPs), las aspartato proteasas y metaloproteinasas; sin embargo, las CPs son las proteasas más abundantes en *E. histolytica* (Baxt y Singh, 2008).

- La apoptosis de células del huésped se ha detectado en el AHA y en casos con amibiasis intestinal, tanto en modelos animales como en tejidos humanos (Stanley, 2003). La apoptosis es activada por la caspasa-3, pues al utilizar inhibidores específicos para esta proteína se impide la muerte celular; además, los ratones deficientes de caspasa-3 son resistentes a la amibiasis. Al utilizar inhibidores para las caspasas 8 y 9, no se inhibe la citotoxicidad, de modo que la apoptosis es independiente de estas caspasas (Ralston y Petri, 2011b).

Además de los factores citados previamente, se sabe que los trofozoítos causan alteración en la permeabilidad epitelial, ya que en células de linaje intestinal mantenidas en cultivo provocan una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (RET), lo que altera a las proteínas de las uniones intercelulares (UICs), y con ello se afecta la integridad de las monocapas (Betanzos *et al.*, 2013, 2014; Hernández-Nava, 2017). En estos eventos participan varias moléculas de la amiba como: el complejo EhCPADH, otras CPs, SPs, una proteína similar a la ocludina (componente de las UICs) y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Lejeune *et al.*, 2011).

### **1.6.3 Fagocitosis y trogocitosis**

Los trofozoítos de *E. histolytica* pueden fagocitar a otros microorganismos o células de su hospedero, y un ejemplo claro de este proceso es la eritrofagocitosis, que consiste en la ingestión de eritrocitos. Además de estas células, los trofozoítos pueden engullir enterocitos,

fibroblastos, linfocitos, células apoptóticas y desechos celulares. Estos dos últimos, suelen ser fagocitados como un mecanismo de virulencia para evitar la detección del sistema inmune, durante la invasión de tejidos (Orozco *et al.*, 1983).

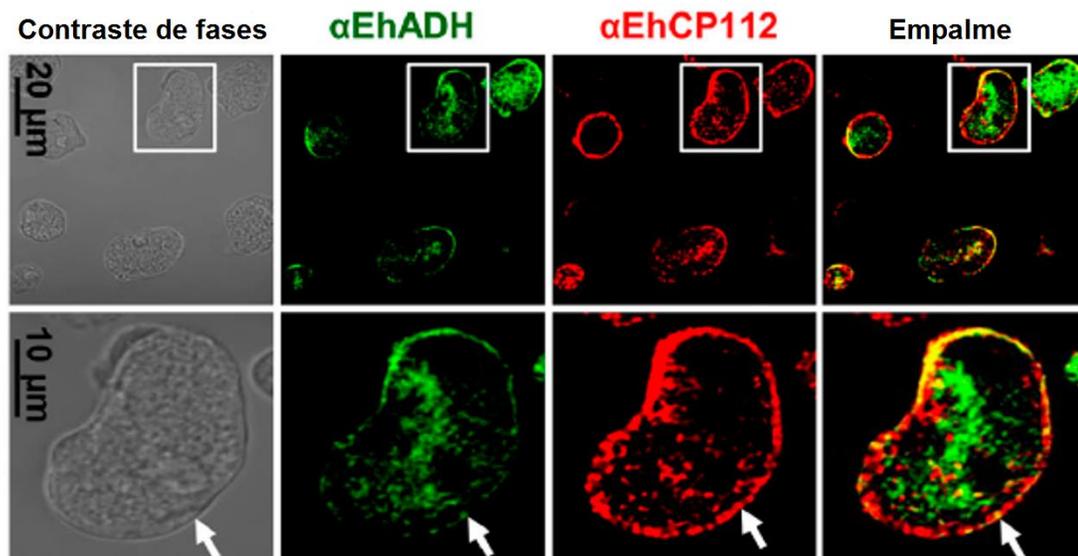
*E. histolytica* no solo tiene la capacidad de fagocitar, además de eso, lleva a cabo un proceso denominado trogocitosis, que consiste en la ingestión de fragmentos de células viables. Este evento genera elevación del calcio intracelular y pérdida de la integridad de la membrana plasmática; lo cual a corto plazo, provoca la muerte de las células blanco. Luego de la muerte celular, las amibas se desprenden y dejan de ingerir. Según estudios recientes, se cree que no todos los tipos celulares son vulnerables a la trogocitosis de *E. histolytica*, y tampoco lo son al mismo nivel. Se ha observado que células epiteliales que crecen en monocapas son menos susceptibles, probablemente debido a la limitada flexibilidad de su membrana plasmática que posee UICs, las cuales suelen ser más fuertes que en las células que no crecen en monocapas (S. Ghosh *et al.*, 2019; Ralston *et al.*, 2014).

#### **1.6.4 Evasión de la respuesta inmune**

La participación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nitroso (NO) juegan un papel esencial en la respuesta inmune a la amibiasis. Las células del sistema inmune del hospedero son reclutadas al sitio de la infección, lo que genera inicialmente una respuesta inflamatoria aguda, en la que el sistema inmune libera ROS y NO para dañar a los trofozoítos. Sin embargo, el parásito ha desarrollado varios mecanismos para minimizar el daño causado por las ROS y NO, incluyendo la expresión de varias moléculas de superficie como: peróxido dismutasa, superóxido dismutasa (SOD) y NADPH flavin oxidoreductasa. SOD genera  $H_2O_2$  en presencia de  $O_2$ ; la NADPH flavin oxidoreductasa cataliza la reducción del  $O_2$  a  $H_2O_2$ ; y la peróxido dismutasa metaboliza el  $H_2O_2$  de ambas vías en  $H_2O$  (Wilson *et al.*, 2012).

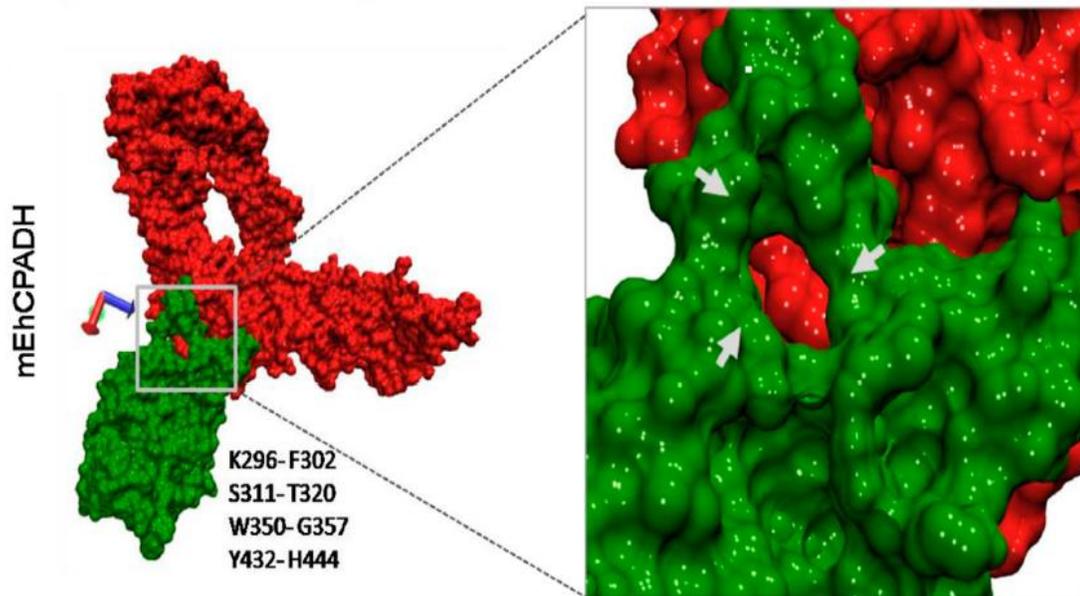
### 1.7 Complejo EhCPADH

El complejo EhCPADH es un factor de virulencia que como se mencionó anteriormente está integrado por dos proteínas, la cisteína proteasa EhCP112 y la adhesina EhADH. Este complejo se localiza en la membrana de los trofozoítos de *E. histolytica* y en vesículas internas, por lo que puede detectarse con anticuerpos en extractos totales de trofozoítos o en el citoplasma, a través de ensayos de inmunofluorescencia (IF). También se localiza en los productos de secreción de las amibas. Los anticuerpos específicos han permitido conocer la ubicación no sólo del complejo, sino también de sus componentes, a los que se les puede observar también de manera independiente (Betanzos *et al.*, 2013; García-Rivera *et al.*, 1999) (Figura 3).



**Figura 3. Localización de las proteínas EhCP112 y EhADH en amibas.** Se aprecia que ambas proteínas se encuentran de manera independiente o en conjunto, en la membrana plasmática y en el citoplasma de los trofozoítos. Los paneles inferiores son ampliaciones de las áreas delimitadas con un cuadrado en los paneles superiores. Las flechas indican un sitio de co-localización. Imagen tomada y modificada de Montañaño *et al.*, 2017.

La interacción entre EhCP112 y EhADH en el complejo EhCPADH se realiza a través de 18 a 21 puentes de hidrógeno. Cuando estas dos proteínas se unen, se forma una cavidad en EhCP112 en donde se une EhADH, lo cual hace más estable al complejo (Montaño *et al.*, 2017) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Estructura tridimensional predicha *in silico* del complejo EhCPADH. Se observa el acoplamiento molecular entre EhADH (en rojo) y la forma madura de EhCP112 (en verde), donde es evidente la cavidad formada entre ambas proteínas y los aa involucrados en esta interacción. Imagen tomada de Montaño *et al.*, 2017.

A través de varios experimentos se ha podido relacionar a dicho complejo en eventos de adhesión, eritrofagocitosis y citólisis celular, lo que evidencia que sus componentes, tanto de manera conjunta como independiente, participan en la virulencia del parásito (Betanzos *et al.*, 2013; García-Rivera *et al.*, 1999; Hernández-Nava, 2017; Ocádiz *et al.*, 2005). Durante el proceso de eritrofagocitosis se puede localizar al complejo EhCPADH en las copas fagocíticas. Además, cuando los trofozoítos se preincuban con anticuerpos específicos para el complejo EhCPADH, disminuye su tasa de eritrofagocitosis en un 41% (García-Rivera *et al.*, 1999).

### 1.7.1 EhCP112

El gen *ehcp112* consta de 1,338 pb que codifican para la cisteína proteasa EhCP112, que inicialmente es de 446 aa con un peso molecular de 52 kDa. Sin embargo, esta enzima es procesada y luego de ello, la proteína madura se conforma de 315 aa y su peso molecular es de 35.5 kDa (Quintas-Granados *et al.*, 2009). EhCP112 cuenta con un dominio catalítico característico de catepsina-L, y una secuencia RGD que en otros organismos interactúa con las integrinas del huésped (Cuellar *et al.*, 2017). La proteasa EhCP112 es activa en un rango amplio de pHs y a temperaturas diferentes, degradando con gran afinidad a la hemoglobina y a componentes de la matriz extracelular, como colágeno tipo I y fibronectina (Ocadiz *et al.*, 2005). Junto con la EhCP5, EhCP112 es la única CP con capacidad para degradar mucina (Cuellar *et al.*, 2017).

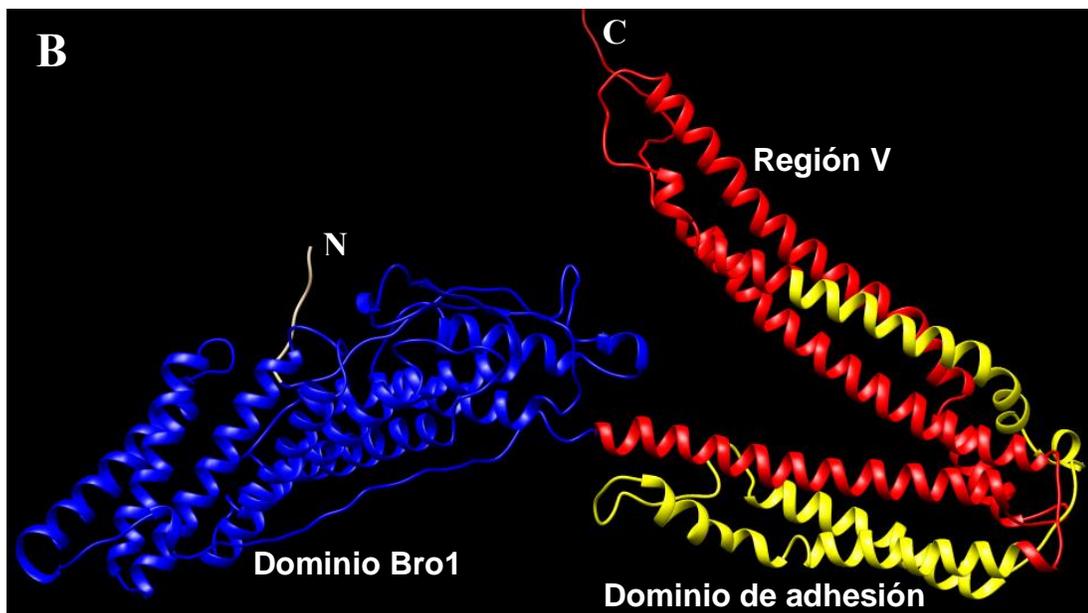
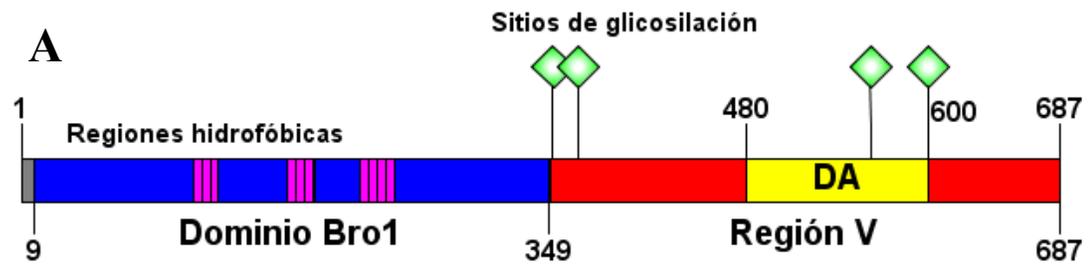
Mediante el uso de la proteína EhCP112 recombinante en ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que esta molécula tiene la capacidad de interactuar, deslocalizar y degradar a proteínas de las uniones estrechas (UEs) como claudina-1 y 2 en el epitelio intestinal, permitiendo el flujo de iones a través de la ruta paracelular, contribuyendo así al daño epitelial (Cuellar *et al.*, 2017).

### 1.7.2 EhADH

El gen *ehadh* consta de 2061 pb y codifica para la adhesina EhADH de 687 aa, con un peso molecular de 75 kDa. Su secuencia presenta dos regiones principales, la primera es un dominio llamado Bro1, en el extremo N-terminal (del aa 9 al 349), y la segunda se encuentra en el extremo C-terminal, denominada región V, por tener esa morfología estructural (del aa 395-657). Dentro de la región V, la adhesina cuenta con un motivo de adherencia (del aa 480 al 600) (Bañuelos *et al.*, 2012; García-Rivera *et al.*, 1999) (**Figura 5**).

EhADH posee tres regiones hidrofóbicas (aa 114-130, 176-195 y 224-247) que podrían tratarse de sitios transmembranales o regiones para interactuar con otras proteínas. Tiene también 7 residuos embebidos en la membrana (aa 97, 231, 227, 282, 662, 680 y 681), por lo que no es raro localizarla en la membrana plasmática o en membranas endosomales (Bañuelos *et al.*, 2012). Además, presenta cuatro posibles sitios de glicosilación (aa 352, 369, 562 y 600), y varios sitios probables de fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas a lo largo de su secuencia. De hecho, casi en la región final del dominio Bro1 se localiza un potencial sitio de fosforilación en una secuencia consenso que reconocen las cinasas de la familia Src, lo cual sugiere que la adhesina podría jugar un papel importante en la transducción de señales, aunque para determinar esto se requieren más estudios (Bañuelos *et al.*, 2005; García-Rivera *et al.*, 1999; Montañó *et al.*, 2017) (**Figura 5A**).

Adicionalmente, en el genoma de *E. histolytica* se han reportado otros dos genes que codifican para proteínas semejantes a EhADH, porque cuentan con el dominio Bro1, aunque no tienen el motivo de adhesión. Estas proteínas se denominaron EhADH-like, pero aún no se han caracterizado, y se desconoce su función (Bañuelos *et al.*, 2005).



**Figura 5. Dominios proteicos y estructura terciaria de EhADH predichos *in silico*.** **A)** Esquema de los dominios de EhADH: dominio Bro1 (azul), región V (rojo), dominio de adhesión (DA, amarillo), 3 regiones hidrofóbicas (rosado) y 4 sitios de glicosilación (verde). **B)** Estructura terciaria de la adhesina, principalmente formada de  $\alpha$ -hélices. En el extremo N se localiza el dominio Bro1, mientras que en el extremo C está la región V.

Por tener en su estructura al dominio Bro1, la proteína EhADH pertenece a la gran familia ALIX/AIP1, que cuenta con miembros en varias especies. Estas son proteínas multifuncionales de andamiaje que participan en diversos procesos celulares como la endocitosis, fagocitosis, apoptosis y división celular, entre muchas otras funciones (Bañuelos *et al.*, 2005, 2012; Odorizzi, 2006). Siendo parte de la familia ALIX, EhADH podría también ser una proteína multifuncional, sin embargo, se requiere estudiar a fondo sus funciones.

Actualmente, se conocen algunos procesos celulares en los que la adhesina EhADH participa, y estos procesos son parte de los eventos de virulencia de *E. histolytica*. Se ha demostrado que EhADH está involucrada en la adhesión de los trofozoítos con las células blanco y en la eritrofagocitosis; ya que su sobreexpresión en trofozoítos incrementa la adhesión de estas células y también incrementa de manera significativa la tasa de eritrofagocitosis (Bañuelos *et al.*, 2012). Además, al realizar el silenciamiento del gen *ehadh* los trofozoítos muestran una adhesión disminuida a células del hospedero, de hasta un 65% (Ocádiz-Ruiz *et al.*, 2015).

En *E. histolytica* se sabe que el dominio Bro1 de EhADH es responsable de reclutar a la proteína EhVps32 de la maquinaria ESCRT-III (Bañuelos *et al.*, 2012). Esta maquinaria es esencial en el trofozoíto para llevar a cabo la endocitosis y posterior degradación de proteínas cargo ubiquitinadas, o bien, de materia fagocitada. La maquinaria ESCRT (Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, por sus siglas en inglés, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) se compone de subcomplejos que tienen como finalidad la formación de cuerpos multivesiculares o MVB (por sus siglas en inglés, *multivesicular bodies*), los cuales se fusionan con los lisosomas para degradar su contenido. Por lo tanto, se ha considerado que EhADH está implicada no sólo en la adhesión y fagocitosis de células blanco, sino también en el procesamiento de las moléculas endocitadas, debido a que esta adhesina es una proteína accesoria de la maquinaria ESCRT, y a que interactúa con EhVps32 para generar los MVB (Avalos-Padilla *et al.*, 2015). Algunos ortólogos de la adhesina en otros organismos se reportan con la

misma función y también se consideran proteínas accesorias de la maquinaria ESCRT (Bissig y Gruenberg, 2014).

El motivo de adherencia que hay en EhADH es particular, ya que sólo se encuentra en la adhesina de *E. histolytica* y no se ha identificado una región similar en ningún ortólogo de la familia ALIX. Este motivo puede ser reconocido por anticuerpos monoclonales, y cuando eso sucede, el anticuerpo bloquea al motivo e impide la adhesión de los trofozoítos a las células blanco (García-Rivera *et al.*, 1999). En eritrocitos pre-tratados con un polipéptido que contiene los últimos 240 aa de EhADH, hay un decremento de la fagocitosis. Las células rojas son 79% menos fagocitadas que aquellos eritrocitos sin un pre-tratamiento (Martínez-López *et al.*, 2004). Hasta el momento, no se tienen evidencias de la participación de este motivo de adhesión en otros procesos celulares.

La proteína EhADH también participa en el daño a los epitelios, ya que EhADH recombinante tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales como MDCK y Caco-2, para después co-localizar con las proteínas claudina-1 y ocludina en las UEs, generando la apertura de la ruta paracelular y el flujo de moléculas en el epitelio. Además, se observó que células epiteliales MDCK transfectadas con esta adhesina son más susceptibles a la citólisis, lo que sugiere un papel de la EhADH, por sí misma o en sinergia con otras moléculas, durante la invasión de tejidos (Betanzos *et al.*, 2018).

## **2. Justificación**

La adherencia de *E. histolytica* a sus células blanco es un evento crucial en la patogénesis de la amibiasis. Para este proceso son importantes las moléculas de adhesión como la adhesina EhADH, la cual participa en otros eventos de virulencia como la fagocitosis. Dado que la adhesina presenta dominios y motivos diversos, éstos podrían conferirle multifuncionalidad, como sucede con otras proteínas de la misma familia ALIX.

Por lo tanto, es de relevancia estudiar las funciones de los dominios de EhADH y el rol que juegan en los eventos de virulencia, lo cual permitirá en un futuro desarrollar estrategias terapéuticas contra la amibiasis.

## **3. Hipótesis**

La adhesina EhADH de *E. histolytica* es una proteína andamio, cuyos dominios contribuyen diferencialmente durante varios mecanismos de virulencia de este parásito.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Analizar la participación de los dominios de la proteína EhADH de *Entamoeba histolytica* durante diferentes eventos de virulencia.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Analizar la expresión exógena de los dominios de la proteína EhADH en los trofozoítos y su papel durante eventos de virulencia *in vitro* e *in vivo*.
2. Producir los dominios recombinantes de la proteína EhADH.
3. Identificar proteínas de *E. histolytica* que se asocien con los dominios Bro1, Linker y Adh de la proteína EhADH.

## 5. Estrategia experimental

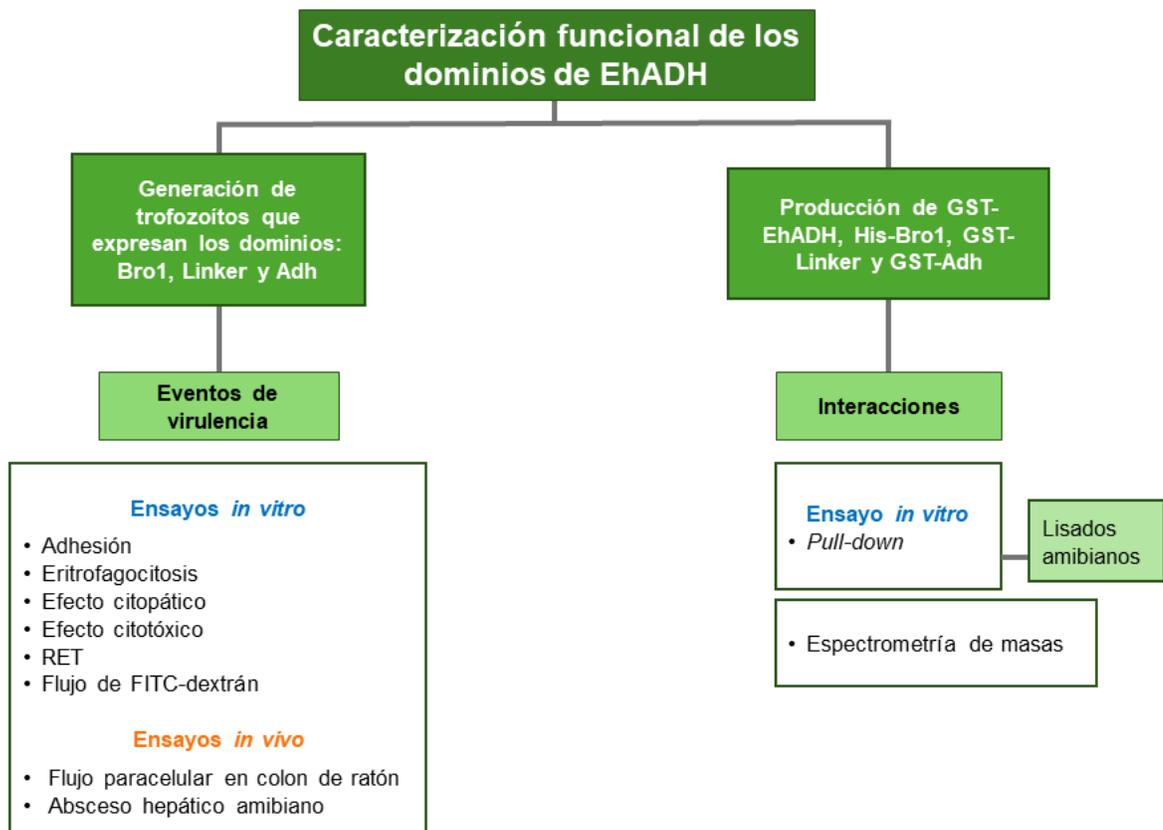


Figura 6. Estrategia experimental general.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Generación de la estructura secundaria y terciaria de EhADH y sus dominios Bro1, Linker y Adh

La secuencia de aa de EhADH (número de acceso: EHI\_181220) se recuperó de AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/>) (Amos *et al.*, 2022). Mediante análisis *in silico*, se localizó el dominio Bro1, característico de las proteínas ALIX, y se alineó con la secuencia completa de aa de EhADH, para después compararlo con los ortólogos de ALIX (Protein BLAST (Cantalloube *et al.*, 1995) y SMART). Los otros dominios de EhADH fueron identificados en los servidores UniProt (Consortium, 2023) y ScanProsite (Saqi y Sayle, 1989). La estructura primaria se representó utilizando el servidor Illustrator for Biological Sequences (IBS).

La estructura 3D de EhADH predicha se obtuvo utilizando como molde las proteínas Alix y Bro1 de *Homo sapiens* (PDB: 2OEV) y *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 1ZB1), respectivamente. Se seleccionó el modelo obtenido del servidor I-TASSER (Roy *et al.*, 2010) con la puntuación C más alta y se visualizó la estructura 3D utilizando el software UCSF Chimera v1.16. El interactoma se realizó con la proteína EhADH como cebo, proteínas amibianas como presas, y la base de datos STRING.

### 6.2 Diseño de péptidos específicos de los dominios Bro1, Linker y Adh

La secuencia aminoacídica de los dominios de la proteína EhADH se introdujo en los programas ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>), Bcpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) y SVMTrip (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/>), para determinar el epítipo idóneo para generar un anticuerpo específico contra cada dominio. Los programas usados permitieron determinar: hidrofobicidad, accesibilidad, superficie expuesta, polaridad y antigenicidad de los candidatos analizados. Los péptidos seleccionados (**Tabla 1**) fueron comparados mediante BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la base de datos AmoebaDB (Amos *et al.*, 2022), con el objetivo de confirmar su especificidad. Todos los péptidos fueron acoplados a la proteína inmunogénica KLH en su extremo N. La síntesis de los péptidos se llevó a cabo por la empresa GL Biochem (<http://www.glbiochem.com/en/index/index.aspx>) en Shangai, China.

**Tabla 1. Péptidos específicos diseñados para la obtención de anticuerpos policlonales.**

Dominio	Secuencia	Longitud (aa)	Posición en la proteína EhADH	Proteína acoplada en el extremo N	Especie animal en que se inoculó	Hidrofobicidad (%)	Propensión antigénica promedio
Bro1	NQLIPSVDAFKTFYKITV	18	212-229	KLH	Rata	50	1.0632
Linker	IEAETTASFEKGITALDS	18	426-443	KLH	Ratón	38.89	0.9895
Adh	KFRQFENDIKLLCEGNIQ	18	495-512	KLH	Conejo	33.33	1.0086

### 6.3 Obtención de anticuerpos policlonales

Para obtener anticuerpos policlonales que reconocieran a los dominios de la proteína EhADH, se sintetizaron los tres péptidos mencionados previamente (**Tabla 1**). Los péptidos Bro1 (200 µg), Linker (100 µg) y Adh (600 µg) se inocularon en diferentes especies animales (ratas Wistar n=3, ratones Balb/cJ n=7 y conejo New Zealand n=1, respectivamente) por vía intramuscular y subcutánea. Para la inmunización, los péptidos fueron emulsificados en el adyuvante Titer-Max Classic (Sigma-Aldrich). Previo al primer reto se obtuvo una muestra de sangre de cada animal para obtener el suero pre-inmune, el cual se utilizó como control negativo. Los animales se inmunizaron tres veces más utilizando la mitad de la concentración inicial del antígeno, con un intervalo de 15 días entre cada reto. Se obtuvo una muestra sanguínea antes de cada inmunización para medir la presencia y el título de los anticuerpos. Las muestras de sangre se incubaron a 37°C durante 1 h para facilitar la separación del suero. Posterior a la incubación, la sangre se centrifugó a 2,000 rpm durante 15 min a 4°C para recuperar el suero, el cual se separó en alícuotas que se almacenaron a -20°C hasta su uso. El análisis

de la especificidad y la titulación de los anticuerpos policlonales generados se realizó mediante ensayos de Western Blot (WB).

#### **6.4 Cultivos celulares**

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS clona A (Orozco *et al.*, 1983) fueron cultivados axénicamente en cajas de cultivo a 37°C en medio TYI suplementado con 3% de la mezcla de vitaminas Diamond (Diamond *et al.*, 1978) (North American Biologicals), 0.25 UI/mL de benzilpenicilina (Lakeside), 35 µg/mL de estreptomina (Lakeside) y 15% de suero bovino adulto (SBA) (Microlab) inactivado por calentamiento durante 30 min/56°C (TYI-S-33). Los parásitos se recolectaron durante la fase de crecimiento logarítmico, enfriando los tubos de cultivo durante 10 min en un baño de agua helada, y se recogieron mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 5 min.

Células epiteliales MDCK (de riñón de perro aisladas por Madin Darby) (Cereijido *et al.*, 1978) o Caco-2 (de adenocarcinoma colorectal humano), fueron cultivadas a confluencia en medio DMEM suplementado con 100 IU/mL de penicilina (In Vitro); 100 mg/mL de estreptomina (In Vitro), 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 0.08 U/mL de insulina (Eli Lilly), a 37°C y con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La confluencia de las líneas celulares se verificó por microscopía óptica y por los valores de RET, normalmente arriba de 1,000 Ω/cm<sup>2</sup> para las células MDCK y 1,400 Ω/cm<sup>2</sup> para Caco-2.

#### **6.5 Cuantificación de células en cámara de Neubauer**

Para cuantificar el número de trofozoítos o células epiteliales, se realizó un conteo en la cámara de Neubauer, empleando la siguiente fórmula:

No. células (sumatoria de los 4 cuadrantes) / 4\*(factor de dilución) = No. células/mL.

## 6.6 Extracción de ARN total de *E. histolytica*

La extracción de ARN total se realizó con el reactivo comercial Trizol (Invitrogen), según las especificaciones del proveedor. Los trofozoítos de la clona A de *E. histolytica* fueron colectados por centrifugación a 1,700 rpm/5 min/4°C. A la pastilla se le adicionó Trizol, utilizando 200 µL/10<sup>6</sup> amibas. La mezcla se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 5 min. Se adicionaron 30 µL de cloroformo por cada 10<sup>6</sup> amibas, después el tubo se agitó y se incubó a TA por 5 min, seguido de una centrifugación a 13,000 rpm/15 min/4°C para separar la solución en una fase orgánica y otra acuosa, esta última localizada en la parte superior del tubo. La fase acuosa se recuperó en un tubo estéril y el ARN se precipitó a TA por 10 min con 75 µL de isopropanol frío. La muestra se mezcló suavemente por inversión, se incubó a TA por 10 min, se centrifugó a 13,000 rpm/15 min/4°C y el sobrenadante se descartó. La pastilla de ARN recuperada se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 13,000 rpm/15 min/4°C; después se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en condiciones de esterilidad. El ARN fue resuspendido en agua libre de ARNasas (agua con dietilpirocarbonato, DEPC). La integridad del ARN se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo). El ARN se almacenó a -70°C hasta su uso.

## 6.7 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

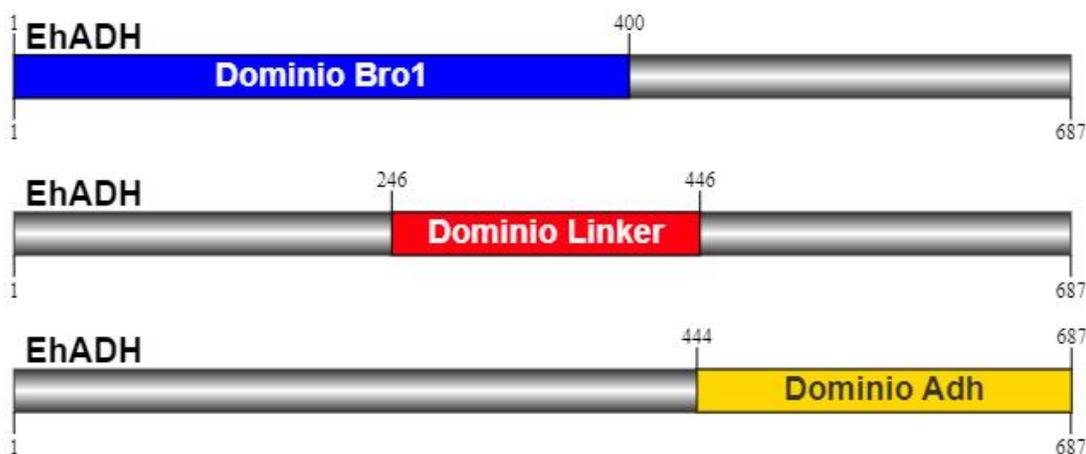
Para eliminar el ADN remanente en las muestras de ARN se hizo un tratamiento con ADNasa I. Para ello, se utilizaron 5 µg del ARN obtenido, se adicionó 1 U de la enzima ADNasa I (Promega) y 2 µL de amortiguador 5X, completando con agua-DEPC hasta alcanzar un volumen de 10 µL. Esta mezcla se incubó durante 30 min a 37°C; posteriormente se adicionó 1 µL de EDTA 50 mM y se incubó por 10 min a 65°C, con la finalidad de inactivar a la enzima ADNasa I.

El ARN tratado con ADNasa se mezcló con 100 ng de oligo dT (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 5 min. A continuación, al tubo se le agregó 1 µL

de la mezcla de dNTPs 10 mM, se colocó inmediatamente en hielo y se le agregó la siguiente mezcla: 4 µL de amortiguador de reacción Superscript II (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), 2 µL de ditioneitol (DTT) 100 mM y 2 µL de inhibidor de ARNasas (RNAsin, Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, la mezcla se incubó por 2 min a 42°C y después se adicionaron 200 U de la enzima Superscript™ II RT (Invitrogen), para incubar nuevamente a 42°C/50 min. Posteriormente, la reacción se volvió a incubar, ahora a 70°C/15 min para inactivar a la transcriptasa reversa. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 µL de ARNasa con la finalidad de obtener un mayor rendimiento de la reacción de PCR, debido a que se elimina el ARN molde y se impide la formación de moléculas dúplex de ADN-ARN. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### 6.8 Diseño de oligonucleótidos específicos

Para el estudio de las diferentes regiones de la adhesina EhADH, la proteína se dividió en 3 dominios denominados Bro1, Linker y Adh. El dominio Bro1 abarca el dominio completo descrito por Montaña *et al.*, 2017, desde el nucleótido 1 al 1,200 (del aa 1 al 400). Por su parte el dominio Linker, abarca desde el nucleótido 748 al 1,350 (del aa 250 al 450) e incluye parte del extremo carboxilo del dominio Bro1, donde se encuentra el principal sitio de fosforilación por cinasas de la familia Src. Además, el dominio Linker incluye el principal sitio de unión a la CP para la formación del complejo EhCPADH. Por último, el dominio Adh comprende desde el nucleótido 1,330 al 2,061 (del aa 444 al 687). En la **Figura 7** se puede apreciar la distribución de los dominios dentro de la proteína EhADH. Los oligonucleótidos diseñados sirvieron para la generación de trofozoítos mutantes y para la producción de proteínas recombinantes.



**Figura 7. Distribución de los dominios Bro1, Linker y Adh dentro de la secuencia de EhADH.** Se representa la proteína EhADH completa (en color gris) y la extensión de cada uno de los dominios a estudiar. Los números superiores indican los aa abarcados para cada dominio.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones que codifican para cada dominio, mismos que se indican en la **Tabla 2**. El diseño se realizó con el apoyo del programa bioinformático Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), y se analizaron las características de los mismos con el programa OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), procurando que los oligonucleótidos no formaran estructuras secundarias y tuvieran un buen contenido de los nucleótidos G y C. Posterior a eso, se realizó un análisis de alineamiento con BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), usando la base de datos de *E. histolytica* AmoebaDB, con la finalidad de comprobar que las secuencias elegidas se localizaran exclusivamente en los fragmentos de interés. A los oligonucleótidos se les añadieron secuencias, para ser reconocidos por enzimas de restricción específicas. Además, se añadieron 3 nucleótidos G o C en el extremo 5' de cada oligonucleótido, para favorecer la estabilidad de unión de las enzimas de restricción.

**Tabla 2. Oligonucleótidos específicos que se utilizaron para amplificar los fragmentos Bro1, Linker y Adh de EhADH de *E. histolytica*.**

Oligonucleótidos para la generación de trofozoítos mutantes					
Dominio	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Enzima de restricción que lo corta	Tamaño del amplicón (pb)
Bro1	ptetBro1S	CC GGT ACC TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG AAT AGA CAA TTC ATT CCT GAA TT	60	<i>KpnI</i>	1,221
	ptetBro1AS	CCC GGA TCC TAA AAT GTC TTG TGG AAT ATC ACA TG		<i>BamHI</i>	
Linker	ptetLinkerS	CC GGT ACC TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG ACA TTG GCT GCT AAA GGT GC	60	<i>Sall</i>	631
	ptetLinkerAS	GC CGC GGC CGC TTA TCT TCT TTC TTC AGC TGC TTC AG		<i>NotI</i>	
Adh	ptetAdhS	CC GGT ACC TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG GAA GCA GCT GAA GAA AGA AGA TTA AG	60	<i>Sall</i>	757
	ptetAdhAS	GC CGC GGC CGC TTA AAG AGA TGG AAA CAT AGG ATT GG		<i>NotI</i>	
Oligonucleótidos para la generación de proteínas recombinantes					
Dominio	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Enzima de restricción que lo corta	Tamaño del amplicón (pb)
Bro1	Bro1-KpnI-pCold-S	CGG GGT ACC ATG AAT AGA CAA TTC ATT CCT GAA TT	60	<i>KpnI</i>	1,221
	Bro1-BamHI-pCold-AS	CC GGA TCC TTA AAT GTC TTG TGG AAT ATC ACA TG		<i>BamHI</i>	
Linker	V-Sall-pGEX-S	CG CGT CGA CGC ATG ACA TTG GCT GCT AAA GGT GC	60	<i>KpnI</i>	631
	V-NotI-pGEX-AS	CC GGA TCC TTA TCT TCT TTC TTC AGC TGC TTC AG		<i>BamHI</i>	
Adh	Adh-Sall-pGEX-S	CG CGT CGA CGC ATG GAA GCA GCT GAA GAA AGA AGA TTA AG	60	<i>KpnI</i>	757
	Adh-NotI-pGEX-AS	CC GGA TCC TTA AAG AGA TGG AAA CAT AGG ATT GG		<i>BamHI</i>	

\*Dentro de la secuencia (5'-3') de los oligonucleótidos se indican en letras rojas las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción usadas, en color rosa se señala la etiqueta de HA agregada a los oligonucleótidos, en color verde se indica el codón de inicio (ATG) de los oligonucleótidos sentido (S) y, en color azul se muestra el codón de paro de los oligonucleótidos antisentido (AS).

## **6.9 Amplificación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh**

La amplificación de los dominios Bro1, Linker y Adh se realizó mediante PCR. En estos ensayos se utilizaron 100 ng de ADNc, 10  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos sintetizados (sentido y antisentido), 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), amortiguador GC 5X, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de la enzima de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart DNA polymerase (Kapa Biosystems) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25  $\mu$ L. En el control negativo, se añadió toda la mezcla de reacción, excepto el molde de ADNc.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C/3 min, 30 ciclos a 95°C/30 s, alineamiento a 60°C/30 s, extensión a 72°C/1.5 min y la extensión adicional se llevó a cabo a 72°C/10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, en solución TAE (40 mM Tris, 40 mM Acetato, 1 mM EDTA, pH 8).

## **6.10 Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de ácidos nucleicos (ADN y ARN) fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE. A las muestras se les adicionó amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25% y glicerol al 26%), posteriormente fueron cargadas en geles de agarosa y se llevó a cabo la electroforesis manteniendo un voltaje constante de 60-70 V por 120 min. Luego del corrimiento, los geles fueron desmontados y se colocaron en una solución de bromuro de etidio al 0.05% (0.5  $\mu$ g/mL) por aproximadamente 5 min. Para la detección de los ácidos nucleicos, los geles se observaron bajo luz UV en el equipo GelDoc (Bio-Rad). Cuando se trabajó con ARN, el agua utilizada fue tratada con DEPC para eliminar ARNasas y con ella se prepararon todos los reactivos para llevar a cabo la electroforesis.

### **6.11 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

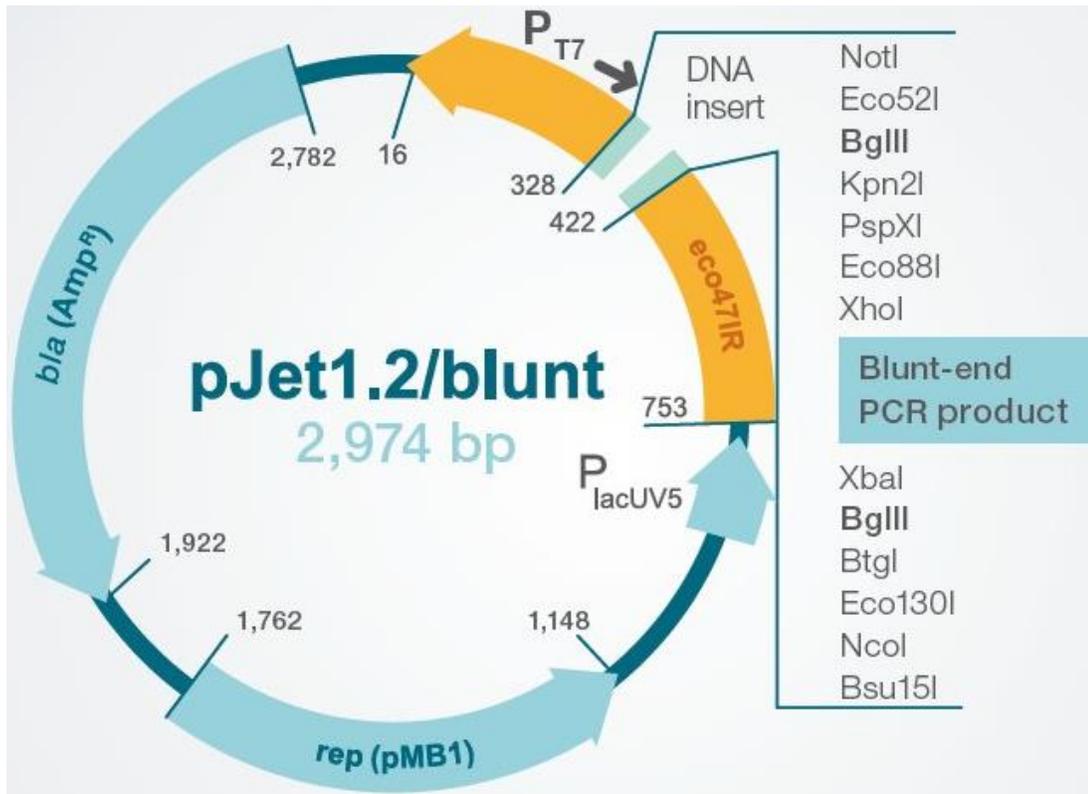
Las bandas en el gel de agarosa correspondientes a los productos amplificados que codificaban para los fragmentos Bro1, Linker y Adh se purificaron con el kit “GeneJET Gel extraction Kit” (Fermentas). Los fragmentos de ADN se cortaron de los geles de agarosa con una hoja de bisturí y se pesaron dentro de un microtubo de 1.5 mL. Después, se agregó un volumen 1:1 del amortiguador de unión y la mezcla se incubó a 50-60°C durante 10 min o hasta que el gel estuvo completamente disuelto. La mezcla se agitó suavemente por inversión, se agregó un volumen de isopropanol al 100% y se mezcló vigorosamente. Luego se cargó en una columna de purificación GeneJET, se centrifugó a 14,000 rpm/1 min/TA y se descartó el residuo del tubo colector. Con la finalidad de lavar el ADN unido a la columna, se colocaron 100 µL del amortiguador de unión, se centrifugó como se mencionó anteriormente y se lavó con 700 µL de amortiguador de lavado, nuevamente centrifugando con las condiciones ya establecidas. Al final, se realizó una centrifugación adicional para remover los residuos de etanol del amortiguador de lavado. Para eluir el ADN obtenido, la columna se colocó en un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril, se adicionaron 30 µL de agua estéril a 50°C y se centrifugó a 14,000 rpm/1 min/TA. El ADN eluído de la columna se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm en un equipo Nanodrop (Thermo) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.12 Clonación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh en el vector de tránsito *pJET1.2/blunt***

Los dominios amplificados y purificados fueron clonados en el vector de tránsito *pJET1.2/blunt* (Fermentas) (**Figura 8**), el cual permite clonar directamente productos de PCR con extremos romos generados por la ADN polimerasa de alta fidelidad. Adicionalmente, este vector contiene un gen letal que es interrumpido por la ligación de un inserto de ADN en el sitio de clonación, de manera que sólo las células que contienen los plásmidos

recombinantes son capaces de propagarse, evitando la necesidad de seleccionar clonas.

La ligación del producto amplificado y purificado y del vector se llevó a cabo en una proporción 1:3 (vector:inserto), con la siguiente mezcla de reacción: 10  $\mu$ L de amortiguador de reacción 2X, 75 ng del producto de PCR purificado, 25 ng del vector *pJET1.2/blunt*, 1  $\mu$ L de ADN ligasa T4 y agua libre de nucleasas para un volumen total de 20  $\mu$ L. La preparación se mezcló por pipeteo y se incubó a TA durante 30 min. Luego de esto, la mezcla se empleó para transformar bacterias competentes, las cuales se sembraron en placas Petri con medio Luria Bertani (LB: 1% triptona; 0.5% extracto de levadura; 1% NaCl) y agar (15 g por cada litro de medio LB) con ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/mL. Algunas de las colonias resultantes fueron resembradas en placas iguales para aislarlas y utilizarlas posteriormente.



**Figura 8. Vector de tránsito *pJET1.2/blunt*.** El vector consta de 2,974 pb. Posee un replicón (en la posición 1762-1148), un sitio de resistencia al antibiótico ampicilina (2782-1922), un sitio de inicio de la replicación (1148), un gen letal que permite la selección de las colonias que poseen el plásmido (753-16), múltiples sitios de clonación para colocar el inserto (422-328) y un sitio de inserción para ligar el inserto. Imagen tomada de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning/clonejet-pcr-cloning-kit.html>.

### 6.13 Preparación de bacterias competentes

Una colonia de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  (cepa que carece de endonucleasas y resulta útil para expandir plásmidos) o BL21 (cepas DE3 o C43, aptas para la inducción de proteínas recombinantes), se inocularon en 5 mL de medio LB a 37°C, en una incubadora con agitación orbital a 180 rpm (Lab-Line<sup>R</sup> Incubator-Shaker), durante la noche (ON, por sus siglas en inglés, *Over Night*). Al día siguiente, las bacterias fueron resembradas, tomando 50  $\mu$ L de ese cultivo para inocularlos en 5 mL de medio LB. Posteriormente, el cultivo se incubó a 37°C con agitación hasta que las células alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0.6 a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm. El cultivo fue colocado en tubos para, después, centrifugarlos a 3,000 rpm/10 min/4°C. La pastilla se resuspendió en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y se incubó por 20 min/4°C en hielo. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3,000 rpm/10 min/4°C y finalmente las bacterias se resuspendieron en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Las bacterias ahora competentes se almacenaron en alícuotas a 4°C hasta por una semana o a -70°C, hasta su uso.

### 6.14 Transformación de bacterias competentes

Para introducir los plásmidos deseados en las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21 se colocaron 50  $\mu$ L de bacterias competentes frescas en un tubo de microcentrífuga y se agregaron 20 ng del plásmido a transformar, la mezcla se incubó durante 30 min en hielo. Posteriormente, se le dio un choque térmico durante 90 s a 42°C, seguido por una incubación de 3 min en hielo. Al término de este tiempo se adicionaron 300  $\mu$ L de medio LB y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación constante (250 rpm). Después de esta incubación, las células recién transformadas fueron espatuladas en placas Petri que contenían medio LB-agar-ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Finalmente, estos cultivos se incubaron ON a 37°C.

### **6.15 Conservación de bacterias transformadas**

Una colonia de bacterias transformadas se cultivó en 5 mL de medio LB con antibiótico ON, a 37°C con agitación, a 170 rpm. Al día siguiente, el contenido del tubo se empastilló por centrifugación a 14,000 rpm/1 min/TA. El sobrenadante se decantó y la pastilla fue resuspendida en un volumen de 500 µL de glicerol diluido al 25% en medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Posteriormente, la muestra se incubó 10 min/4°C para que el glicerol pudiera penetrar a las células. Terminado ese tiempo, las bacterias se almacenaron a -20°C o -70°C, hasta su uso.

### **6.16 Purificación de plásmidos**

Para realizar la extracción de ADN plasmídico de las bacterias transformadas se utilizó el kit “QIAGEN Plasmid Purification” (QIAGEN). Las colonias resultantes de cada transformación se crecieron en 5 mL de medio LB y ampicilina (100 µg/mL) ON, a 37°C, con agitación constante a 170 rpm. Los cultivos iniciales fueron diluidos 1:100 en 100 mL de medio LB con antibiótico y se incubaron por 16 h a 37°C, en agitación constante a 170 rpm. A continuación, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4,000 rpm/30 min/4°C y el sobrenadante se decantó. La pastilla se resuspendió en 4 mL de amortiguador “P1” (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, EDTA 10 mM y 100 µg/mL de ARNasa), posteriormente se le adicionaron 4 mL de amortiguador “P2” (NaOH 200 mM y SDS 1%), el tubo se mezcló por inversión de cuatro a seis veces y se incubó a 4°C durante 15 min. La mezcla fue centrifugada a 4,000 rpm/30 min/4°C, se colectó el sobrenadante y se filtró. Al mismo tiempo, una columna QIAGEN-tip 100 fue equilibrada, agregando 4 mL de amortiguador QBT (NaCl 1.25 M, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol 15% y Tritón X-100 0.15%), permitiendo que la columna se vaciara por gravedad. Una vez equilibrada la columna, se agregó el sobrenadante filtrado y se permitió su entrada a la resina. La columna se lavó con dos volúmenes de 10 mL de amortiguador QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM e isopropanol 15%) y el ADN plasmídico fue eluido con 5 mL del amortiguador QF (NaCl 1.25 M, Tris 50 mM pH 8.5 e isopropanol

15%) precalentado a 65°C. El ADN obtenido se precipitó, adicionando 3.5 mL de isopropanol y se centrifugó a 2,500 rpm/1.5 h/4°C. Al término de este tiempo, el sobrenadante se decantó cuidadosamente y la pastilla con el ADN se lavó con 2 mL de etanol frío al 70%, centrifugando a 2,500 rpm/10 min/4°C. La pastilla se secó al aire hasta que se evaporó completamente el etanol (aproximadamente en 10 min). Finalmente, el ADN seco fue resuspendido en un volumen apropiado de agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C hasta su uso. Luego de este procedimiento, cada una de las construcciones generadas en este proyecto fue secuenciada.

### **6.17 Secuenciación de construcciones**

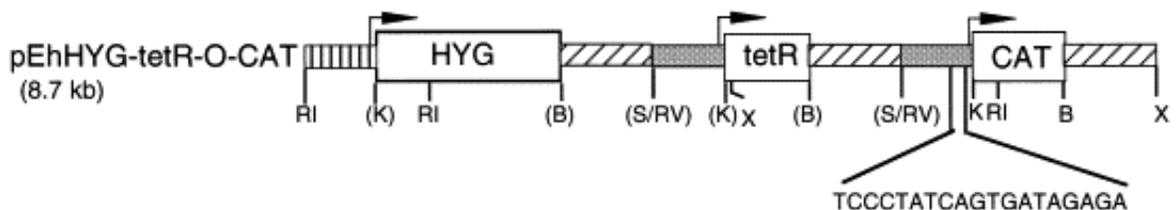
Se usó el kit Sequencing Standards, BigDye™ Terminator v3.1 para secuenciar todas las construcciones generadas en este proyecto. Se utilizó la mezcla de reacción: 4 µL BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 2 µL BigDye™ Terminator v1.1 y v3.1 5X Sequencing Buffer, 1 µL (10 mM) del oligonucleótido de secuenciación (sentido o antisentido, con reacciones por separado), 1 µg del vector a secuenciar y un volumen total de 20 µL completado con agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción de amplificación fueron las siguientes: inicialmente a 96 °C/60 s, posteriormente 30 ciclos a 96 °C/30 s, alineamiento a 52 °C /30 s y elongación a 60 °C/60 s. La extensión final a 72 °C/4 min.

La reacción se purificó por columnas Centri-Sep™ Spin Columns (Applied Biosystems, 401762), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias esperadas según las bases de datos, para comprobar la ausencia de mutaciones y que las secuencias se hallaran en marco de lectura.

## 6.18 Clonación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh en el vector de transfección *pEhHYG-tetR-O-CAT*

Con la finalidad de ahondar en la comprensión de la función y la participación de los dominios de EhADH en el proceso patogénico de *E. histolytica*, se procedió a utilizar un plásmido llamado *pEhHYG-tetR-O-CAT* (**Figura 9**), diseñado para transfectar y sobreexpresar proteínas en el parásito. Este plásmido fue donado por el Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía (Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav).

Las construcciones que ya se encontraban en el plásmido de tránsito *pJET1.2/blunt* (Fermentas) se digirieron con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* y los insertos liberados se subclonaron en el plásmido *pEhHYG-tetR-O-CAT*, que posteriormente en esta tesis se denominará *pTet*. Este plásmido cuenta con un promotor fuerte de la lectina Gal/GalNac y río abajo se encuentra una secuencia de resistencia al antibiótico tetraciclina, que funge como un inductor para la expresión de las construcciones (**Figura 9**). Este sistema permite expresar momentáneamente proteínas que podrían ser letales para la amiba y, además, evita que los trofozoítos se acostumbren a la sobreexpresión, visualizando de mejor manera los efectos de la expresión. Las construcciones se amplificaron en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  y se purificaron utilizando el kit Qiagen Midi (Qiagen). Posteriormente, se sometieron también a secuenciación, para determinar la ausencia de mutaciones y que los fragmentos estuvieran en marco de lectura.



**Figura 9. Vector de expresión inducible *pTet*.** En la posición 5' se localiza un promotor para regular la expresión de la secuencia codificante de *hygR*, que permite la selección primaria de las poblaciones. Posteriormente, el vector contiene un promotor fuerte de la lectina Gal/GalNac y el gen *tetR* para la inducción momentánea de las secuencias de interés con el antibiótico tetraciclina. Hay otro promotor fuerte de la lectina Gal/GalNac, que controla al gen

reportero CAT. Para la clonación, se libera al gen CAT usando los sitios de restricción *KpnI* y *BamHI*, y en esa posición se inserta la secuencia de interés. Imagen tomada de Hamann *et al.*, 1997.

### **6.19 Sobreexpresión de los dominios Bro1, Linker y Adh en trofozoítos de *E. histolytica***

Se realizó la transfección del vector *pEhHYG-tetR-O-CAT* con cada uno de los dominios de la proteína EhADH (*pEhHYG-tetR-O-CAT/Bro1*, *pEhHYG-tetR-O-CAT/Linker*, *pEhHYG-tetR-O-CAT/Adh*) en trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS. Como control se transfectaron trofozoítos con el vector *pEhHYG-tetR-O-CAT* vacío, sin inserto.

Un inóculo de  $3 \times 10^5$  amibas se mantuvieron en placas de cultivo de 6 pozos (Corning) ON, en medio TYI y con una presión parcial de 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las amibas se lavaron con 5 mL de medio M199 (Sigma-Aldrich) precalentado y se cultivaron con 1.8 mL de medio M199 suplementado con 15% de SBA (Microlab). Posteriormente, se añadió lentamente la mezcla de transfección (20 µg del plásmido, 100 µL de medio M199 precalentado y 20 µL de Superfect [Qiagen, 301305]) y se incubó 10 min a TA. Se retiró el medio de cultivo a los trofozoítos y se lavaron con 5 mL de medio M199; enseguida se agregaron 1.8 mL del mismo medio suplementado con 20% de SBA. Las amibas se colocaron en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 3 h a 37°C. Después, las amibas se enfriaron y se transfirieron a un tubo con 10 mL de medio LB precalentado y se colocaron a 37°C en una incubadora sin CO<sub>2</sub>.

Luego de 48 h de realizada la transfección, los trofozoítos se seleccionaron con 1 µg/mL del análogo de gentamicina G-418 (Sigma-Aldrich), hasta obtener un crecimiento estable, que se dio entre 3 y 5 µg/mL. Los cultivos fueron mantenidos estables en medio TYI completo con SBA al 20% con el antibiótico selector. Como las construcciones se encuentran en un vector inducible, para inducir la expresión de los diferentes dominios de EhADH, se añadió 1 µg/ml del antibiótico tetraciclina (Sigma-Aldrich) al medio TYI-S-33. La sobreexpresión de los diferentes dominios se analizó mediante ensayos de WB e IF.

## **6.20 Ensayo de Inmunofluorescencia (IF)**

Los trofozoítos transfectados se colocaron en cubreobjetos durante 2 h para permitir su adhesión y después se fijaron con etanol absoluto por 30 min a -20°C. Posteriormente, las preparaciones se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), se bloquearon con BSA al 0.5% por 1 h y se incubaron ON a 4°C con los anticuerpos producidos previamente. Después, las muestras se lavaron tres veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos acoplados a fluorocromos. Los núcleos se marcaron con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 0.25 mg/ml durante 5 min a TA, la fluorescencia se preservó con Vectashield (Vector Laboratories, H-1000) y las células se montaron en portaobjetos para su análisis por microscopía confocal en el microscopio Carl Zeiss LSM-700.

## **6.21 Obtención de eritrocitos humanos**

Se obtuvo una muestra de sangre humana (aproximadamente 3 mL) por punción venosa y se colocó en solución Alsever (ácido cítrico 2.86 mM, citrato de sodio 27.2 mM, NaCl 71.8 mM y dextrosa 113.7 mM, pH 6.1), la cual se utilizó como anticoagulante. La muestra se centrifugó a 2,400 rpm/10 min/4°C y se lavó cuatro veces con la misma solución Alsever. Los sobrenadantes, que contenían las células blancas, se eliminaron y las pastillas, con los eritrocitos, se cuantificaron en una cámara de Neubauer, como se mencionó previamente. Los eritrocitos se utilizaron al momento, o se almacenaron a 4°C hasta por 15 días.

## **6.22 Ensayo de adhesión de eritrocitos**

Para medir la capacidad de adhesión de eritrocitos de los trofozoítos transfectados, éstos se incubaron con eritrocitos humanos (relación 1:25) en medio TYI sin suero, durante 0, 1, 5, 15, 30 y 60 min a 4°C en hielo. Los trofozoítos se centrifugaron a 2,300 rpm/5 min/4°C. El sobrenadante se eliminó

y la pastilla con las amibas se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua. Muestras de todos los tiempos de interacción fueron teñidas con 2 mg/mL de diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich) y visualizadas mediante microscopía de luz, para contar los eritrocitos adheridos por cada amiba. Los ensayos se llevaron a cabo tres veces por triplicado.

### **6.23 Ensayo de eritrofagocitosis**

Para hacer el ensayo de eritrofagocitosis, los trofozoítos transfectados se incubaron con eritrocitos humanos (relación 1:25) en medio TYI sin suero, durante 0, 1, 5, 15, 30 y 60 min a 37°C. Los eritrocitos no ingeridos por las amibas se lisaron con ácido acético al 3%. Posteriormente, los trofozoítos se centrifugaron a 2,300 rpm/5 min/4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla con las amibas que fagocitaron eritrocitos se lisó con ácido fórmico absoluto. Los trofozoítos fueron lisados en sesiones de congelamiento y descongelamiento y la concentración de hemoglobina fue cuantificada por espectrofotometría a 400 nm. En paralelo, muestras de todos los tiempos de interacción fueron teñidas con 2 mg/mL de diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich) y visualizadas mediante microscopía de luz, para contar los eritrocitos fagocitados por cada amiba. Los ensayos se llevaron a cabo tres veces por triplicado.

### **6.24 Efecto citopático de trofozoítos mutantes sobre cultivos celulares**

Monocapas de células MDCK ( $3 \times 10^5$ ) confluentes fueron lavadas dos veces con PBS para retirarles trazas de suero, después se incubaron con los trofozoítos mutantes que sobreexpresaban a los dominios Bro1, Linker y Adh (relación 20:1), a 37°C en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, durante aproximadamente 2 h, hasta observar un 80% de destrucción de las monocapas. Como control, se usaron trofozoítos transfectados con el vector *pTet* vacío. Para detener la acción citopática de las amibas, las preparaciones se incubaron a 4°C durante 15 min. El medio con las amibas despegadas se

retiró y las monocapas epiteliales se lavaron seis veces con PBS frío y una vez con PBS a -20°C por 2 min. Para comprobar la completa remoción de las amibas sobre las células MDCK, se realizaron observaciones al microscopio óptico. Las células que quedaron en las placas de cultivo se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 15 min/TA y se lavaron tres veces con PBS. Después se tiñeron con azul de metileno al 1% en amortiguador de boratos 0.1 M pH 8.7 (100 mL de ácido bórico 0.2 M y 150 mL de tetraborato de sodio 0.05 M), durante 10 min. Se realizaron tres lavados con amortiguador de boratos 0.01 M y el colorante fue extraído con 1 mL de HCl 1N, durante 30 min a 37°C. La suspensión se cuantificó por espectrofotometría, a una  $\lambda=660$  nm. Estos ensayos se realizaron al menos tres veces y por triplicado, de manera independiente. Las mediciones se analizaron utilizando el programa bioinformático ImageJ. La destrucción de las células epiteliales se midió en función de la intensidad del color de la monocapa celular restante, en comparación con el control, que fueron células MDCK no incubadas con trofozoítos.

### **6.25 Efecto citotóxico de trofozoítos mutantes sobre cultivos celulares**

A partir de trofozoítos mutantes de *E. histolytica* que expresaban a los dominios Bro1, Linker y Adh ( $2 \times 10^6$ ), se realizaron extractos totales que fueron colocados sobre monocapas de células MDCK ( $3 \times 10^5$ ), a 37°C durante aproximadamente 4-5 h, hasta observar un 80% de destrucción de las monocapas. Como control, se usaron trofozoítos transfectados con el vector *pTet* vacío. Las preparaciones se incubaron por 15 min/4°C. Las monocapas epiteliales se lavaron tres veces con PBS frío. Posteriormente, las células epiteliales se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS, durante 15 min/TA y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se tiñeron con azul de metileno al 1%, en amortiguador de boratos 0.1 M pH 8.7, por 10 min. Se realizaron tres lavados con el mismo amortiguador y el colorante fue extraído con 1 mL de HCl 1N, durante 30 min/37°C. La suspensión se cuantificó por

espectrofotometría a una  $\lambda=660$  nm. Estos ensayos se realizaron al menos tres veces y por triplicado, de manera independiente. La destrucción de las células epiteliales se midió en función de la intensidad del color de la monocapa celular restante, en comparación con el control, que fueron células MDCK no incubadas con trofozoítos.

### **6.26 Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET)**

Células MDCK crecidas a confluencia en cámaras transwell (6.5 mm diámetro y 0.4  $\mu\text{m}$  de poro; Corning) se incubaron por la parte apical con trofozoítos transfectados que expresaban a los dominios Bro1, Linker y Adh, y después se les midió la RET con un voltímetro EVOM (World Precision Instruments) durante 90 min. Como control positivo se utilizaron monocapas incubadas con el quelante de calcio EDTA (5 mM), que desacopla las UICs y produce una caída drástica de la RET. La medición de la RET de cada pozo se normalizó de acuerdo con su valor inicial previo al tratamiento (alrededor de 1,000  $\Omega/\text{cm}^2$ ) (Betanzos *et al.*, 2013).

### **6.27 Ensayo de flujo de dextrán**

La permeabilidad paracelular de las células epiteliales se determinó por medio de la cuantificación de la difusión del compuesto dextrán acoplado a FITC (2 a 4 kDa) (Sigma-Aldrich). Este compuesto (3 mg/mL) se adicionó a la parte apical de células MDCK confluentes crecidas en filtros transwells. Después, a la cámara superior se le adicionaron los trofozoítos transfectados que expresaban a los dominios Bro1, Linker y Adh. También se usaron monocapas tratadas con EDTA (5 mM), como control positivo. Las muestras se incubaron por 90 min, a 37°C, con agitación suave. Se colectaron muestras de la cámara inferior cada 30 min y se midió la fluorescencia que difundió mediante un fluorómetro (Fluoroskan) a  $\lambda=492$  y 520 nm, de excitación y emisión, respectivamente. Los valores de emisión se convirtieron a concentración de dextrán-FITC, por medio de una curva estándar.

### **6.28 Permeabilidad epitelial en colon de ratón**

Ratones machos de la cepa C57/BL6 (n=3) libres de patógenos, de 6-8 semanas de edad y de aproximadamente 30 g de peso cada uno, se anestesiaron intraperitonealmente con 125 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Sanofi) y 12.5 mg/kg de xilacina (Phoenix Scientific). A continuación, los animales se inocularon a través de una cánula rectal suave lubricada con glicerol, con los trofozoítos transfectados que expresaban a los dominios Bro1, Linker y Adh, y como control positivo se utilizaron trofozoítos transfectados con el vector vacío *pTet* ( $10^6$  parásitos en 300  $\mu$ L de PBS pH 6.8). Después de 30 min, se realizó una laparotomía, se insertó otra cánula a través de una pequeña incisión en el colon proximal y este tejido se lavó extensamente con PBS. Después, utilizando la misma cánula, se administró en el colon el colorante azul de Evans al 1.5% (Sigma-Aldrich), durante 15 min. A continuación, los animales se sacrificaron y se extrajo el intestino grueso, el cual se lavó con una cánula insertada en el ciego para eliminar el exceso de colorante y se trató con N-acetilcisteína 6 mM para eliminar el exceso de moco. El intestino grueso se pesó, el colorante se eluyó con dimetilformamida al 99% y se cuantificó mediante espectrofotometría a una  $\lambda=610/660$  nm, tomando en cuenta el peso del tejido, para expresarlo como daño por gramo de tejido. Para su análisis, el colon se dividió en dos zonas, proximal (zona más cercana al sitio de inoculación del colorante) y distal.

### **6.29 Formación del Absceso Hepático Amibiano (AHA) en hámsteres**

Con los trofozoítos mutantes que expresaban a los dominios Bro1, Linker y Adh, se indujo la formación del AHA en el modelo de hámster dorado sirio (machos, 4 semanas de edad y 80-100 g de peso). Los animales se anestesiaron con 45 mg/Kg de pentobarbital sódico (Anestosal, Pfizer) y se inocularon intraportalmente con  $3 \times 10^6$  trofozoítos. Como control positivo se utilizaron trofozoítos transfectados con el vector vacío *pTet*. Una semana después del desafío, los hámsteres fueron sacrificados y sus hígados fueron

disecionados para ponderar la formación de los abscesos. El daño hepático se calculó como el peso de los abscesos formados, dividido entre el peso del hígado entero, antes de que las áreas lesionadas fueran removidas.

### **6.30 Manejo ético de animales de laboratorio**

Todos los animales utilizados en esta tesis fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Cinvestav). El comité institucional de ética acerca del uso y cuidado de los animales, revisó y aprobó el protocolo usado en estos experimentos; dentro de los que se incluyeron ratones, ratas y conejos para producir anticuerpos, así como ratones de la cepa C57/BL6 y hámsteres dorados sirios utilizados en experimentos de virulencia *in vivo*. En el documento CICUAL 001, se informa que nuestra institución cumple la NOM-062-ZOO-1999 que se ocupa de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, dadas por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Esta Secretaría verifica y aprueba el cumplimiento de los lineamientos/regulación internacional para el uso y cuidado de los animales usados en el laboratorio en el Cinvestav (Número de verificación aprobado: BOO.02.03.02.01.908).

### **6.31 Clonación de los fragmentos Bro1, Linker y Adh en los vectores de expresión en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$**

Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción mostradas en la **Tabla 3**. La mezcla de reacción se realizó utilizando 3  $\mu$ g de vector, 10 U de cada enzima de restricción, 4  $\mu$ L de amortiguador de reacción 5X y se ajustó a un volumen final de 20  $\mu$ L con agua libre de nucleasas. La reacción se incubó ON a 37°C y los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

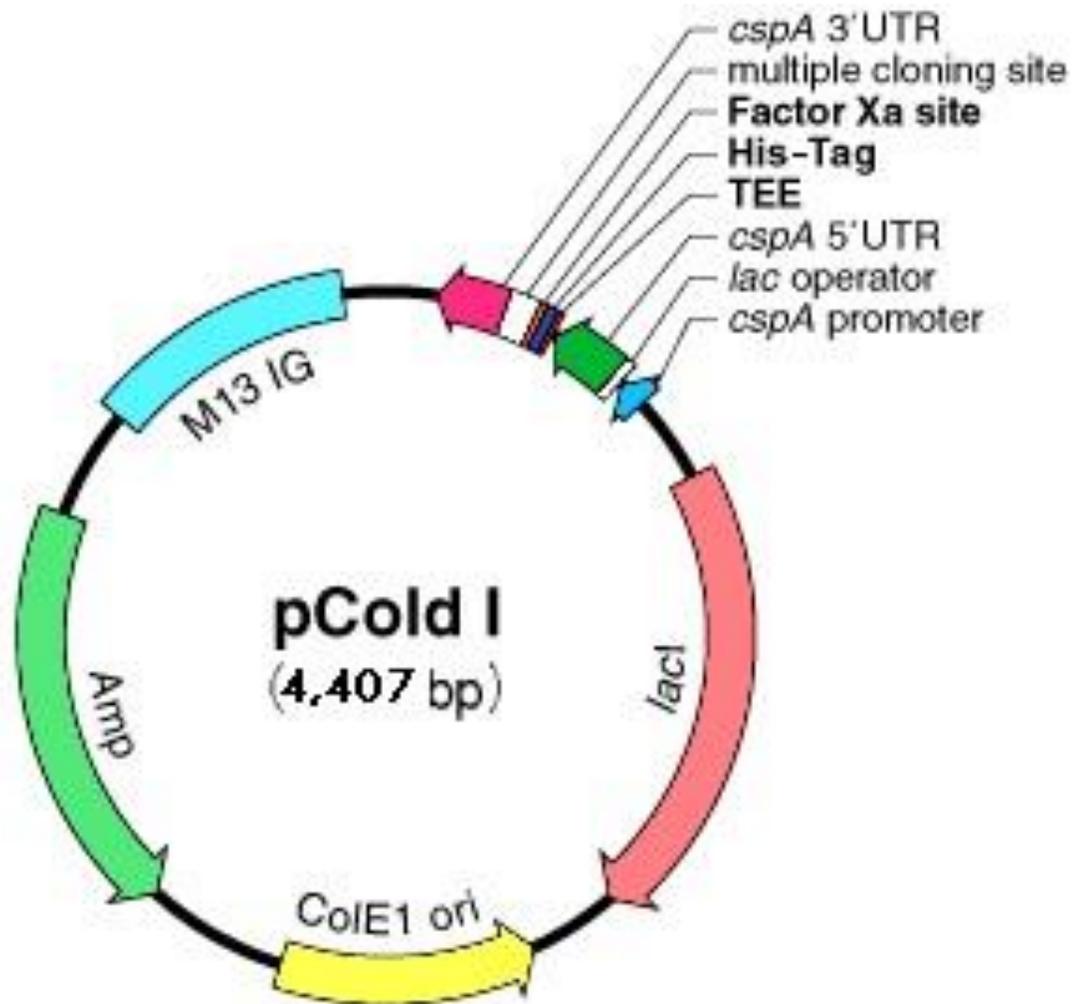
**Tabla 3. Construcciones y vectores de expresión que se utilizaron para subclonar los fragmentos Bro1, Linker y Adh de EhADH de *E. histolytica*.**

Construcción	Enzimas de restricción	Vector de expresión	Etiqueta
<i>pJET1.2/blunt-Bro1</i>	<i>KpnI</i> y <i>BamHI</i>	<i>pColdI</i>	His
<i>pJET1.2/blunt-Linker</i>	<i>Sall</i> y <i>NotI</i>	<i>pGEX-6P-1</i>	GST
<i>pJET1.2/blunt-Adh</i>	<i>Sall</i> y <i>NotI</i>	<i>pGEX-6P-1</i>	GST

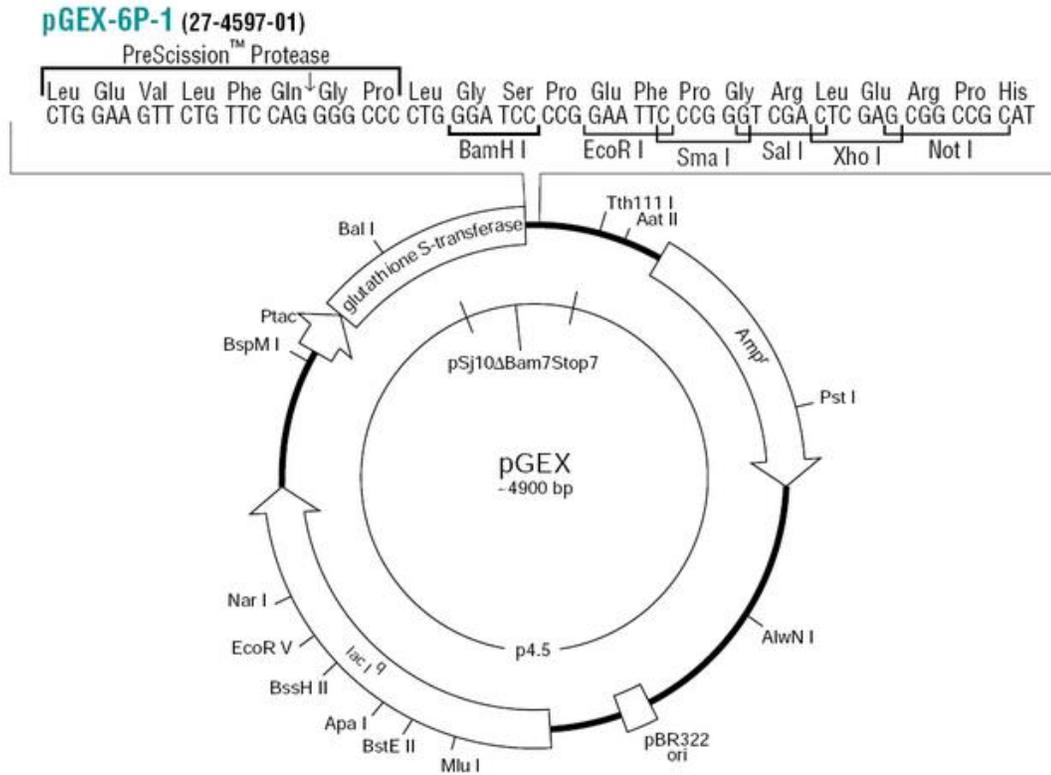
\*El vector de expresión *pColdI* se muestra en la **Figura 10**, mientras que el vector *pGEX-6P-1* se muestra en la **Figura 11**.

Para subclonar los fragmentos en los vectores de expresión, tanto las construcciones del vector *pJET1.2/blunt* con cada fragmento, como los plásmidos de expresión sin inserto se sometieron a restricción enzimática, y se purificaron del gel como se mencionó anteriormente.

El ensayo de ligación se realizó en una proporción 1:10 (vector:inserto) con la siguiente mezcla de reacción: 50 ng de plásmido digerido y purificado y la cantidad necesaria del inserto para tener la relación molar deseada, 100 U de la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen), 4 µL de amortiguador 5X (Invitrogen) y se ajustó a un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 4°C durante 16 h. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de ligación, pero sin el inserto. La reacción completa se utilizó para transformar bacterias DH5α competentes, mismas que fueron sembradas en placas Petri con medio LB-agar-ampicilina (100 µg/mL). A las colonias bacterianas que crecieron se les realizó una prueba de PCR, para saber si contenían los insertos, y a las colonias positivas se les realizó la extracción de los plásmidos.



**Figura 10. Vector de expresión *pColdI*.** Mapa del vector utilizado para la clonación del fragmento Bro1. Los sitios de restricción utilizados para insertar el producto de interés fueron los de las enzimas *KpnI* y *BamHI*. Imagen tomada de <https://www.takarabio.com/products/protein-research/expression-vectors-and-systems/protein-folding-kits/pcold-dna-cold-shock>.



**Figura 11. Vector de expresión pGEX-6P-1.** Mapa del vector utilizado para la clonación de los fragmentos Linker y Adh. Los sitios de restricción utilizados para insertar los productos de interés fueron los de las enzimas *Sall* y *NotI*. *Ptac*, promotor inducible por IPTG. *Amp<sup>r</sup>*, gen de resistencia a ampicilina, pBR322 ori, origen de replicación del plásmido pBR322. *Lac I<sup>q</sup>*, gen represor del gen *lac*. Imagen tomada de <https://lifescience-market.com/plasmid-c-94/pgex-6p-1-p-63185.html>.

### **6.32 Inducción de las proteínas recombinantes GST-EhADH y de los dominios recombinantes His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh**

Para expresar las proteínas recombinantes, las construcciones se transformaron en bacterias de cepas diferentes de *E. coli*. GST-EhADH se transformó en bacterias *E. coli* C43; mientras que His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh, en células *E. coli* BL21.

La expresión se realizó bajo el control de los promotores *tac* y *cspA*, que son inducidos por isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se inoculó una colonia de la cepa transformada en 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), las bacterias se crecieron en una incubadora con agitación orbital (Lab-Line<sup>R</sup> Incubator-Shaker) a 37°C y en agitación constante a 170 rpm. El cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una DO de  $\lambda=600$  nm, se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 14,000 rpm/1 min/TA para tener una muestra no inducida. Con el resto del cultivo se llevó a cabo la inducción de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG 1 mM e incubándose ON a 16°C. Posteriormente, 1 mL del cultivo se centrifugó a 14,000 rpm/1 min/TA para tener la muestra inducida. Las pastillas (no inducida e inducida) se resuspendieron con 60  $\mu$ L de amortiguador de muestra 1X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 26%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.05% y 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol). Las muestras se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

### **6.33 Solubilización de las proteínas recombinantes**

El cultivo bacteriano inducido (100 mL) se centrifugó a 3,000 rpm/20 min/4°C, la pastilla se resuspendió en 2.5 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM y PMSF 1 mM); se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incubó por 1 h/4°C. La mezcla se sonicó en frío cinco veces, con intervalos de 10 s a una amplitud de 60 W en un sonicador ultrasónico de punta Vibra-Cell Sonics<sup>R</sup>. El lisado celular se centrifugó a 8,000 rpm/20 min/4°C, para separar la fracción soluble

(sobrenadante) y la insoluble (pastilla). Se tomó una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de cada fracción y se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 26%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.05% y 5  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol), para ser analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie (metanol 50%, ácido acético 10% y azul de Coomassie R-250 0.2%), para analizar la fracción en la que se encontraba la proteína recombinante.

### **6.34 Purificación de las proteínas recombinantes**

La purificación de la proteína EhADH y los dominios recombinantes con la etiqueta de GST se realizó de acuerdo con el manual de acoplamiento y purificación de proteínas fusionadas a GST (GE Healthcare, 17075601). Para ello, 1 mL de la resina Glutación-Sefarosa 4B se equilibró lavando tres veces con cinco volúmenes de PBS frío y se centrifugó a 1,000 rpm/1 min/4°C, después de cada lavado. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad siguiendo el protocolo “en *batch*”, en donde la resina se incubó con los extractos proteicos de bacterias obtenidos previamente en la solubilización. La interacción se realizó con agitación constante a 4°C durante 16 h y posteriormente se centrifugó a 1,000 rpm/1 min/4°C. La resina unida a la proteína recombinante fue lavada con diez volúmenes de PBS frío, centrifugando a 1,000 rpm/1 min/4°C, después de cada lavado. Las proteínas recombinantes fueron eluidas utilizando 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl; 10 mM glutatión reducido, pH 8) e incubando por 30 min a 4°C en agitación constante. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 1,000 rpm/1 min/4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Adicionalmente se realizaron tres eluciones más, siguiendo el mismo esquema. Las proteínas recombinantes fueron cuantificadas mediante el método de Lowry. Finalmente, se tomó una alícuota de cada fracción de elución para su análisis mediante geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y por ensayos de WB. Los eluidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La purificación del dominio Bro1 con la etiqueta de His se llevó a cabo de manera similar, pero con una resina de Cobalto (His-Pur, PIERCE) previamente equilibrada con la solución de equilibrio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl, 0.5 M, imidazol pH 7.4 20 mM y urea 8 M). La resina se lavó con 3 mL de imidazol a concentraciones crecientes (10, 30 y 60 mM, tres veces por gradiente) y finalmente se agregaron 2 mL de amortiguador de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 0.5 M; imidazol pH 7.4 250 mM; urea 4 M). La proteína fue igualmente cuantificada y analizada en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y por ensayos de WB.

### **6.35 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica***

Los trofozoítos se colectaron en fase de crecimiento logarítmico, se enfriaron por 10 min a 4°C con el fin de remover las células de la caja de cultivo y se centrifugaron a 1,700 rpm/10 min/4 °C. El medio de cultivo se desechó y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen con PBS pH 6.8 frío y estéril. Este paso se repitió dos veces más con la finalidad de lavar la pastilla de amibas. Posteriormente, la pastilla se resuspendió con un volumen mínimo de PBS pH 6.8, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (p-hidroximercuribenzoato [PHMB] 100 mM, PMSF 100 mM; benzamidina 100 mM; aprotinina 10 mg/mL; pepstatina 1 mg/mL; leupeptina 10 mg/mL y E-64 1 mg/mL) (García-Rivera *et al.*, 1999). Los trofozoítos se lisaron con ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación con agitación en vórtex a TA. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo). Los lisados se utilizaron al momento o se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **6.36 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Los extractos proteicos bacterianos y amibianos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970). El gel separador se preparó con acrilamida 10%, bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1 %,

persulfato de amonio (PSA) 0.1 % y TEMED 0.15%. El gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, SDS 0.1 %, PSA 0.1 % y TEMED 0.15%. Para determinar el peso molecular de las proteínas de interés, se utilizaron marcadores de peso molecular conocidos y preteñidos (Bio-Rad Dual Color).

Las proteínas cuantificadas se hirvieron durante 5 min con amortiguador de carga 2X (glicerol 20%, SDS 4%, Tris-HCl 0.125 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.05% y pironina 0.05%) y se separaron en geles de poliacrilamida al 8%, 10% y 12% con una corriente de 80 V, hasta que las proteínas migraron del gel concentrador y a 120 V en el gel separador, hasta el final de la migración. Al final del corrimiento, algunos geles fueron teñidos con azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.05%, metanol 5% y ácido acético 10%) durante 1 h. Después, los geles se destiñeron con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7%, haciendo varios cambios de esta solución hasta que se visualizaron las bandas correspondientes a las proteínas. Otros geles no fueron teñidos y se utilizaron para llevar a cabo ensayos de WB.

### **6.37 Ensayo de Western Blot (WB)**

Luego de llevar a cabo la electroforesis, las proteínas en los geles se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en unidades de electrotransferencia (Bio-Rad). Las unidades se montaron a manera de emparedado en el siguiente orden: ánodo (base negra), esponja, papel filtro Whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman, esponja y cátodo (base blanca). La cámara se cargó con solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 100 mM, SDS 0.1 % y metanol 20%) fría y se colocó en un baño de hielo para transferir las proteínas a 400 mA por 1.5 h. Después, la cámara de electrotransferencia fue desmontada y las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%), para verificar la integridad de las proteínas y la correcta transferencia desde el gel hacia la membrana. La membrana fue desteñida rápidamente con solución de

transferencia. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 h/TA con PBS-leche baja en grasa al 5%. Después, las membranas se incubaron ON con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-leche al 5%. Estos anticuerpos fueron los siguientes: ratón  $\alpha$ -His (1:500), cabra  $\alpha$ -GST (1:10,000), rata  $\alpha$ -Bro1 (1:2,000), ratón  $\alpha$ -Linker (1:1,000), conejo  $\alpha$ -Adh (1:2,000), conejo  $\alpha$ -EhCPADH (1:35,000), conejo  $\alpha$ -EhCP112 (1:5,000), rata  $\alpha$ -EhVps23 (1:500), ratón  $\alpha$ -EhVps32 (1:500), ratón  $\alpha$ -actin (1:3,000; amablemente donado por el Dr. José Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN), ratón  $\alpha$ -ubiquitina (1:100), conejo  $\alpha$ -EhRabB (1:500), conejo  $\alpha$ -lectina Gal/GalNAc (1:500; amablemente donado por el Dr. William A. Petri Jr del Departamento de Patología, Universidad de Virginia, EUA), conejo  $\alpha$ -EhNPC1 (1:3,000), conejo  $\alpha$ -HSP70 (1:1,000) y ratón  $\alpha$ -EhPrx (1:500; amablemente donado por el Dr. José Luis Rosales del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN). Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T (Tris-HCl 25 mM, NaCl 126 mM y Tween-20 0.05%) durante 5 min cada lavado, y se incubaron por 1 h a TA con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a la enzima peroxidasa de rábano y diluidos 1:10,000 en PBS-leche al 5%. Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 min cada lavado. La unión antígeno-anticuerpo se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL-plus (Amersham) y el equipo Microchemist 4.2 (AccesoLab). Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa bioinformático ImageJ para realizar la cuantificación densitométrica.

### **6.38 Ensayo de *pull-down***

Los lisados bacterianos con la proteína recombinante inducida fueron pre-aclarados con 200  $\mu$ L de la resina de cobalto (para la proteína His-Bro1) o la resina de Glutación-Sefarosa 4B (para las proteínas GST-EhADH, GST-Linker y GST-Adh) (GE Healthcare, 17075601) ON a 4°C. La resina fue previamente equilibrada con PBS. La muestra se centrifugó a 1,000 rpm/10 min/4°C, y se retiró el sobrenadante. La resina se lavó con cinco volúmenes

de PBS-Tritón 1%. En este punto, la proteína recombinante se considera unida a la resina.

Por otro lado, se prepararon extractos totales de *E. histolytica*, como se describió anteriormente, y 2 mg se incubaron con la proteína recombinante que se pre-aclaró previamente unida a la resina, ON a 4 °C. El sobrenadante se descartó. La resina se lavó cinco veces con PBS, y posteriormente se agregaron 100 µL de amortiguador de muestra, y se hirvió durante 5 min. Se corrieron 20 µL de muestra en geles de poliacrilamida, y se hizo una comparación del perfil de las proteínas unidas a las proteínas recombinantes. Finalmente, para identificar a las proteínas unidas a cada proteína recombinante, los carriles completos teñidos con BIOSAFE (Bio-Rad, 161-0787) se cortaron del gel y se analizaron por espectrometría de masas.

También se realizaron ensayos de *pull-down* utilizando lisados de células Caco-2. Estas células fueron cultivadas a confluencia, se lavaron con PBS y se colectaron empleando un raspador de células (Corning). Posteriormente, se incubaron por 30 min y en agitación constante a 4°C con el amortiguador RIPA (Tris-HCl pH 7.6, 40 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 2 mM; glicerol, 10%; Tritón X-100, 1%; deoxicolato de sodio, 0.5% SDS, 0.2%; PMSF, 1 mM; mezcla de inhibidores Complete™ (Roche), 1x). Los extractos se sonicaron tres veces por 5 segundos a 80% de intensidad y se centrifugaron por 15 min a 2,500 rpm a 4°C, para eliminar los restos celulares. Para el fraccionamiento con Tritón X-100, las células Caco-2 se resuspendieron en amortiguador de lisis (KCl, 100 mM; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1 mM; sacarosa, 200 mM; Hepes, 10 mM pH 7.1, Tritón X-100, 1%) y se incubaron en agitación suave a 4°C por 30 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por medio de centrifugación a 2,500 rpm. Ese sobrenadante se incubó con la proteína recombinante GST-EhADH unida a las perlas de Glutación-Sefarosa 4B, y se llevó a cabo el ensayo de la misma manera que con los lisados de *E. histolytica*.

### **6.39 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas**

Las proteínas que interactuaron y se corrieron en geles, se procesaron mediante espectrometría de masas en nano UPLC ACQUITY “M” Class junto con un espectrómetro de masas QToF Synapt G2-Si (Waters Corporation), en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del Cinvestav. La información resultante se analizó en Protein Lynx Global Server (PLGS) v3.0.3 (Waters Corporation). Los datos obtenidos fueron curados y seleccionados cuando presentaron un porcentaje de confiabilidad mayor al 95%. El porcentaje de confiabilidad se obtuvo durante el proceso de identificación de péptidos. El software aseguró que cada ion identificado cumpliera con los parámetros fisicoquímicos elegidos. Para probar la especificidad de las asociaciones, realizamos el ensayo de *pull-down* con los extractos amibianos totales y las resinas, pero sin la proteína recombinante de interés.

### **6.40 Análisis estadístico**

Todos los resultados de este trabajo se mostraron como media y error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba *t*-Student y ANOVA de dos vías, utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Las puntuaciones que muestran diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos en los gráficos y se asumen cuando: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  o \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Análisis *in silico* de EhADH

El objetivo general de este proyecto fue analizar a profundidad los dominios de la adhesina EhADH de *E. histolytica*. Para lograr dicha meta, comenzamos estudiando *in silico* a EhADH, definiendo sus principales características y delimitando sus dominios funcionales.

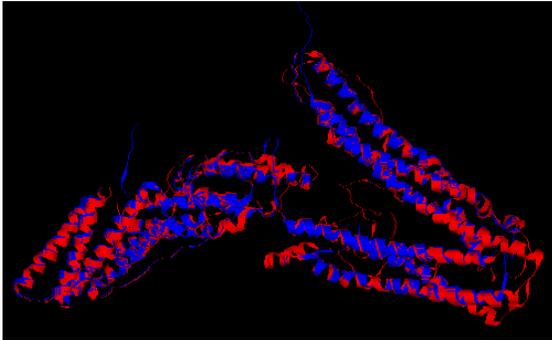
En primer lugar, realizamos una búsqueda de las proteínas homólogas a EhADH en otros organismos. La mayoría de los eucariontes cuentan con proteínas de la familia ALIX, ya que éstas tienen participación en diversas funciones celulares básicas. En humanos esta proteína se llama Alix y en *S. cerevisiae* se denomina Bro1. En la **Tabla 4** podemos observar el tamaño en aa de estas proteínas (que son más grandes que EhADH), además de su porcentaje de homología e identidad. Los valores no son muy elevados puesto que se comparan las proteínas completas.

**Tabla 4. Comparación de las proteínas homólogas Alix y Bro1 con EhADH.**

Código de acceso	Proteína	Organismo	Tamaño (aa)	Homología (%)	Identidad (%)
XP_652992.1	EhADH	<i>Entamoeba histolytica</i>	687	No aplica	
Q8WUM4.1	Alix	<i>Homo sapiens</i>	868	40	20.37
Q7SAN9.1	Bro1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1012	38	21.65

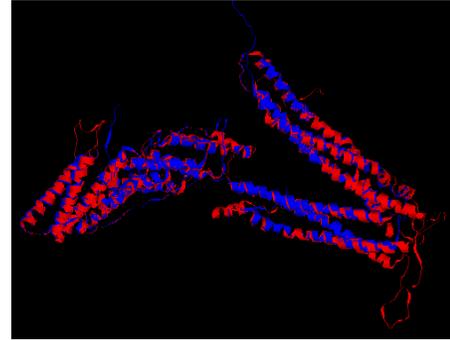
La homología de las proteínas Alix y Bro1 se ve incrementada cuando se compararon con EhADH, a nivel estructural. En ese caso podemos observar que el plegamiento de las proteínas es muy similar y todas tienen la forma característica del dominio Bro1 y la región “V” (**Figura 12**).

## EhADH y Alix



Homología estructural: 90%

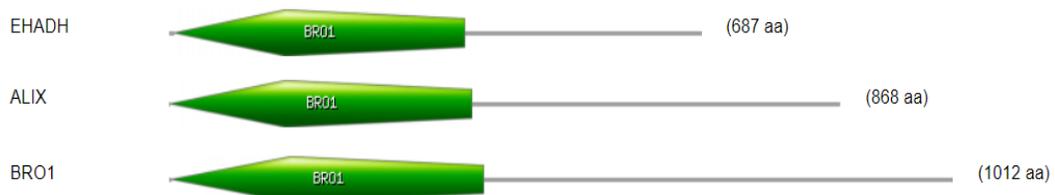
## EhADH y Bro1



Homología estructural: 89%

**Figura 12. Comparación estructural de las proteínas Alix y Bro1 con EhADH.** En azul se representa la estructura de EhADH, mientras que en rojo se muestra la estructura de Alix y de Bro1, respectivamente. En la parte inferior de las imágenes se presenta el porcentaje de homología estructural para cada comparación.

La principal característica que comparten estas tres proteínas homólogas es su dominio Bro1 (**Figura 13**), mismo que los sitúa como miembros de la familia ALIX. A pesar de que la identidad de estos dominios no es muy elevada, son muy conservados considerando la alta divergencia que existe entre los organismos que lo poseen; es decir, *E. histolytica*, *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Además, su longitud en aa es bastante similar (**Tabla 5**).



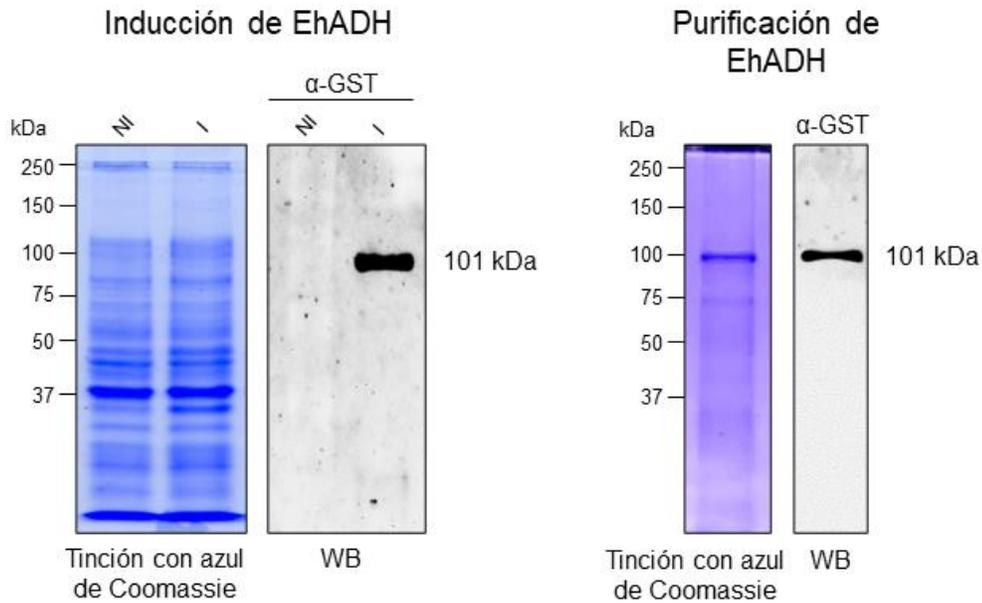
**Figura 13. Comparación de los dominios Bro1 en las proteínas EhADH, Alix y Bro1.** La imagen representa la longitud de cada proteína y en verde se indica el dominio Bro1 en la región N de las proteínas.

**Tabla 5. Comparación de los dominios Bro1 en las proteínas homólogas Alix y Bro1 con EhADH.**

Proteína	Extensión del dominio Bro1 (aa)	Tamaño (aa)	Identidad de secuencia (%)
EhADH ( <i>Eh</i> )	9-349	340	No aplica
Alix ( <i>Hs</i> )	3-392	389	20.99
Bro1 ( <i>Sc</i> )	5-407	402	24.44

## 7.2 Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EhADH

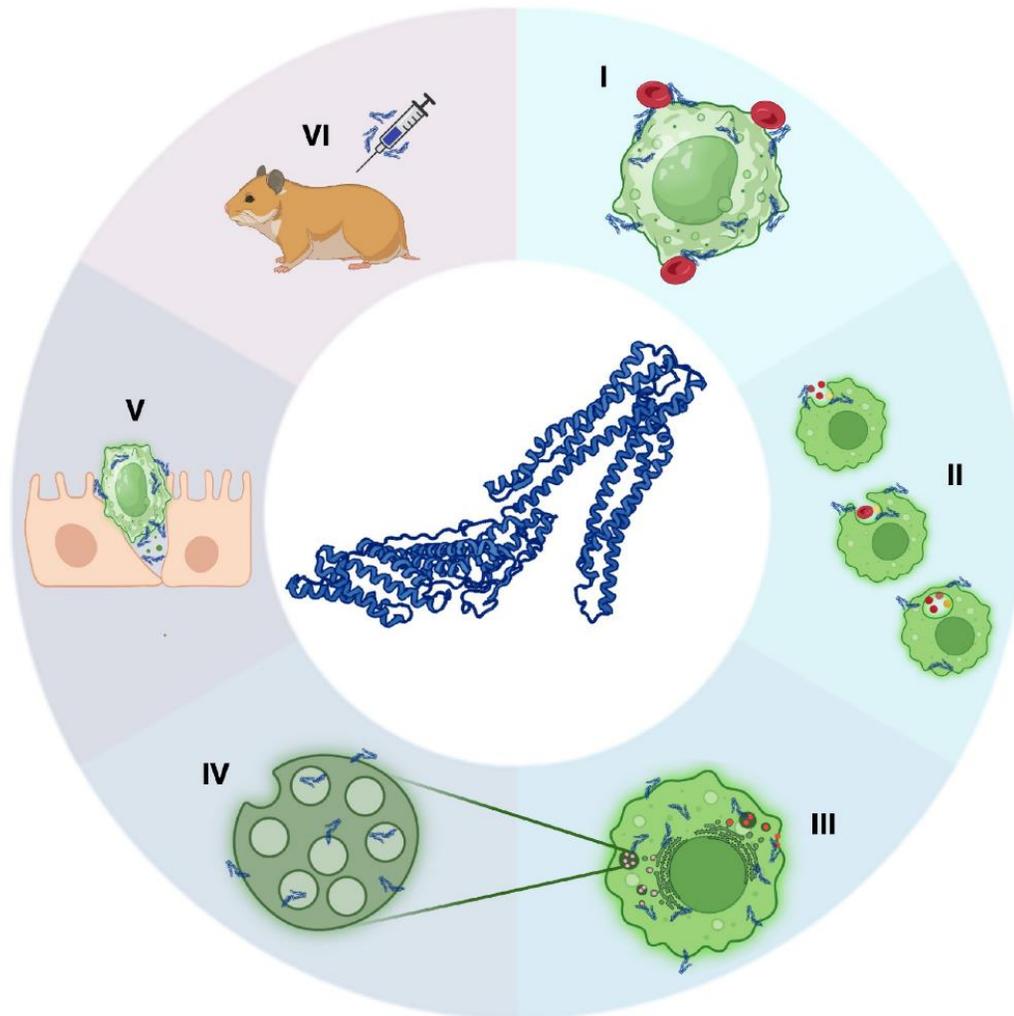
La proteína completa EhADH ya había sido clonada, inducida y purificada previamente en nuestro grupo de trabajo (Hernández-Nava, 2017); pero para utilizarla en este proyecto, nuevamente la expresamos y purificamos. La proteína tiene un peso de 75 kDa; sin embargo, al sumar la etiqueta de GST que posee, su peso aumentó a 101 kDa. La inducción fue llevada a cabo en bacterias *E. coli* C43, cepa deficiente en proteasas, lo que facilita la expresión de proteínas que para otras cepas podrían resultar tóxicas. Posteriormente, se realizó la purificación de la proteína, utilizando una resina de perlas de sefarosa con glutatión (**Figura 14**). La proteína recombinante GST-EhADH es altamente lábil y se degrada con mucha facilidad, por lo que la purificación es complicada y requiere de diversos inhibidores de proteasas, así como un control estricto de las temperaturas durante todo el proceso de inducción y purificación.



**Figura 14. Inducción y purificación de GST-EhADH.** La expresión de esta proteína recombinante se indujo en bacterias *E. coli* C43 transformadas con el plásmido *pGEX6P1-ehadh* mediante IPTG 1 mM y se analizó en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y ensayos de WB utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -GST. NI: no inducido. I: inducido. Números a la izquierda: estándares de peso molecular en kDa. Números a la derecha: peso molecular esperado de la proteína de interés.

### 7.3 EhADH interactúa con proteínas implicadas en el tráfico vesicular y la endocitosis

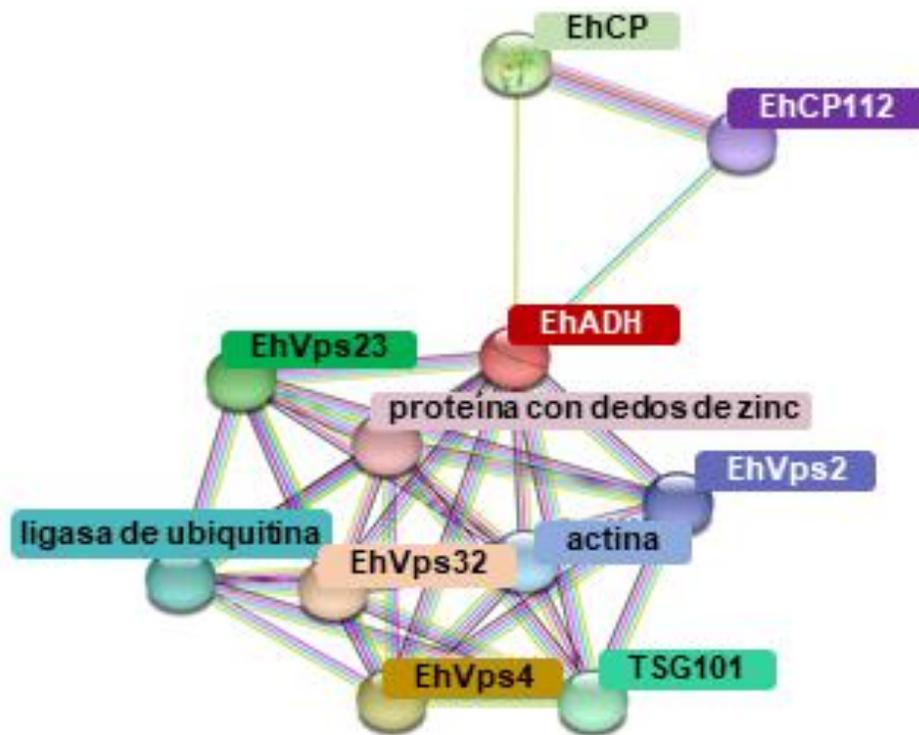
La adhesina EhADH es una molécula multifuncional de 687 aa (Betanzos *et al.*, 2013, 2018; Cornick *et al.*, 2016; García-Rivera *et al.*, 1999; Hernández-Nava *et al.*, 2017; Lejeune *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2009), cuya estructura 3D predicha *in silico* está conformada principalmente por  $\alpha$ -helices (Montaño *et al.*, 2017) y en general, la molécula completa adopta una forma de “zapatilla” (**Figura 15**). La proteína exhibe un dominio Bro1 con una forma de “boomerang” y una región con la forma de la letra “V”, que contiene al dominio de adhesión; el cual, hasta donde se sabe, no se ha encontrado en otros miembros de la familia ALIX, lo que le confiere a EhADH una característica particular y única entre las ALIX (Bañuelos *et al.*, 2012; Montaño *et al.*, 2017).



**Figura 15. Esquema de las funciones de EhADH.** I: Adherencia a células blanco (Bañuelos *et al.*, 2012; García-Rivera *et al.*, 1999). II: Fagocitosis (Avalos-Padilla *et al.*, 2015; Bañuelos *et al.*, 2005, 2012; García-Rivera *et al.*, 1999). III y IV: Tráfico vesicular y formación de MVB (participando como una proteína accesoria de la maquinaria ESCRT) (Avalos-Padilla *et al.*, 2015; Bañuelos *et al.*, 2012). V: Alteración de la barrera epitelial (Betanzos *et al.*, 2018; García-Rivera *et al.*, 1999). VI: Potencial candidato a vacuna contra la amibiasis (Martínez *et al.*, 2009; Martínez-López *et al.*, 2004). En el centro: modelo 3D de EhADH predicho *in silico*.

Para ejecutar sus múltiples funciones, se piensa que EhADH podría interactuar directa o indirectamente con otras moléculas para formar complejos. Con la finalidad de obtener más información sobre los posibles socios de EhADH durante los eventos de virulencia, en primer lugar,

realizamos un análisis *in silico* del interactoma, utilizando el servidor STRING. El interactoma mostró 10 proteínas asociadas a EhADH (**Figura 16**): 1) EhCP112 (EHI\_181230), y 2) otra cisteína proteasa (EhCP, EHI\_168240). Cabe destacar que EhADH participa en la formación de MVB, por lo que se esperaba que también interactuara con algunos componentes de la maquinaria ESCRT. Efectivamente, el interactoma reveló la interacción con: 3) EhVps23 (EHI\_178530; ESCRT-I) y su ortólogo 4) TSG101 (EHI\_131530), 5) EhVps32 (EHI\_169820; ESCRT-III), 6) EhVps2 (EHI\_194400; ESCRT-III) y 7) EhVps4-ATPasa (EHI\_118900; otra proteína accesoria ESCRT). Además, EhADH se asoció con: 8) actina (EHI\_008780), 9) una proteína con dedos de zinc (EHI\_117910), y 10) una proteína ligasa de ubiquitina (EHI\_010740).



**Figura 16. Interactoma de EhADH.** Muestra a 10 proteínas con las que podría interactuar EhADH. Generado por STRING.

Para verificar experimentalmente algunas de estas interacciones, produjimos la proteína recombinante GST-EhADH y con ella se llevaron a cabo ensayos de *pull-down* empleando lisados de *E. histolytica*. Las proteínas que

interactuaron fueron identificadas mediante espectrometría de masas. Cabe mencionar que la mayoría de las proteínas que se revelaron en el interactoma (STRING) también fueron identificadas mediante estos experimentos.

Según los resultados obtenidos en la espectrometría de masas a partir de los ensayos de *pull-down*, las interacciones con mayor puntaje se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Análisis de espectrometría de masas de las proteínas de *E. histolytica* que interactuaron con GST-EhADH.**

Número de acceso	Proteína	Funciones	Referencias
EHI_181220 <sup>†</sup>	<b>EhADH</b>	Adhesión	Bañuelos <i>et al.</i> , 2012; García-Rivera <i>et al.</i> , 1999
EHI_181230	<b>EhCP112</b>	Degradación de sustratos	Ocádiz <i>et al.</i> , 2005a
EHI_110750 <sup>†</sup>	Dipeptidil peptidasa III	Degradación de sustratos	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_178530 <sup>†</sup>	<b>EhVps23</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-I)	Galindo <i>et al.</i> , 2021
EHI_045320	<b>EhVps36</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-II)	Díaz-Hernández <i>et al.</i> , 2023
EHI_131120 <sup>†</sup>	<b>EhVps22</b> , complejo ELL subunidad EAP30	Transporte vacuolar (ESCRT-II)	Díaz-Hernández <i>et al.</i> , 2023
EHI_169820 <sup>†</sup>	<b>EhVps32</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-III)	Avalos-Padilla <i>et al.</i> , 2015)
EHI_194400 <sup>†</sup>	<b>EhVps2</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-III)	Avalos-Padilla <i>et al.</i> , 2015
EHI_118900 <sup>†</sup>	<b>EhVps4</b>	Unión a ATP y transporte vacuolar (proteína accesoria del ESCRT)	López-Reyes <i>et al.</i> , 2010
EHI_080220 <sup>†</sup>	<b>EhNPC1</b>	Tráfico de colesterol	Bolaños <i>et al.</i> , 2016

EHI_008780 <sup>†</sup>	<b>Actina</b>	Citoesqueleto	Manich <i>et al.</i> , 2018; Meza <i>et al.</i> , 1983; Rath y Gourinath, 2020
EHI_164440 <sup>†</sup>	Proteína similar a Actinina	Citoesqueleto	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_108610 <sup>†</sup>	<b>Rab</b> GTPasa	Enzima (transducción de señales, tráfico vesicular, etc)	Bosch y Siderovski, 2013; Saito-Nakano <i>et al.</i> , 2005; Verma <i>et al.</i> , 2020
EHI_167300 <sup>†</sup>	EhGrainina 1	Unión a iones de calcio	Babuta <i>et al.</i> , 2020; Domínguez-Fernández <i>et al.</i> , 2018; Nickel <i>et al.</i> , 2000
EHI_111720 <sup>†</sup>	EhGrainina 2	Unión a iones de calcio	Babuta <i>et al.</i> , 2020; Domínguez-Fernández <i>et al.</i> , 2018; Nickel <i>et al.</i> , 2000
EHI_197510 <sup>†</sup>	Proteína con un dominio de unión a calcio	Unión a iones de calcio	Babuta <i>et al.</i> , 2020
EHI_117910	Proteína con dedos de zinc	Unión a iones metálicos	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023

---

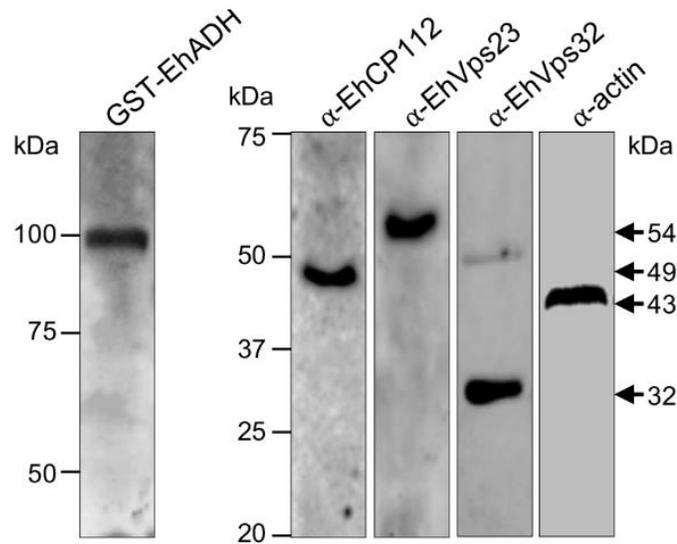
Las proteínas seleccionadas tuvieron un porcentaje de confiabilidad superior al 95%.

Las proteínas en negrita se han relacionado con diversos eventos de virulencia.

<sup>†</sup>Proteínas con evidencia de expresión en membranas o fagosomas en trofozoítos, según AmoebaBD.

Entre las moléculas más relevantes aparecieron algunas relacionadas con la virulencia como las involucradas en: la degradación de sustratos (EhCP112 y dipeptidil peptidasa III), el transporte vacuolar (EhVps23, EhVps36, EhVps22, EhVps32 y EhVps2), el tráfico de colesterol (EhNPC1), la regulación del citoesqueleto (actina y una proteína similar a la actinina), una proteína de unión a GTP (Rab GTPasa), proteínas de unión a calcio (EhGrainina 1, EhGrainina 2 y una proteína con un dominio de unión a calcio) y una proteína con dedos de zinc. Anteriormente, algunas de estas interacciones ya habían sido sugeridas o probadas mediante bioinformática y enfoques experimentales. Aquí, algunas de estas asociaciones se verificaron

mediante ensayos de *pull-down* y WB, utilizando anticuerpos específicos para cada proteína (**Figura 17**). Estos experimentos demostraron que EhADH forma complejos proteicos mediante unión directa o indirecta para realizar las distintas tareas en las que participa.

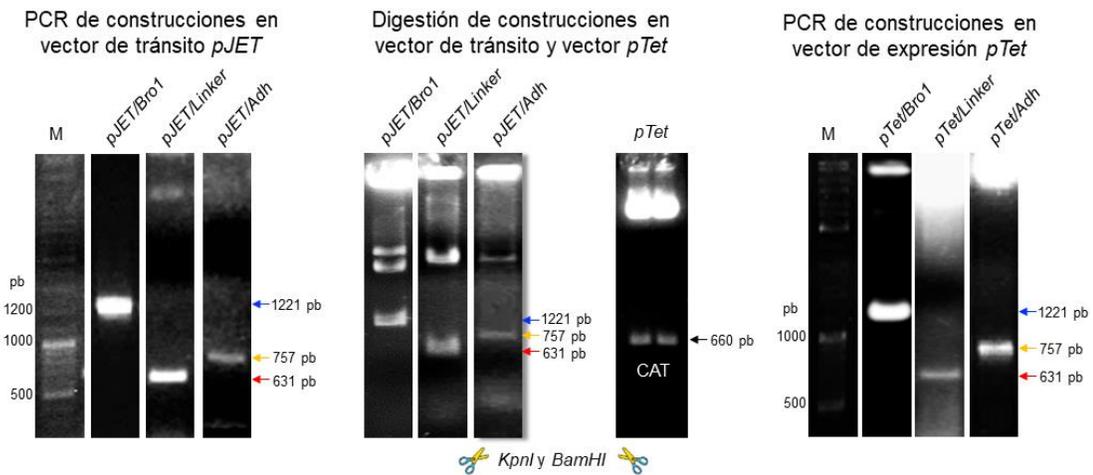


**Figura 17. Ensayos de WB de las interacciones establecidas entre la proteína recombinante GST-EHADH y algunas proteínas de *E. histolytica*.** Las proteínas que interactúan en ensayos de *pull-down* se analizaron mediante SDS-PAGE al 10 %, seguido de experimentos de WB empleando los anticuerpos α-EhCP112, α-EhVps23, α-EhVps32 y α-actina. *Input*: GST-EHADH. Los números a la izquierda indican los estándares de peso molecular en kDa. Las flechas señalan las proteínas inmunodetectadas.

#### 7.4 Generación de trofozoítos que sobreexpresan los diferentes dominios de la EhADH

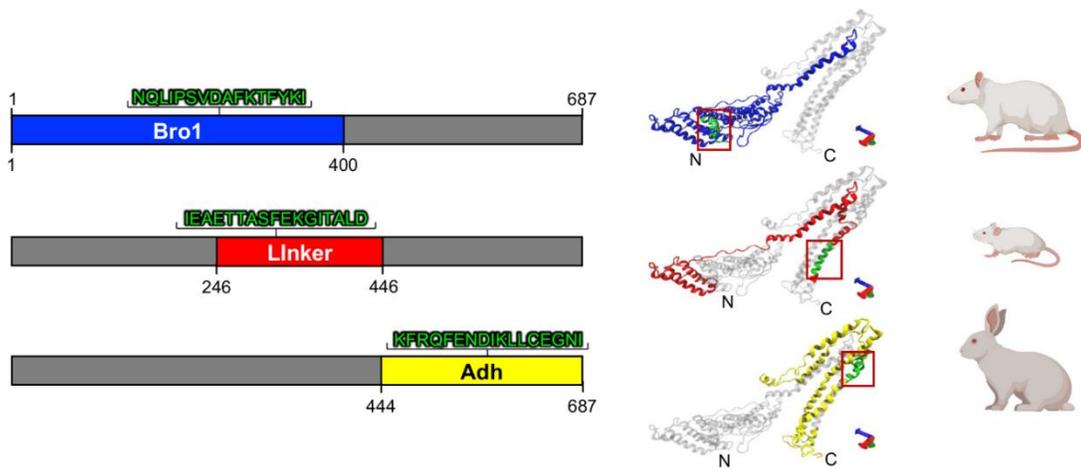
Con la finalidad de analizar la función y las interacciones protéicas de EhADH, dividimos a esta proteína en tres segmentos: i) dominio Bro1 (1-400 aa); ii) región central de la proteína (246-446 aa), denominada dominio Linker; y iii) dominio de adherencia (444-687 aa), denominado dominio Adh. Produjimos el dominio Linker teniendo en cuenta los últimos 103 aa del dominio Bro1, porque contiene varios residuos susceptibles de fosforilación que pueden modificar la función de la proteína, y los socios de EhADH que podrían unirse a estos sitios no se detectarían en el primer segmento de la

proteína, debido a la abundancia de socios del dominio Bro1. Las secuencias de oligonucleótidos empleadas para amplificar cada dominio se sintetizaron comercialmente y cada fragmento amplificado se clonó en el vector *pTet*, generando las construcciones *pTet/Bro1*, *pTet/Linker* y *pTet/Adh* (**Figura 18**). Después de la secuenciación, estos plásmidos se transfectaron en los parásitos, generando poblaciones de trofozoítos Bro1, Linker y Adh.



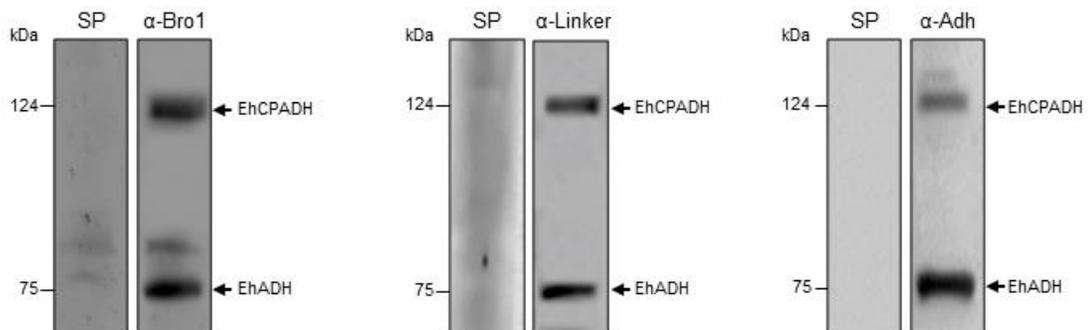
**Figura 18. Clonación de los dominios Bro1, Linker y Adh en el vector de transfección *pTet*.** Los dominios se clonaron primero en el vector de tránsito *pJET*, posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*, para clonarse finalmente en el vector *pTet*. Números a la izquierda: estándares de tamaño molecular en pb. Las flechas señalan los amplificadores correspondientes a Bro1 (azul), Linker (rojo) y Adh (amarillo).

Al mismo tiempo, se produjeron anticuerpos específicos contra cada fragmento, derivados de péptidos diseñados con alta especificidad, residuos expuestos y regiones inmunogénicas (**Figura 19**).



**Figura 19. Generación de anticuerpos específicos contra los dominios EhADH.** Representación esquemática de la estructura primaria y modelos 3D predichos *in silico* de los dominios Bro1 (azul), Linker (rojo) y Adh (amarillo). Las secuencias mostradas en verde en los cuadrados rojos indican los péptidos utilizados para la generación de anticuerpos en diferentes modelos animales. Cada secuencia se conjugó con la proteína KLH y se inmunizaron ratas, ratones y un conejo con los péptidos Bro1, Linker y Adh, respectivamente.

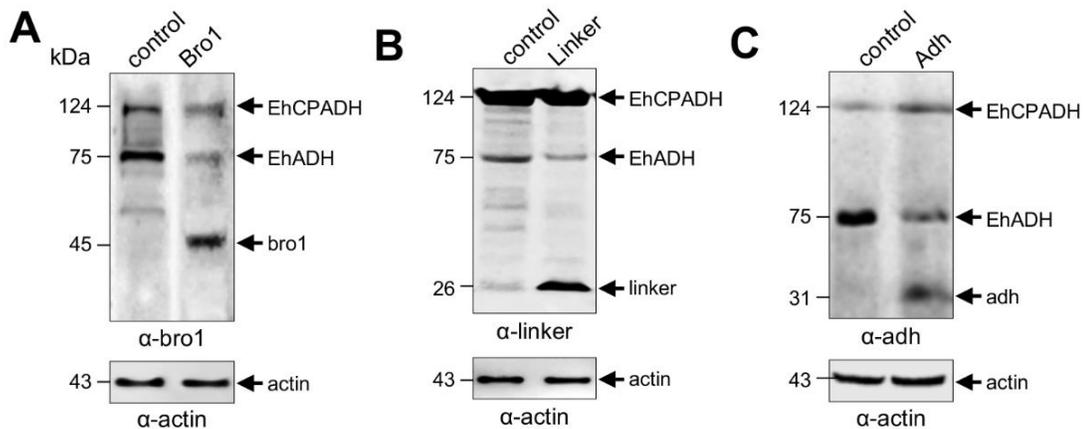
Las secuencias peptídicas seleccionadas de los dominios EhADH se examinaron cuidadosamente para corroborar que eran exclusivas de cada dominio EhADH y que no reaccionaban de forma cruzada con otras proteínas de *E. histolytica*. La especificidad de los anticuerpos se probó en lisados de trofozoítos mediante ensayos de WB. Como se esperaba, los tres anticuerpos reconocieron la proteína endógena EhADH (75 kDa) y el complejo EhCPADH (124 kDa) (**Figura 20**). Los sueros preinmunes no detectaron ninguna banda.



**Figura 20. Especificidad de los anticuerpos  $\alpha$ -Bro1,  $\alpha$ -Linker y  $\alpha$ -Adh.** Ensayos de WB fueron llevados a cabo empleando lisados de trofozoítos y los anticuerpos generados

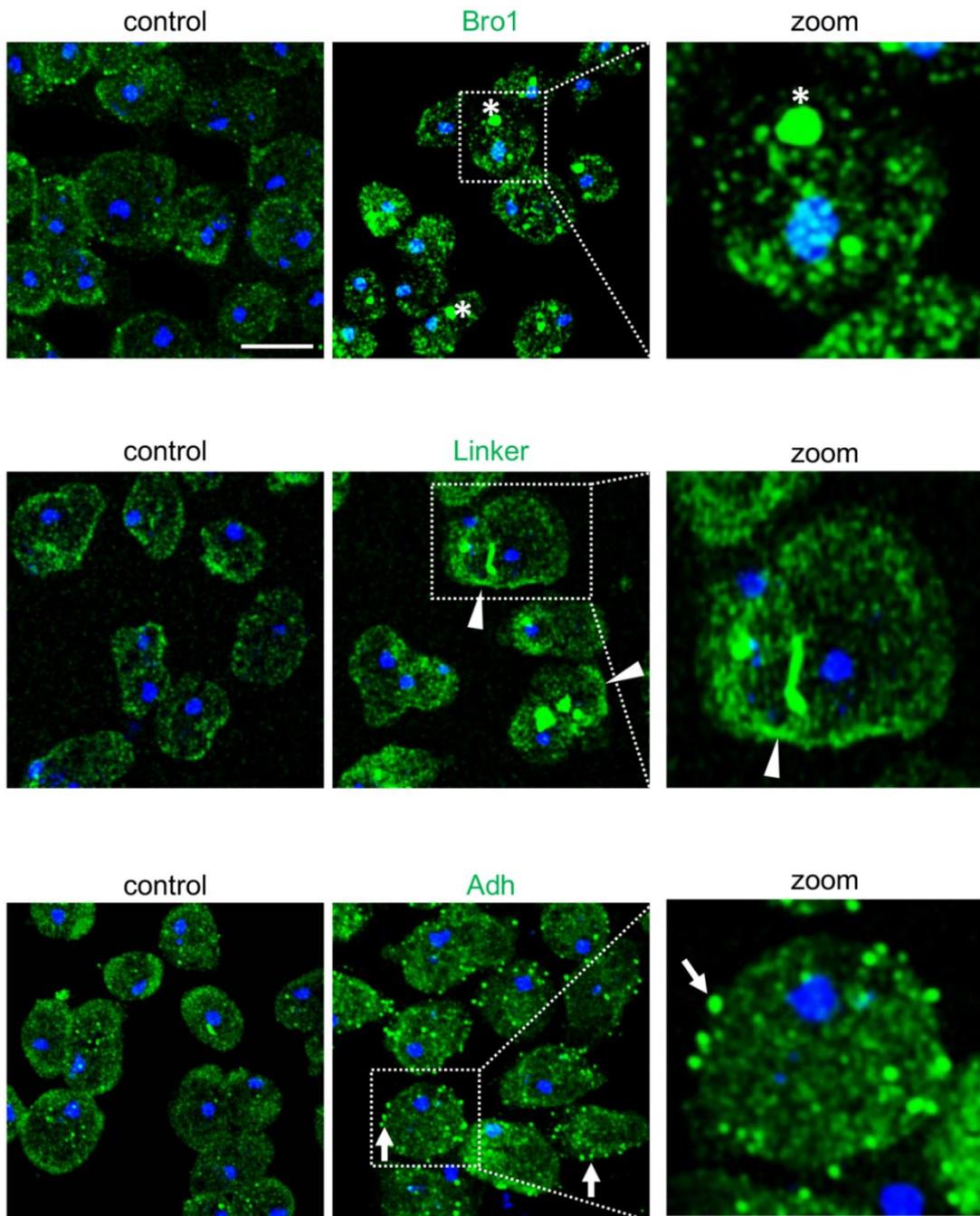
previamente. SP: suero preinmune. Los números a la izquierda indican el peso molecular del estándar en kDa. Las flechas señalan las proteínas inmunodetectadas.

A continuación, se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -Bro1,  $\alpha$ -Linker y  $\alpha$ -Adh para evaluar la expresión de cada dominio en trofozoítos transfectedados con las construcciones inducidas por tetraciclina. Mediante ensayos de WB utilizando lisados de trofozoítos transfectedados, los anticuerpos detectaron los dominios exógenos Bro1 (45 kDa), Linker (26 kDa) y Adh (31 kDa). Los anticuerpos también revelaron el complejo endógeno EhCPADH y la proteína EhADH. Sin embargo, en los trofozoítos control, transfectedados con el plásmido *pTet* vacío, los anticuerpos sólo reconocieron el complejo endógeno EhCPADH y la proteína EhADH (**Figura 21**). La banda correspondiente a la proteína EhADH completa (75 kDa) o al complejo EhCPADH (124 kDa) migró de manera similar en los trofozoítos control y en los parásitos que contenían a los dominios Bro1, Linker y Adh exógenos. Como control de carga, utilizamos actina.



**Figura 21. Expresión de los dominios EhADH en trofozoítos transfectedados.** Se generaron poblaciones de trofozoítos control, Bro1, Linker y Adh, mediante la transfección de los plásmidos *pTet*, *pTet/Bro1*, *pTet/Linker* o *pTet/Adh*, respectivamente. A continuación, se llevaron a cabo ensayos de WB, empleando lisados de estos trofozoítos y los anticuerpos  $\alpha$ -Bro1 (**A**),  $\alpha$ -Linker (**B**) y  $\alpha$ -Adh (**C**). El anticuerpo  $\alpha$ -actina se utilizó como control de carga. Los números a la izquierda indican el peso molecular estándar en kDa. Las flechas señalan las proteínas inmunodetectadas.

Estudios previos han reportado que la proteína EhADH se localiza en la membrana plasmática y en el citoplasma, principalmente en las membranas endosomales y en los fagosomas. Así, que mediante ensayos de IF y microscopía confocal, analizamos el destino celular de cada uno de los dominios EhADH en los trofozoítos transfectados, utilizando los respectivos anticuerpos primarios y secundarios. En las imágenes, se observó un aumento de la fluorescencia en las poblaciones Bro1, Linker y Adh, en comparación con las amibas control. Los trofozoítos Bro1 exhibieron una tinción más abundante en las vesículas citoplasmáticas; mientras que en los parásitos transfectados con Linker, el patrón estaba más definido en la membrana plasmática; y por otro lado, las poblaciones Adh mostraron la marca en puntos ubicados en el citoplasma y la membrana plasmática (**Figura 22**).

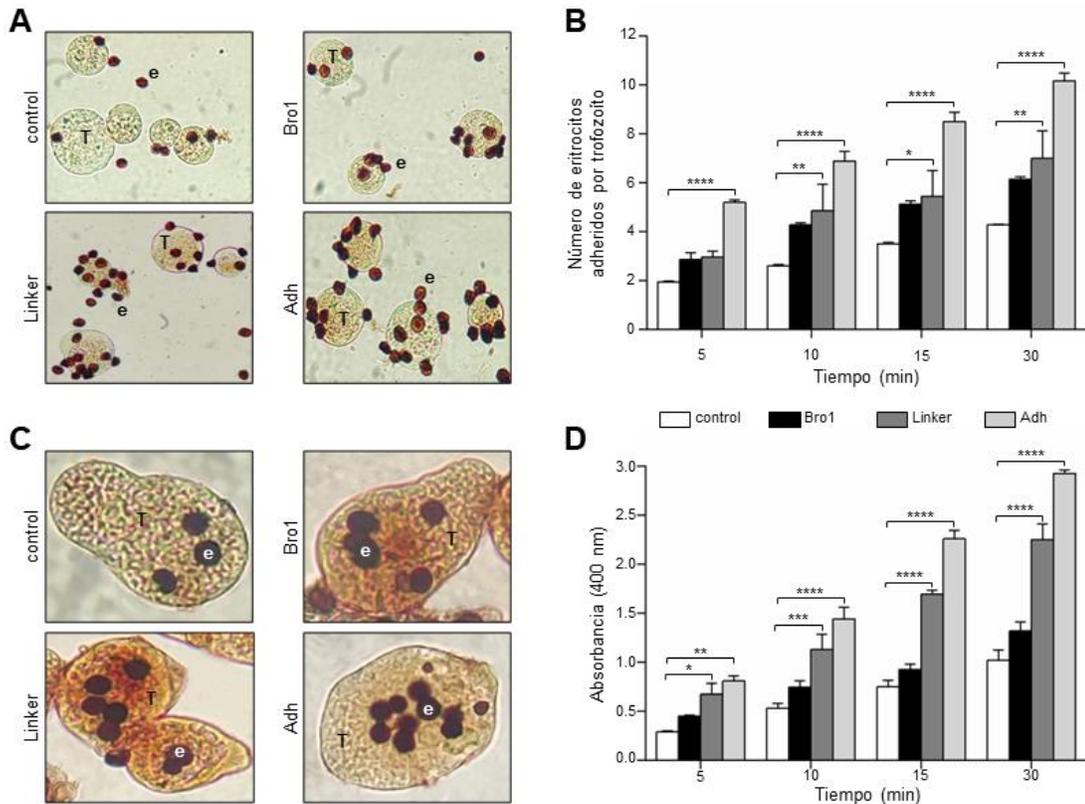


**Figura 22. Localización celular de los dominios Bro1, Linker y Adh en trofozoítos transfectados.** Trofozoítos transfectados fueron procesados para IF, empleando los anticuerpos primarios  $\alpha$ -Bro1,  $\alpha$ -Linker y  $\alpha$ -Adh, seguidos de los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a FITC (verde). Los núcleos (azul) se tiñeron con DAPI. Asteriscos: vesículas citoplasmáticas. Puntas de flecha: membrana plasmática. Flechas: puntos en el citoplasma y la membrana. Barra=20  $\mu$ m.

## 7.5 El dominio Adh influye en la adhesión y fagocitosis de los trofozoítos

EhADH participa en la adhesión y la fagocitosis de los eritrocitos (Bañuelos *et al.*, 2012). Para estudiar la contribución de cada dominio a esas funciones, determinamos la eficiencia de adhesión de los trofozoítos transfectados y la tasa de fagocitosis que tienen estos parásitos por los glóbulos rojos. En el caso de los experimentos de adhesión, ambos tipos celulares (trofozoítos y eritrocitos) se incubaron a 4°C durante 5, 10, 15 y 30 min, como se describe en Materiales y Métodos. Después de 30 min de incubación, los trofozoítos transfectados que sobreexpresaban el dominio Bro1 mostraron un aumento en la adhesión de los glóbulos rojos, pero este aumento no fue estadísticamente significativo comparado con la población control, cuya eficiencia de adhesión estuvo dada por las proteínas endógenas. Los trofozoítos transfectados con el dominio Linker aumentaron la adhesión un 62%, y es de destacar que los parásitos que sobreexpresaban el dominio Adh exhibieron la mayor capacidad de adhesión, adhiriéndose un 136% más que el control (**Figura 23A, B**).

Luego, analizamos la tasa de eritrofagocitosis de todas las poblaciones. Se incubaron los trofozoítos con glóbulos rojos a 37 °C. A los 30 min, la población Bro1 engulló un 28% más que el control, pero no fue estadísticamente significativo. En cambio, los trofozoítos que sobreexpresaban el dominio Linker ingirieron un 120%, y los que expresaban el dominio Adh ingirieron un 185% más que el control (**Figura 23C, D**).



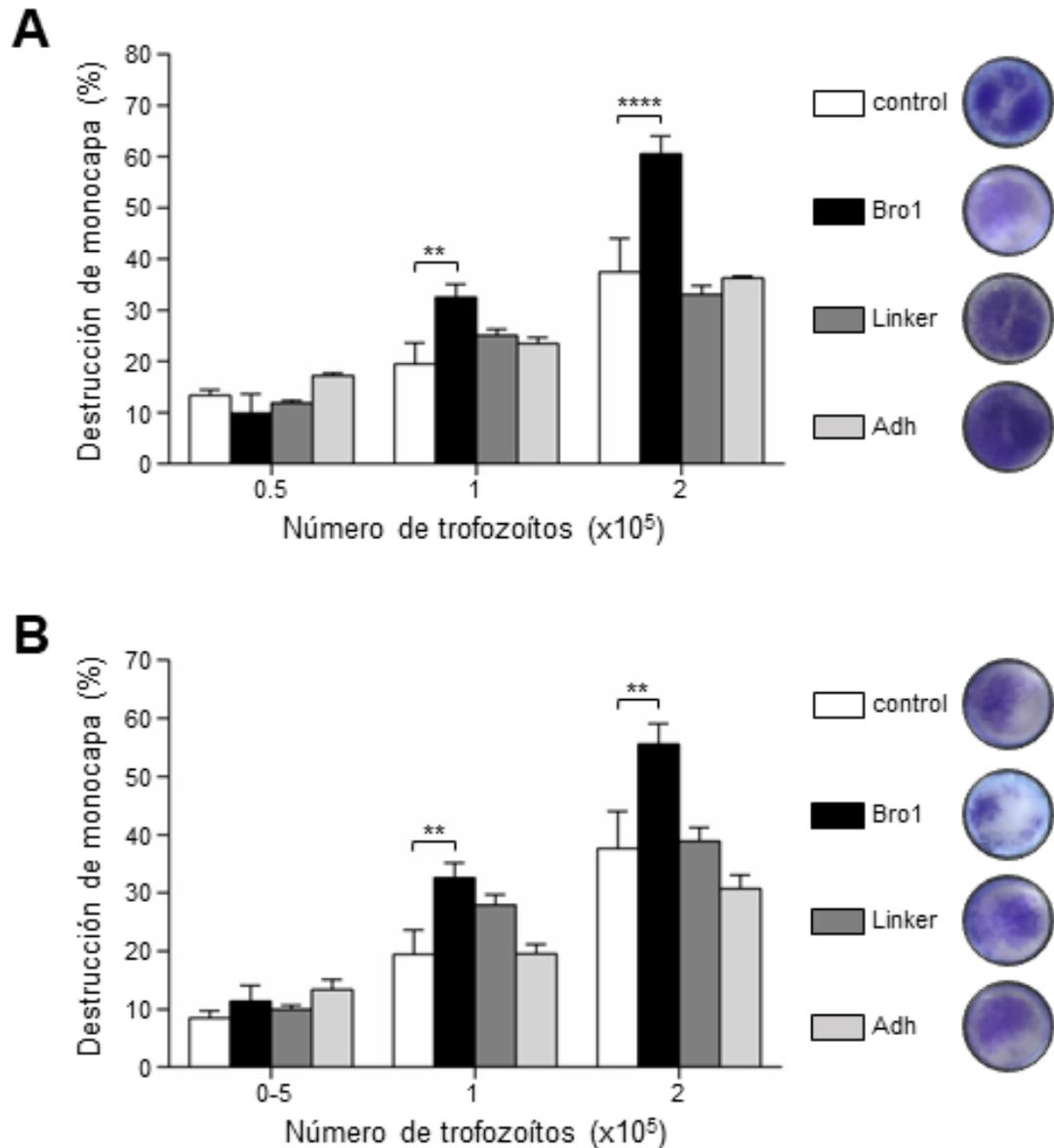
**Figura 23. Adhesión y fagocitosis de eritrocitos por trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH.** Las poblaciones de trofozoítos control, Bro1, Linker y Adh se incubaron en diferentes momentos con eritrocitos a 4°C (**A, B**) o 37°C (**C, D**). **A**) Tinción de Novikoff de trofozoítos después de 30 min de adhesión. **B**) Número de eritrocitos adheridos a trofozoítos. **C**) Tinción de Novikoff de trofozoítos que ingirieron eritrocitos durante 30 min. **D**) Tasa de eritrofagocitosis medida por la concentración de hemoglobina dentro de los trofozoítos. Los datos representan la media y el error estándar del número de eritrocitos contados en 100 trofozoítos seleccionados al azar en tres experimentos independientes. T: trofozoíto; e: eritrocito. \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.001 \*\*p<0.01, \*p<0.1.

Los parásitos que expresaron el dominio Adh mostraron la mayor eficiencia de adhesión y tasa de eritrofagocitosis, tal vez debido a su localización enriquecida en la membrana plasmática o a las asociaciones que establece esta región, que la hace más expuesta a atrapar eritrocitos. Con respecto al dominio Linker, ya que contiene varios sitios susceptibles de fosforilación, es probable que los estados de fosforilación de la molécula

influyan en la unión de EhADH con otras proteínas, lo que afectaría los eventos de adhesión y eritrofagocitosis, pero esto es sólo una hipótesis que necesita ser probada experimentalmente.

### **7.6 El dominio Bro1 potencia el efecto citopático y citotóxico producido por los trofozoítos**

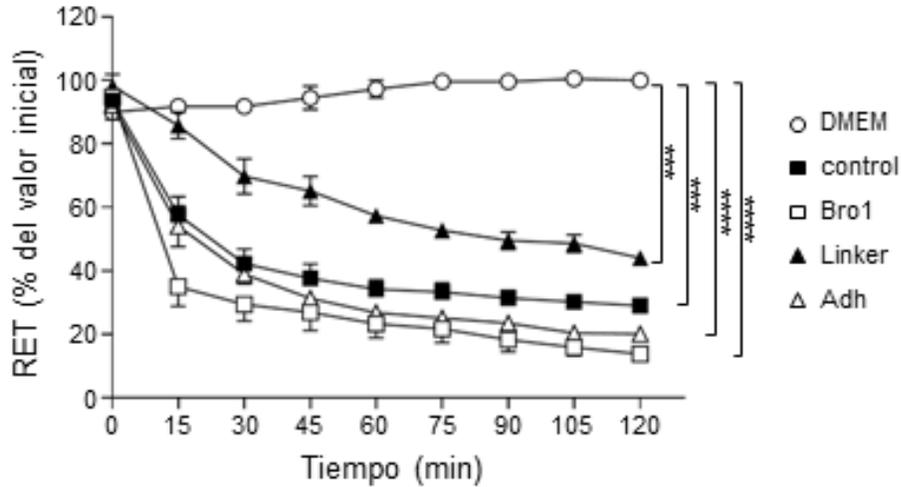
Además de fagocitar glóbulos rojos, bacterias y otras células y partículas, los trofozoítos son capaces de destruir epitelios tanto *in vitro* como *in vivo*. La proteína EhADH está estrechamente involucrada en estos eventos. Sin embargo, desconocemos la región proteica implicada en estos procesos. Para evaluar estos eventos de virulencia, realizamos ensayos citopáticos y citotóxicos con las amibas transfectadas. Se incubaron trofozoítos vivos (para efecto citopático) o lisados (para efecto citotóxico) con monocapas de células epiteliales MDCK y se cuantificó la destrucción celular producida por los parásitos como se describe en Materiales y Métodos. Los trofozoítos vivos que sobreexpresaban el dominio Bro1 dañaron las monocapas de MDCK hasta un 61% más que el control (**Figura 24A**). En cambio, los trofozoítos transfectados con los dominios Linker y Adh produjeron una destrucción de la monocapa epitelial similar a la de las amibas control. Un comportamiento parecido se observó cuando se incubaron lisados de trofozoítos con monocapas de células MDCK. Los lisados de trofozoítos transfectados con Bro1 destruyeron las células un 47% más que el control; a diferencia de las amibas que expresaban los dominios Linker y Adh, que presentaron resultados similares al control (**Figura 24B**). Así, la población Bro1 potenció el daño que los trofozoítos producen a las células epiteliales, probablemente debido a su capacidad de interactuar con otras moléculas, formando complejos que participan en la destrucción de las células diana.



**Figura 24. Efecto citopático y citotóxico de trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH sobre células epiteliales.** Destrucción de monocapas de células MDCK incubadas con trofozoítos vivos (A) o lisados (B). El daño de la monocapa se determinó espectrofotométricamente mediante azul de metileno absorbido por las monocapas restantes. A la derecha se muestran imágenes representativas de monocapas de MDCK teñidas. Los valores representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ .

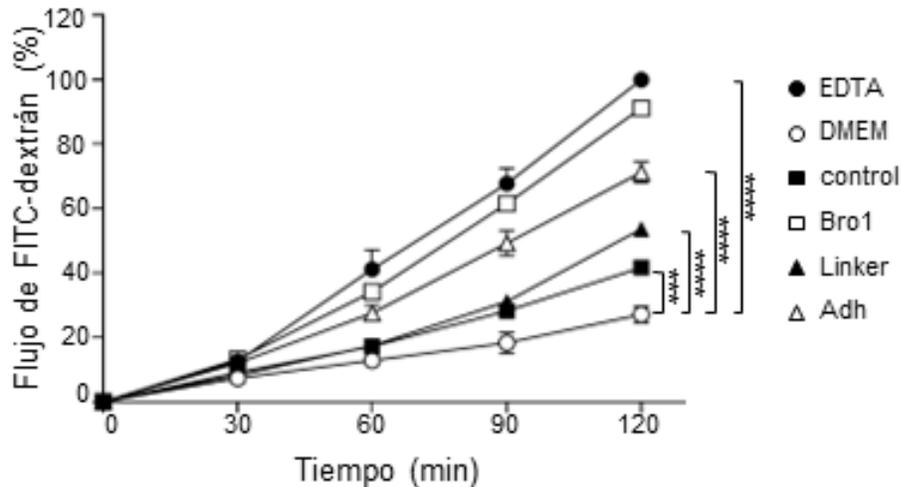
## 7.7 Los dominios Bro1 y Adh alteran las funciones de la barrera epitelial *in vitro*

La primera barrera que protege a los epitelios es la UE. Estas estructuras mantienen unidas a las células adyacentes y regulan el flujo de iones y macromoléculas a través de la vía paracelular. El complejo EhCPADH participa en el daño epitelial, ya que interactúa con ocludina y claudina-1, abriendo la UE (Betanzos *et al.*, 2013). Posteriormente, actúa sobre las uniones adherentes (UAs) y los desmosomas (DSMs), provocando redondeo y desprendimiento celular. El estudio sobre EhADH y EhCP112 por separado, utilizando proteínas recombinantes, mostró que EhADH afecta directamente las uniones epiteliales, sin la intervención de EhCP112 u otras moléculas. Para investigar la región activa de EhADH que participa en la apertura de las UEs, en este trabajo utilizamos monocapas de células epiteliales MDCK cultivadas en filtros transwell, incubadas con los trofozoítos transfectados con cada uno de los dominios de EhADH. En general, las tres poblaciones y los trofozoítos control provocaron una caída de la RET, indicativa de la apertura de las UEs. Como control de una barrera epitelial estable, tomamos como 100% la RET exhibida por las monocapas celulares incubadas con DMEM sin parásitos durante 120 min a 37°C. En cambio, los trofozoítos control disminuyeron hasta el 29% la RET de las células MDCK. Por su parte, los trofozoítos Bro1 generaron consistentemente el mayor daño a las células MDCK, las cuales presentaron valores de 13% de RET; mientras que las monocapas celulares incubadas con los trofozoítos Adh y Linker exhibieron 20% y 44% de RET, respectivamente (**Figura 25**).



**Figura 25. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH sobre la RET de monocapas MDCK.** Los trofozoítos control, Bro1, Linker y Adh se incubaron con células MDCK durante 120 min y se midió la RET. La RET se normalizó según el valor inicial para cada transwell ( $\sim 1,000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). DMEM: células MDCK incubadas con medio de cultivo, sin parásitos. Las medias y el error estándar se representan para cada punto temporal de tres ensayos independientes realizados por triplicado. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Con la finalidad de investigar si los dominios de EhADH también impactan en la permeabilidad paracelular de las macromoléculas, realizamos ensayos de flujo de FITC-dextrán. El quelante de  $\text{Ca}^+$  EDTA desensambla las UICs, permitiendo el flujo libre de macromoléculas; por lo que las monocapas celulares incubadas con EDTA se tomaron como 100% de flujo de dextrán. Después de 120 min, todas las poblaciones de trofozoítos aumentaron el flujo paracelular de macromoléculas en células MDCK, en comparación con las células incubadas sólo con DMEM. Las células epiteliales incubadas con los trofozoítos control presentaron un flujo de FITC-dextrán del 41%. Sorprendentemente, las monocapas celulares incubadas con trofozoítos Bro1 permitieron el flujo del 91% de las macromoléculas, similar a las células epiteliales tratadas con EDTA (**Figura 26**). En concordancia con los resultados del flujo de iones, los trofozoítos Linker y Adh aumentaron el flujo de macromoléculas en 53% y 71%, respectivamente.



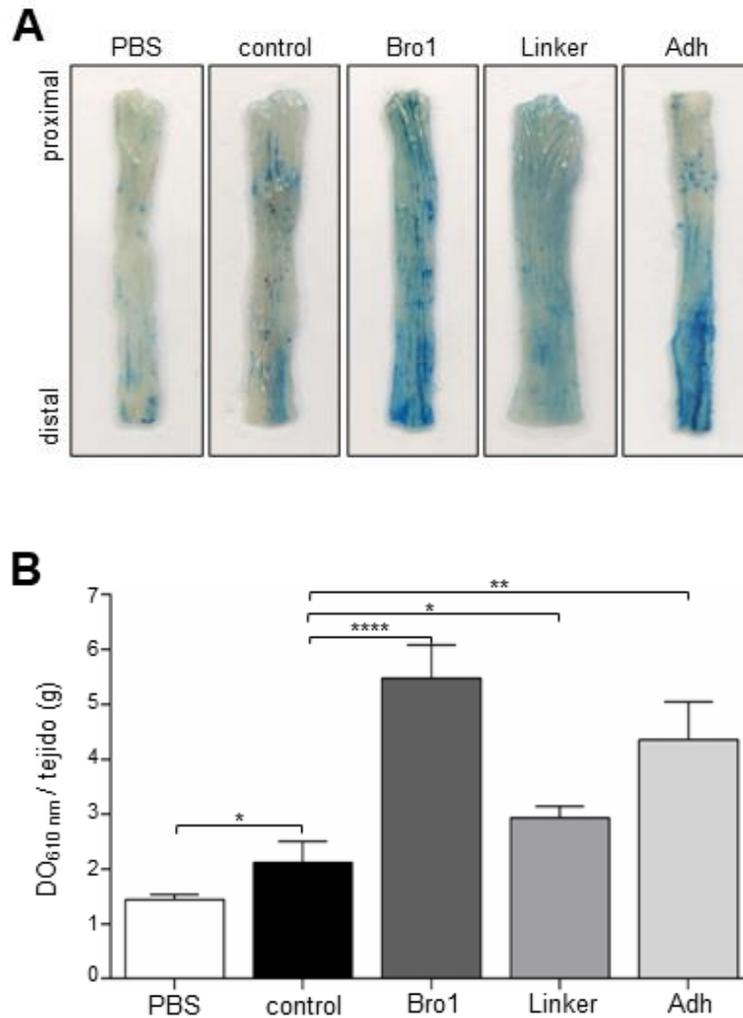
**Figura 26. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresaban a los dominios de EhADH sobre el flujo de macromoléculas a través de la ruta paracelular.** Los trofozoítos control, Bro1, Linker y Adh se incubaron con células MDCK. Se añadió FITC-dextrán apicalmente a las células cultivadas en transwells y se incubaron durante 120 min con trofozoítos. El FITC-dextrán obtenido del lado basal se midió mediante espectroscopía de fluorescencia y se normalizó de acuerdo con las células epiteliales tratadas con EDTA 5 mM, utilizadas como control positivo. DMEM: células MDCK incubadas con medio de cultivo, sin parásitos. La media y el error estándar se representan para cada punto temporal de tres ensayos independientes realizados por triplicado. \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.001.

Una vez que la proteína EhADH daña las UEs, puede alcanzar las UAs dañando sus proteínas E-cadherina y  $\beta$ -catenina, así como a las proteínas desmosomales desmogleína-2 y desmoplaquina I/II, como se ha demostrado previamente (Betanzos *et al.*, 2018). Por tanto, la ruptura del sello paracelular por EhADH permite que *E. histolytica* invada eficientemente el epitelio.

### 7.8 El dominio Bro1 promueve el daño al epitelio colónico de ratones

Hasta ahora, hemos presentado evidencia experimental sobre el efecto de las tres regiones EhADH sobre distintas propiedades de virulencia *in vitro*. Para obtener más información sobre la participación *in vivo* de los dominios de EhADH, investigamos el efecto de los trofozoítos Bro1, Linker y Adh en el epitelio intestinal de ratones C57/BL6. Para estos experimentos, inyectamos

trofozoítos por vía rectal en ratones anestesiados. Después de 30 min de incubación, también se inyectó rectalmente el colorante azul de Evans, con el objetivo de determinar el daño tisular evidenciado por la absorción del colorante en el colon. Los ratones se sacrificaron, se les extrajo el intestino grueso y se cuantificó espectrofotométricamente el colorante a una  $DO_{610\text{ nm}}$ . Los ratones tratados sólo con PBS no mostraron daños evidentes a lo largo del colon ( $DO_{610\text{ nm}}=1.44$ ); mientras que los animales inoculados con los trofozoítos control presentaron un daño visible ( $DO_{610\text{ nm}}=2.11$ ) (**Figura 27**). El epitelio de todos los ratones inoculados con trofozoítos Bro1, Linker y Adh, mostró una mayor penetración del azul de Evan, a simple vista. Sorprendentemente, después de la elución y cuantificación del colorante mediante un análisis densitométrico, encontramos que los trofozoítos Bro1 produjeron 159% ( $DO_{610\text{ nm}}=5.47$ ) más daño que la población control, seguidos por los trofozoítos Adh y Linker que indujeron 105% ( $DO_{610\text{ nm}}=4.35$ ) y 38% ( $DO_{610\text{ nm}}=2.93$ ), respectivamente.



**Figura 27. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresaban a los dominios de EhADH sobre la permeabilidad epitelial del colon murino.** Ratones C57/BL6 se inocularon por vía rectal con trofozoítos y después de 30 min, se evaluó el daño en el epitelio del colon mediante la absorción del colorante azul de Evans. **A)** Se muestran imágenes representativas de las porciones distales y proximales del colon después de la tinción. PBS: colon tratado con PBS, sin parásitos. **B)** El colorante azul de Evans se eluyó y midió espectrofotométricamente a DO<sub>610 nm</sub>, para evaluar la permeabilidad epitelial. La media y el error estándar se representan para cada punto temporal de tres ensayos independientes realizados por triplicado. \*\*\*\*p<0.0001, \*\*p<0.01, \*p<0.1.

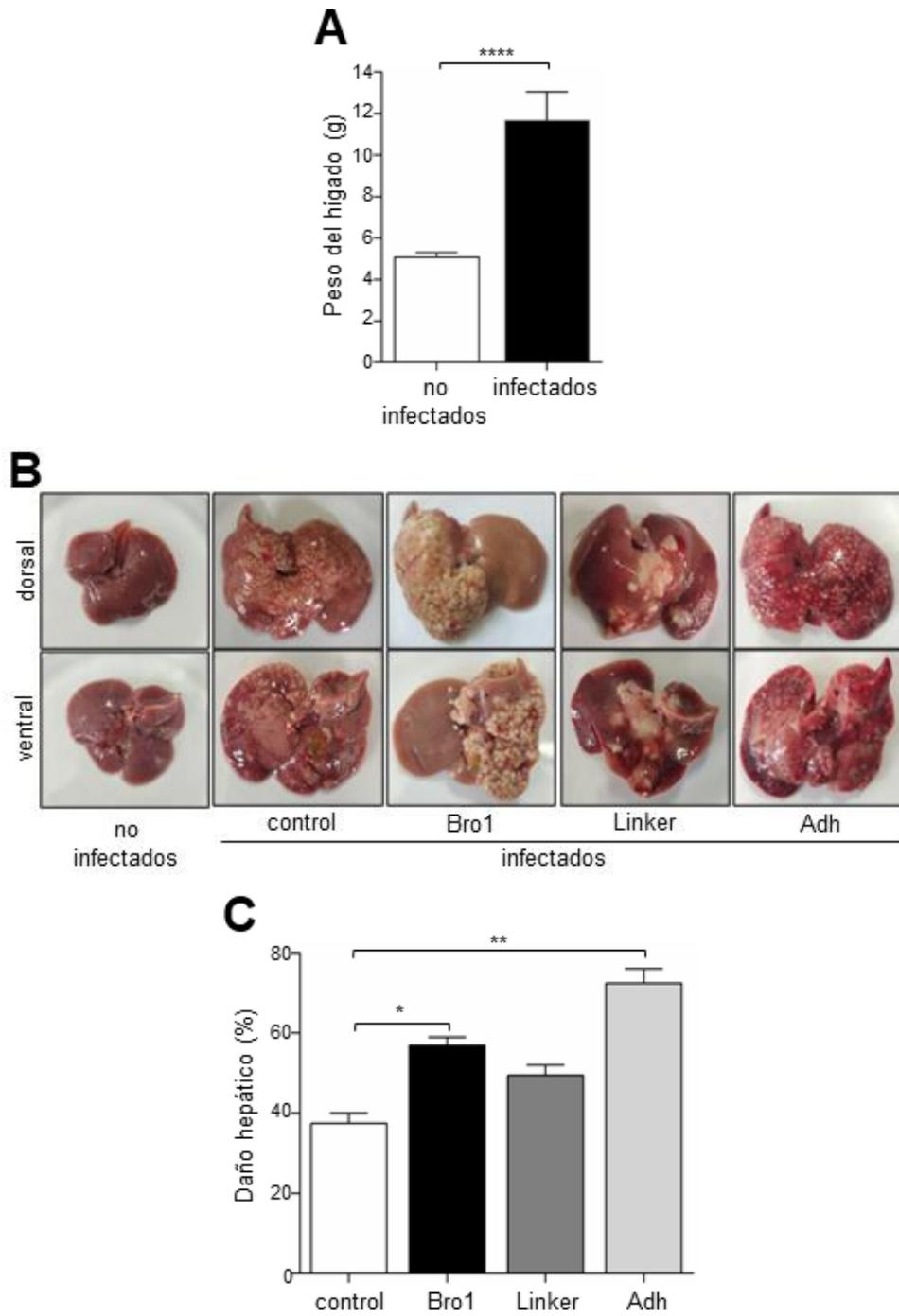
Estos hallazgos indican que los trofozoítos que sobreexpresaban el dominio Bro1 produjeron la mayor permeabilidad del epitelio colónico, probablemente porque esta región interactúa con otras moléculas del parásito que contribuyen a alterar las UICs o porque se asocia con proteínas epiteliales, imitando interacciones homo y heterodiméricas para abrir las UEs.

Así, estos resultados revelaron que el dominio Bro1 puede estar directamente involucrado en el deterioro de la integridad de la barrera epitelial producida por los trofozoítos, como lo sugirieron fuertemente las estrategias *in vitro* (**Figuras 24, 25 y 26**) e *in vivo* (**Figura 27**) utilizadas aquí. Nuestra hipótesis es que puede deberse a la capacidad del dominio Bro1 para interactuar con varias moléculas, formando complejos que inducen el daño epitelial. Las interacciones del dominio Bro1 con otras proteínas para realizar distintas funciones celulares se han descrito para otros miembros de la familia ALIX (Odorizzi, 2006).

### **7.9 Los trofozoítos que sobreexpresaban el dominio Adh produjeron abscesos hepáticos más grandes**

Generalmente, *E. histolytica* daña principalmente el intestino; sin embargo, eventualmente migra al hígado produciendo AHAs, que pueden ser letales. Hasta el momento, se desconoce si en ambos casos actúan las mismas moléculas y participan mecanismos de virulencia similares. Para explorar el papel de los dominios EhADH en la formación del AHA, inoculamos intraportalmente parásitos control y trofozoítos que sobreexpresaban los distintos dominios de EhADH en hámsteres anestesiados. Después de una semana, los animales fueron anestesiados nuevamente y se extrajeron los hígados para examinar el daño. Todos los animales infectados presentaron hígados más grandes, casi del doble del tamaño, en comparación con los hámsteres no infectados (**Figura 28A, B**). Sorprendentemente, los abscesos producidos por las distintas poblaciones de trofozoítos exhibieron consistentemente diferencias morfológicas (**Figura 28B**). Los parásitos control produjeron abscesos pequeños y dispersos a lo largo del tejido; mientras que

los trofozoítos que sobreexpresaban el dominio Bro1 causaron daño localizado en uno de los lóbulos y los abscesos lucían granulares. Además, la coloración del hígado era más clara que la de los controles, probablemente debido a la interferencia con el suministro de sangre al órgano. Aquellos parásitos que expresaban el dominio Linker, provocaron daños más significativos en la zona central del hígado, y los abscesos parecían más compactos y uniformes. Los trofozoítos que sobreexpresan el dominio Adh produjeron AHA macroscópicamente similares al control; sin embargo, se formó un mayor número de abscesos. Además, se observó una coloración oscura o violácea en algunas zonas del hígado, que podría deberse a necrosis. La cuantificación del tejido hepático lesionado reveló que los animales inoculados con los trofozoítos control presentaron alrededor del 37.5% de tejido dañado, pero los trofozoítos Adh provocaron la mayor lesión en el hígado (72.5%), seguidos por los parásitos Bro1 y Linker (57% y 49.5%, respectivamente) (**Figura 28C**).



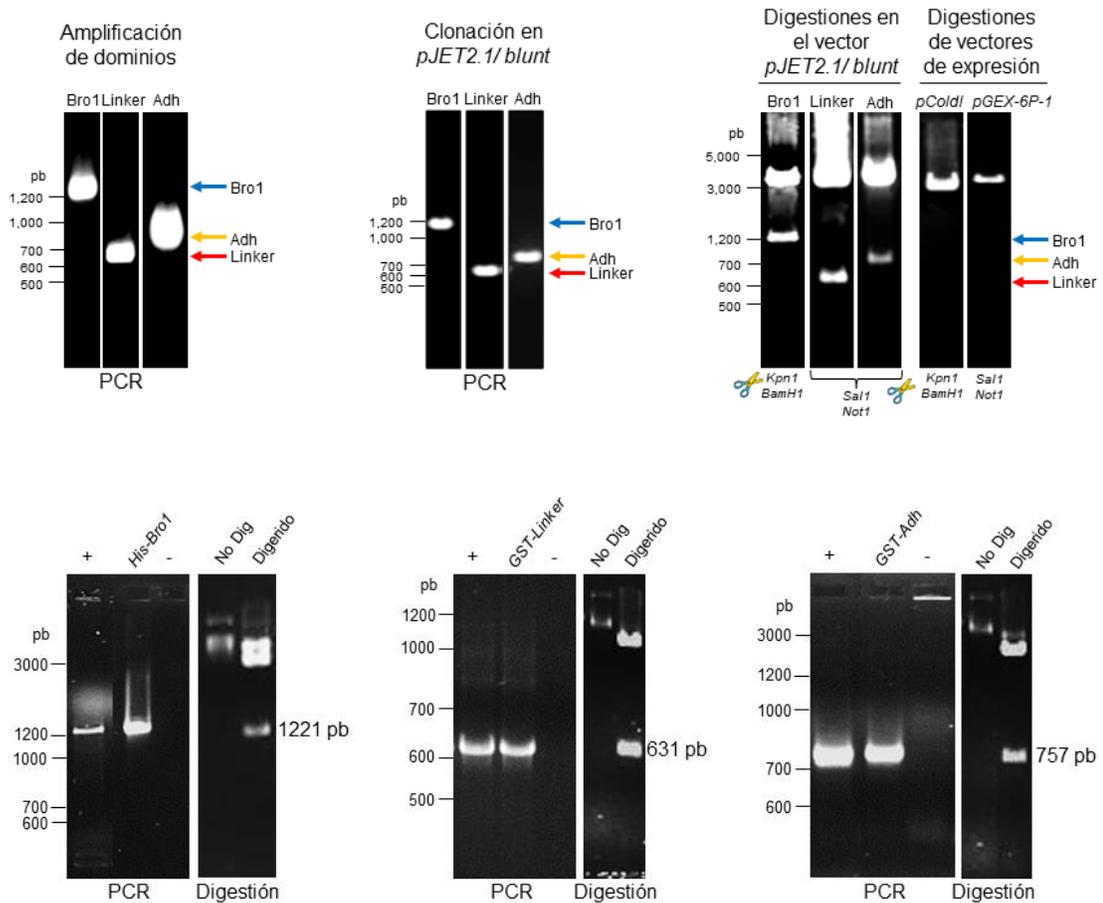
**Figura 28. AHA en hámsteres inoculados con trofozoítos que sobreexpresaban los dominios de EhADH.** Hámsteres fueron inoculados intraportalmente con trofozoítos control, Bro1, Linker o Adh. Una semana después, los animales se anestesiaron y se extrajeron los hígados para examinar el tamaño y daño producido. **A)** Peso del hígado. **B)** Vistas dorsal y ventral representativas de los hígados. **C)** Daño hepático evaluado como el peso de los abscesos formados, dividido por el peso de todo el hígado, antes de que se eliminaran las

áreas lesionadas. Los valores representan la media y el error estándar de cinco experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.1$ .

El daño producido por los trofozoítos Adh podría estar relacionado con el aumento de la adhesión y fagocitosis que presentaban estos parásitos, como se demostró en experimentos previos de este trabajo (**Figura 23**); o con la formación de grupos de proteínas que obstruyen el paso del flujo sanguíneo y permiten la concentración de moléculas dañinas derivadas de los parásitos y del huésped.

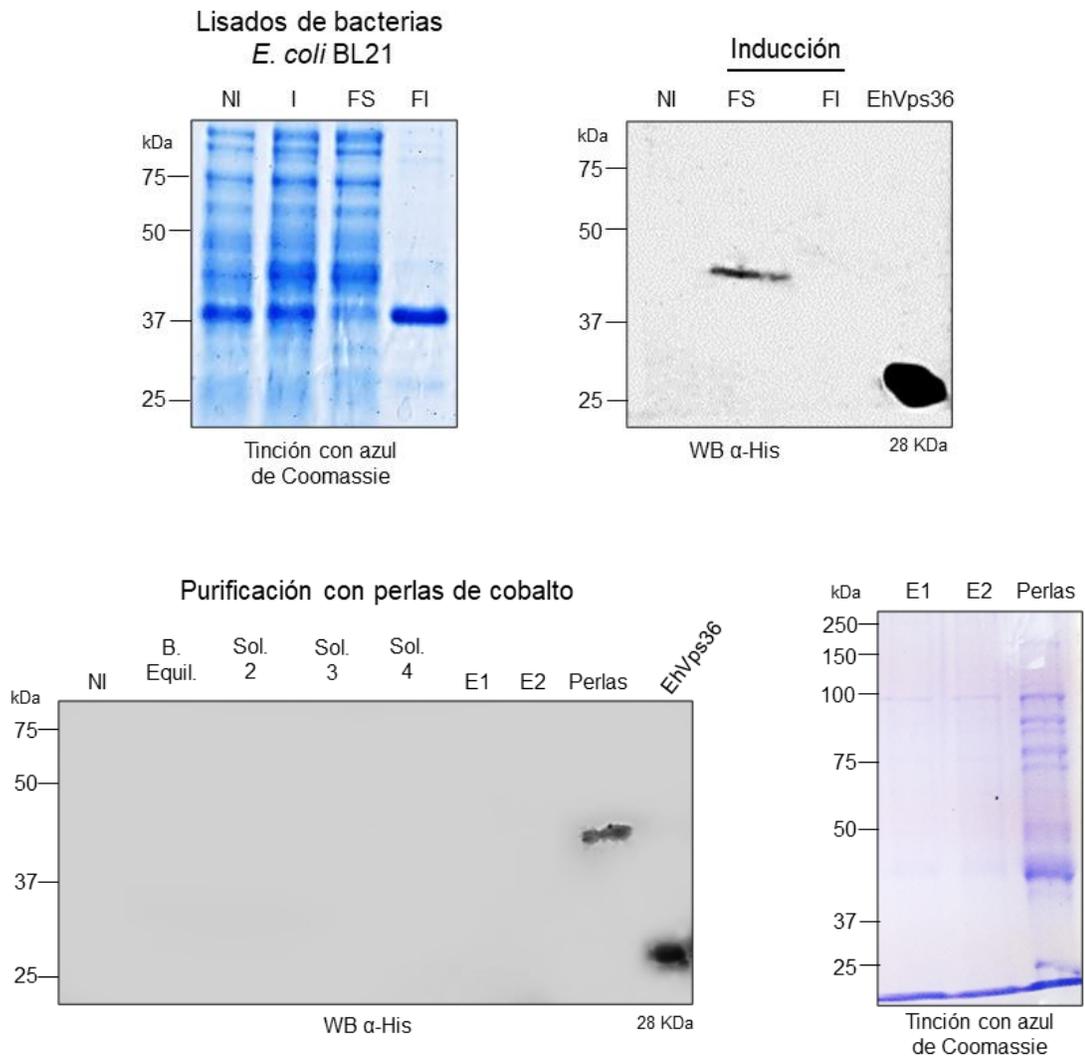
### **7.10 Clonación de los dominios recombinantes His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh**

Con el objetivo de estudiar las interacciones proteicas que establece cada dominio, y dar luz a los mecanismos moleculares que permiten las funciones tan versátiles de EhADH, realizamos la clonación de los fragmentos recombinantes His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh. Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes y con ellos realizamos la amplificación de los fragmentos de interés, empleando una polimerasa de alta fidelidad y ADN genómico, ya que la EhADH no contiene intrones. Los fragmentos esperados fueron de 1,221 pb para el dominio Bro1, 631 pb para Linker y 757 pb para Adh. Posteriormente, los amplificados se clonaron en el vector de tránsito *pJET1.2/blunt* y al digerir con enzimas de restricción, se liberaron los fragmentos con los tamaños moleculares esperados. Posteriormente, los fragmentos fueron clonados en los vectores de expresión: el dominio Bro1 se clonó en el vector *pColdIDNA* con la etiqueta de His, mientras que los dominios Linker y Adh se clonaron en el vector *pGEX-6P-1* con la etiqueta de GST (**Figura 29**).



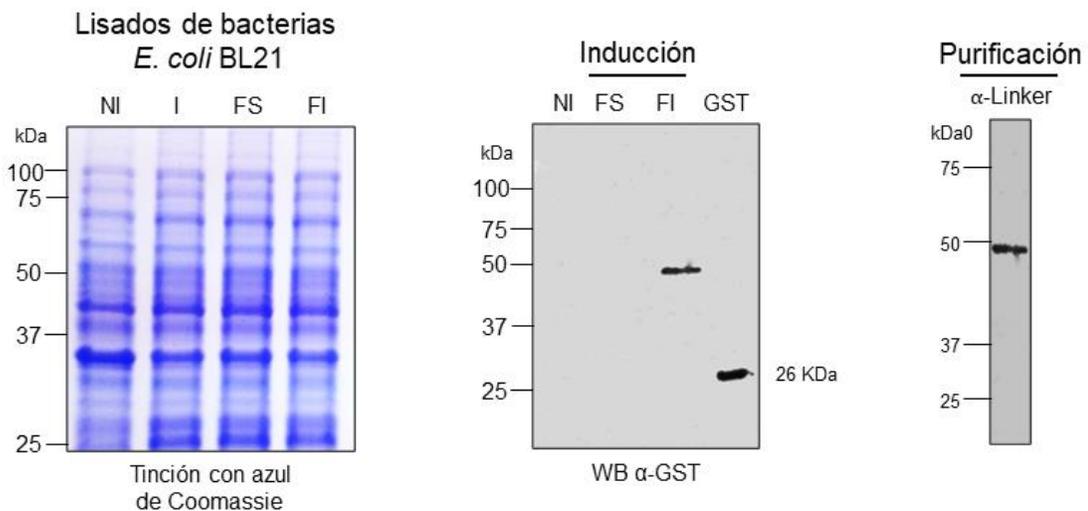
**Figura 29. Clonación de los dominios Bro1, Linker y Adh en los vectores de expresión.** Panel superior: amplificación por PCR de los dominios, clonación en el vector de tránsito y restricción que libera a los fragmentos, para luego ser insertados en los vectores de expresión linealizados. Panel inferior: amplificación por PCR de las construcciones His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh, las cuales fueron digeridas y liberan los fragmentos con los tamaños moleculares esperados. Números a la izquierda: estándares de tamaño molecular en pb. Números a la derecha: tamaños moleculares de los fragmentos Bro1 (1221 pb), Linker (631 pb) y Adh (757 pb).

La inducción de la proteína His-Bro1 se llevó a cabo en las bacterias *E. coli* cepas BL21 y Rosetta (DE3), al utilizar el inductor IPTG a una concentración de 1 mM ON. La proteína inducida con un peso aproximado de 47 kDa, se localizó en la fracción soluble, lo que permitió su purificación (**Figura 30**). Procedimos con esta, utilizando perlas de cobalto que tienen afinidad por la etiqueta His de este dominio. De ese modo, se puede unir a la proteína de interés y posteriormente, realizar lavados para eliminar a las otras proteínas del lisado y después eluir a la proteína de interés. Sin embargo, tuvimos algunos problemas con la purificación porque la proteína no se eluyó y se quedó unida a las perlas (**Figura 30**). Como un control, y para corroborar que no era un problema de la metodología, indujimos la expresión de la proteína recombinante Vps36 de 28 kDa que también cuenta con una etiqueta de His y la purificamos al mismo tiempo que His-Bro1. Los resultados de WB, empleando un anticuerpo anti-His demostraron que solo se eluyó la proteína His-Vps36, pero no His-Bro1. De cualquier modo, His-Bro1 se encuentra purificada y debido a su unión fuerte a la resina, fue posible utilizarla más adelante en los experimentos de *pull-down*.



**Figura 30. Inducción y purificación del dominio His-Bro1 recombinante.** La inducción y expresión de esta proteína se realizó en bacterias *E. coli* BL21, y se concentra principalmente en la fracción soluble. La proteína recombinante se purificó con una resina de perlas de cobalto, aunque su unión con la resina es muy fuerte y no fue posible eluirla. Como control de inducción, purificación y elución se empleó la proteína His-Vps36. Números a la izquierda: estándares de peso molecular en kDa.

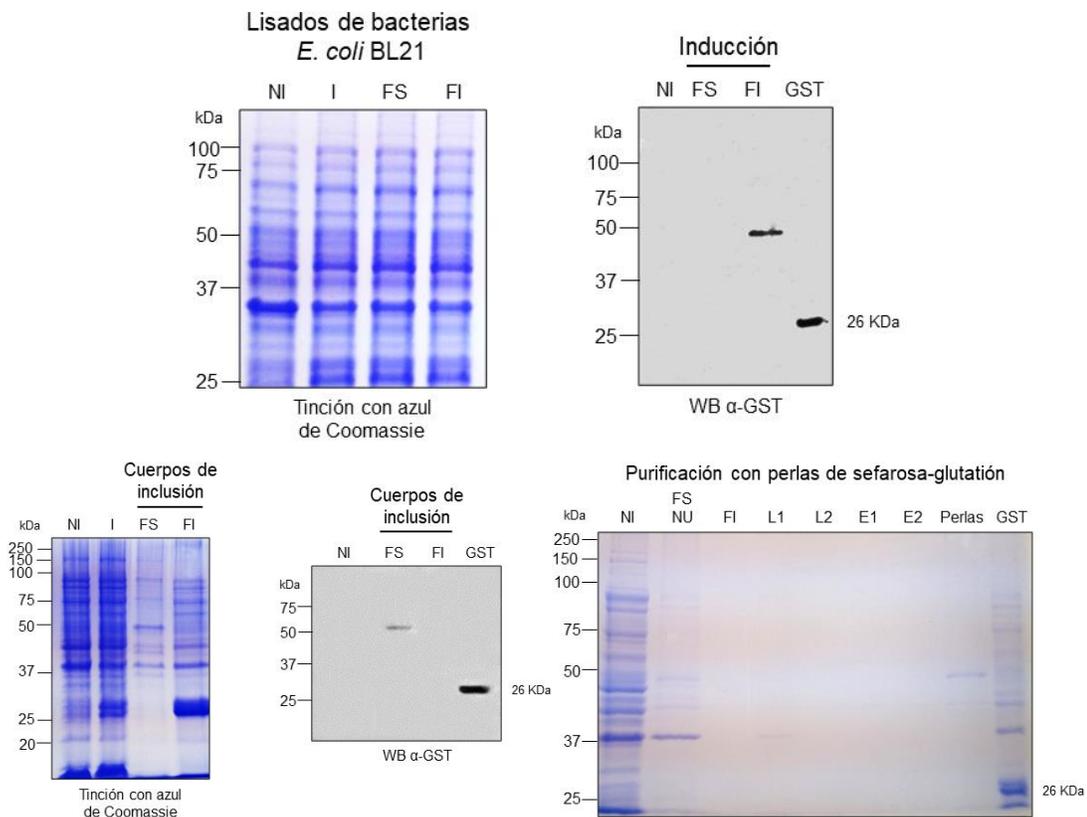
Respecto al dominio GST-Linker, su expresión se indujo en las bacterias *E. coli* BL21, utilizando IPTG a una concentración de 1 mM ON. La purificación se realizó con perlas de sefarosa-glutatión, las cuales tienen afinidad por la etiqueta de GST. De ese modo, se pudo unir a la proteína de interés y después de realizar lavados para eliminar otras proteínas del lisado, se logró eluir a la proteína GST-Linker. En este caso, la proteína se expresó con un peso de aproximadamente 50 kDa en la fracción soluble, lo que permitió su purificación. Como un control del proceso de purificación, se indujo la expresión de la proteína GST sola de 26 kDa (**Figura 31**).



**Figura 31. Inducción y purificación del dominio GST-Linker recombinante.** La inducción y expresión de esta proteína se realizó en bacterias *E. coli* BL21, la cual se concentró en la fracción soluble. La proteína recombinante se purificó con una resina de sefarosa-glutatión y su elución se verificó por tinción de Coomassie y ensayos de WB, empleando el anticuerpo anti-GST. Como control de la expresión, purificación y elución se empleó la proteína GST sola. Números a la izquierda: estándares de peso molecular en kDa.

En el caso de la inducción y purificación del dominio Adh, probamos varias cepas de *E. coli*, ya que la expresión no se concentraba en la fracción soluble. El mejor resultado se logró en las bacterias BL21, usando IPTG a una concentración de 1 mM ON. A pesar de inducir la expresión de la proteína, ésta se concentró en la fracción insoluble, así que se empleó un protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión. Siguiendo este protocolo, se logró

obtener una pequeña concentración de la proteína soluble, misma que pudo ser purificada. A pesar de que el peso teórico era de 56 kDa, se identificó una banda de aproximadamente 50 kDa. La purificación se llevó a cabo empleando perlas de sefarosa-glutación, aunque al igual que la proteína His-Bro1, GST-Adh no pudo ser eluida de la resina (**Figura 32**). Sin embargo, esto no impidió que más adelante se usara esta recombinante en los experimentos de *pull-down*. Como control de la inducción y purificación, se empleó la proteína GST sola, de 26 kDa.

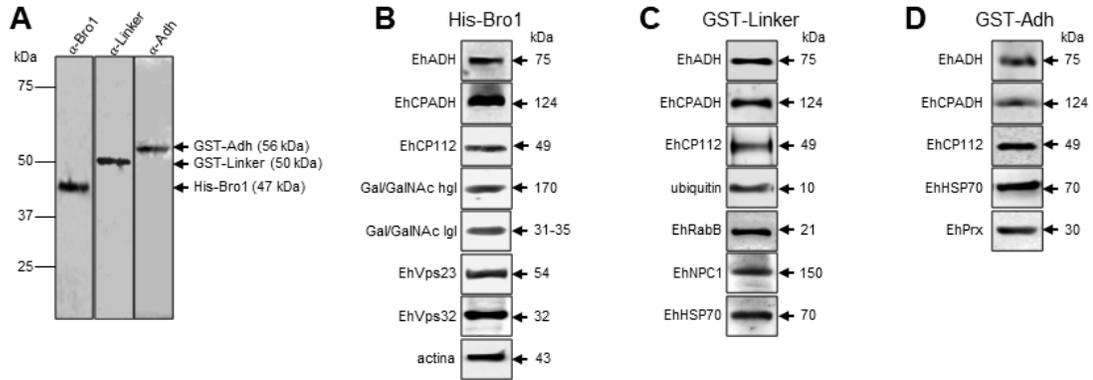


**Figura 32. Inducción y purificación del dominio GST-Adh recombinante.** La inducción y expresión de esta proteína se realizó en bacterias *E. coli* BL21, la cual se concentró en la fracción insoluble. Por lo tanto, se llevó a cabo un protocolo de solubilización a partir de cuerpos de inclusión con el cual, se recuperó una parte de la proteína en la fracción soluble. La purificación de esta proteína se realizó con una resina de sefarosa-glutación, pero no pudo ser eluida de las perlas. La expresión se verificó por tinción de Coomassie y ensayos de WB, empleando el anticuerpo anti-GST. Como control de la expresión, purificación y elución se empleó la proteína GST sola. Números a la izquierda: estándares de peso molecular en kDa.

### 7.11 Los dominios recombinantes Bro1, Linker y Adh interactúan con proteínas del citoesqueleto y proteínas relacionadas con la virulencia

El hecho de que cada dominio contribuya de manera diferencial con distintas propiedades de virulencia de *E. histolytica*, no significa que el dominio por sí solo pueda realizar la función. Es más probable que cada dominio reclute otras proteínas para formar complejos funcionales, que juntos desempeñan un papel en la virulencia.

Para explorar los mecanismos moleculares y desvelar algunas de las proteínas que interactúan con cada dominio de EhADH, generamos los dominios recombinantes His-Bro1 (47 kDa), GST-Linker (50 kDa) y GST-Adh (56 kDa). La identidad de estas proteínas recombinantes se corroboró mediante experimentos de WB, utilizando los anticuerpos específicos generados previamente (**Figura 33A**). Posteriormente, se realizaron ensayos de *pull-down* utilizando estas proteínas recombinantes, las cuales se incubaron con lisados de trofozoítos. Las proteínas que interaccionaron fueron eluidas, separadas por SDS-PAGE y analizadas por espectrometría de masas. Los resultados indicaron que His-Bro1 interactuaba con la lectina Gal/GalNAc; EhCP112 y EhCP2; proteínas de la maquinaria ESCRT (ESCRT-I y ESCRT-III); EhVps26 (un componente del complejo retrómero); actina y tubulina (**Tabla 7**). Algunas de estas interacciones se verificaron mediante ensayos de WB y empleando anticuerpos específicos, corroborando que la proteína His-Bro1 se asocia con EhCP112, lectina Gal/GalNAc, EhVps23 (ESCRT-I), EhVps32 (ESCRT-III) y actina (**Figura 33B**). Sorprendentemente, este dominio también está asociado con la proteína EhADH de longitud completa (75 kDa) y con el complejo EhCPADH (124 kDa).



**Figura 33. Generación de los dominios recombinantes de EhADH.** A) Experimentos de WB de proteínas recombinantes generadas a partir de la secuencia codificante de nucleótidos para cada dominio, que se clonó en vectores de expresión, generando las construcciones *pCold/Bro1*, *pGEX/Linker* y *pGEX/Adh*. La expresión de proteínas recombinantes fue inducida por IPTG. Los números a la izquierda indican el peso molecular del estándar en kDa. B-D) Ensayos de WB de proteínas de *E. histolytica* que interactúan con los dominios recombinantes (B: His-Bro1; C: GST-Linker; y D: GST-Adh), obtenidas a partir de ensayos de *pull-down* e identificadas por espectrometría de masas. Los números de la derecha muestran el peso molecular de las proteínas inmunodetectadas.

**Tabla 7. Proteínas de *E. histolytica* que interactúan con el dominio His-Bro1, identificadas por ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas.**

Número de acceso	Proteína	Funciones	Referencias
EHI_012270 <sup>†</sup>	<b>Lectina Gal/GalNAc subunidad pesada</b>	Adhesión, factor de virulencia	Gilchrist y Petri, 1999
EHI_006980 <sup>†</sup>	<b>Lectina Gal/GalNAc subunidad Igl1</b>	Adhesión, factor de virulencia	Gilchrist y Petri, 1999
EHI_181230	<b>EhCP112</b>	Degradación de sustratos	Ocádiz <i>et al.</i> , 2005
EHI_033710 <sup>†</sup>	<b>EhCP2</b>	Degradación de sustratos	Irmer <i>et al.</i> , 2009; Pertuz Belloso <i>et al.</i> , 2004
EHI_168240 <sup>†</sup>	<b>CP</b>	Degradación de sustratos	Serrano-Luna <i>et al.</i> , 2013
EHI_178530 <sup>†</sup>	<b>EhVps23</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-I)	Galindo <i>et al.</i> , 2021
EHI_169820 <sup>†</sup>	<b>EhVps32</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-III)	Avalos-Padilla <i>et al.</i> , 2018

EHI_114790	<b>EhVps20</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-III)	Avalos-Padilla <i>et al.</i> , 2018
EHI_194400 <sup>†</sup>	<b>EhVps2</b>	Transporte vacuolar (ESCRT-III)	Avalos-Padilla <i>et al.</i> , 2018
EHI_062490 <sup>†</sup>	<b>EhVps26</b>	Transporte retrógrado (complejo retrómero)	Nakada-Tsukui <i>et al.</i> , 2005
EHI_182900 <sup>†</sup>	<b>Actina</b>	Citoesqueleto	Manich <i>et al.</i> , 2018; Meza <i>et al.</i> , 1983; Rath y Gourinath, 2020
EHI_008780 <sup>†</sup>	<b>Actina</b>	Citoesqueleto	Manich <i>et al.</i> , 2018; Meza <i>et al.</i> , 1983; Rath y Gourinath, 2020
EHI_198930 <sup>†</sup>	<b>Actina</b>	Citoesqueleto	Manich <i>et al.</i> , 2018; Meza <i>et al.</i> , 1983; Rath y Gourinath, 2020
EHI_049920 <sup>†</sup>	<b>Proteína de la familia Tubulina</b>	Citoesqueleto	Gilchrist y Petri, 1999; Sánchez <i>et al.</i> , 1994
EHI_119930 <sup>†</sup>	Proteína con dominio de cinasa	Enzima, transferencia de fosfatos	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_121880 <sup>†</sup>	Proteína con dominio de cinasa	Enzima, transferencia de fosfatos	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_197350	Proteína con dominio de tirosina cinasa	Enzima, transferencia de fosfatos	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023)
EHI_010600 <sup>†</sup>	Proteína con dominio BAR/SH3	Vías de señalización	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023

Las proteínas seleccionadas tuvieron un porcentaje de confiabilidad superior al 95%.

Las proteínas en negrita se han relacionado con diversos eventos de virulencia.

<sup>†</sup>Proteínas con evidencia de expresión en membranas o fagosomas en trofozoítos, según AmoebaBD.

La proteína recombinante GST-Linker también interactuó con la proteína EhADH de longitud completa; EhCP112; ubiquitina; proteínas de unión a GTP, como Rabs; EhVps35 (un componente del complejo retrómero); EhNPC1 (un transportador de colesterol); y la chaperona EhHSP70; entre otros (**Tabla 8**). Los experimentos de WB corroboraron la asociación del dominio Linker con

EhCP112, ubiquitina, EhRabB, EhNPC1 y EhHSP70 (**Figura 33C**). Al igual que el dominio Bro1, la proteína GST-Linker también se une a la proteína completa EhADH y al complejo EhCPADH.

**Tabla 8. Proteínas de *E. histolytica* que interactúan con la región GST-Linker, identificadas por ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas.**

Número de acceso	Proteína	Funciones	Referencias
EHI_181220 <sup>†</sup>	<b>EhADH</b>	Adhesión	Bañuelos <i>et al.</i> , 2012; García-Rivera <i>et al.</i> , 1999
EHI_181230	<b>EhCP112</b>	Degradación de sustratos	Ocádiz <i>et al.</i> , 2005
EHI_166800 <sup>†</sup>	<b>Ubiquitina</b>	Proteína de marcaje	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_031410 <sup>†</sup>	<b>Proteína de unión a GTP</b>	Enzima (transducción de señales, tráfico vesicular, etc)	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_108610 <sup>†</sup>	<b>Rab</b> GTPasa	Enzima (transducción de señales, tráfico vesicular, etc)	Bosch y Siderovski, 2013; Saito-Nakano <i>et al.</i> , 2005; Verma <i>et al.</i> , 2020
EHI_164900 <sup>†</sup>	<b>Rab</b> GTPasa	Enzima (transducción de señales, tráfico vesicular, etc)	Bosch y Siderovski, 2013; Saito-Nakano <i>et al.</i> , 2005; Verma <i>et al.</i> , 2020
EHI_005900	<b>Rab7</b> GTPasa pequeña	Enzima (transducción de señales, tráfico vesicular, etc)	Saito-Nakano <i>et al.</i> , 2021; Welter <i>et al.</i> , 2002
EHI_041950 <sup>†</sup>	<b>EhVps35</b>	Transporte retrógrado (complejo retrómero)	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_080220 <sup>†</sup>	<b>EhNPC1</b>	Tráfico de colesterol	Bolaños <i>et al.</i> , 2016
EHI_105240 <sup>†</sup>	Proteína con dominio BAR/SH3	Vías de señalización	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_127700	<b>EhHSP70</b>	Chaperona	Gilchrist y Petri, 1999
EHI_004760 <sup>†</sup>	Subunidad alfa del proteasoma	Proteosomal	Gaudet <i>et al.</i> , 2011

EHI_152570 <sup>†</sup>	Proteína ribosomal 60S L26	Ribosomal	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_139360	Acetiltransferasa, familia GNAT	Enzima	Ramakrishnan <i>et al.</i> , 2004
EHI_176700 <sup>†</sup>	Proteína de la familia AIG1	Desconocida	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_170330	Proteína de la familia RIO1	Desconocida	Gaudet <i>et al.</i> , 2011

Las proteínas seleccionadas tuvieron un porcentaje de confiabilidad superior al 95%.

Las proteínas en negrita se han relacionado con diversos eventos de virulencia.

<sup>†</sup>Proteínas con evidencia de expresión en membranas o fagosomas en trofozoítos, según AmoebaBD.

Finalmente, el dominio Adh (GST-Adh) interactuó con EhADH de longitud completa; la chaperona EhHSP70; varias enzimas involucradas en procesos metabólicos; proteínas ribosómicas; y un antígeno de 20 kDa (**Tabla 9**). La unión de GST-Adh a la proteína EhADH, el complejo EhCPADH, EhCP112, EhHSP70 y EhPrx se verificó en los ensayos de *pull-down* y mediante experimentos de WB (**Figura 33D**).

**Tabla 9. Proteínas de *E. histolytica* que interactúan con el dominio GST-Adh, identificadas por ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas.**

Número de acceso	Proteína	Funciones	Referencias
EHI_181220 <sup>†</sup>	<b>EhADH</b>	Adhesión	Bañuelos <i>et al.</i> , 2012; García-Rivera <i>et al.</i> , 1999
EHI_061640 <sup>†</sup>	<b>EhHSP70</b>	Chaperona	Gilchrist y Petri, 1999
EHI_001420 <sup>†</sup>	EhPeroxirredoxina (EhPrx)	Enzima	González-Vázquez <i>et al.</i> , 2012; Jiménez-Delgadillo <i>et al.</i> , 2004
EHI_051060 <sup>†</sup>	Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa	Enzima	Rodríguez <i>et al.</i> , 1998
EHI_098570 <sup>†</sup>	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	Enzima	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_011210 <sup>†</sup>	Factor de elongación 1- Alpha 1	Enzima	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023

EHI_024240	Aldehído-alcohol deshidrogenasa 2	Enzima	Pineda <i>et al.</i> , 2013
EHI_051940 <sup>†</sup>	Poli (ADP-ribosa) glucohidrolasa	Enzima	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_152650 <sup>†</sup>	Flavoproteína tipo A	Enzima	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_044970 <sup>†</sup>	Enzima málica	Enzima	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_068660 <sup>†</sup>	Proteína ribosomal 60S L5	Ribosomal	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023
EHI_050130 <sup>†</sup>	Proteína ribosomal 60S L14	Ribosomal	Gaudet <i>et al.</i> , 2011)
EHI_035600 <sup>†</sup>	Proteína ribosomal L18a	Ribosomal	Gaudet <i>et al.</i> , 2011
EHI_057670 <sup>†</sup>	Antígeno de 20 kDa	Antígeno	Amos <i>et al.</i> , 2022; Consortium, 2023

---

Las proteínas seleccionadas tuvieron un porcentaje de confiabilidad superior al 95%.

Las proteínas en negrita se han relacionado con diversos eventos de virulencia.

<sup>†</sup>Proteínas con evidencia de expresión en membranas o fagosomas en trofozoítos, según AmoebaBD.

## 7.12 Interacción de los dominios Bro1, Linker y Adh con proteínas del hospedero

Durante los procesos de virulencia, cuando la amiba tiene contacto con el hospedero, es posible que la proteína EhADH también tenga un rol relevante interactuando no sólo con proteínas del parásito sino también con proteínas del organismo infectado. Además, previamente se ha reportado que esta proteína puede interactuar con proteínas de las UICs (Betanzos *et al.*, 2018). Por tal motivo, mediante ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas analizamos las interacciones de la proteína completa GST-EhADH con las proteínas de células epiteliales intestinales (Caco-2). Este análisis nos permitió determinar que la adhesina puede interactuar con un receptor que se asocia con la isoforma 3 de la serina/treonina cinasa 1, localizado en la periferia del epitelio. No descartamos que sea el único receptor específico para EhADH, ya que se ha reportado otro posible receptor de 97 kDa en células MDCK

(Martínez-López *et al.*, 2004). Por otra parte, EhADH también interactúa con las moléculas transportadoras caveolina y clatrina, mismas con las que ya antes se había observado co-localización en ensayos de IF (Betanzos *et al.*, 2018). Además, esta adhesina se asocia con proteínas del citoesqueleto como la actina, una molécula de adhesión y proteínas de las UICs (claudina-1 y -4) (**Tabla 10**). Seguramente, existen más proteínas epiteliales o de otras células blanco con las que puede interactuar EhADH, por lo que se requieren más abordajes experimentales que arrojen luz sobre estos grupos proteicos y su función.

**Tabla 10. Proteínas de células epiteliales humanas Caco-2 que interactúan con GST-EhADH, identificadas por ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas.**

Número de acceso	Proteína	Funciones	Referencias
NP_001341860.1	Receptor que se asocia con la isoforma 3 de la serina/treonina cinasa 1	Receptor	Dondelinger <i>et al.</i> , 2019; He <i>et al.</i> , 2009; Xie <i>et al.</i> , 2013
NP_001166368.1	Isoforma beta de caveolina-1	Molécula transportadora	Fujimoto <i>et al.</i> , 2000
NP_004850.1	Isoforma 1 de la cadena pesada 1 de clatrina	Molécula transportadora	Brodsky, 1985; Royle <i>et al.</i> , 2005
NP_001092.1	Actina 1 citoplásmica	Citoesqueleto	Davidson y Cadot, 2021; Pollard, 2016
NP_391988.1	Precursor 1D de la isoforma 1D de integrina beta-1	Adhesión	Huttenlocher <i>et al.</i> , 1998
NP_066924.1	Claudina-1	Uniones intercelulares	Volksdorf <i>et al.</i> , 2017
NP_001296.1	Claudina-4	Uniones intercelulares	Gaudet <i>et al.</i> , 2011

Las proteínas seleccionadas tuvieron un porcentaje de confiabilidad superior al 95%.

## 8. Discusión

EhADH es una proteína que pertenece a la familia ALIX/AIP1, ya que tiene un dominio Bro1 en su extremo N (**Figura 5**), lo cual es una firma de esta familia (Bañuelos *et al.*, 2005, 2012; Montaña *et al.*, 2017). Además de EhADH, el genoma de *E. histolytica* tiene otras dos proteínas ALIX: EhADH-like 1 y EhADH-like 2; sin embargo, éstas se diferencian de EhADH en su secuencia y no contienen el dominio Adh, que es fundamental para determinadas funciones de virulencia en el parásito (Bañuelos *et al.*, 2012). Los miembros de la familia ALIX se han relacionado con la adherencia celular, la clasificación de proteínas endosómicas, la remodelación del citoesqueleto, la regulación del pH y la apoptosis, entre otras funciones (Bissig y Gruenberg, 2014; Odorizzi, 2006).

La versatilidad de todas estas funciones, muchas de ellas también reportadas en *E. histolytica* (Bandyopadhyay y Ghosh, 2023; Christy y Petri, 2011; A. S. Ghosh *et al.*, 2010; López-Reyes *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2007; Ravdin, 1989; Tavares *et al.*, 2000; Vanegas-Villa *et al.*, 2022), nos llevó a explorar cuidadosamente las características de EhADH. Consideramos que EhADH tiene un papel importante en los procesos de virulencia porque sus regiones separadas son responsables de funciones particulares que contribuyen a la patología generada por el parásito. Por tanto, es fundamental estudiar sus dominios por separado, como unidades funcionales y estructurales.

Con la finalidad de lograr esto, desarrollamos dos estrategias: i) el análisis de la proteína completa EhADH (1-687 aa) y la generación de tres fragmentos que abarcaran el amino (Bro1: 1-400 aa), la parte central (Linker: 246- 446 aa) y la región del extremo carboxilo (Adh: 447-687 aa) conteniendo el dominio de adherencia. Estos segmentos se sobreexpresaron en trofozoítos para analizar por separado su influencia en diferentes eventos de virulencia, *in vitro* e *in vivo*. ii) La producción de proteínas recombinantes utilizando los segmentos mencionados, para identificar proteínas de *E. histolytica* que

interactuaron con cada uno de ellos y así sugerir un posible mecanismo y función celular. A través de estos enfoques, dilucidamos asociaciones con moléculas reportadas previamente y nuevos socios de unión, que nos permiten aclarar algunos mecanismos moleculares necesarios para que EhADH funcione como una proteína de andamio.

De manera adicional y como herramienta, generamos anticuerpos policlonales específicos contra cada uno de los dominios, utilizando secuencias de aa únicas que no se encontraron en los otros segmentos, ni en otras proteínas amibianas o de otros organismos (**Figura 19**). Los anticuerpos reconocieron a cada uno de los dominios de EhADH, a la EhADH completa y, además, reconocieron también al complejo EhCPADH (formado por las proteínas EhADH y EhCP112) (**Figura 20**) lo que indica que el epítipo reconocido en los dominios está expuesto a pesar de la interacción con otra proteína como EhCP112, y no compiten por su unión con EhADH. Curiosamente, los trofozoítos transfectados con cada uno de los segmentos examinados con los anticuerpos dieron distintos patrones de fluorescencia (**Figura 22**) y los péptidos recombinantes se unieron a diferentes proteínas. La localización celular del dominio Bro1, se concentró en vesículas citoplásmicas profusamente iluminadas de diferente tamaño, posiblemente correspondientes a endosomas o MVB (**Figura 22**), ya que se ha reportado que las proteínas Alix se localizan en membranas endosomales (Bissig y Gruenberg, 2014; Odorizzi, 2006; Odorizzi *et al.*, 2003). Por su parte, el anticuerpo contra el dominio Linker reaccionó con regiones de la membrana plasmática (**Figura 22**), lo que puede deberse a su asociación con la EhADH completa, como lo reveló el análisis de espectrometría de masas (**Tabla 8**). Además, informes anteriores revelaron a EhADH en la membrana plasmática (Bañuelos *et al.*, 2012; Montaña *et al.*, 2017). El anticuerpo contra el dominio de adherencia tiñó muchas vesículas en la superficie de los trofozoítos (**Figura 22**), lo que sugiere que esta región participa en el proceso de secreción, como se ha observado para la proteína completa (Galindo *et al.*, 2022). Al parecer, EhADH y los dominios exógenos podrían estar en el citoplasma para interactuar con otras

proteínas de los trofozoítos, pero también en la membrana plasmática para interactuar con otras moléculas fuera del parásito.

Posteriormente, se investigó el impacto de los dominios de EhADH sobre diferentes propiedades de virulencia *in vitro*, utilizando los trofozoítos transfectados. Sorprendentemente, las tres poblaciones de trofozoítos (Bro1, Linker y Adh) se comportaron de manera diferente durante estos experimentos. Los trofozoítos transfectados con el dominio Adh exhibieron una mayor eficiencia de adhesión y una mayor tasa de erifagocitosis, que los parásitos control; mientras que los trofozoítos transfectados con el dominio Bro1 mostraron un efecto menor sobre estos eventos (**Figura 23**). El dominio Linker también parece estar ubicado en o cerca de la membrana plasmática (**Figura 22**) y puede adherirse más que el control, aunque en menor medida que los trofozoítos Adh. Tanto el dominio Adh como el Linker adoptan una conformación en “V” tridimensional, lo que podría ayudar a adherir más de una célula objetivo a la vez. Probablemente, la presencia de una mayor cantidad del dominio Adh en las vacuolas periféricas observadas en las imágenes de fluorescencia, expuso a los trofozoítos a un mayor número de glóbulos rojos, lo que facilitó su adhesión e ingesta.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Bañuelos *et al.*, 2012), los trofozoítos transfectados con el dominio Bro1 se probaron en ensayos de adhesión y eritrofagocitosis. Sin embargo, los resultados indicaron que los trofozoítos Bro1 adhieren y fagocitan menos eritrocitos que los controles con el vector vacío. Esto puede deberse a que en ese trabajo solo se transfectaron los primeros 166 aa de EhADH. Actualmente, en este trabajo utilizamos el dominio Bro1 completo (340 aa) para evitar generar un posible efecto dominante negativo y analizar adecuadamente la función del dominio. Es por eso que los resultados actuales son diferentes de los reportados anteriormente.

Uno de los primeros signos de daño epitelial producido por los trofozoítos es la apertura de las UICs, lo cual produce la separación de las células de los epitelios (Betanzos *et al.*, 2014). En este proceso participa EhADH, ya que, en

experimentos previos, empleando la proteína recombinante EhADH purificada, se produce un incremento en la permeabilidad epitelial (Betanzos *et al.*, 2018). Para explicar este proceso, previamente se evidenció que EhADH se une a la claudina-1, deslocalizándola a ella y a otras proteínas de las UEs (Betanzos *et al.*, 2018) y produciendo primero la apertura de las UEs y, posteriormente, la ruptura de las UAs y DSMs (Hernández-Nava, 2017). Además, la EhADH purificada es capaz de unirse a la clatrina epitelial del huésped y a la caveolina (Betanzos *et al.*, 2018; Hernández-Nava, 2017). En esta tesis, hemos descubierto que los trofozoítos transfectados con Bro1 y sus lisados mostraron la mayor capacidad para destruir monocapas de células epiteliales. Mientras que los trofozoítos transfectados con Linker y Adh, exhibieron un efecto menor, en comparación con los trofozoítos control. Esto podría deberse a las interacciones establecidas por el dominio Bro1, reveladas mediante ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas. Bro1 podría estar reclutando algunas proteínas ESCRT, relacionadas con este tipo de eventos de virulencia, además de CP, que ayudan a degradar el tejido. El dominio Bro1 parece estar ubicado en el citoplasma de las amibas en condiciones basales (**Figura 22**), sin embargo, es posible que cuando las amibas enfrentan un estímulo como la presencia de células epiteliales, la ubicación de Bro1 cambie y el dominio sea redirigido a la membrana plasmática para colaborar en el efecto citopático. En conformidad con estos resultados, los trofozoítos transfectados con los dominios Bro1 y Adh fueron más eficientes que la población control para abrir las UICs, provocando una dramática caída de la RET. En concordancia, estas poblaciones también permitieron un flujo de dextrán mayor que el control, lo que indica que el flujo de macromoléculas en los epitelios también está alterado. Nuestra hipótesis es que EhADH es una proteína altamente dinámica, capaz de interactuar con varias proteínas, y a través de distintas regiones en la misma proteína.

Los experimentos *in vivo* realizados en esta tesis confirmaron que al menos ciertos eventos que ocurren *in vitro* también ocurren *in vivo*, validando los modelos para estudiar la virulencia de *E. histolytica*.

La formación de AHA es un experimento *in vivo* que permite analizar el daño que los trofozoítos provocan en el tejido hepático. Para este daño se tienen en cuenta varios factores, como la respuesta inmune del huésped y la especie animal utilizada. En este caso observamos abscesos con todos los parásitos, sin embargo, la morfología y la extensión difieren. Los abscesos formados por trofozoítos Bro1 parecen gránulos sólidos concentrados en un lóbulo del hígado. El daño causado por los trofozoítos Linker es uniforme, sin gránulos y en la zona central del hígado. Dado que la inoculación de los parásitos es intraportal, parece que estos no migran y permanecen muy cerca de la zona de inoculación. El contenido del absceso es generalmente líquido y parece muy similar al tipo de absceso reportado en humanos con amebiasis hepática. Por otro lado, el absceso causado por los trofozoítos Adh tiene una forma muy similar al daño de los trofozoítos control, pero de mayor extensión. A pesar del extenso daño en todos los casos, los animales tuvieron un comportamiento normal, es decir, no lucían enfermos, solo presentaron un agrandamiento en la cavidad abdominal que se correlacionaba con la hepatomegalia que padecían, la cual determinamos pesando los hígados. Cuando cuantificamos el tejido hepático dañado, determinamos que el mayor daño lo causaban los trofozoítos Adh. Probablemente lo atribuimos a la mayor capacidad de adhesión de estas amibas, lo que hace que se adhieran fuertemente al tejido y se dificulte su eliminación. Además, estos trofozoítos también tienen una mayor capacidad de eritrofagocitosis, y dado que el hígado es un órgano muy irrigado, los trofozoítos podrían encontrar en él las condiciones ideales para su desarrollo.

Para entender como hace EhADH para llevar a cabo todas estas funciones, se generaron proteínas recombinantes con cada uno de los dominios y se buscaron interacciones con otras proteínas amibianas. Los resultados de los experimentos de *pull-down* y el análisis por espectrometría de masas revelaron que cada dominio interactúa con proteínas diferentes, lo que podría explicar su participación y liderazgo en distintos eventos de virulencia. Mientras que una parte de la proteína participa más activamente en

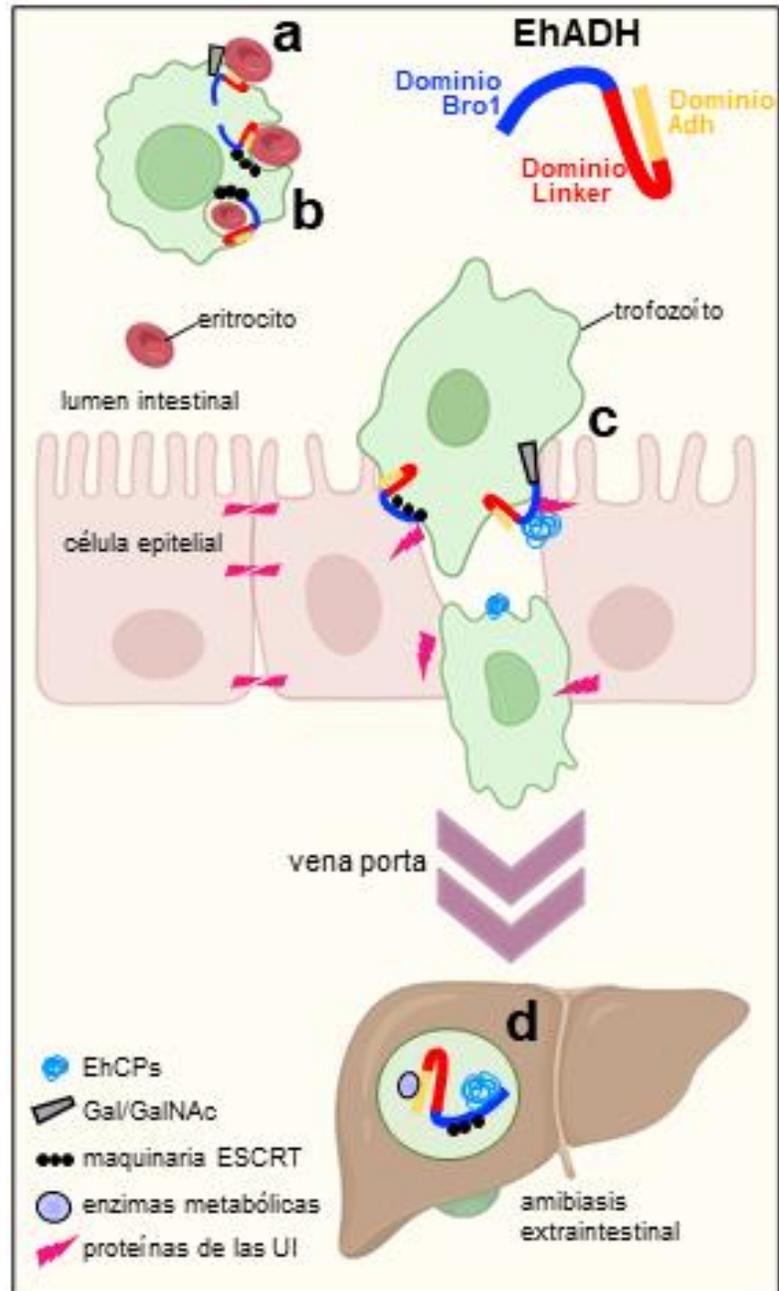
la adhesión, otra parte produce la separación de las células del tejido. La cooperación molecular con otras proteínas también es necesaria para llevar a cabo las múltiples funciones de esta proteína de andamio. Nuestros hallazgos mostraron la participación de diversas moléculas en eventos de adhesión-fagocitosis y en la destrucción epitelial y formación de AHA, por asociación a diferentes moléculas. Aunque también evidenciamos el efecto cooperativo de las tres regiones de EhADH, para interactuar con una célula diana. El dinamismo y la versatilidad de EhADH le permiten una amplia diversidad de movimientos y la posibilidad de adoptar distintas conformaciones que, a su vez, le ayudan a interactuar con diferentes moléculas para conducir las al sitio que requieren los trofozoítos. Curiosamente, EhADH es capaz de unirse a una misma molécula por diferentes regiones dependiendo de su estructura 3D. Como se ha informado con las proteínas ALIX en otros organismos, y también es posible que generen dímeros o multímeros. En este trabajo verificamos que EhADH también puede hacer esto, ya que cada dominio interactúa por separado con la proteína EhADH como se sugiere en los ensayos de *pull-down* y se comprueba en los de WB.

Consideramos que el dominio Bro1 interactúa preferentemente con moléculas directamente relacionadas con la virulencia de *E. histolytica*, como miembros de la maquinaria ESCRT y CPs, además de la lectina Gal/GalNAc. El dominio Linker podría estar relacionado con funciones de transporte porque interactúa con proteínas transportadoras como la familia Rab o transportadores de colesterol. Quizá este dominio lidere funciones como el tráfico vesicular. El dominio Adh está relacionado con enzimas que participan en diferentes rutas metabólicas. A pesar de las funciones diferenciales de cada dominio, la participación de EhADH es evidente como una proteína de andamio dinámica presente durante toda la vía endocítica (**Figura 34**).

Por otra parte, EhADH recluta no sólo moléculas amebianas sino también proteínas del huésped durante la invasión del tejido, como citocinas y otras células que se congregan en los epitelios para llevar a cabo su tarea defensiva, pero que paradójicamente también dañan al huésped. De hecho, hemos

informado de la interacción de EhADH con proteínas de las UICs (Betanzos *et al.*, 2013, 2018). Además, enzimas metabólicas y otras proteínas como compañeras de EhADH sugieren la participación de esta adhesina en otras funciones aparentemente no relacionadas con la invasión.

Consideramos que EhADH tiene un papel importante en los procesos de virulencia porque sus regiones separadas son responsables de funciones particulares que contribuyen a la patología del parásito. Por tanto, fue fundamental estudiar a sus dominios por separado, como unidades funcionales y estructurales.



**Figura 34. Modelo de posibles funciones para cada dominio de EhADH y moléculas reclutadas involucradas en eventos de virulencia.** (a) El dominio Adh participa en la adhesión de las células diana, interactuando con otras moléculas del parásito, incluida la lectina Gal/GalNAc. (b) También participa en la fagocitosis, junto con la maquinaria ESCRT. (c) El dominio Bro1 está involucrado en la alteración de las UI, probablemente por su unión con ocludina y claudina, y promueve la formación de complejos con EhCPs y miembros de la maquinaria ESCRT. (d) Los trofozoítos pueden llegar al hígado por la vena porta, generando el AHA con la participación principal del dominio Adh, que interactúa con las EhCPs y las enzimas metabólicas.

## 9. Conclusión

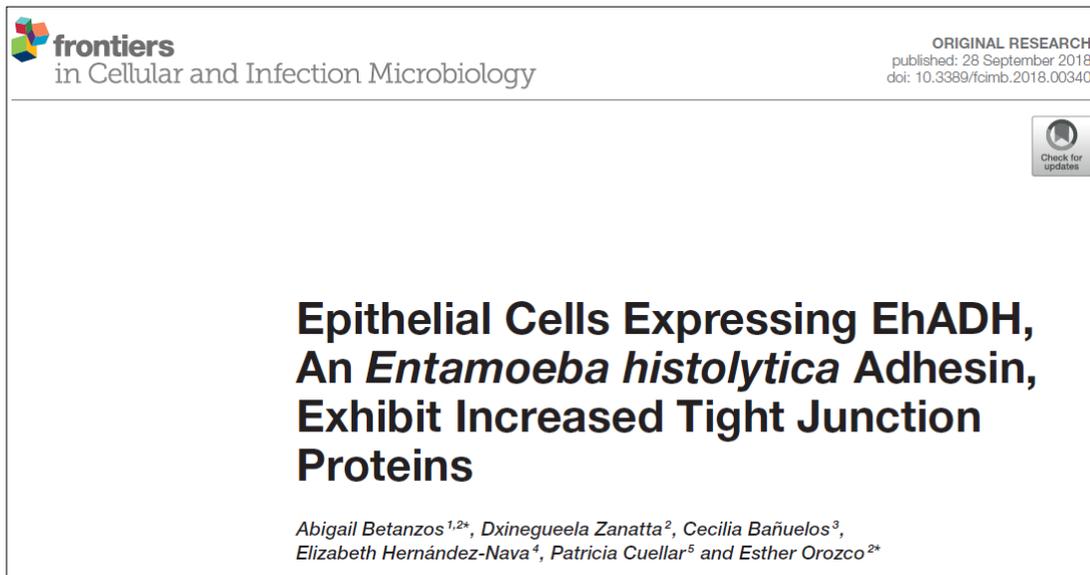
Estos hallazgos muestran que EhADH es de hecho una proteína andamio que interactúa con varias moléculas, muchas de las cuales han sido identificadas como factores de virulencia. Los dominios de EhADH participan diferencialmente en la adhesión, fagocitosis, lesión epitelial y formación de AHA, a través de sus interacciones con proteínas involucradas en estos eventos, como adhesinas, moléculas relevantes durante la formación de MVB, proteínas de transporte retrógrado, moléculas del citoesqueleto, proteínas de tráfico vesicular, degradación de sustratos, enzimas metabólicas y proteínas de choque térmico. EhADH también se une a varias moléculas del huésped durante la invasión epitelial, facilitando la entrada, colonización e invasión.

## 10. Perspectivas

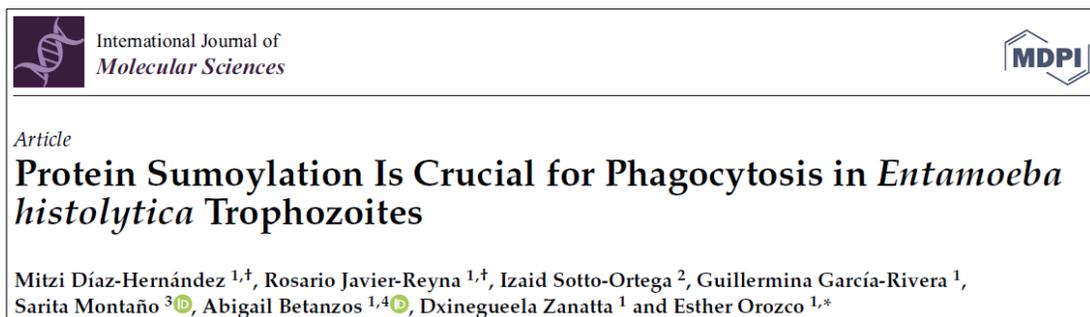
- Sobre-expresión de una forma mutada de los dominios Bro1, Linker y Adh, para evaluar la participación de los dominios en los eventos de virulencia *in vitro* e *in vivo* de *E. histolytica*.
- Realizar mutaciones puntuales en sitios específicos de los dominios His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh, con la finalidad de evitar su unión con las proteínas identificadas por espectrometría de masas y así corroborar su interacción.
- Analizar las proteínas de células epiteliales humanas Caco-2 que interactúan con los dominios His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh, por ensayos de *pull-down* y espectrometría de masas.
- Determinar la participación de los dominios His-Bro1, GST-Linker y GST-Adh en la formación de cuerpos multivesiculares *in vitro*, usando el modelo de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs, por sus siglas en inglés *Giant Unilamellar Vesicles*).

## 11. Artículos

- Betanzos, A., Zanatta, D., Bañuelos, C., Hernández-Nava, E., Cuellar, P., y Orozco, E. (2018). Epithelial Cells Expressing EhADH, An *Entamoeba histolytica* Adhesin, Exhibit Increased Tight Junction Proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00340>



- Díaz-Hernández, M., Javier-Reyna, R., Sotto-Ortega, I., García-Rivera, G., Montaña, S., Betanzos, A., Zanatta, D., y Orozco, E. (2021). Protein sumoylation is crucial for phagocytosis in *entamoeba histolytica* trophozoites. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115709>



## 12. Ponencias



La Universidad Veracruzana a través del UV-CA-156  
Inmunología y Biología Molecular Aplicada de la Facultad  
de Ciencias Químicas, otorga la presente



### CONSTANCIA

Por su participación como PONENTE a:

**M. EN C. DXINEGUELA Y. ZANATTA GARCIA**

En la **IV Jornada de Investigación Biomédica "De las moléculas a la inmunidad"**, celebrada el 25 de noviembre de 2019

Con una duración de 10 horas, dentro del marco de las actividades académicas del UV-CA-156 y del 75 aniversario de Nuestra Casa de Estudios

*"Lis de Veracruz:Arte, Ciencia, Luz"*  
Ixtaczoquitlán, Ver., 25 de noviembre de 2019

**DRA. ARACELY LÓPEZ MONTEÓN**  
Representante UV-CA-156  
Inmunología y Biología Molecular  
Aplicada

**M. EN C. LUIS A. SÁNCHEZ BAZÁN**  
Director  
Facultad de Ciencias Químicas

**DR. ANGEL RAMOS LIGONIO**  
Presidente Asociación Chagas con  
Ciencia y Conocimiento





El Laboratorio de Bioquímica Médica del Departamento de Bioquímica del  
CINVESTAV-IPN

Otorga el presente

AGRADECIMIENTO

a: *MSc. Dxinegueela Yolanda Zanatta García*

Por haber impartido en formato virtual, el Seminario

**“EhADH, un factor de virulencia de Entamoeba  
Histolytica”**

Dirigido a los estudiantes de Doctorado del Laboratorio Bioquímica Médica

El 13 de agosto de 2020

Dr. José Víctor Calderón Salinas  
Jefe del Laboratorio de Bioquímica Médica  
Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN

Ciudad de México, a 26 de octubre de 2020.

# CERTIFICADO

OTORGADO A

*Dxinegueela Zanatta García*

Live con los editores: publicación de artículos y libros científicos

24-abr-2020

Fecha de finalización

*Heloisa Tiberio*

Organizador

**SPRINGER NATURE**

# Certificate of Participation

This certifies that

Dxinegueela Yolanda Zanatta García

---

Name

Mexico City, Mexico

---

City, Country

participated in the

29<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Parasitology



15–17 March 2021

digital conference

Conference chairs

**Prof. Dr. Achim Hörauf & Prof. Dr. Marc Hübner**



LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA A TRAVÉS  
DEL UV-CA-156 INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR APLICADA DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS QUÍMICAS



Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

## DXINEGUEELA YOLANDA ZANATTA GARCIA

por su PARTICIPACIÓN COMO PONENTE en el II WEBINAR TÉCNICAS  
EN BIOMEDICINA: EXPECTATIVAS vs REALIDAD

Celebrado de forma virtual en Orizaba, Ver., Mex., del 5 al 8 de julio de 2021, con  
una duración de 15 horas, dentro del marco de las actividades académicas del

UV-CA-156

DRA. ARACELY LÓPEZ MONTEÓN

Representante del UV-CA-156  
Inmunología y Biología Molecular  
Aplicada



UV-CA-156  
INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR APLICADA

DRA. GUADALUPE VIVAR VERA

Directora Facultad de Ciencias  
Químicas



LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA A  
TRAVÉS DEL UV-CA-156 INMUNOLOGÍA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA DE  
LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Otorgan la presente **CONSTANCIA** a la:

## DRA. DXINEGUEELA Y. ZANATTA GARCÍA

por su PARTICIPACIÓN en la VI JORNADA DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA "DE LA INVESTIGACIÓN A LA PRÁCTICA" con la conferencia  
AYER CON LOS BICHOS, HOY CON LOS PACIENTES

Celebrado de forma virtual en Orizaba, Ver., Mex., el 24 de noviembre de 2023, con  
una duración de 10 horas, dentro del marco de las actividades académicas del UV-

CA-156

DRA. ARACELY LÓPEZ MONTEÓN

Representante del UV-CA-156  
Inmunología y Biología Molecular  
Aplicada



DRA. GUADALUPE VIVAR VERA

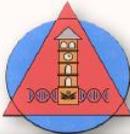
Directora Facultad de Ciencias  
Químicas



UV-CA-156  
INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR APLICADA

VI JORNADA DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
DE LA INVESTIGACIÓN A LA PRÁCTICA  
2023

REUNIENDO ENSEÑANZAS, VALORES, OPORTUNIDADES Y LENGUAS, UNIFICANDO A LA CIENCIA, CULTURA, INNOVACIÓN, OFICIOS, NATURALEZA, EDUCACIÓN Y SABERES



REVOLUCIONES

Otorga la presente constancia a:

***Dxinequeela Yolanda Zanatta Garcia***

Por su colaboración, creación de contenido y formar parte de REVOLUCIONES, organización benéfica cuyo objetivo es la **divulgación de la ciencia, tecnología, humanística, social, arte y cultura** a través de sus diferentes redes sociales.



M. en C. Melisa Karina Chacón Lázaro  
Fundadora y creadora de contenido

LAET. Jocelyn Santiago Rodríguez  
Cofundadora y creadora de contenido

Ciudad de México, México a 12 de enero de 2024

### 13. Bibliografía

- Amos, B., Aurrecoechea, C., Barba, M., Barreto, A., Basenko, E. Y., Bažant, W., Belnap, R., Blevins, A. S., Böhme, U., Brestelli, J., Brunk, B. P., Caddick, M., Callan, D., Campbell, L., Christensen, M. B., Christophides, G. K., Crouch, K., Davis, K., DeBarry, J., ... Zheng, J. (2022). VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D898–D911. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab929>
- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 23(2), 151–158. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90150-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90150-2)
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., Ortega, J., and Orozco, E. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005079>

- Avalos-Padilla, Y., Knorr, R. L., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Lipowsky, R., Dimova, R., and Orozco, E. (2018). The conserved ESCRT-III machinery participates in the phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00053>
- Bandyopadhyay, A., and Ghosh, S. K. (2023). Apoptosis-inducing factor-like protein-mediated stress and metronidazole-responsive programmed cell death pathway in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology*, 119(5). <https://doi.org/10.1111/mmi.15061>
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., Vincent, O., and Orozco, E. (2012). EhADH112 Is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/657942>
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., and Orozco, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: An *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Experimental Parasitology*, 110(3 SPEC. ISS.), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.005>
- Baxt, L. A., and Singh, U. (2008). New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. In *Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 21, Issue 5). <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32830ce75f>
- Bercu, T. E., Petri, W. A., and Behm, B. W. (2007). Amebic colitis: New insights into pathogenesis and treatment. In *Current Gastroenterology Reports* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s11894-007-0054-8>
- Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., González-Mariscal, L., Schnoor, M., and Orozco, E. (2013). The EhCPADH112 Complex of *Entamoeba histolytica* Interacts with Tight Junction Proteins Occludin and Claudin-1 to Produce Epithelial Damage. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065100>
- Betanzos, A., Schnoor, M., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Pais-Morales, J., and Orozco, E. (2014). Analysis of the epithelial damage produced by *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Visualized Experiments*, 88. <https://doi.org/10.3791/51668>
- Betanzos, A., Zanatta, D., Bañuelos, C., Hernández-Nava, E., Cuellar, P., and Orozco, E. (2018). Epithelial Cells Expressing EhADH, An *Entamoeba histolytica* Adhesin, Exhibit Increased Tight Junction Proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00340>
- Bissig, C., and Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 19–25). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.10.009>

- Bolaños, J., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García- Rivera, G., Huerta, M., Pais-Morales, J., González-Robles, A., Rodríguez, M. A., Schnoor, M., and Orozco, E. (2016). EhNPC1 and EhNPC2 Proteins Participate in Trafficking of Exogenous Cholesterol in *Entamoeba histolytica* Trophozoites: Relevance for Phagocytosis. *PLoS Pathogens*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006089>
- Bosch, D. E., and Siderovski, D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 45, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/emm.2013.30>
- Brodsky, F. M. (1985). Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. II. Identification of in vivo forms of clathrin. *Journal of Cell Biology*, 101(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.101.6.2055>
- Bruhn, H., and Leippe, M. (2001). Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1514(1). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00345-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00345-5)
- Cantalloube, H., Labesse, G., Chomilier, J., Nahum, C., Cho, Y. Y., Chams, V., Achour, A., Lachgar, A., Mbika, J. P., Issing, W., Mornon, J. P., Bizzini, B., Zagury, D., and Zagury, J. F. (1995). Automat and BLAST: Comparison of two protein sequence similarity search programs. *Bioinformatics*, 11(3). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/11.3.261>
- Carrero, J. C., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Unzueta, J., León-Sicairos, N., and de la Garza, M. (2020). Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 310, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>
- CDC, C. for D. C. and P. (2019, October 15). *DPDx-Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern-Amebiasis-Entamoeba histolytica*. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>.
- CDC, C. for D. C. and P. (2021, December 3). *Parasites-Amebiasis-Entamoeba histolytica Infection*. <https://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/index.html>.
- Cereijido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A., and Sabatini, D. D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *Journal of Cell Biology*, 77(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.77.3.853>
- Chacín-Bonilla, L. (2013). [An update on amebiasis]. *Revista Medica de Chile*, 141(5).
- Christy, N. C. V., and Petri, W. A. (2011). Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba*

- histolytica. In *Future Microbiology* (Vol. 6, Issue 12). <https://doi.org/10.2217/fmb.11.120>
- Consortium, T. U. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Cornick, S., and Chadee, K. (2017). Entamoeba histolytica: Host parasite interactions at the colonic epithelium. In *Tissue Barriers* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283386>
- Cornick, S., Moreau, F., and Chadee, K. (2016). Entamoeba histolytica Cysteine Proteinase 5 Evokes Mucin Exocytosis from Colonic Goblet Cells via  $\alpha\beta3$  Integrin. *PLoS Pathogens*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005579>
- Cuellar, P., Hernández-Nava, E., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Betanzos, A., and Orozco, E. (2017). Entamoeba histolytica EhCP112 dislocates and degrades claudin-1 and claudin-2 at tight junctions of the intestinal epithelium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00372>
- Davidson, P. M., and Cadot, B. (2021). Actin on and around the Nucleus. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 31, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.11.009>
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of entamoeba histolytica and other entamoeba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4). [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90144-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90144-X)
- Dondelinger, Y., Delanghe, T., Priem, D., Wynosky-Dolfi, M. A., Sorobetea, D., Rojas-Rivera, D., Giansanti, P., Roelandt, R., Gropengiesser, J., Ruckdeschel, K., Savvides, S. N., Heck, A. J. R., Vandenabeele, P., Brodsky, I. E., and Bertrand, M. J. M. (2019). Serine 25 phosphorylation inhibits RIPK1 kinase-dependent cell death in models of infection and inflammation. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09690-0>
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R., and Une, T. (2000). Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *Journal of Cell Science*, 113(19). <https://doi.org/10.1242/jcs.113.19.3509>
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., and Orozco, E. (2022). EhVps23, an ESCRT-I Member, Is a Key Factor in Secretion, Motility, Phagocytosis and Tissue Invasion by Entamoeba histolytica. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.835654>
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Montaña, S., Ortega-Lopez, J., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., and Orozco,

- E. (2021). EhVps23: A Component of ESCRT-I That Participates in Vesicular Trafficking and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.770759>
- García, M. A., Gutiérrez-Kobeh, L., and Vancell, R. L. (2015). *Entamoeba histolytica*: Adhesins and lectins in the trophozoite surface. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/molecules20022802>
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., and Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*, 33(3), 556–568. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x>
- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., and Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*, 12(5). <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>
- Ghosh, A. S., Dutta, S., and Raha, S. (2010). Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 59(2). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.01.001>
- Ghosh, S., Padalia, J., and Moonah, S. (2019). Tissue Destruction Caused by *Entamoeba histolytica* Parasite: Cell Death, Inflammation, Invasion, and the Gut Microbiome. In *Current Clinical Microbiology Reports* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s40588-019-0113-6>
- Gilchrist, C. A., and Petri, W. A. (1999). Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 2, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80076-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80076-9)
- González-Vázquez, M. C., Carabarin-Lima, A., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P., and Rosales-Encina, J. L. (2012). Obtaining of three recombinant antigens of *Entamoeba histolytica* and evaluation of their immunogenic ability without adjuvant in a hamster model of immunoprotection. *Acta Tropica*, 122(2), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.12.007>
- Hamann, L., Buß, H., and Tannich, E. (1997). Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 84(1), 83–91. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02771-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02771-5)
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$ . *Cell*, 137(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>

- Hernández-Nava, E. (2017). *Mecanismo del daño a las uniones adherentes y a los desmosomas por el complejo EhCPADH de Entamoeba histolytica*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Hernández-Nava, E., Cuellar, P., Nava, P., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Orozco, E., and Betanzos, A. (2017). Adherens junctions and desmosomes are damaged by *Entamoeba histolytica*: Participation of EhCPADH complex and EhCP112 protease. *Cellular Microbiology*, 19(11). <https://doi.org/10.1111/cmi.12761>
- Hou, Y., Mortimer, L., and Chadee, K. (2010). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFκB-mediated pro-inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066035>
- Huttenlocher, A., Lakonishok, M., Kinder, M., Wu, S., Truong, T., Knudsen, K. A., and Horwitz, A. F. (1998). Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. *Journal of Cell Biology*, 141(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.515>
- Irmer, H., Tillack, M., Biller, L., Handal, G., Leippe, M., Roeder, T., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2009). Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Molecular Microbiology*, 72(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06672.x>
- Javier-Reyna, R., Montaña, S., García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., González-Robles, A., and Orozco, E. (2019). EhRabB mobilises the EhCPADH complex through the actin cytoskeleton during phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 21(10). <https://doi.org/10.1111/cmi.13071>
- Jiménez-Delgado, B., Chaudhuri, P. P., Baylón-Pacheco, L., López-Monteon, A., Talamás-Rohana, P., and Rosales-Encina, J. L. (2004). *Entamoeba histolytica*: cDNAs cloned as 30 kDa collagen-binding proteins (CBP) belong to an antioxidant molecule family. Protection of hamsters from amoebic liver abscess by immunization with recombinant CBP. *Experimental Parasitology*, 108(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.06.007>
- Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., and Ochner, C. (2018). *Entamoeba Histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. In *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/4601420>

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259). <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lejeune, M., Moreau, F., and Chadee, K. (2011). Prostaglandin E2 produced by entamoeba histolytica signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *American Journal of Pathology*, 179(2). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.001>
- López-Reyes, I., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Herranz, S., Vincent, O., López-Camarillo, C., Marchat, L. A., and Orozco, E. (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in Entamoeba histolytica and Characterization of the EhVps4 Protein. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 890674. <https://doi.org/10.1155/2010/890674>
- Mahon, C., and Manuselis, G. (2000). *Textbook of diagnostic microbiology*. Saunders.
- Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., and Guillén, N. (2018). Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in Entamoeba histolytica. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00179>
- Martínez, M. B., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., Hernández-Pando, R., Aguilar, D., and Orozco, E. (2009). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against Entamoeba histolytica elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine*, 27(31). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.051>
- Martínez-López, C., Orozco, E., Sánchez, T., García-Pérez, R. M., Hernández-Hernández, F., and Rodríguez, M. A. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by Entamoeba histolytica trophozoites. *Cellular Microbiology*, 6(4). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00363.x>
- Meza, I., Sabanero, M., Cazares, F., and Bryan, J. (1983). Isolation and characterization of actin from Entamoeba histolytica. *Journal of Biological Chemistry*, 258(6). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)32757-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)32757-1)
- Mi-ichi, F., Yoshida, H., and Hamano, S. (2016). Entamoeba Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. In *PLoS Pathogens* (Vol. 12, Issue 10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005845>
- Montaño, S., Orozco, E., Correa-Basurto, J., Bello, M., Chávez-Munguía, B., and Betanzos, A. (2017). Heterodimerization of the Entamoeba histolytica EhCPADH virulence complex through molecular dynamics and protein–protein docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(3), 486–503. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1151831>

- Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Rojas-Velázquez, L., González, E., Pérez-Juárez, H., Hernández, E. G., Padilla, M. de los A., Zaragoza, M. E., Portillo-Bobadilla, T., Ramiro, M., and Ximénez, C. (2023). Amoebiasis: Advances in Diagnosis, Treatment, Immunology Features and the Interaction with the Intestinal Ecosystem. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 14). <https://doi.org/10.3390/ijms241411755>
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11). <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0283>
- Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-López, J., García-Pérez, R. M., Sánchez, T., Castillo-Juárez, B. A., García-Rivera, G., and Rodríguez, M. A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology*, 7(2). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00453.x>
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Linford, A. S., Yoshino, T. P., Orozco, E., and Rodríguez, M. A. (2015). The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence. *Parasitology*, 143(1). <https://doi.org/10.1017/S003118201500147X>
- Odorizzi, G. (2006). The multiple personalities of Alix. *Journal of Cell Science*, 119(15), 3025–3032. <https://doi.org/10.1242/jcs.03072>
- Odorizzi, G., Katzmann, D. J., Babst, M., Audhya, A., and Emr, S. D. (2003). Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 116(10). <https://doi.org/10.1242/jcs.00395>
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., and Sánchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*: Phagocytosis as a virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*, 158(5). <https://doi.org/10.1084/jem.158.5.1511>
- Pertuz Belloso, S., Ostoa Saloma, P., Benitez, I., Soldevila, G., Olivos, A., and García-Zepeda, E. (2004). *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunology*, 26(5). <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00706.x>
- Pineda, E., Encalada, R., Olivos-García, A., Néquiz, M., Moreno-Sánchez, R., and Saavedra, E. (2013). The bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase controls ethanol and acetate production in *Entamoeba*

- histolytica under aerobic conditions. *FEBS Letters*, 587(2).  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.11.020>
- Pollard, T. D. (2016). Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>
- Que, X., and Reed, S. L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 13, Issue 2).  
<https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.196-206.2000>
- Quintas-Granados, L. I., Orozco, E., Brieba, L. G., Arroyo, R., and Ortega-López, J. (2009). Purification, refolding and autoactivation of the recombinant cysteine proteinase EhCP112 from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*, 63(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.09.006>
- Ralston, K. S., and Petri, W. A. (2011a). The ways of a killer: How does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? *Essays in Biochemistry*, 51(1).  
<https://doi.org/10.1042/BSE0510193>
- Ralston, K. S., and Petri, W. A. (2011b). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. In *Trends in Parasitology* (Vol. 27, Issue 6, pp. 254–263). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.02.006>
- Ralston, K. S., Solga, M. D., MacKey-Lawrence, N. M., Somlata, Bhattacharya, A., and Petri, W. A. (2014). Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature*, 508(7497).  
<https://doi.org/10.1038/nature13242>
- Ramakrishnan, G., Gilchrist, C. A., Musa, H., Torok, M. S., Grant, P. A., Mann, B. J., and Petri, W. A. (2004). Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138(2).  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.09.002>
- Ramos, E., Olivos-García, A., Nequiz, M., Saavedra, E., Tello, E., Saralegui, A., Montfort, I., and Pérez Tamayo, R. (2007). *Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. *Experimental Parasitology*, 116(3). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.011>
- Rath, P. P., and Gourinath, S. (2020). The actin cytoskeleton orchestra in *Entamoeba histolytica*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 88(10). <https://doi.org/10.1002/prot.25955>
- Ravdin, J. I. (1989). *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *Journal of Infectious Diseases*, 159(3).  
<https://doi.org/10.1093/infdis/159.3.420>
- Rodríguez, M. A., García-Pérez, R. M., Mendoza, L., Sánchez, T., Guillen, N., and Orozco, E. (1998). The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in

- Entamoeba. *Microbial Pathogenesis*, 25(1).  
<https://doi.org/10.1006/mpat.1998.0202>
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4). <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Royle, S. J., Bright, N. A., and Lagnado, L. (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature*, 434(7037). <https://doi.org/10.1038/nature03502>
- Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005). The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*, 110(3 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.02.021>
- Saito-Nakano, Y., Wahyuni, R., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., and Nozaki, T. (2021). Rab7D small GTPase is involved in phago-, trogocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1111/cmi.13267>
- Sánchez, M. A., Peattie, D. A., Wirth, D., and Orozco, E. (1994). Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica*  $\alpha$ -tubulin-encoding gene. *Gene*, 146(2). [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90299-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90299-2)
- Saqi, M. A. S., and Sayle, R. (1989). Pdbmotif-a tool for the automatic identification and display of motifs in protein structures. In *Carcinogenesis* (Vol. 10, Issue 5).
- Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., and De La Garza, M. (2013). Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. In *Journal of Tropical Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2013/890603>
- Shirley, D. A. T., Farr, L., Watanabe, K., and Moonah, S. (2018). A review of the global burden, new diagnostics, and current Therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>
- Showler, A. J., and Boggild, A. K. (2013). *Entamoeba histolytica*. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne*, 185(12), 1064. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121576>
- Stanley, S. J. (2003). Amoebiasis. *Lancet*, 361(9362), 1025–1034.
- Tavares, P., Sansonetti, P., and Guillen, N. (2000). The interplay between receptor capping and cytoskeleton remodeling in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, 31(4 SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(00\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(00)00133-8)
- Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: Primary

- structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-170>
- Vanegas-Villa, S. C., Torres-Cifuentes, D. M., Baylon-Pacheco, L., Espíritu-Gordillo, P., Durán-Díaz, Á., Rosales-Encina, J. L., and Omaña-Molina, M. (2022). External pH Variations Modify Proliferation, Erythrophagocytosis, Cytoskeleton Remodeling, and Cell Morphology of *Entamoeba histolytica* Trophozoites. *Protist*, 173(2). <https://doi.org/10.1016/j.protis.2022.125857>
- Verma, K., Srivastava, V. K., and Datta, S. (2020). Rab GTPases take centre stage in understanding *Entamoeba histolytica* biology. In *Small GTPases* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>
- Volksdorf, T., Heilmann, J., Eming, S. A., Schawjinski, K., Zorn-Kruppa, M., Ueck, C., Vidal-y-Sy, S., Windhorst, S., Jücker, M., Moll, I., and Brandner, J. M. (2017). Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. *American Journal of Pathology*, 187(6). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.02.006>
- Welter, B. H., Laughlin, R. C., and Temesvari, L. A. (2002). Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: A marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(2). [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00047-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00047-6)
- Wilson, I. W., Weedall, G. D., and Hall, N. (2012). Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: What have we learned from their genomes? In *Parasite Immunology* (Vol. 34, Issues 2–3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01325.x>
- Xie, T., Peng, W., Liu, Y., Yan, C., Maki, J., Degterev, A., Yuan, J., and Shi, Y. (2013). Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure*, 21(3). <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.01.016>
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., and Gómez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008>