

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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Participación de EhVps35 en el reciclaje de proteínas y
su relevancia en la virulencia de *Entamoeba histolytica*”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Joselin Díaz Valdez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directoras de la tesis

**Dra. María Esther Orozco Orozco
Dra. Cecilia Bañuelos Barrón**

Ciudad de México

Enero, 2025

Este trabajo se realizó con el apoyo del extinto Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) con el número de CVU 780779. En el laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), bajo la dirección de la Dra María Esther Orozco Orozco.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco por su asesoría y apoyo para realizar este proyecto.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Cecilia Bañuelos y a mis asesores, la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, Dr. Fidel de la Cruz Hernández, Dr. Jaime Ortega López y Dr. Juan Ernesto Ludert León, por su disposición y observaciones que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Ausencio Galindo por su colaboración en la purificación y procesamiento de las vesículas extracelulares de trofozoítos. Además, agradezco su asesoría en el cultivo celular de *E. histolytica* y ayuda para la realización del análisis GO presentado en este trabajo.

A la Unidad de Producción y Experimentación de Animales (UPEAL) del Cinvestav-IPN, en especial al M.V.Z. Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez, por su ayuda en el manejo, inoculación y procesos quirúrgicos realizados en los modelos animales utilizados a lo largo de esta investigación.

Al laboratorio 1 de Biología Celular de la Dra. Martha Espinosa Castellano del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, en especial a la Bióloga Lizbeth Salazar Villatoro, por el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras y manejo del microscopio electrónico de transmisión.

A la Unidad de Microscopía Electrónica, LaNSE del Cinvestav-IPN, en especial al Dr. Daniel Talamás Lara por su apoyo en el procesamiento de las muestras y manejo del microscopio electrónico de transmisión.

A la Unidad de Microscopía Confocal, LaNSE del Cinvestav-IPN , en especial al M. en C. Iván J. Galván Mendoza, por su disposición y asesoría en el manejo del microscopio confocal Leica TCS-SPE DMI4000 1st Gen.

A la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, LaNSE del Cinvestav Unidad Zacatenco a cargo del M. en C. Emmanuel Ríos Castro, en especial a la I. Q. I. Nataly R. Buendía, por su colaboración para el análisis por espectrometría de masas de las proteínas en interacción con EhVps35.

A la Dra. Rosario Javier Reyna, por su asesoría en la técnica de microscopía confocal, así como disposición y observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Maricela Sarita Montaña Valdez, por su colaboración y trabajo para la obtención de los modelos de acoplamiento molecular.

Al Dr. Jaime Ortega López y a su personal de laboratorio, en especial a Octavio Montes Flores, por su tutoría y ayuda para la inducción y purificación de la proteína recombinante EhVps35-N.

A mis compañeros y personal del laboratorio de la Dra. Esther Orozco Orozco, han sido una parte importante en este trabajo. Así como, a los laboratorios a cargo del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, el Dr. Luis Marat Alvarez Salas y el Dr. José Efraín Garrido Guerrero, por su amabilidad al prestarme equipo e instalaciones, muchas gracias, su ayuda fue clave para la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

A ustedes, Mamá, Gus, Brunito, Rex y Ausen, por ser mi inspiración para seguir adelante. Especialmente, tú, mi pequeño, que estuviste acompañándome en cada paso de este trabajo, gracias por ser mi arcoíris aún en los días más complicados.

A mi abuelita y Bilma, donde quiera que estén.

ABSTRACT

The retromer is a highly conserved eukaryotic complex formed by Vps26, Vps29, Vps35 and the SNX-BAR dimer. Its function is protein recycling from the endosomes to the trans-Golgi network or the plasma membrane. In this work, we studied, the *Entamoeba histolytica* Vps35 protein (EhVps35) role in the recycling of proteins associated to the plasma membrane, and the relation of EhVps35 with phagocytosis, migration, secretion and tissue invasion; as well as the relationship of EhVps35 with the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery and adhesion process. Confocal microscopy assays revealed that EhVps35 is located in the plasmatic and endosomal membranes. During phagocytosis assays, EhVps35 follows the target cell from the moment it is in contact with the trophozoites, in phagocytic cups and channels, phagosomes and multivesicular bodies (MVBs). Molecular docking analyses, immunoprecipitation assays, and microscopy studies revealed that EhVps35 interacts with the EhTom1 (ESCRT-0), EhVps23 (ESCRT-I), EhVps32 (ESCRT-III), EhADH (ESCRT accessory proteins), Gal/GalNac lectin, and actin, proteins. Mass spectrometry analysis revealed that EhVps35 interacts with at least 300 proteins that participate in vesicle trafficking, secretion, migration and phagocytosis. *Knock-down* of the *Ehvps35* gene induced a decrease in protein recycling, as well as impairments in the efficiency of adhesion and the rate of phagocytosis, as well disorganization of the actin cytoskeleton, decreased the migration and tissue invasion. EhVps35 is involved in the recycling of EhADH and Gal/GalNac, two molecules highly involved in virulence. The ESCRT complex selects ubiquitinated proteins for sorting into MVBs, and it is involved in protozoan parasite virulence mechanisms. Laser confocal and transmission electron microscopy images, as well as secretion assays revealed that EhVps35 is secreted in vesicles together with EhVps23 and EhADH. This interaction was confirmed by molecular docking analysis, evidencing the association between these complexes. *Knock-down* of the *Ehvps35* gene impacts the cellular localization of ubiquitin, EhVps23 (ESCRT-I) and EhVps32 (ESCRT-III) proteins; and decrease MVBs formation. Our results taken together strongly suggest that EhVps35 is a key factor in *E. histolytica* virulence mechanisms, due to its interaction with ESCRT and other regulatory proteins involved in vesicle trafficking, secretion, migration, cell proliferation and tissue damage.

RESUMEN

El retrómero es un complejo eucariota altamente conservado formado por Vps26, Vps29, Vps35 y un dímero SNX-BAR. Su función es el reciclaje de proteínas desde los endosomas a la red trans-Golgi o la membrana plasmática. En este trabajo, se estudió el papel de la proteína EhVps35 en el reciclaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática y su impacto en mecanismos de virulencia de *Entamoeba histolytica*; así como la relación de EhVps35 con la maquinaria ESCRT (por sus siglas en inglés *endosomal sorting complex required for transport*) y el proceso de adhesión. Los ensayos de microscopía confocal revelaron que EhVps35 se encuentra en las membranas plasmática y endosómica; mientras que, durante la fagocitosis, se localizó en los sitios de contacto con los eritrocitos, copas y canales fagocíticos, fagosomas y MVBs (por sus siglas en inglés *multivesicular bodies*). El análisis de espectrometría de masas reveló que EhVps35 interactúa con al menos 300 proteínas que participan en el tráfico vesicular, secreción, migración y fagocitosis. Los análisis de acoplamiento molecular, inmunoprecipitación y microscopía revelaron que EhVps35 interactúa con las proteínas EhTom1 (ESCRT-0), EhVps23 (ESCRT-I), EhVps32 (ESCRT-III), EhADH (proteína accesoria de ESCRT), lectina Gal/GalNac y actina. El *knock-down* del gen *Ehvps35* indujo una disminución en el reciclaje de proteínas, así como una reducción en la tasa de adhesión y fagocitosis, la desorganización del citoesqueleto de actina, la disminuyó en la migración e invasión tisular. EhVps35 está involucrada en el reciclaje de EhADH y Gal/GalNac, dos moléculas altamente involucradas en la virulencia. Además, en este trabajo, se estudió la relación entre el retrómero y la maquinaria ESCRT. El complejo ESCRT, selecciona proteínas ubiquitinadas para su clasificación en cuerpos multivesiculares (MVBs). Imágenes de microscopía electrónica de transmisión y confocal, así como ensayos de secreción, revelaron que EhVps35 se secreta en vesículas junto con EhVps23 y EhADH. El *knock-down* del gen *Ehvps35* impactó la localización celular de las proteínas ubiquitina, EhVps23 (ESCRT-I) y EhVps32 (ESCRT-III); y disminuyó la formación de MVBs. Nuestros resultados en conjunto sugieren que EhVps35 es un factor clave en los mecanismos de virulencia de *E. histolytica*, debido a su interacción con ESCRT y otras proteínas involucradas en el tráfico de vesículas, la secreción, la migración, la proliferación celular y el daño tisular.

INDICE

ABSTRACT.....	V
RESUMEN.....	VI
INDICE.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE TABLAS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tráfico vesicular en eucariontes.....	1
1.1.1 La vía secretora.....	3
1.1.2 Vía endocítica.....	4
1.1.3 El retrómero.....	8
1.1.3.1 Mecanismo de reciclaje del retrómero.....	13
1.1.3.2 Blancos del reciclaje mediados por el retrómero.....	17
1.1.3.3 El papel del retrómero en parásitos.....	21
1.2 Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i>	22
1.2.1 La amebiasis.....	23
1.2.2 Mecanismos de virulencia de <i>E. histolytica</i>	24
1.2.3 Tráfico vesicular en <i>E. histolytica</i>	25
1.2.4 El retrómero en <i>E. histolytica</i>	29
2. JUSTIFICACIÓN.....	39
3. HIPÓTESIS.....	40
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos particulares.....	40
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
6.1 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	42
6.2 Viabilidad celular.....	42
6.3 Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	42
6.3 Ensayos de <i>western blot</i>	43
6.4 Clonaciones de los fragmento <i>Ehvps35</i> _(1-445 pb) , <i>Ehvps35</i> _(1-1428pb) , <i>Ehvps35</i> _(1429-2274 pb) y el gen <i>Ehvps35</i>	44
6.4.1 Producción de cDNA de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	44
6.4.2 Diseño de <i>primers</i>	45
6.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45

6.4.4 Clonación de los fragmentos <i>Ehvps35</i> ₍₁₋₄₅₄₎ , <i>Ehvps35</i> ₍₄₋₁₅₁₂₎ , <i>Ehvps35</i> _(1429-2274 pb) y el gen <i>Ehvps35</i> ₍₄₋₂₂₇₄₎ de <i>E. histolytica</i> en el vector <i>pJET1.2/blunt</i>	48
6.4.5 Producción de bacterias <i>E. coli</i> competentes	48
6.4.6 Transformación de bacterias competentes	49
6.4.7 Purificación de vectores a partir de bacterias <i>E. coli</i> de la cepa DH5 α	49
6.4.8 Ensayo de restricción enzimática de los vectores <i>pJET1.2/Ehvps35_S</i> , <i>pJET1.2/Ehvps35-ha</i> , <i>pJET1.2/Ehvps35_1-ha</i> y <i>pJET1.2/Ehvps35_250</i>	49
6.4.9 Ligación de los fragmento <i>Ehvps35</i> _(1-454 pb) , <i>Ehvps35</i> _(1429-2274 pb) , <i>Ehvps35</i> _(4-1512 pb) y el gen <i>Ehvps35</i> _(4-2274 pb) a los vectores de expresión <i>pL4440</i> , <i>pColdI</i> o <i>pNeo</i>	50
6.4.10 Secuenciación de los vectores de expresión	51
6.5 Inducción y purificación de las proteínas recombinantes EhVps35-N y EhVps35-C	53
6.5.1 Estandarización de la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes EhVps35-N y EhVps35-C	53
6.5.2 Inducción de la expresión de la proteína rEhVps35-N	54
6.5.3 Lisis y fraccionamiento celular de bacterias <i>E. coli</i> BL21(DE3) inducidas para la expresión de la proteína rEhVps35-N	54
6.5.4 Purificación de la proteína rEhVps35-N	56
6.6 Producción de anticuerpos policlonales α -EhVps35	57
6.7 Sobreexpresión de la proteína EhVps35-N y EhVps35 en <i>E. histolytica</i> ...	57
6.8 <i>Knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	58
6.8.1 Producción y purificación de RNAs de doble cadena específicos para el gen <i>Ehvps35</i>	58
6.8.2 Suministro de RNAs de doble cadena específicos para producir <i>knock-</i> <i>down</i> del gen <i>Ehvps35</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	60
6.8.3 Verificación del <i>knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> a nivel de proteína	60
6.9 Determinación de la función de EhVps35	60
6.9.1 Inmunoprecipitación	60
6.9.2 Análisis de espectrometría de masas LC-ESI-HDMSE	61
6.9.3 Obtención de un modelo tridimensional de EhVps35 y EhTom1	62
6.9.3 Ensayos de acoplamiento molecular <i>in silico</i>	63
6.9.4 Obtención de eritrocitos humanos	63
6.9.5 Cuantificación de la eritrofagocitosis	64
6.9.6 Cuantificación de la adhesión	64
6.9.7 Ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza analizados por <i>western</i> <i>blot</i>	64
6.9.8 Ensayos de eritrofagocitosis para inmunofluorescencia	65
6.9.9 Ensayos de inmunofluorescencia	66
6.9.10 Microscopía electrónica de transmisión	66
6.9.11 Ensayo de sensibilidad a la cicloheximida	67
6.9.12 Ensayo de reciclaje de proteínas de la membrana plasmática en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	67
6.9.13 Ensayos de secreción	68
6.9.14 Purificación de vesículas secretadas	69

6.9.15 Ensayo de migración	69
6.9.16 Amebiasis experimental.....	69
6.10 Análisis estadísticos	70
6.11 Manejo ético de los animales.....	70
7. RESULTADOS	71
7.1 Inducción de la proteína rEhVps35-C	71
7.1.1 Clonaciones del fragmento <i>Ehvps35</i> _(1429-2274 pb) en el vector <i>pColdI</i>	71
7.1.2 Inducción de la proteína rEhVps35-C	74
7.2 Purificación de la proteína rEhVps35-N.....	80
7.2.1 Inducción de rEhVps35-N en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21 (DE3) y SoluBL21 (DE3).....	80
7.2.2 Purificación de rEhVps35-N en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21(DE3)	84
7.3 Producción de anticuerpos α -EhVps35.....	88
7.4 Disminución de EhVps35 en trofozoítos estimulados con eritrocitos.....	92
7.5 El estímulo de trofozoítos con eritrocitos produce la relocalización de la proteína EhVps35	94
7.6 EhVps35 interacciona con múltiples proteínas asociadas al tráfico vesicular, secreción, motilidad, fagocitosis y citoesqueleto de actina .	99
7.7 EhVps35 se secreta en vesículas extracelulares.....	105
7.8 EhVps35 co-localizó con EhVps23 y EhADH durante la fagocitosis.....	110
7.9 EhVps35 interacciona con EhTom1, EhVps23, EhVps32, EhADH, la subunidad pesada de Gal/GalNac y actina	117
7.10 Estandarización de la sobreexpresión de EhVps35 en trofozoítos	126
7.10.1 Clonación del gen <i>Ehvps35</i> en el vector <i>pNeo</i>	126
7.10.2 Clonación del fragmento <i>Ehvps35_1-ha</i> en el vector <i>pNeo</i>	129
7.10.3 Transfección de trofozoítos con las construcciones <i>pNeo/Ehvps35-ha</i> y <i>pNeo/Ehvps35_1-ha</i>	132
7.11 Estandarización del <i>knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> en trofozoítos	132
7.11.1 Clonación del fragmento <i>Ehvps35</i> _(1-438 pb) en el vector <i>pL4440</i>	132
7.11.2 La administración de dsRNA- <i>Ehvps35</i> redujo la expresión de la proteína EhVps35 en trofozoítos.....	135
7.12 EhVps35 participa en el reciclaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática	140
7.13 Los trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i> tienen mayor sensibilidad a la cicloheximida	142
7.14 EhVps35 participa en el reciclaje de las proteínas EhADH y la subunidad pesada de Gal/GalNac	144
7.15 En trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i> , EhADH se localizó principalmente en vesículas ácidas.....	148

7.16	En los trofozoítos <i>Ehvps35</i> -KD disminuyó la capacidad de fagocitosis	152
7.17	Trofozoítos <i>Ehvps35</i> -KD presentan desestructuración de la F-actina .	155
7.18	Trofozoítos <i>Ehvps35</i> -KD presentan una reducción en su capacidad de migración y formación del absceso hepático amebiano.....	158
7.19	El <i>knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> alteró la localización de EhVps23 y EhVps32	161
8.	DISCUSIÓN	167
9.	CONCLUSIONES.....	175
10.	PERSPECTIVAS.....	176
11.	ANEXOS	177
11.1	Mapa de los vectores <i>pJET1.2/Ehvps35</i> _(1-1428 pb) y <i>pColdI/EhVps35</i> _(1-1428 pb)	177
11.2	Mapa de los vectores <i>pJET1.2/Ehvps35_2</i> y <i>pColdI/Ehvps35_2</i>	178
11.3	Mapa de los vectores <i>pJET1.2/Ehvps35_S</i> y <i>pL4440/Ehvps35_S</i>	179
11.4	Mapa de los vectores <i>pJET1.2/Ehvps35-ha</i> y <i>pNeo/EhVps35-ha</i>	180
11.5	Mapa de los vectores <i>pJET1.2/Ehvps35_1-ha</i> y <i>pNeo/EhVps35_1-ha</i>	181
11.6	Proteínas que interaccionan con EhVps35	182
12.	PUBLICACIONES	190
13.	BIBLIOGRAFÍA	225

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tráfico vesicular en células eucariontes.	2
Figura 2.	El reciclaje de proteínas mediado por el retrómero.....	7
Figura 3.	Comparación de los complejos proteicos considerados genéricamente como el retrómero.	10
Figura 4.	Dominios y mapa de las interacciones de los componentes del complejo retrómero.	12
Figura 5.	Modelo del reciclaje de proteínas mediado por el retrómero.	16
Figura 6.	Compartimientos intracelulares de <i>E. histolytica</i>	27
Figura 7.	Mapa de las interacciones de las proteínas EhVps26, EhVps29, EhVps35 y EhRab7A.	31
Figura 8.	Representación comparativa entre el retrómero canónico de humano y levadura con el modelo del retrómero en <i>E. histolytica</i>	33
Figura 9.	Actividad de las cisteína proteasas en relación con la sobreexpresión de EhVps26, así como la localización de EhVps26, EhVps29 y EhSNX1.	35
Figura 10.	Reconocimiento del suero inmune α -EhVps35.....	37
Figura 11.	Expresión y localización de la proteína EhVps35 en ensayos de eritrofagocitosis.....	38
Figura 12.	Estrategia experimental.	41
Figura 13.	Clonaciones del fragmento <i>Ehvps35</i> _(1429-2274 pb) en el vector <i>pColdI</i>	73
Figura 14.	Identificación de codones raros para <i>E. coli</i> en la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína rEhVps35-C.....	75
Figura 15.	PCR- <i>colony</i> de las bacterias <i>E. coli</i> transformadas con la construcción <i>pColdI/Ehvps35_2</i>	76
Figura 16.	Inducción de la proteína rEhVps35-C en bacterias <i>E. coli</i> de las cepas BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rosetta (DE3).....	78
Figura 17.	Cinética de la inducción de EhVps35 en bacterias <i>E. coli</i> de las cepas BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rosetta (DE3).....	79
Figura 18.	Comparación de la inducción de la proteína rEhVps35-N en bacterias <i>E. coli</i> de las cepas BL21(DE3) y SoluBL21(DE3).....	81
Figura 19.	Cinética de la inducción de la proteína rEhVps35-N en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21(DE3).	82
Figura 20.	Comparación de la inducción de rEhVps35 en bacterias <i>E. coli</i> BL21(DE3) en dos medios: medio de autoinducción y medio LB con IPTG.	83

Figura 21.	Fraccionamiento celular de biomasa obtenida de la inducción de rEhVps35-N en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21 (DE3) en el biorreactor New Brunswick BioFlo/CelliGen 115.....	85
Figura 22.	Purificación de rEhVps35-N utilizando las columnas HisTrap FF. .	87
Figura 23.	Reconocimiento del anticuerpo α -EhVps35 en ensayos de <i>western blot</i>	89
Figura 24.	Reconocimiento del anticuerpo α - EhVps35 en ensayos de microscopía confocal.....	91
Figura 25.	Expresión relativa de EhVps35 durant cinéticas de eritrofagocitosis.	93
Figura 26.	Localización de EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis por pulso y caza.....	95
Figura 27.	Imágenes de microscopía electrónica que muestran la localización de EhVps35 en trofozoítos de condiciones basales.....	97
Figura 28.	Imágenes de microscopía electrónica que muestran la localización de EhVps35 en trofozoítos estimulados con eritrocitos.	98
Figura 29.	Clasificación obtenida en Panther Server de las proteínas que interaccionan con EhVps35.	100
Figura 30.	Análisis GO de las proteínas que interaccionan con EhVps35. ...	102
Figura 31.	Proteínas que interaccionan con EhVps35 asociadas a fagocitosis, secreción, movilidad y citoesqueleto de actina.	104
Figura 32.	Las proteínas EhVps35 y EhVps23 se secretan en trofozoítos en condiciones basales y estimulados con eritrocitos.....	106
Figura 33.	EhVps35 se localizó en MVBs en trofozoítos en condiciones basales.	108
Figura 34.	EhVps35 se secreta en vesículas extracelulares.....	109
Figura 35.	Co-localización de EhVps35 y EhVps23 durante la eritrofagocitosis.	112
Figura 36.	Co-localización de EhADH y EhVps23 durante la eritrofagocitosis.	115
Figura 37.	Co-localización entre EhVps35/EhVps23 y EhVps35/EhADH en MVBs.	116
Figura 38.	Ensayo de inmunoprecipitación utilizando α -EhVps35 analizado por <i>western blot</i>	118
Figura 39.	Simulación de la dinámica molecular del modelo 3D de EhVps35.	120
Figura 40.	Simulación de la dinámica molecular del modelo 3D de EhTom1.	121

Figura 41.	Acoplamiento molecular de EhVps35-EhTom1, EhVps35-EhVps23, EhVps35-EhVps32 y EhVps35-EhADH.	124
Figura 42.	Esquema representativo de EhTom1, EhVps23, EhVps32, EhADH y EhVps35 con sus respectivos dominios y las regiones de interacción con otras proteínas.	125
Figura 43.	Clonación del gen <i>Ehvps35</i> en el vector <i>pNeo</i>	128
Figura 44.	Clonación del fragmento <i>Ehvps35_1-ha</i> en el vector <i>pNeo</i>	131
Figura 45.	Clonación del fragmento <i>Ehvps35_S</i> en el vector <i>pL4440</i>	134
Figura 46.	Purificación y administración de dsRNA- <i>Ehvps35</i> a trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	136
Figura 47.	Cinética del <i>knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	138
Figura 48.	Análisis del <i>knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> en trofozoítos.	139
Figura 49.	Reducción del reciclaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática en trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i>	141
Figura 50.	Reducción de la viabilidad en trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i> tratados con cicloheximida.	143
Figura 51.	EhVps35 recicla a EhADH y Hgl Gal/GalNac.	145
Figura 52.	Ensayo de reciclaje de EhADH y Gal/GalNac analizados por <i>western blot</i>	147
Figura 53.	Reciclaje de EhADH durante la fagocitosis.	151
Figura 54.	Reducción de la tasa de adhesión y fagocitosis en trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i>	154
Figura 55.	Desestructuración del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis en trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i>	157
Figura 56.	Los trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i> presentan reducción en la motilidad.	159
Figura 57.	El <i>knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> produjo la reducción en la virulencia <i>in vivo</i>	160
Figura 58.	Trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i> presentan alteraciones en la localización celular de EhVps23 y EhUb.	163
Figura 59.	Trofozoítos <i>Ehvps35-KD</i> presentan alteraciones en la localización celular de EhVps32.	166
Figura 60.	Modelo de la participación de EhVps35 en <i>E. histolytica</i>	174

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias reconocidas en las proteínas blanco de reciclaje por el retrómero.	18
Tabla 2.	Procesos celulares en los que participan las proteínas blanco del retrómero.	20
Tabla 3.	Comparación de las características de las proteínas que integran el retrómero en <i>E. histolytica</i> , <i>H. sapiens</i> y <i>S. cerevisiae</i>	30
Tabla 4.	<i>Primers</i> diseñados para la amplificación de fragmentos del gen <i>Ehvps35</i>	47
Tabla 5.	<i>Primers</i> utilizados para la secuenciación de los vectores <i>pColdI/Ehvps35_2</i> , <i>pL4440/Ehvps35_S</i> , <i>pNeo/Ehvps35</i> y <i>pNeo/Ehvps35_1</i>	52
Tabla 6.	Proteínas que interaccionan con EhVps35 agrupadas por asociación a la fagocitosis*, secreción **, motilidad*** y citoesqueleto de actina****.	182

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
aa	Aminoácido.
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , por sus siglas en inglés).
cDNA	.DNA complementario (<i>Complementary DNA</i> , por sus siglas en inglés).
CHX.....	Cicloheximida.
CRC	Complejo de reconocimiento de carga (<i>Cargo Recognition Complex</i> , por sus siglas en inglés).
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato.
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i> , por sus siglas en inglés).
dsRNA.....	RNA de doble cadena (double-stranded RNA, por sus siglas en inglés).
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i> .
<i>Ehvps35</i>	Gen <i>Ehvps35</i> .
EhVps35	Proteína EhVps35.
<i>Ehvps35-KD</i>	<i>Knock-down</i> del gen <i>Ehvps35</i> .
ESCRT	Complejo Endosomal Requerido para el Transporte (<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i> , por sus siglas en inglés).
g	Gramos.
Gal/GalNac	Galactosa y N-acetil-D-galactosamina.
Hs.....	<i>Homo sapiens</i> .
IPTG	Isopropil-β-D-1-tio-galactósido.
kDa	Kilodaltones.
LB	Medio Luria-Bertani.
M	Concentración molar.
M6PR	Receptor de manosa-6-fosfato (<i>Mannose-6-Phosphate Receptor</i> , por sus siglas en inglés).
min	Minutos.
ml	Mililitros.
mM	Micromolar.
mRNA	RNA mensajero (<i>Messenger RNA</i> , por sus siglas en inglés).
MVBs	.Cuerpos multivesiculares (<i>Multivesicular Bodies</i> , por sus siglas en inglés).
ng	Nanogramos.
nm	Nanómetros.

pb	Pares de bases.
PBS	Buffer de fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i> , por sus siglas en inglés).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i> , por sus siglas en inglés).
PX	Dominio Phox.
Rg.....	Radio de giro (<i>radius of gyration</i> , por sus siglas en inglés).
RMSD.....	Desviación cuadrática media (<i>root mean square deviation</i> , por sus siglas en inglés).
RMSF.....	Fluctuación cuadrática media (<i>root mean square fluctuation</i> , por sus siglas en inglés).
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i> , por sus siglas en inglés).
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-qPCR	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (<i>Quantitative reverse transcription PCR</i> , por sus siglas en inglés).
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , por sus siglas en inglés).
SNX	Nexinas de clasificación (<i>Sorting Nexins</i> , por sus siglas en inglés)
SNX-BAR	Nexina de clasificación con un dominio BAR (<i>Sorting Nexins with BAR domain</i> , por sus siglas en inglés).
TAE	Tris-Acetato-EDTA.
Vps	Proteínas de clasificación vacuolar (<i>Vacuolar Protein Sorting</i> , por sus siglas en inglés).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tráfico vesicular en eucariontes

El tráfico vesicular es el proceso que media el transporte y la clasificación de moléculas para su degradación o reciclaje. Dicho proceso, toma su nombre del transporte de estructuras circulares delimitadas por una doble membrana, denominadas vesículas (Sorkin and Von Zastrow, 2002; Alberts et al., 2016; Brodin and Shupliakov, 2018).

El tráfico vesicular se puede explicar de forma simplificada en dos categorías, la vía secretora y la vía endocítica. La vía secretora es el movimiento de vesículas formadas a partir de un tipo de membrana intracelular (membranas de los organelos celulares) con un tráfico en dirección hacia el exterior de la célula (exocitosis) o hacia los organelos (Figura 1, flecha verde) (Sorkin and Von Zastrow, 2002; Vassilieva and Nusrat, 2008). En cambio, la vía endocítica o endocitosis es el movimiento de vesículas formadas de la membrana plasmática en dirección a algún destino que se ubica dentro de la célula (Figura 1, flecha roja) (Sorkin and Von Zastrow, 2002; Vassilieva and Nusrat, 2008).

La vía endocítica y la vía secretora son eventos celulares que involucran procesos de fusión y fisión de las membranas plasmática e intracelulares, lo cual, modifica la composición y el área superficial de las mismas (Gundelfinger et al., 2003; Alberts et al., 2016). Ambos tipos de membranas son bicapas lipídicas compuestas por una variedad de lípidos y proteínas, los cuales se distribuyen heterogéneamente formando dominios en las membranas (Edidin, 2003). La presencia de proteínas en las membranas es esencial para: la internalización o secreción de iones (sodio, potasio, calcio, cloro, etc.) y/o moléculas (azúcares, aminoácidos, ADP, ATP, etc.), mediante proteínas que forman poros o canales en la membrana; la señalización intra y extracelular, con proteínas que actúan como receptores de un ligando; y el transporte de moléculas hacia organelos o hacia la membrana plasmática, mediante proteínas adaptadoras, es decir, proteínas que son un puente o plataforma para la interacción con otras proteínas (Gundelfinger et al., 2003; Alberts et al., 2016).

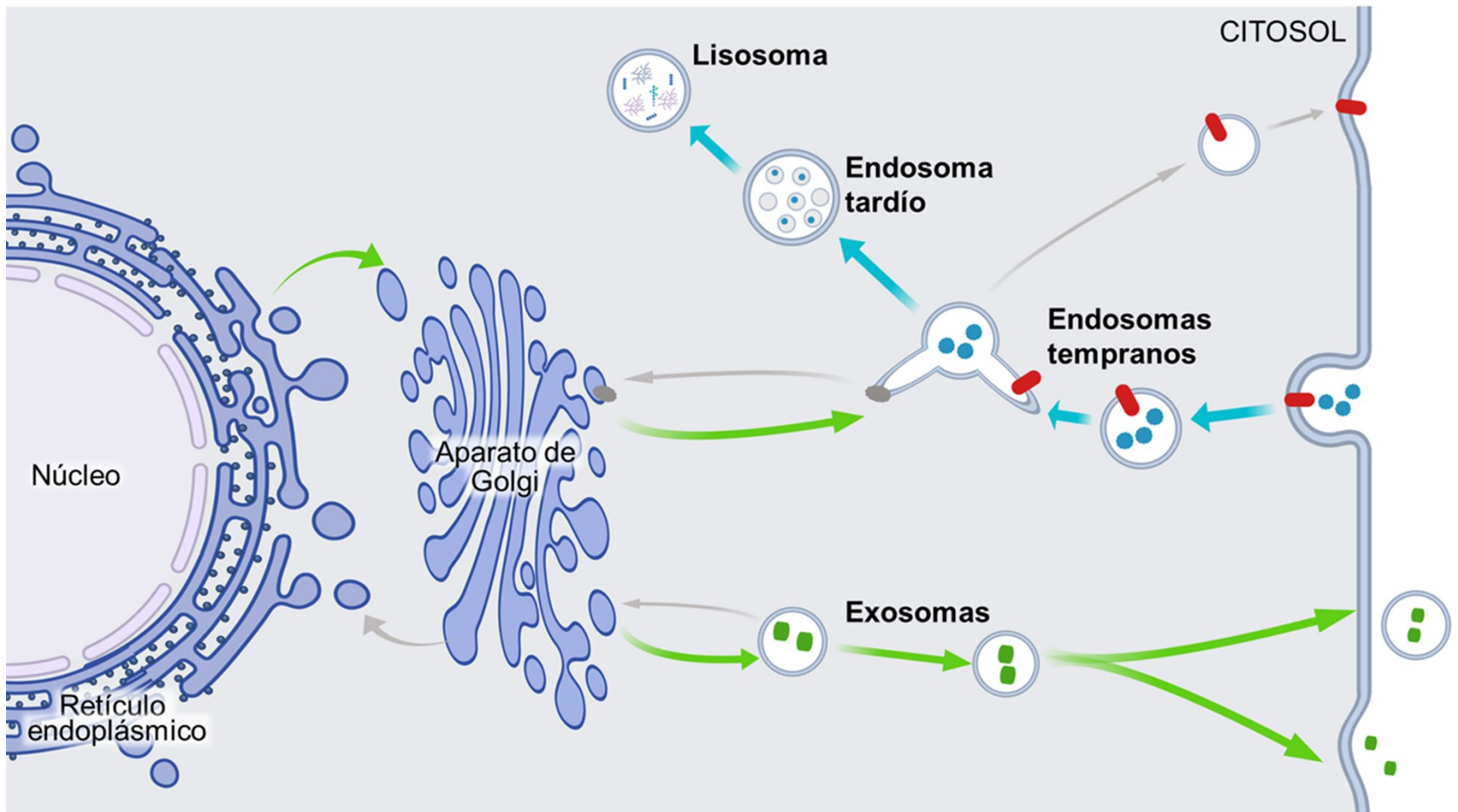


Figura 1. Tráfico vesicular en células eucariontes.

Esquema general de los dos grandes eventos del tráfico vesicular, la vía endocítica (flechas azules) y la vía exocítica (flechas verdes). En flechas grises se muestra el reciclaje de proteínas. Imagen modificada de Alberts et al., 2016.

1.1.1 La vía secretora

La vía secretora o exocitosis es el transporte de moléculas en vesículas hacia la membrana plasmática (Vassilieva and Nusrat, 2008; Alberts et al., 2016; Christ et al., 2017). En la mayoría de las células eucariontes, existe un organelo denominado retículo endoplásmico, el cual se encarga de la síntesis de proteínas, la síntesis de lípidos y el almacenamiento intracelular de Ca^{2+} (Alberts et al., 2016). La gran mayoría de estas proteínas son transportadas en vesículas recubiertas por la proteína COPII (por sus siglas en inglés *Coat protein complex II*), la cual es una señal para su direccionamiento al aparato de Golgi (Nickel and Rabouille, 2008; Brandizzi and Barlowe, 2013). Las proteínas en el aparato de Golgi se transportan hacia la membrana plasmática en vesículas (Nickel and Rabouille, 2008; Brandizzi and Barlowe, 2013).

El exosoma, un tipo de vesículas de la vía secretora originado por la maquinaria ESCRT, tiene como principal función el transporte de productos celulares hacia la membrana plasmática, donde la fusión de la membrana exosomal y plasmática permite liberar el contenido exosomal al espacio extracelular, evento que se conoce como exocitosis secretora (Chieriegatti and Meldolesi, 2005; Brandizzi and Barlowe, 2013). Sin embargo, algunos exosomas únicamente se transportan hacia la membrana plasmática sin secretar su contenido al medio extracelular; de esta manera las proteínas de la membrana exosomal se translocan a la membrana plasmática sin la fusión de ambas membranas, en un proceso conocido como exocitosis no secretora (Chieriegatti and Meldolesi, 2005).

La vía secretora también implica el transporte de vesículas hacia otras estructuras celulares, el ejemplo mejor descrito y de relevancia para este proyecto es el transporte de hidrolasas lisosomales del aparato de Golgi a los endosomas tempranos y tardíos (Gundelfinger et al., 2003; Vassilieva and Nusrat, 2008; Alberts et al., 2016; Christ et al., 2017).

1.1.2 Vía endocítica

La vía endocítica o endocitosis es el evento celular mediante el que se internalizan y transportan moléculas en vesículas denominadas endosomas (Sorkin and Von Zastrow, 2002). La endocitosis se inicia con la formación de concavidades (invaginaciones) en dominios específicos de la membrana plasmática. La formación de invaginaciones requiere de la presencia de dos tipos de proteínas, las que se asocian a la membrana y aquellas que tienen la capacidad de polimerizarse (unirse con otras proteínas iguales) como la clatrina (Sorkin and Von Zastrow, 2002; Vassilieva and Nusrat, 2008). La polimerización de proteínas como la clatrina, hace que la curvatura de la invaginación en la membrana sea más pronunciada, dando paso a una estructura circular que finalmente será separada de la membrana plasmática y dará origen al endosoma (Vassilieva and Nusrat, 2008). Una variante de la endocitosis es la fagocitosis, evento que implica la formación de proyecciones de la membrana plasmática alrededor de la célula o partículas mayores a $0.5 \mu\text{m}$ que se van a internalizar (Flannagan et al., 2012; Gordon, 2016). Las proyecciones de la membrana y la posterior formación del endosoma es también resultado de los rearrreglos del citoesqueleto de la célula (Flannagan et al., 2012; Gordon, 2016).

La membrana endosomal pasa por un proceso gradual e irreversible de adquisición, pérdida y recambio de múltiples proteínas, destacando entre ellas la familia de proteínas Rab, un tipo de GTPasas (enzimas con la capacidad de hidrolizar GTP), que por su unión específica a la membrana endosomal en su estado activo (Rab unida a GTP), se consideran marcadores del proceso de maduración endosomal (paso de endosoma temprano a tardío) (Vassilieva and Nusrat, 2008; Balderhaar et al., 2010; Alberts et al., 2016; Liu, 2016). Particularmente, la proteína Rab5 es un marcador de endosomas tempranos, en tanto que Rab7 se asocia a la membrana de endosomas tardíos (Alberts et al., 2016). El proceso de maduración endosomal tiene como fin clasificar el contenido endosomal (carga) hacia la degradación o el reciclaje. Los eventos celulares que se presentan durante la maduración endosomal son: (a) acidificación progresiva del endosoma temprano; (b) clasificación de la carga endosomal para su

destrucción (degradación) o para su direccionamiento hacia otras estructuras celulares (reciclaje); y (c) transporte de proteínas desde el aparato de Golgi al endosomas tempranos y tardíos por la vía secretora (Figura 2) (Okada and Nozaki, 2006; Vassilieva and Nusrat, 2008; Alberts et al., 2016).

El proceso de acidificación durante la maduración endosomal (aproximadamente hasta pH 6) se lleva a cabo por una ATPasa de tipo V o bomba vacuolar de iones ubicada en la membrana endosomal, la cual, bombea H⁺ del citosol al lumen del endosoma, reduciéndose el pH progresivamente (Figura 2) (Flannagan et al., 2012; Alberts et al., 2016; Gordon, 2016).

La clasificación de las proteínas del endosoma hacia su degradación inicia con la adición de la proteína ubiquitina (Raiborg and Stenmark, 2009; Alberts et al., 2016). Dicha proteína, se une a la porción citosólica de proteínas transmembranales presentes en la membrana endosomal, por la acción de una ligasa de ubiquitina, en un proceso denominado ubiquitinación (Raiborg and Stenmark, 2009; Alberts et al., 2016). La ubiquitina es la señal para el reconocimiento de las proteínas que se degradarán en el proteosoma o en el lisosoma (Okada and Nozaki, 2006; Vassilieva and Nusrat, 2008; Raiborg and Stenmark, 2009; Alberts et al., 2016). La degradación de proteínas en el lisosoma inicia con el reconocimiento de la etiqueta de ubiquitina por la maquinaria proteica ESCRT (por sus siglas en inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), un conjunto de proteínas que remodelan la membrana endosomal para formar vesículas intra-endosomales (Figura 2) (Okada and Nozaki, 2006; Vassilieva and Nusrat, 2008; Alberts et al., 2016). Estas estructuras celulares denominadas cuerpos multivesiculares (MVBs, por sus siglas en inglés *Multivesicular Bodies*) se fusionan a un lisosoma, evento que libera las vesículas intra-endosomales para que sean degradadas en el lumen del lisosoma (Okada and Nozaki, 2006; Raiborg and Stenmark, 2009; Alberts et al., 2016).

El transporte de proteínas desde el aparato de Golgi a endosomas tempranos y tardíos es el punto de convergencia de la vía secretora y la vía endocítica (Figura 2) (Vassilieva and Nusrat, 2008; Alberts et al., 2016; Christ et al., 2017). Dicha

convergencia propicia que los endosomas tengan proteínas transmembranales con funciones en el aparato de Golgi (Figura 2, rojo) o en la membrana plasmática (Figura 2, verde) que deben regresar a su ubicación original por un proceso de reciclaje (Figura 2, flecha amarilla) (Gundelfinger et al., 2003; Saftig and Klumperman, 2009; Alberts et al., 2016). Las proteínas que se reciclan son principalmente proteínas transmembranales con una porción citoplásmica que interacciona con complejos proteicos específicos que median su reciclaje (McNally et al., 2017; Rabouille, 2017; Simonetti et al., 2017).

El reciclaje de una proteína blanco se lleva a cabo por tres mecanismos diferentes, según el complejo proteico del que se trate. Los complejos que participan en el reciclaje de proteínas incluyen al heterodímero de proteínas SNX-BAR (por sus siglas en inglés *Sorting Nexins with BAR domain*), el recuperador (del inglés *retriever*) y el retrómero (Okada and Nozaki, 2006; Vassilieva and Nusrat, 2008; Raiborg and Stenmark, 2009; Alberts et al., 2016). El complejo proteico retrómero media el proceso de reciclaje más estudiado y evolutivamente conservado entre eucariontes que se ha relacionado con múltiples procesos celulares (McNally et al., 2017; Rabouille, 2017; Simonetti et al., 2017).

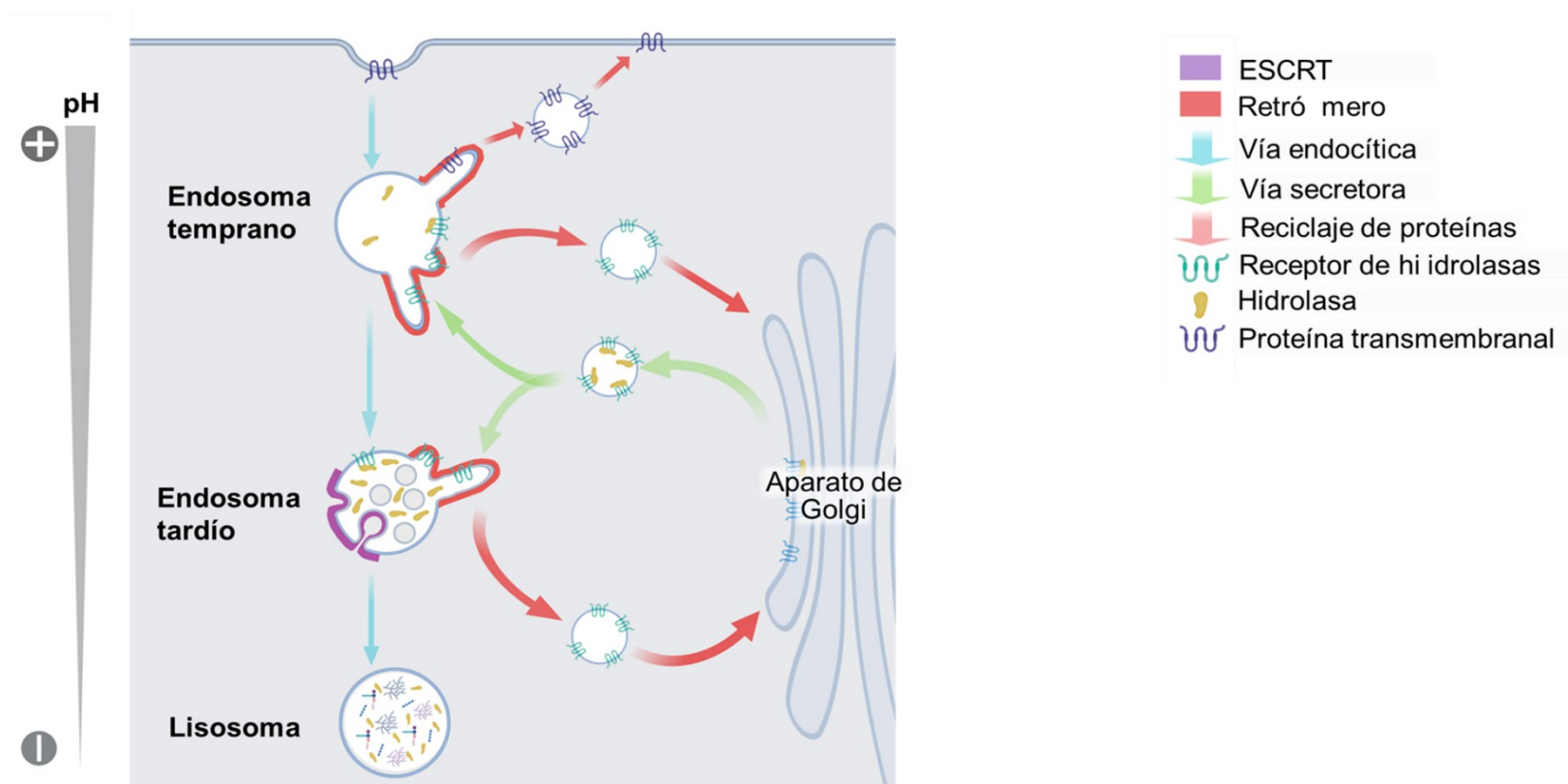


Figura 2. El reciclaje de proteínas mediado por el retrómero.

En la membrana endosomal hay proteínas transmembranales procedentes de la vía secretora (flecha azul) y la vía endocítica (flecha verde). El retrómero media el reciclaje de proteínas desde el endosoma hacia el aparato de Golgi o la membrana plasmática (flecha rojo). El receptor de hidrolasas lisosomales (azul) funciona como proteína adaptadora para el transporte de su ligando hacia los endosomas y debido a la disminución del pH pierde afinidad hacia su ligando. El receptor de hidrolasas sin su ligando es reconocido por el retrómero y reciclado hacia el aparato de Golgi.

1.1.3 El retrómero

El retrómero es un complejo de proteínas que lleva a cabo la recuperación de proteínas, generalmente transmembranales, en endosomas tempranos y tardíos con el propósito de evitar la degradación de estas proteínas blanco (Figura 2) (Bonifacino and Hurley, 2008; Brodin and Shupliakov, 2018). El retrómero media el proceso de reciclaje más estudiado en eucariontes (Lauffer et al., 2010; Koumandou et al., 2011; Harrison et al., 2014; Sangaré et al., 2016; McGough et al., 2018). Siendo *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) y *Homo sapiens* (humanos), los organismos modelo en los que se ha descrito a detalle el proceso de reciclaje. En ambos organismos, el retrómero se compone de cinco proteínas que se arreglan en dos subunidades: (1) el complejo de reconocimiento de carga (CRC, por sus siglas en inglés *Cargo Recognition Complex*) y (2) el heterodímero SNX-BAR (Figura 3, A) (Bonifacino and Hurley, 2008; Koumandou et al., 2011; Brodin and Shupliakov, 2018). El CRC es un heterotrímero compuesto por las proteínas: Vps26, Vps29 y Vps35. El heterodímero SNX-BAR se compone por diferentes proteínas SNX-BAR en humanos y levaduras (Bonifacino and Hurley, 2008; Cullen, 2008; Koumandou et al., 2011; Liu, 2016; Lucas et al., 2016; Brodin and Shupliakov, 2018) En levadura, el heterodímero de proteínas SNX-BAR está conformado por la unión de Vps5 y Vps17 (Seaman et al., 1997, 1998). En humanos, el heterodímero SNX-BAR se forma por la combinación de SNX1, SNX2, SNX5 y SNX6, que da la posibilidad de cuatro diferentes heterodímeros: SNX1/SNX5, SNX1/SNX6, SNX2/SNX5 y SNX2/SNX6 (Koumandou et al., 2011; Trousdale and Kim, 2015; Simonetti et al., 2017).

En otros eucariontes, el retrómero está integrado generalmente por el CRC (Vps26, Vps29 y Vps35) y un heterodímero SNX-BAR (retrómero típico), por lo que se considera evolutivamente conservado (Figura 3, A) (Koumandou et al., 2011). Cabe destacar que la mayoría de las divergencias con el retrómero antes descrito, se presentan en organismos unicelulares (Lauffer et al., 2010; Koumandou et al., 2011; Harrison et al., 2014; Sangaré et al., 2016; McGough et al., 2018).

El primer ejemplo de la discrepancia con el retrómero típico es la ausencia de Vps29 en el organismo *Ostreococcus tauri*, un alga verde unicelular con un retrómero integrado por Vps26, Vps35 y el heterodímero de proteínas SNX-BAR (Figura 3, B) (Koumandou et al., 2011).

La segunda discrepancia es la presencia de SNX3 o SNX27, que funcionan como puente para la interacción entre el retrómero y la proteína blanco (Figura 3, C) (Strochlic et al., 2007; Temkin et al., 2011; McGarvey et al., 2016; Kvainickas et al., 2017b). El retrómero-SNX3/SNX27 se ha reportado en levadura y humano (Strochlic et al., 2007; Temkin et al., 2011; McGarvey et al., 2016; Kvainickas et al., 2017b).

El tercer ejemplo de discrepancia con el retrómero típico es la ausencia de genes que codifiquen para proteínas SNX-BAR que forman el heterodímero SNX-BAR (Tenter et al., 2000; Nakada-Tsukui et al., 2005; Koumandou et al., 2011; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013; Krai et al., 2014; Sangaré et al., 2016; Iqbal et al., 2018). Dicho complejo proteico se compone de Vps26, Vps29 y Vps35 (retrómero mínimo) (Figura 3, D) y es reportado generalmente en parásitos unicelulares. Concretamente, la carencia de proteínas SNX-BAR se reporta en *Guillardia theta* (alga unicelular), *Plasmodium falciparum* (protozoario parásito intracelular del humano), *Toxoplasma gondii* (protozoario parásito intracelular de mamíferos y aves), *Theileria parva* (protozoario parásito intracelular del ganado bovino), *Trichomonas vaginalis* (protozoario parásito del humano), *Giardia intestinalis* (protozoario parásito del humano) y *Entamoeba histolytica* (protozoario parásito del humano) (Tenter et al., 2000; Nakada-Tsukui et al., 2005; Koumandou et al., 2011; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013; Krai et al., 2014; Sangaré et al., 2016; Iqbal et al., 2018).

El cuarto ejemplo de discrepancia con el retrómero típico es el retrómero mínimo-SNX3 (Vps26, Vps29, Vps35 y SNX3) en *Caenorhabditis elegans* y humanos (Figura 3, E). La proteína SNX3 funciona como un adaptador para el reconocimiento de la proteína blanco (Harterink et al., 2011; McGough et al., 2018).

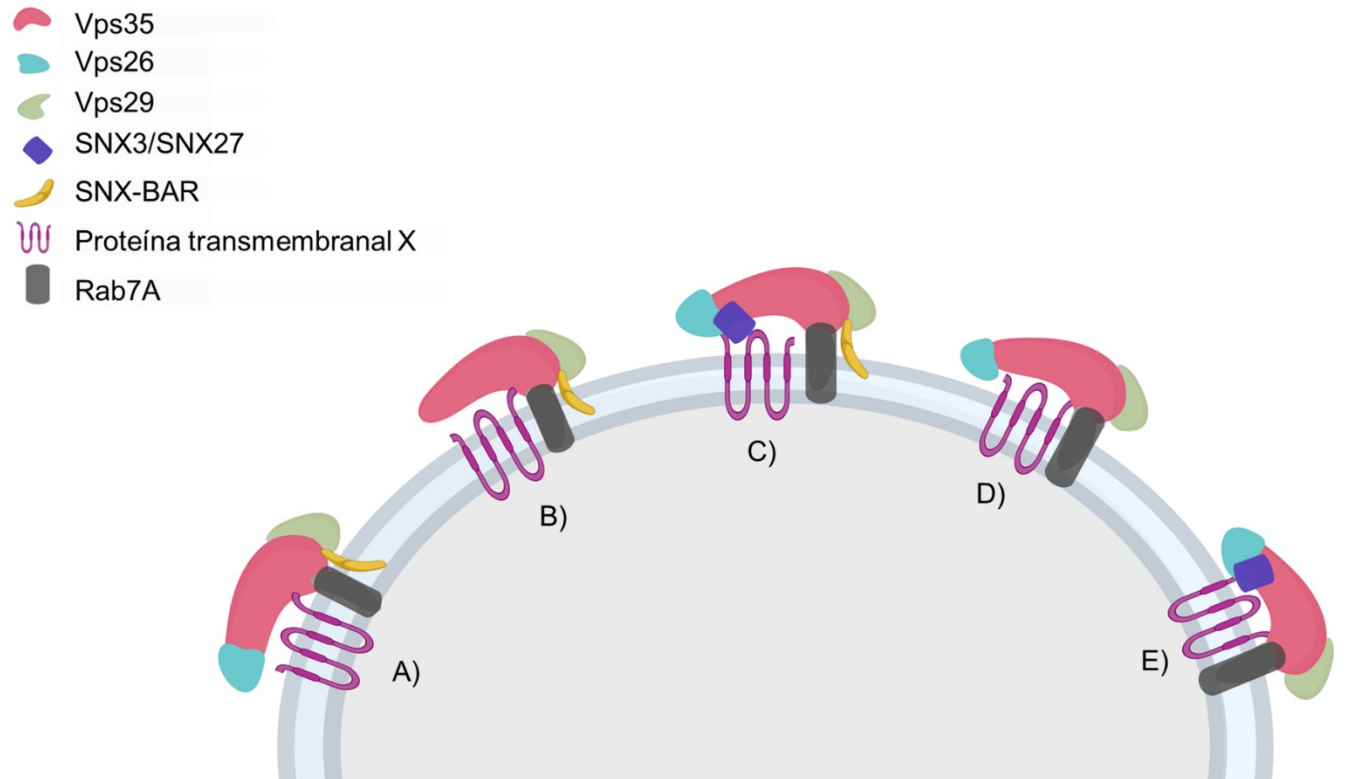


Figura 3. Comparación de los complejos proteicos considerados genéricamente como el retrómero.

A) El retrómero típico se compone por un heterodímero de proteínas SNX-BAR y un CRC (Vps26, Vps35 y Vps29). La proteína Vps35 interacciona con la proteína blanco del reciclaje. B) Retrómero con ausencia de Vps29. C) El retrómero-SNX3/SNX27 se compone de Vps26, Vps29, Vps35, el heterodímero SNX-BAR y SNX3 o SNX27. La proteína blanco interacciona con SNX3 o SNX27. D) El retrómero mínimo se compone de Vps26, Vps29 y Vps35. E) El retrómero mínimo-SNX3 se compone de las proteínas Vps26, Vps29, Vps35 y SNX3. La proteína blanco interacciona con SNX3. Imagen elaborada con la información de: Tenter et al. 2000; Nakada-Tsukui et al., 2005; Strohlic et al., 2007; Harterink et al., 2011; Koumandou et al., 2011; Temkin et al., 2011; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013; Krai et al., 2014; McGarvey et al., 2016; Sangaré et al., 2016; Kvainickas et al., 2017a, 2017b; Iqbal et al., 2018; y McGough et al., 2018.

El complejo proteico considerado genéricamente como el retrómero, pese a sus variaciones, tiene como única función reportada, el reciclaje de proteínas generalmente transmembranales (Lauffer et al., 2010; Koumandou et al., 2011; Harrison et al., 2014; Sangaré et al., 2016; McGough et al., 2018).

Los componentes universales del retrómero son Vps26, Vps29 y Vps35 (Tenter et al., 2000; Nakada-Tsukui et al., 2005; Harterink et al., 2011; Koumandou et al., 2011; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013; Krai et al., 2014; Sangaré et al., 2016; Iqbal et al., 2018; McGough et al., 2018). Dichas proteínas conforman el complejo de reconocimiento de carga (CRC) y sus pesos moleculares han sido descritos en humano y levadura (Tabla 3). La interacción entre las proteínas del CRC se ha descrito en humanos, levaduras, *P. falciparum*, *G. intestinalis* y *E. histolytica* (Haft et al., 2000; Collins et al., 2005; Nakada-Tsukui et al., 2005; Hierro et al., 2007; Zhao et al., 2007; Puthenveedu et al., 2010; Swarbrick et al., 2011; Jia et al., 2012; Rivero et al., 2012; Krai et al., 2014; Priya et al., 2015; Lucas et al., 2016; Srivastava et al., 2017; Iqbal et al., 2018). En todos los casos, Vps35 es la proteína central del CRC, que interacciona con Vps26 y Vps29, ya que no hay una interacción directa entre Vps26 y Vps29 (Figura 3). Específicamente, el motivo compuesto por los aminoácidos PRLYL en la región amino de Vps35 interacciona con Vps26 (Figura 4, rojo y azul) (Haft et al., 2000; Hierro et al., 2007; Zhao et al., 2007; Rivero et al., 2012; Lucas et al., 2016), mientras la región carboxilo de Vps35 interacciona con Vps29 (Figura 4, rojo y verde) (Hierro et al., 2007; Swarbrick et al., 2011).

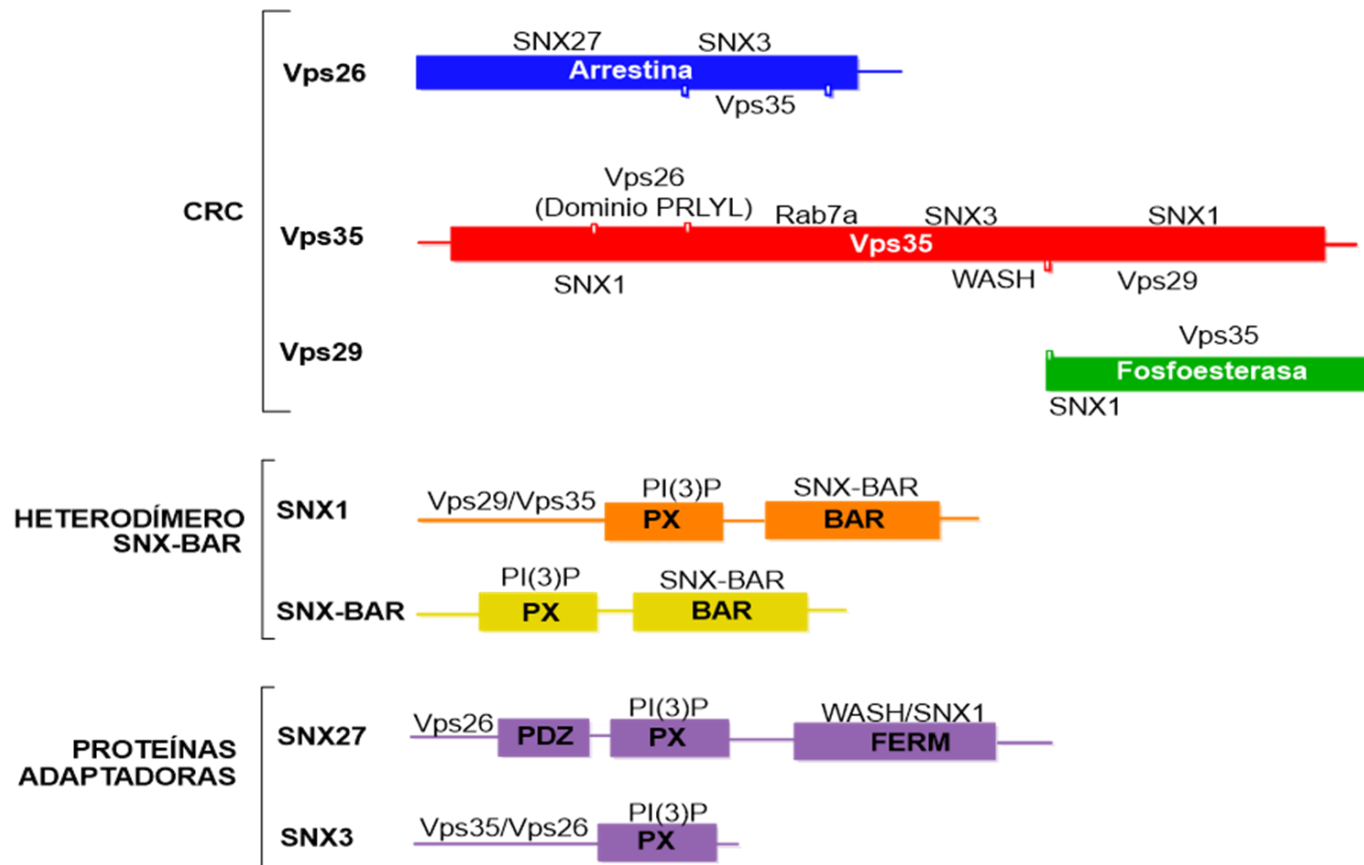


Figura 4. Dominios y mapa de las interacciones de los componentes del complejo retrómero.

El retrómero se compone de dos subunidades: el complejo de reconocimiento de carga y el heterodímero SNX-BAR. El complejo de reconocimiento de carga (CRC) está integrado por Vps26 (azul), Vps35 (rojo) y Vps29 (verde). El heterodímero SNX-BAR se forma de la unión de dos proteínas SNX-BAR (amarillo), siendo la más caracterizada SNX1 (naranja). Las proteínas adaptadoras (morado), en algunos casos son el puente para la interacción del CRC con la proteína blanco. Imagen elaborada con la información de: Haft et al., 2000; Hierro et al., 2007; Rojas et al., 2007; Bonifacino and Hurley, 2008; Wassmer et al., 2009; Swarbrick et al., 2011; Steinberg et al., 2013; Gallon et al., 2014; Trousdale y Kim, 2015; Liu, 2016; Lucas et al., 2016; y Simonetti et al., 2017.

La función del CRC es reconocer a la proteína blanco de reciclaje, para lo cual generalmente Vps35 interacciona con una secuencia de aminoácidos en la porción citosólica de la proteína blanco (Tabla 1 y 2). Sin embargo, el reconocimiento de la proteína blanco, en algunos casos, se realiza a través de la proteína SNX3 o SNX27, que funcionan como puente para la interacción entre el retrómero y la proteína blanco (Figura 4) (Strochlic et al., 2007; Harterink et al., 2011; Temkin et al., 2011; Liu, 2016; Lucas et al., 2016; McGarvey et al., 2016; Kvainickas et al., 2017b; McGough et al., 2018).

El heterodímero de proteínas SNX-BAR está formado por proteínas con dos dominios, el dominio PX (por sus siglas en inglés *phagocyte oxidase*) y el dominio BAR (por las siglas de las proteínas donde se identificó inicialmente este dominio, Bin1, Anfifisina y Rvs161/167) (Itoh and Takenawa, 2009; Liu, 2016; Lucas et al., 2016). El dominio PX es responsable de la unión a la membrana endosomal por su afinidad al fosfatidilinositol, principalmente fosfatidilinositol 3-monofosfato (PI(3)P), que es abundante en la membrana endosomal en proceso de maduración (Cullen, 2008). El dominio BAR tiene unión con otra proteína SNX, por lo que es responsable de la formación del heterodímero SNX-BAR (Cullen, 2008). Las proteínas SNX-BAR al formar dímeros y al interactuar con la membrana endosomal producen la deformación de la membrana endosomal (formación de protuberancias o estructuras tubulares), característica del reciclaje por el retrómero (Figura 2) (Bonifacino and Hurley, 2008; Cullen, 2008).

1.1.3.1 Mecanismo de reciclaje del retrómero

El proceso de reciclaje de proteínas en endosomas (tempranos y tardíos) mediado por el retrómero implica cuatro pasos: i) reconocimiento de la proteína blanco de reciclaje, ii) remodelación de la membrana endosomal, iii) formación de una vesícula y iv) transporte de la vesícula a su destino final (Figura 5).

El reconocimiento de la proteína blanco de reciclaje de tipo transmembranal ocurre generalmente por Vps35 (Tabla 2), la cual, reconoce una secuencia de aminoácidos de tipo hidrofóbico en la porción expuesta de la proteína blanco en

la membrana endosomal (Figura 5, A). El reconocimiento de la proteína blanco permite el reclutamiento del resto de los componentes del retrómero (Vps26, Vps29 y el heterodímero SNX-BAR) (Figura 5, B) (Strochlic et al., 2007; Wassmer et al., 2009; Lauffer et al., 2010; Temkin et al., 2011; Harrison et al., 2014; Fuse et al., 2015; Priya et al., 2015). Este reconocimiento está regulado por la interacción de Vps35 con Rab7A (Figura 5, A y E) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009; Balderhaar et al., 2010; Jia et al., 2012; Liu et al., 2012; Zelazny et al., 2013; Priya et al., 2015). Dicha interacción, solo ocurre cuando Rab7A está en su forma activa, es decir, unida a GTP (Rab7A-GTP) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Seaman et al., 2009; Priya et al., 2015; Jia et al., 2016). Rab7A ancla al retrómero a la membrana endosomal evitando que se disocie, razón por la cual se considera el efector del retrómero (Nakada-Tsukui et al., 2005; Seaman et al., 2009; Balderhaar et al., 2010; Liu et al., 2012; Zelazny et al., 2013; Jia et al., 2016).

La remodelación de la membrana endosomal consiste en el alargamiento de la membrana endosomal (estructuras tubulares), que dará paso a la formación de vesículas con la proteína blanco dentro de ellas (Figura 5, C) (Bonifacino and Hurley, 2008). La remodelación de la membrana solo se ha caracterizado en humanos y levaduras. En ambos organismos, la remodelación de la membrana endosomal inicia en regiones con abundancia de la proteína blanco en interacción con el CRC, por acción del heterodímero SNX-BAR (Cullen, 2008; Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009; Balderhaar et al., 2010; Puthenveedu et al., 2010; Jia et al., 2012; Liu et al., 2012; Zelazny et al., 2013; Harrison et al., 2014). Las proteínas SNX-BAR al dimerizarse adquieren una curvatura descrita como tipo banana que al interactuar con la membrana forman una protuberancia (Itoh and Takenawa, 2009). Dicha protuberancia se alarga formando estructuras tubulares debido a la interacción entre el retrómero y el complejo WASH (por sus siglas en inglés *Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homology*) (Figura 4, C) (Puthenveedu et al., 2010; Jia et al., 2012; Bartuzi et al., 2016; Kvainickas et al., 2017b). El complejo WASH activa la polimerización de actina que paulatinamente “empuja” un punto en la membrana endosomal alargando la

estructura tubular (Derivery et al., 2009, 2012; Puthenveedu et al., 2010; Jia et al., 2012; Bartuzi et al., 2016; Kvainickas et al., 2017b; Kovtun et al., 2018).

La formación de las vesículas que contienen a la proteína blanco solo se ha caracterizado en humanos y *Caenorhabditis elegans*, donde se encontró que se requiere la participación de elementos del citoesqueleto (Figura 4, D) (Hong et al., 2009; Wassmer et al., 2009). La interacción del heterodímero SNX-BAR con la proteína p150 (subunidad del complejo proteico dineína) produce la estrangulación de la estructura tubular y la formación de una vesícula (Figura 4, E) (Hong et al., 2009; Wassmer et al., 2009). El retrómero aún unido a la membrana de la vesícula, se disocia y la vesícula es transportada hacia su destino final (organelo o membrana plasmática) por la interacción entre los complejos proteicos dineína y dinactina que se unen a elementos del citoesqueleto (microtúbulos) (Hong et al., 2009; Wassmer et al., 2009; Alberts et al., 2016).

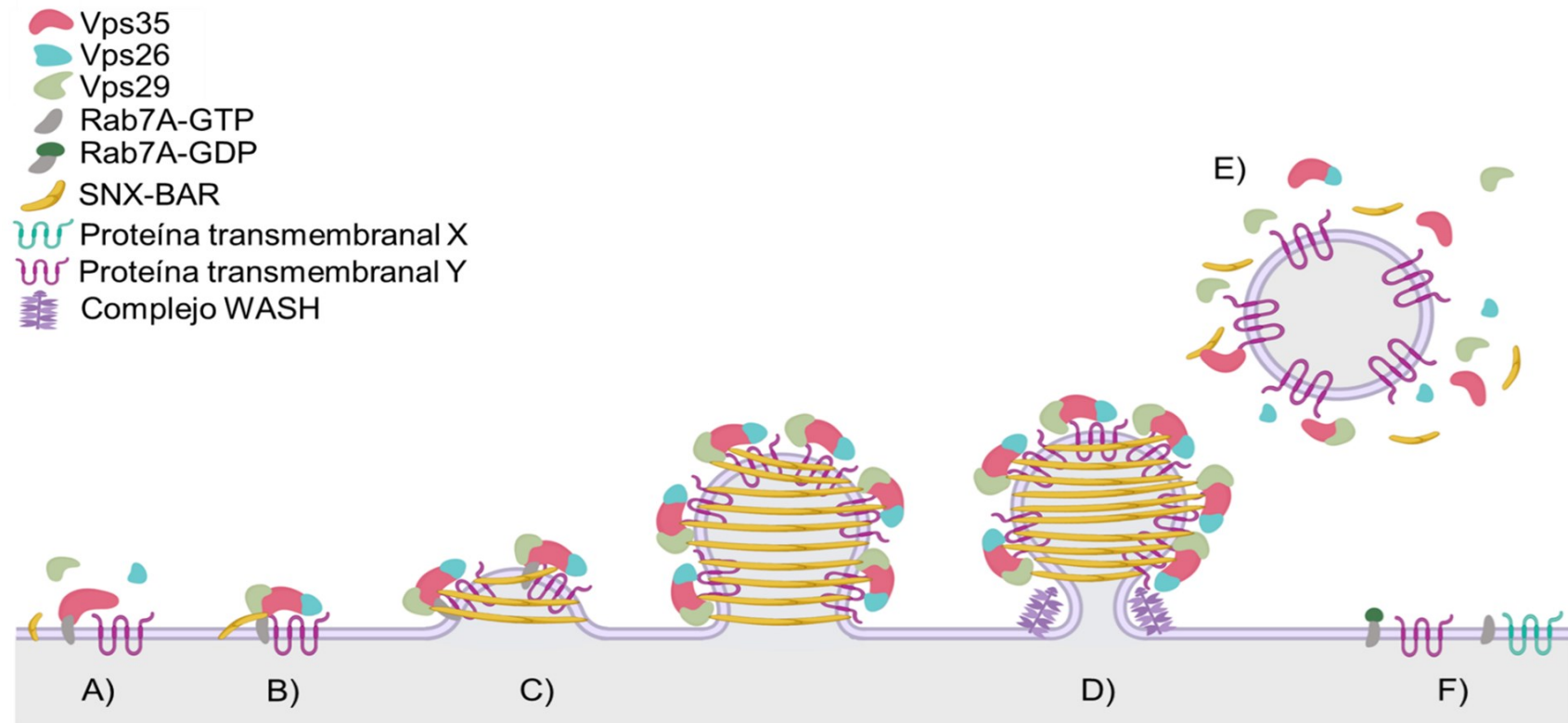


Figura 5. Modelo del reciclaje de proteínas mediado por el retrómero.

A) Vps35 interacciona con Rab7A-GTP. B) Las proteínas SNX-BAR se unen a PI(3)P en la membrana endosomal. Vps35 reconoce a la proteína transmembranal X y el resto de los componentes del retrómero se reclutan a esa región de la membrana endosomal. C) Inicia la formación de una estructura tubular en la membrana endosomal por acción de las proteínas SNX-BAR. D) Polimerización de actina por acción del complejo WASH. E) Se forma una vesícula que se transportará hacia algún destino en la célula. F) El retrómero no recicla a la proteína transmembranal x en el endosoma cuando Rab7A está en su forma inactiva (Rab7A-GDP) o cuando la proteína transmembranal no es reconocida por el retrómero (proteína transmembranal Y).

1.1.3.2 Blancos del reciclaje mediados por el retrómero

Las proteínas relocalizadas por medio de la endocitosis están implicadas en procesos celulares como: el intercambio de iones (sodio, potasio, calcio, cloro, etc.) y otras moléculas (azúcares, aminoácidos, ADP, ATP, etc.), así como múltiples vías de señalización (Gundelfinger et al., 2003; Alberts et al., 2016). En cambio, las proteínas relocalizadas por la vía secretora están relacionadas con el transporte de proteínas, secreción de proteínas y vías de señalización (Gundelfinger et al., 2003; Saftig and Klumperman, 2009; Alberts et al., 2016). La relocalización de proteínas hacia los endosomas hace necesario un proceso que regrese a la proteína a su localización original (proceso de reciclaje). Las proteínas que son recicladas por el retrómero son nombradas genéricamente como proteínas blanco (Figura 5, proteína X). Dichas proteínas son transmembranales generalmente y tienen una secuencia de aminoácidos en su porción citoplásmica que es reconocida por el retrómero (Figura 5, B). Sin embargo, en algunos casos las proteínas son recicladas indirectamente, gracias a la interacción con una proteína blanco que es reconocida por el retrómero (Tabla 2).

Una gran variedad de proteínas transmembranales es relocalizada a los endosomas, por lo que determinar una característica común en las proteínas recicladas por el retrómero ha sido una pregunta obligada. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha identificado una secuencia universal presente en las proteínas blanco. Las secuencias identificadas hasta este momento poseen una longitud variable y son ricas en aminoácidos hidrofóbicos (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias reconocidas en las proteínas blanco de reciclaje por el retrómero.

Proteína blanco	Proteína del retrómero que media el reconocimiento	Secuencia de reconocimiento	Referencia
DLP1	Vps35	FLV	Wang et al., 2017
CI-M6PR	Vps35	WLM	Seaman, 2007
CI-M6PR	SNX5	VSYKY	Yong et al., 2020
Sortilina	Vps35	FLV	Canuel et al., 2008; Seaman, 2007)
Vps10	Vps35	FYVFSN	Cereghino et al., 1995; Nothwehr et al., 2000
DMT1-II	Vps26/SNX3	YLL	Lucas et al., 2016; Tabuchi et al., 2010
β 2AR	SNX27	dominio PDZ	Lauffer et al., 2010; Temkin et al., 2011
Ftr1p	SNX3	GHLPFCKNLQ	Strochlic et al., 2007)
DAT	Vps35	LKV	Wu et al., 2017)
TGN38	Vps35	SXYQRL	Roquemoire & Banting, 1998
SorLA	Vps26	FTAFANSHY	Fjorback et al., 2012
Enzima β -APP	Vps35	CQWRCLRCLQQHDDFADDIS	Cuartero et al., 2012
SEMA4C	SNX5/SNX27	VGYYYY/ dominio PDZ	Yong et al., 2020)

El reciclaje de proteínas mediado por el retrómero es necesario para el transporte de proteínas, el transporte de hierro, la captura de glucosa, vías de señalización, el reconocimiento de células apoptóticas, la polaridad celular y la regulación de procesos neurodegenerativos (Tabla 2). Incluso el reciclaje mediado por el retrómero es tan importante que la interrupción de este proceso es letal durante etapas larvales en *D. melanogaster* (Franch-Marro et al., 2008). Sin embargo, el reciclaje de receptores de hidrolasas como CI-M6PR, Vps10 y sortilina es el ejemplo de reciclaje mediado por el retrómero más estudiado y evolutivamente conservado (Cereghino et al., 1995; Nothwehr et al., 2000; Seaman, 2007; Canuel et al., 2008; Hong et al., 2009; Wassmer et al., 2009; Sloves et al., 2012; Sangaré et al., 2016).

El reciclaje de receptores de hidrolasas lisosomales se propone como una posible función del retrómero en los parásitos *G. intestinalis* y *E. histolytica* (Nakada-Tsukui et al., 2005; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013). El transporte de hidrolasas lisosomales (enzimas hidrolíticas activas en condiciones ácidas) desde el aparato de Golgi a los endosomas ocurre en cinco pasos: interacción entre la hidrolasa lisosomal y su receptor, transporte de la hidrolasa lisosomal a endosomas y el reciclaje del receptor de hidrolasas lisosomales (Seaman, 2007; Alberts et al., 2016; Pan et al., 2017). Los receptores de hidrolasas lisosomales son M6PR (receptor de manosa-6-fosfato) y sortilina. En el caso del M6PR, las hidrolasas lisosomales tienen una etiqueta de manosa-6-fosfato (M6P) adquirida en el aparato de Golgi (Saftig and Klumperman, 2009). La unión entre el receptor de hidrolasas lisosomales y su ligando es la señal para la formación de vesículas, las cuales se transportarán hacia endosomas tempranos y tardíos (Saftig and Klumperman, 2009; Alberts et al., 2016). La unión entre las hidrolasas lisosomales y M6PR es dependiente del pH, ya que a pH ácidos (aproximadamente pH 6) esta interacción se disocia (Saftig and Klumperman, 2009; Alberts et al., 2016). Al liberar a su ligando, el M6PR es reconocido por el retrómero y regresado al aparato de Golgi (Seaman, 2007).

Tabla 2. Procesos celulares en los que participan las proteínas blanco del retrómero.

UBICACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA BLANCO	PROCESO CELULAR	PROTEÍNA BLANCO	PROTEÍNA RECICLADA	PROTEÍNA DEL RETROMERO QUE MEDIA EL RECONOCIMIENTO	REFERENCIA	
Aparato de Golgi	Transporte de hidrolasas lisosomales	CI-M6PR	CI-M6PR	Vps35	Seaman, 2007	
		Vps10	Vps10	Vps35	Cereghino <i>et al.</i> , 1995; Nothwehr <i>et al.</i> , 2000	
		Sortilina	Sortilina	Vps35	Seaman, 2007; Canuel <i>et al.</i> , 2008	
Membrana plasmática	Transporte y secreción IgA	pIgR	pIgR	SD	Vergés <i>et al.</i> , 2004	
	Transporte de nutrientes	Ftr1p	Ftr1p y Ftr3p	SNX3	Strochlic <i>et al.</i> , 2007	
		DMT1	DMT1	Vps26/SNX3	Tabuchi <i>et al.</i> , 2010; Lucas <i>et al.</i> , 2016	
		Sortilina	Glut4	Vps35	Pan <i>et al.</i> , 2017; Yang <i>et al.</i> , 2016	
		Glut1	Glut1	SNX27	Kvainickas <i>et al.</i> , 2017 ^b	
		SNAT2	SNAT2	SD	Curnock <i>et al.</i> , 2019	
	Vías de señalización	PTHR	PTHR	SNX27	Feinstein <i>et al.</i> , 2011; McGarvery <i>et al.</i> , 2016	
		β2AR	β2AR	SNX27	Temkin <i>et al.</i> , 2011	
		DAT	DAT	Vps35	Wu <i>et al.</i> , 2017	
		Wls	Wls	SNX3	Harterink <i>et al.</i> , 2011; Zhang <i>et al.</i> , 2011	
		SEMA4C	SEMA4C	SNX5/SNX27	Yong <i>et al.</i> , 2020	
	Reconocimiento de células apoptóticas	CED-1	CED-1	SD	Chen <i>et al.</i> , 2010	
	Polaridad celular	Crumbs	Crumbs	SD	Pocha <i>et al.</i> , 2011; Zhou <i>et al.</i> , 2011	
	Endosomas	Procesos degenerativos en neuronas	SorLA	APP	Vps26	Fjorback <i>et al.</i> , 2012
			Enzima β-APP	Enzima β-APP	Vps35	Cuartero <i>et al.</i> , 2012
Mitocondria	Apoptosis	DLP1	DLP1	Vps35	Wang <i>et al.</i> , 2017	
		Bcl-xL	Bcl-xL	SD	Farmer <i>et al.</i> , 2019	

SD: sin datos.

1.1.3.3 El papel del retrómero en parásitos

La recuperación o el reciclaje de proteínas realizado por el retrómero ha sido ampliamente estudiado en eucariontes, ya que se ha descrito como de relevancia en diferentes eventos celulares (Lauffer et al., 2010; Koumandou et al., 2011; Harrison et al., 2014; Sangaré et al., 2016; McGough et al., 2018). Sin embargo, en protozoarios de importancia médica, el retrómero ha sido poco estudiado. En *P. falciparum*, *T. gondii*, *G. intestinalis* y *E. histolytica* el retrómero se encuentra parcialmente conservado (carente de proteínas SNX-BAR canónicas). Estudiar el funcionamiento de este complejo ayudaría a entender la implicación del reciclaje en la biología de los parásitos (Lauffer et al., 2010; Koumandou et al., 2011; Harrison et al., 2014; Sangaré et al., 2016; Iqbal et al., 2018; McGough et al., 2018).

En *T. gondii* el retrómero se ha relacionado con el desarrollo de micronemas y roptrías (Sloves et al., 2012; Sangaré et al., 2016), organelos exclusivos de parásitos apicomplejos que secretan proteínas implicadas en el proceso de invasión celular (Tenter et al., 2000). La formación de dichos organelos depende del transporte de las proteínas ROP y MIC hacia roptrías y micronemas (Sangaré et al., 2016). Dichas proteínas son transportadas al interactuar con el receptor tipo Sortilina-like (TgSORTLR o *T. gondii* Sortilina-like por sus siglas en inglés) (Tenter et al., 2000; Sloves et al., 2012; Sangaré et al., 2016). TgSORTLR al igual que su homólogo en humano al liberar a su ligando, es redirigido por el retrómero (TgVps26, TgVps29 y TgVps35) al aparato de Golgi (Sangaré et al., 2016).

En *P. falciparum*, *G. intestinalis* y *E. histolytica* se han identificado los componentes del retrómero y por medio de estudios *in silico*, microscopía confocal, inmunoprecipitación y ensayos de doble híbrido se han propuesto posibles blancos, (Nakada-Tsukui et al., 2005; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013; Krai et al., 2014; Iqbal et al., 2018). El retrómero de *P. falciparum* (PfVps26, PfVps29 y PfVps35) tiene como un posible blanco de reciclaje a PfSortilina, una proteína homóloga a TgSORTLR de *T. gondii*, por lo que, podría tener una

función en la biogénesis de los organelos secretores, importante para el proceso de invasión celular (Krai et al., 2014; Iqbal et al., 2018).

En *G. intestinalis*, se propone que el retrómero (GIVps26, GIVps29 y GIVps35) recicla a la proteína GIVps (receptor de AcPh) (Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013). La proteína AcPh (por sus siglas en inglés *Acid Phosphatase*) es una hidrolasa lisosomal que se transporta desde el retículo endoplásmico a vacuolas periféricas (estructura que simultáneamente son endosomas y lisosomas) con su receptor GIVps (Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013). Debido a la interacción directa ente GIVps y GIVps35 Rivero et al. (2012) proponen que GIVps podría ser redirigido al retículo endoplásmico después de liberar su ligando de forma similar a lo reportado para otros receptores de hidrolasas (M6PR, Vps10 y sortilina).

En el parásito de interés para este trabajo, *E. histolytica*, el retrómero (EhVps26, EhVps29 y EhVps35) se ha relacionado con la actividad de las cisteína proteasas. Debido a que las cisteína proteasas son hidrolasas, se propone que al igual que en otros organismos, un receptor de hidrolasas media su transporte hacia los endosomas y al liberar su ligando, éste es reciclado por el retrómero (Que and Reed, 2000; Nakada-Tsukui et al., 2005; Furukawa et al., 2013a). Debido al papel de las cisteína proteasas en el mecanismo de invasión de *E. histolytica*, el retrómero debe tener un papel importante en la virulencia de este parásito.

1.2 Generalidades de *Entamoeba histolytica*

El parásito protozoario *E. histolytica* es el agente causal de la amebiasis en los humanos. Dicho parásito presenta dos estadios durante su ciclo de vida, una forma resistente (quiste) y una forma ameboide (trofozoíto). El quiste es una forma esférica no móvil con un diámetro entre 10 a 15 μm (Stanley, 2003; Ximénez et al., 2007, 2009). El trofozoíto es una forma móvil con un diámetro entre 10 a 50 μm , que coloniza la mucosa del intestino grueso (Stanley, 2003; Ximénez et al., 2007, 2009).

E. histolytica es transmitida por el consumo de alimentos y agua contaminados con quistes y en menor proporción por la vía sexual (Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). Los quistes ingeridos no sufren daño por la acidez en el estómago debido a la pared de quitina que los envuelve y confiere resistencia (Stanley, 2003; Ximénez et al., 2007, 2009). Una vez en el intestino delgado (íleon terminal) se produce el desenquistamiento, el cual da origen a ocho trofozoítos que migran al intestino grueso para colonizar la mucosa del colon (Stanley, 2003; Ximénez et al., 2007, 2009). En este lugar, los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y después de la segunda división nuclear sucesiva se producen quistes tetranucleados, que son expulsados en las heces, completando de esta forma el ciclo de vida de *E. histolytica* (Stanley, 2003; Ximénez et al., 2007, 2009).

1.2.1 La amebiasis

La amebiasis es la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo, siendo endémica en la India, México y algunas regiones de África y Sudamérica (Stanley, 2003; Nagata et al., 2012; Marie and Petri, 2014). La estimación global de casos de amebiasis es complicada, dada la limitada capacidad de diagnóstico y vigilancia en las zonas endémicas, además de la existencia de una variación entre el periodo de la infección y la aparición de los síntomas (en casos extremos hasta después de varios años se presentan los síntomas). La infección por *E. histolytica* es asintomática en el 80 a 90% de los casos, y las personas presentan únicamente la colonización de la mucosa intestinal por los trofozoítos (Ximénez et al., 2009; Nagata et al., 2012; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016; Jackson-Akers et al., 2023). Entre el 10 y 20% restante de los casos, corresponde a personas que presentan síntomas como fiebre, náuseas, vómito, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal dentro de las dos a cuatro semanas posteriores a la infección, y sólo entre el 4 a 10 % presenta colitis autolimitante, colitis invasiva, infecciones extraintestinales, evacuaciones con sangre, náuseas y anorexia (Ximénez et al., 2009; Nagata et al., 2012; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016; Jackson-Akers et al., 2023). De esta manera, los reportes epidemiológicos estiman que a nivel mundial existen entre 40 y 50 millones de personas con amebiasis, de las cuales entre 40 000 a 100 000

mueren por dicha infección (Stanley, 2003; Nagata et al., 2012; Marie and Petri, 2014; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016).

1.2.2 Mecanismos de virulencia de *E. histolytica*

La capacidad de *E. histolytica* para causar daño a su huésped, es decir, su virulencia, depende de múltiples mecanismos moleculares, que implican la adhesión e inducción de apoptosis de las células del huésped, la degradación de mucina, la degradación de la matriz extracelular (ECM), la invasión de tejidos, la fagocitosis y los mecanismos de evasión del sistema inmunológico; en este último también intervienen otros factores del medio, como la microbiota intestinal, por lo que el grado de virulencia del parásito es difícil de predecir (Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). Sin embargo, se sabe que para el establecimiento de la infección es necesaria la unión y adhesión del trofozoíto al colon del huésped, para lo cual el trofozoíto cuenta en su superficie con una lectina con dominio de reconocimiento de carbohidratos para galactosa (Gal) y N-acetil-D-galactosamina (GalNac), nombrada Gal/GalNac, la cual hace posible la adhesión a la mucosa y a las células epiteliales del colon (Huston and Sateriale, 2011; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). La lectina Gal/GalNac está compuesta por dos subunidades: la subunidad pesada ligada a disulfuro (Hgl), subunidad intermedia y la subunidad ligera (Lgl). La subunidad Hgl contiene un dominio rico en cisteínas homólogo al receptor CD59 de humano, que le confiere propiedades adhesivas a *E. histolytica* para unirse a la mucosa intestinal, y la capacidad de evasión del sistema del complemento (Faust and Guillen, 2012). Otra proteína importante en el proceso de adhesión al epitelio intestinal del huésped es el complejo proteico EhCPADH, integrado por la proteína EhCP112 de 49 kDa y la proteína EhADH112 de 75 kDa. Esta última, tiene un dominio implicado en la adherencia de la ameba a su célula diana (García-Rivera et al., 1999; Serrano-Luna et al., 2013).

Debido a que el epitelio intestinal del humano está recubierto de moco, una sustancia, principalmente compuesta de mucinas altamente glicosilada, el siguiente paso para la colonización de las amebas es la degradación de los

carbohidratos presentes en la mucosa intestinal (Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). Para la primera línea de degradación de mucinas, los trofozoítos secretan glicosidasas y cisteína proteasas (CPs), las cuales también son importantes para la invasión extraintestinal, particularmente para la desintegración de la membrana basal y la entrada de *E. histolytica* en la circulación sanguínea (Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). Además, la liberación de las proteínas llamadas amebaporos induce citotoxicidad y apoptosis en las células del huésped, mediante la formación de poros en sus membranas (Huston and Sateriale, 2011). Entre los múltiples eventos intracelulares que se desencadenan en la célula blanco, se incluye un aumento del Ca^{2+} intracelular, producción de ROS (por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), pérdida de la integridad en la membrana, fragmentación del DNA, exposición de fosfatidilserina en la superficie celular y activación de caspasa-3 (Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). Las células en apoptosis son preferentemente fagocitadas por los trofozoítos de *E. histolytica* (Huston and Sateriale, 2011; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016).

La fagocitosis es un evento esencial para que los trofozoítos de *E. histolytica* obtengan alimento, además, este proceso también está relacionado con la invasión tisular, ya que la fagocitosis selectiva de células apoptóticas o muertas minimiza la respuesta inmunológica pro-inflamatoria del huésped (Huston and Sateriale, 2011; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016). Pese a la importancia de la fagocitosis en este organismo, aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares que se presentan en las fases iniciales de este proceso (desde la formación de la copa fagocítica hasta el cierre del fagosoma), ya que algunos de los componentes descritos en otros modelos de estudio no están presentes en los trofozoítos de *E. histolytica* (Huston and Sateriale, 2011).

1.2.3 Tráfico vesicular en *E. histolytica*

El tráfico vesicular, definido antes como el transporte y clasificación de moléculas entre los compartimientos intracelulares (organelos), no aplica totalmente en *E. histolytica*. Este parásito no cuenta con organelos clásicos visibles como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico o las mitocondrias (Ghosh et al., 1999;

Chávez-Munguía et al., 2000; Smith and Guillen, 2010). Característica importante ya que, el retículo endoplásmico es un conjunto de estructuras tubulares donde se transcribe, traduce, pliegan y empaquetan las proteínas para su transporte al aparato de Golgi, y este último es una estructura donde las proteínas son modificadas postraduccionalmente y empaquetadas para su transporte y/o secreción (Smith and Guillen, 2010). A pesar de la carencia de organelos típicos en *E. histolytica*, el empleo de marcadores que evidencien las estructuras intracelulares tradicionales de una célula eucarionte ha permitido identificar a vesículas dispersas en el citoplasma, similares al retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Figura 6) (Smith and Guillen, 2010). El retículo endoplásmico se ha visualizado por la identificación de la proteína BiP (por sus siglas en inglés *Binding immunoglobulin Protein*), la proteína calreticulín, la proteína SERCA y colorantes fluorescentes como ER-Tracker™ Blue-White DPX (E12353) (Ghosh et al., 1999; Smith and Guillen, 2010; Martínez-Higuera et al., 2013; Constantino-Jonapa et al., 2018). El aparato de Golgi se ha identificado por marcadores fluorescentes como DiOC6 y NBD-ceramida (Mazzuco et al., 1997; Ghosh et al., 1999; Smith and Guillen, 2010; Constantino-Jonapa et al., 2018). Además, el uso de marcadores fluorescentes con afinidad por organelos ácidos ha permitido identificar lisosomas y endosomas en proceso de maduración (Figura 6) (Constantino-Jonapa et al., 2018; Nakada-Tsukui et al., 2005).

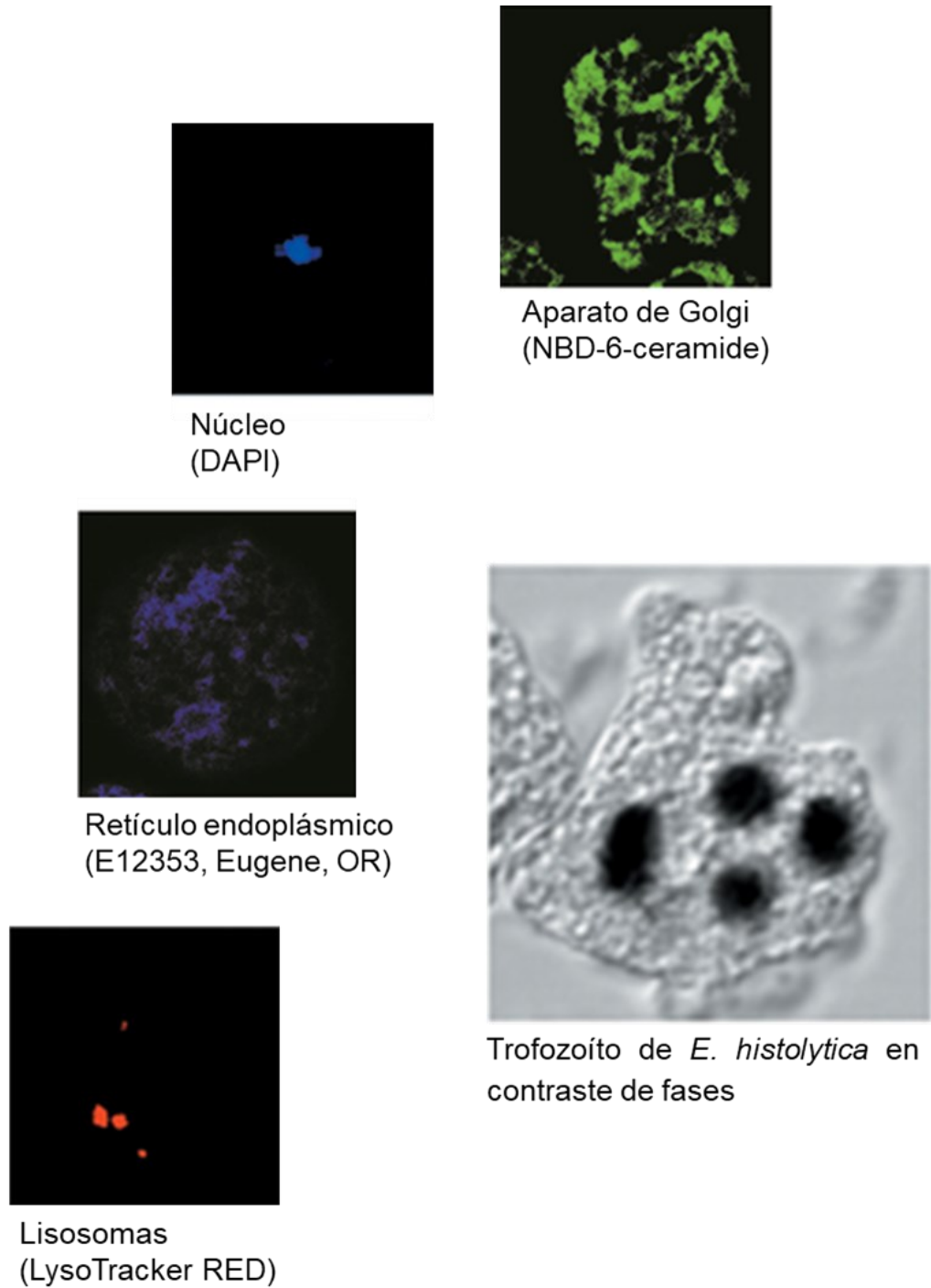


Figura 6. Compartimientos intracelulares de *E. histolytica*.

El trofozoíto de *E. histolytica* no cuenta con retículo endoplásmico y aparato de Golgi clásicos, por lo que se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia analizada por microscopía confocal para definir las regiones que ocupan dichas estructuras. Imagen modificada de Constantino-Jonapa et al. (2018).

El tráfico vesicular en *E. histolytica* al igual que en otros eucariontes se puede explicar de forma simplificada en dos eventos, la exocitosis y la endocitosis. La exocitosis es el transporte y la secreción hacia la membrana plasmática de moléculas que destacan generalmente por su implicación en el proceso de colonización antes descrito (adhesión, inducción de citotoxicidad y fagocitosis) (Huston and Sateriale, 2011). La endocitosis en *E. histolytica* es un proceso necesario para la obtención de nutrientes y un mecanismo de virulencia, ya que el trofozoíto en el intestino de su huésped se alimenta de eritrocitos, leucocitos, células epiteliales y bacterias (Smith and Guillen, 2010; Marie and Petri, 2014). Este parásito tiene diferentes tipos de endocitosis: pinocitosis (internalización de fases fluidas), fagocitosis (internalización de células completas vivas o muertas) y trogocitosis (internalización de fragmentos de células vivas) (Aley et al., 1984; Nozaki y Nakada-Tsukui, 2006; Ralston et al., 2014). Al igual que en otros organismos, el tráfico vesicular en *E. histolytica* está finamente regulado por múltiples GTPasas Rab (Saito-Nakano et al., 2004; Nakada-Tsukui et al., 2010).

La fagocitosis de eritrocitos (eritrofagocitosis) en *E. histolytica* es un evento que implica la adhesión al eritrocito, seguido de la remodelación del citoesqueleto y la formación de la copa fagocítica, estructura que cubre completamente al eritrocito con el propósito de internalizarlo en una vesícula (diámetro entre 3 a 5 μm) (Saito-Nakano et al., 2004; Babuta et al., 2015). En este proceso intervienen múltiples proteínas, siendo de relevancia para este trabajo, EhRab5 y EhRab7A, ambas proteínas están dispersas en el plasmática en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis, se relocalizan en estructuras circulares denominadas vacuolas prefagosomales o PPV (por sus siglas en inglés *Prephagosomal vacuoles*) (Figura 7) (Saito-Nakano et al., 2004). Las PPVs tiene un proceso de maduración que implica: (1) el transporte hacia a las PPVs de dos proteínas degradativas, cisteína proteasa 2 (CP2) y amebaporos A; (2) la pérdida de Rab5 en su membrana de las PPVs; (3) la acidificación gradual de las a las PPVs; y (4) la fusión de las PPVs a los fagosomas (Figura 7) (Saito-Nakano et al., 2004).

Rab7A media la fusión de las PPVs con los fagosomas, estructuras donde inicia la degradación del eritrocito (Saito-Nakano et al., 2004, 2007). Rab7A, una vez

en el fagosoma se desprende de la membrana de dicha estructura aproximadamente entre los 30 y 60 min de eritrofagocitosis (Saito-Nakano et al., 2004, 2007). En este contexto, Nakada-Tsukui et al. (2005) identificó a las proteínas del retrómero en *E. histolytica*, por la interacción de este complejo con Rab7A.

1.2.4 El retrómero en *E. histolytica*

En *E. histolytica*, como en otros parásitos protozoarios, el retrómero está formado por cuatro proteínas: EhVps26 (EHI_062490), EhVps29 (EHI_025270), EhVps35 (EHI_002990) y EhSNX1 (EHI_060320) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Watanabe et al., 2020). El heterodímero SNX-BAR, se considera ausente en este organismo, ya que este parásito solo cuenta con proteínas SNX sin el dominio BAR necesario para la unión a otra proteína SNX (Nakada-Tsukui et al., 2005; Watanabe et al., 2020). EhSNX1 es la única proteína de tipo SNX en este parásito con unión a PI(3)P en la membrana endosomal e interacción con dos componentes del retrómero (EhVps26 y EhVps35), sin embargo, su función en el retrómero aún no está definida (Watanabe et al., 2020).

La identificación del retrómero en *E. histolytica* se realizó mediante un ensayo de *pull down* para identificar las proteínas que interaccionan con GST-Rab7A, el cual fue analizado por dos tipos de espectrometría de masas, MS/MS (por sus siglas en inglés *Tandem Mass Spectrometry*) y LC/MS (por sus siglas en inglés *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (Nakada-Tsukui et al., 2005). En cuanto al análisis *in silico* de EhVps26, EhVps29 y EhVps35 se reportó un mayor porcentaje de identidad con sus homólogas en humano, aunque en ningún caso este es superior al cincuenta por ciento (Tabla 3) (Nakada-Tsukui et al., 2005). La interacción directa entre los componentes del retrómero se comprobó mediante un ensayo de doble híbrido en levadura. Específicamente, la región amino de EhVps26 (1-295 aa) interacciona con la región amino de EhVps35 (1-305 aa), mientras EhVps29 interacciona con la región carboxilo de EhVps35 (583-757 aa) (Nakada-Tsukui et al., 2005). Por lo tanto, los componentes del retrómero interaccionan de forma similar a la reportada en otros organismos (Figura 7 y 8) (Nakada-Tsukui et al., 2005).

Tabla 3. Comparación de las características de las proteínas que integran el retrómero en *E. histolytica*, *H. sapiens* y *S. cerevisiae*.

	<i>E. histolytica</i> (Amiba)					<i>H. sapiens</i> (Humano)			<i>S. cerevisiae</i> (Levadura)		
	Tamaño (aa)	Peso molecular (kDa)		Identidad (%)		Tamaño (aa)	Peso molecular (kDa)		Tamaño (aa)	Peso molecular (kDa)	
		Reportado	Teórico	Eh/Hs	Eh/Sc		Reportado	Teórico		Reportado	Teórico
Vps26	413	60 ^I	48	44%	38%	327	36A ^G /38 ^{HC}	38	379	50 ^F	43
Vps29	157	25 ^I	20.8	46%	35%	182	20 ^{A,G}	20	282	30 ^F	31
Vps35	757	71 ^B	87.2	27%	22%	796	75 ^G /85 ^C 87 ^{A,G} /98 ^H	92	944	110 ^{E,F}	109

^A Damen et al., 2006

^B Díaz-Valdez, 2018

^C Haft et al., 2000

^D Nakada-Tsukui et al., 2005

^E Paravicini et al., 1992

^F Seaman et al., 1998

^G Zhao et al., 2007

^H Fjorback et al., 2012

^I Srivastava et al., 2017

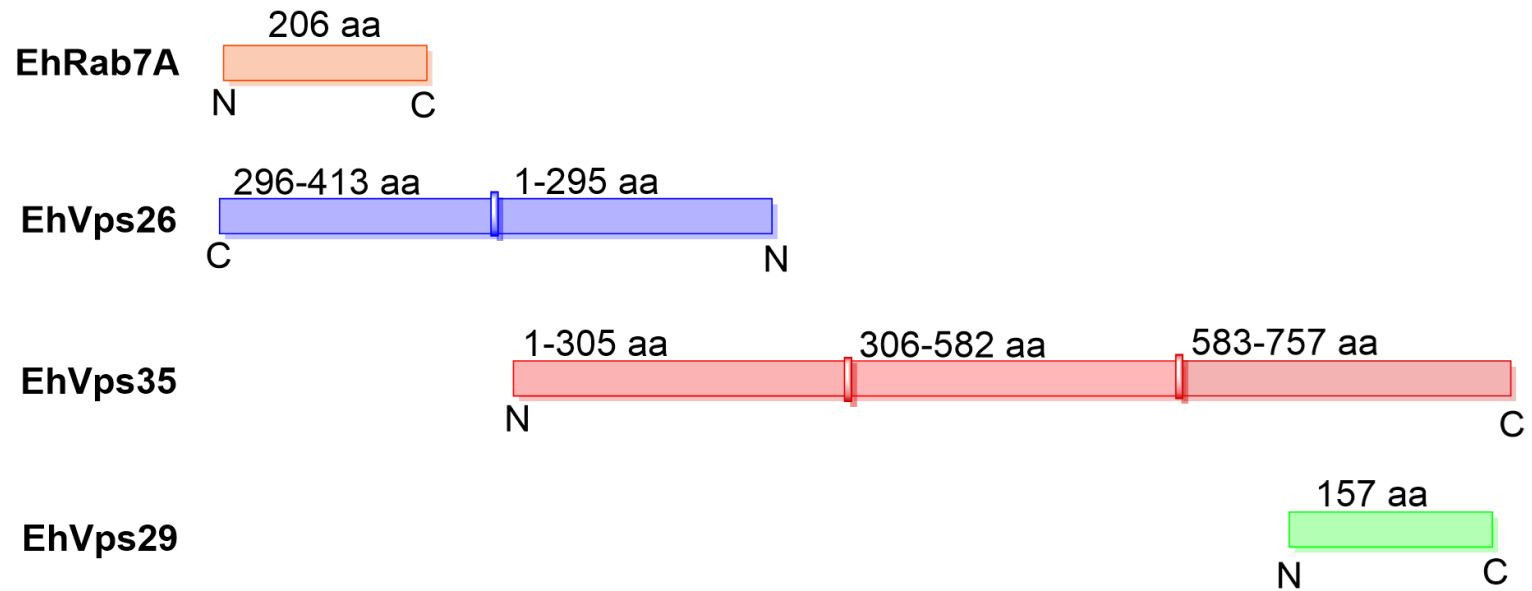
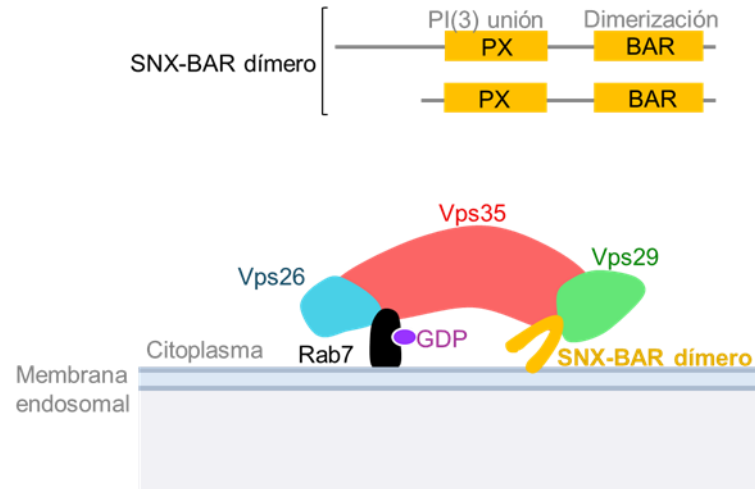


Figura 7. Mapa de las interacciones de las proteínas EhVps26, EhVps29, EhVps35 y EhRab7A.

EhVps35 es el componente central del retrómero en *E. histolytica* de forma similar a lo reportado en otros organismos. La región amino de EhVps35 interacciona con EhVps26, mientras la región carboxilo de EhVps35 interacciona con EhVps29. Únicamente la región amino de EhVps26 interacciona con EhRab7A. Imagen elaborada con los datos de Nakada-Tsukui et al., 2005.

La interacción entre EhVps26 y EhRab7A descrita en ensayos de inmunoprecipitación inicialmente, es importante al menos por tres razones: i) EhRab7A se ubica en los PPV, estructuras formadas en la eritrofagocitosis caracterizadas por el doble marcaje de EhRab5 y EhRab7A, presentes hasta los 30 min de eritrofagocitosis (Saito-Nakano et al., 2004, 2007; Nakada-Tsukui et al., 2005); ii) EhRab7A media la fusión de la PPV con el fagosoma, donde inicia la degradación de la carga endosomal (Saito-Nakano et al., 2004, 2007; Nakada-Tsukui et al., 2005); y iii) EhRab7A es nombrada efector del retrómero (regula la función del retrómero), ya que la interacción entre el retrómero y EhRab7A es importante porque evita la disociación del retrómero y la membrana endosomal (Nakada-Tsukui et al., 2005; Bonifacino y Hurley, 2008; Balderhaar et al., 2010; Priya et al., 2015). En este parásito de forma similar EhRab7A, solo tiene interacción con el retrómero cuando está en su forma activa (EhRab7A-GTP) (Nakada-Tsukui et al., 2005). La interacción entre Rab7A y el retrómero en otros organismos ocurre entre las proteínas Vps35 y Rab7 (Haft et al., 2000; Zhao et al., 2007; Lucas et al., 2016). Sin embargo, en *E. histolytica* EhRab7A interacciona solo con la región C-terminal de la proteína EhVps26 (Figura 7 y 8) (Nakada-Tsukui et al., 2005).

A)



B)

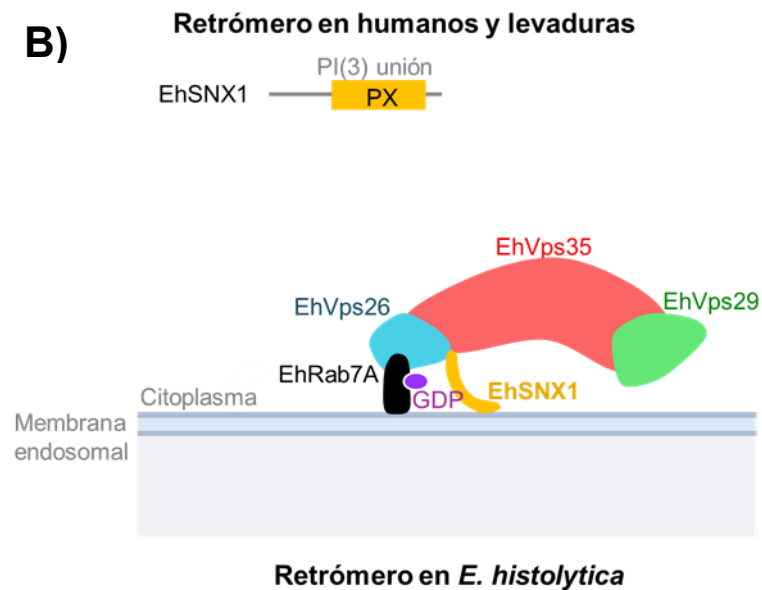


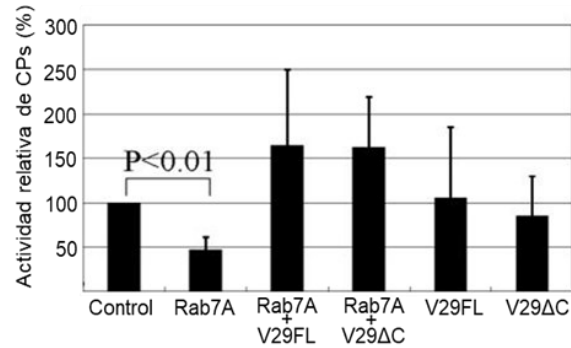
Figura 8. Representación comparativa entre el retrómero canónico de humano y levadura con el modelo del retrómero en *E. histolytica*.

Las principales diferencias entre el retrómero canónico y este complejo en *E. histolytica* son: 1) la interacción entre el retrómero canónico y Rab7 unida a GTP, ocurre entre Vps26, Vps35 y Rab7, mientras en amibas, solo EhVps26 interacciona con Rab7A unida a GTP; y 2) la presencia de proteínas SNX con ausencia del dominio BAR, por lo que en este parásito no forman dímeros. A) El retrómero canónico descrito en los organismos modelo humano y levadura se compone de cinco proteínas, Vps35, Vps26, Vps29 y un dímero de proteínas SNX-BAR. B) En *E. histolytica* el retrómero se compone de EhVps26, EhVps29, EhVps35 y SNX1. Imagen elaborada con la información de Nakada-Tsukui et al., 2005; Bonifacino and Hurley, 2008; Priya et al., 2015; Trousdale and Kim, 2015; Srivastava et al., 2017; y Watanabe et al., 2020.

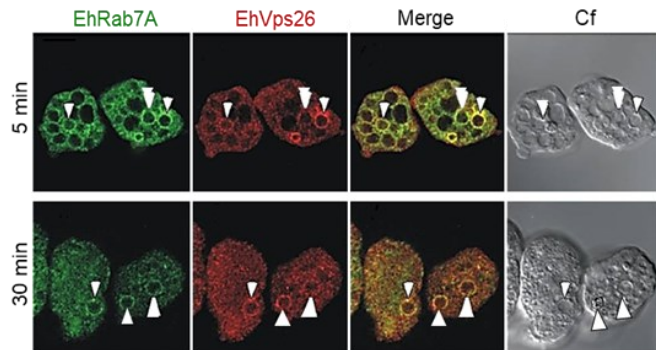
Un indicio de la función del retrómero en *E. histolytica* se basa en la relación entre el nivel de actividad de las CPs y la sobreexpresión de EhRab7A y/o EhVps26 en trofozoítos. Al sobreexpresarse EhRab7A se produjo una mayor fusión de las PPV a los fagosomas, observándose fagosomas de tamaños mayores y una disminución en la actividad de las CPs (Figura 9, A) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Saito-Nakano et al., 2007). Las proteínas CPs al igual que otras hidrolasas transportadas desde el aparato de Golgi a endosomas, son reconocidas por un receptor que funciona como un adaptador que media su transporte (Nakada-Tsukui et al., 2005; Alberts et al., 2016). La sobreexpresión simultánea de EhRab7A y EhVps26 en trofozoítos, provocó que la actividad de las CPs regresara a condiciones basales (Figura 9, A), por lo que, Nakada-Tsukui et al. (2005) sugieren que el retrómero podría reciclar receptores de CPs, denominados CPBF (por sus siglas en inglés *Cysteine protease-binding protein family*), las cuales podrían suplir la función de receptores como Sortilina, M6PR o Vps10 implicados en el transporte de hidrolasas al aparato de Golgi en este parásito (Furukawa et al., 2012, 2013b; Nakada-Tsukui et al., 2012). Sin embargo, a veinte años de la identificación del retrómero en *E. histolytica*, se desconocía hasta esta tesis, una proteína blanco de reciclaje del retrómero.

La localización subcelular de las proteínas EhVps26, EhVps29 y EhSNX1 se ha estudiado por microscopía confocal en trofozoítos en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis. EhVps26, EhVps29 y EhSNX1 en condiciones basales se ubican dispersas en el citoplasma y co-localizan en membranas vacuolares, mientras que durante la eritrofagocitosis se encuentran alrededor de las PPVs y los fagosomas (Figura 9, B-D) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020).

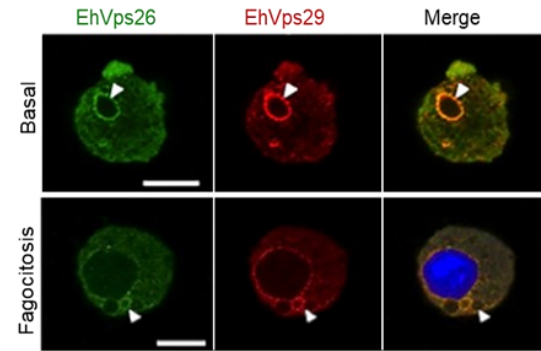
A)



B)



C)



D)

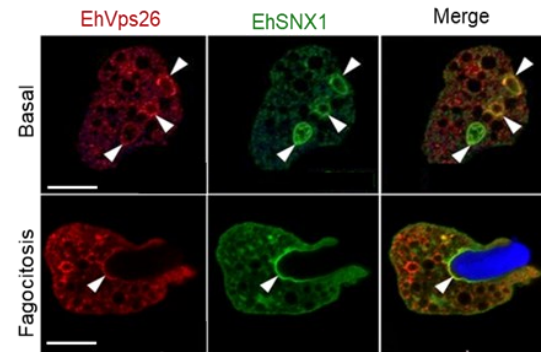


Figura 9. Actividad de las cisteína proteasas en relación con la sobreexpresión de EhVps26, así como la localización de EhVps26, EhVps29 y EhSNX1.

Actividad relativa de las cisteína proteasas (CPs) mediante un sustrato fluorescente de las mismas en trofozoítos con sobreexpresión de Rab7A, así como la sobreexpresión simultánea de EhRab7A y EhVps26. V27FL: EhVps26 completa. V26ΔC: región 1 a 295 aa de EhVps26. B) Localización de EhVps26 y EhRab7A en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos a los 5 y 30 min de fagocitosis. C) Localización de EhVps26 y EhVps29 en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos en condiciones basales y a los 15 min de fagocitosis de células CHO. D) Localización de EhVps26 y EhSNX1 en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos en condiciones basales y a los 15 min de fagocitosis de células CHO. Triángulo blanco: co-localización entre EhRab7A/EhVps26, EhVps29/EhVps26 o EhVps26/EhSNX1. Células CHO teñidas de azul con Cell-Tracker. Barra de escala, 10 nm. Imágenes modificadas de gNakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; y Watanabe et al., 2020.

Clásicamente, la proteína retrómera responsable del reconocimiento de la proteína blanco de reciclaje es Vps35, además de ser el componente central de este complejo proteico. Sin embargo, en *E. histolytica* la proteína EhVps35 se ha estudiado poco, únicamente Nakada-Tsukui et al., (2005) publicaron, como se mencionó antes, la interacción de EhVps35 (EHI_002990) con EhVps26 y EhVps29. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se inició el estudio de EhVps35 con un análisis *in silico* que identificó a cinco isoformas de esta proteína, denominadas EhVps35-A (EHI_086580), EhVps35-B (EHI_041956), EhVps35-C (EHI_002990), EhVps35-D (EHI_096520) y EhVps35-E (EHI_168080) (Díaz-Valdez, 2018). Profundizando en el estudio de la isoforma EhVps35-C (en adelante referida únicamente como EhVps35), se produjo un anticuerpo específico para proteína (Figura 10). Adicionalmente, se ha realizado una caracterización de EhVps35 durante la eritrofagocitosis utilizando ensayos de RT-qPCR (*Quantitative reverse transcription* PCR, por sus siglas en inglés), *western blot* y microscopía confocal (Figura 11). El estímulo de trofozoítos con eritrocitos produjo un incremento en etapas iniciales y un descenso en etapas tardías de la fagocitosis a nivel transcripcional del gen *Ehvps35* (Figura 11, A). Sin embargo, estas variaciones fueron marginalmente significativas a nivel traduccional (Díaz-Valdez, 2018) (Figura 11, B). Por las imágenes de microscopía confocal se observó un cambio en la localización de EhVps35, producto del estímulo con eritrocitos, ya que en condiciones basales se distribuye en cúmulos puntuales en el citoplasma y durante los ensayos de eritrofagocitosis se relocaliza cerca de los eritrocitos fagocitados y formando estructuras circulares en el citoplasma (Figura 11, C) (Díaz-Valdez, 2018). Por lo que, la proteína EhVps35, debido a los cambios observados por el estímulo con eritrocitos, podría tener un papel en uno de los principales mecanismos de virulencia de *E. histolytica*, la fagocitosis. Además, al ser EhVps35 el componente central del retrómero, es necesario para el reclutamiento de los componentes de este complejo y podría tener una función en el reconocimiento de las proteínas recicladas hacia la membrana plasmática y el aparato de Golgi.

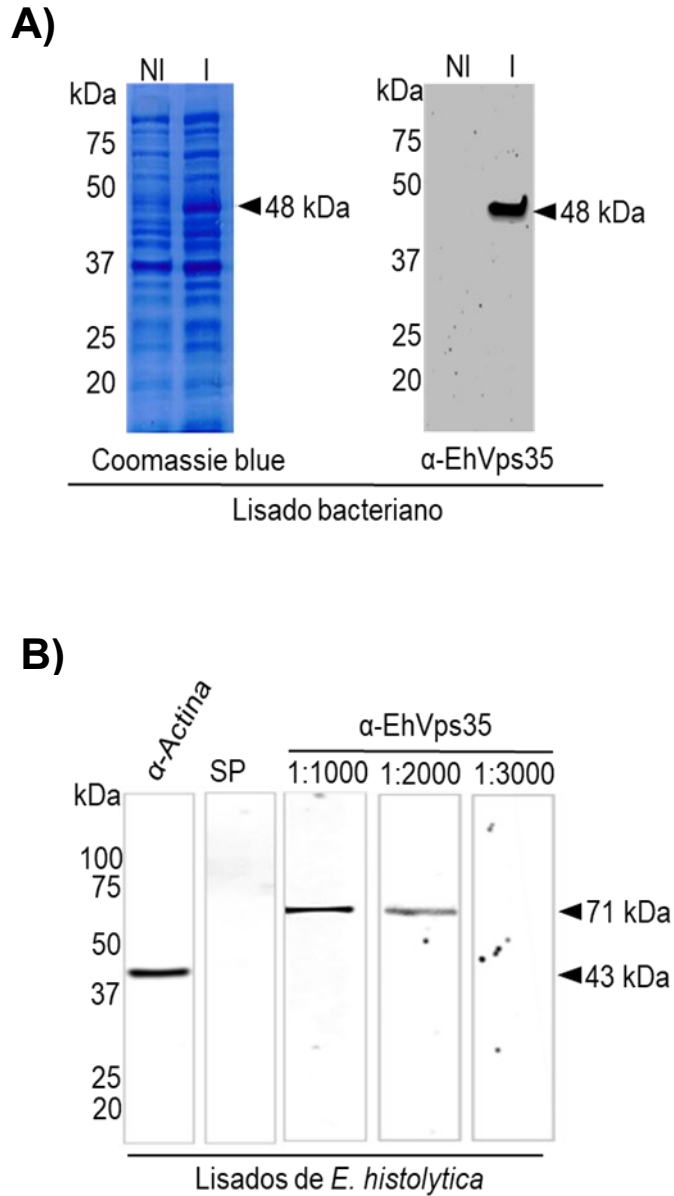


Figura 10. Reconocimiento del suero inmune α -EhVps35.

Se realizó la inmunización de ratones BALB/c con el péptido específico para EhVps35 (N₃₀-ESEIMNAALNNKDLSK-C₄₅) para obtener el suero inmune α -EhVps35. A) Ensayos de *western blot* realizados contra extractos de bacterias *E. coli* BL21(DE3) sin inducción (NI) e inducidas (I) para la producción de la proteína rEhVps35-N. A la izquierda se muestra un gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie procedente de bacterias NI e I para la producción de la proteína rEhVps35-N. B) Ensayos de *western blot* realizados con lisados de trofozoítos. SP: suero preinmune. Como control positivo se utilizó α -actina para los extractos totales de trofozoítos. Imágenes modificadas de Díaz-Valdez, 2018.

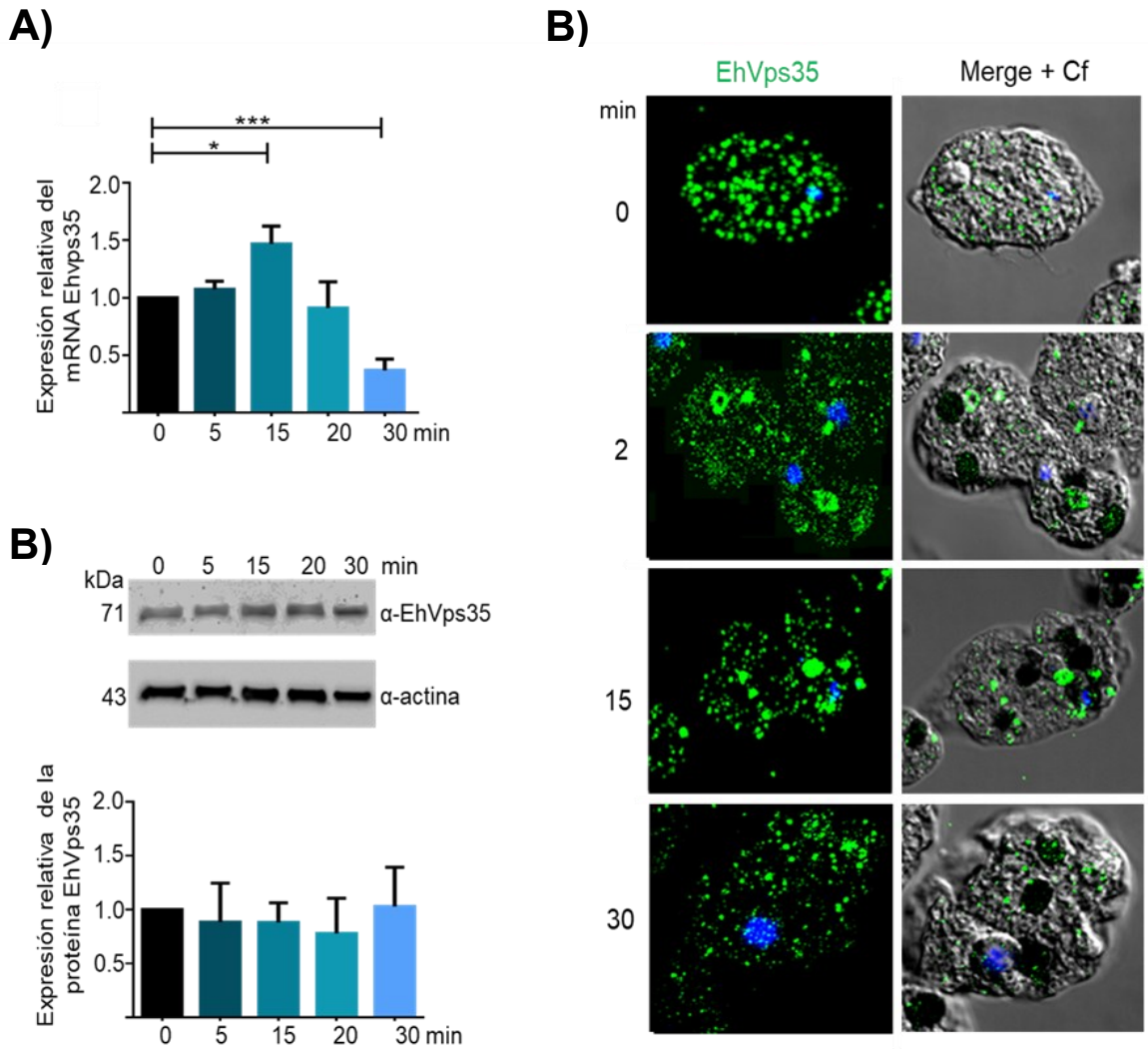


Figura 11. Expresión y localización de la proteína EhVps35 en ensayos de eritrofagocitosis.

Trofozoítos de *E. histolytica* clona A, fueron incubados con eritrocitos humanos por 2, 15, 20 y 30 min para realizar los ensayos de eritrofagocitosis. A) Análisis de la expresión relativa del mRNA de *EhVps35* utilizando de ensayos de RT-qPCR (*Quantitative reverse transcription PCR*, por sus siglas en inglés). B) Expresión relativa de EhVps35 utilizando lisados de trofozoítos analizados por *western blot*. C) Localización de EhVps35 en trofozoítos procesados para microscopía confocal. Imágenes modificadas de Díaz-Valdez, 2018.

2. JUSTIFICACIÓN

El reciclaje de proteínas es un mecanismo esencial para múltiples funciones celulares. En el protozoo parásito *T. gondii* se ha reportado que el retrómero recicla proteínas esenciales para su virulencia. Sin embargo, en *E. histolytica* únicamente se ha demostrado la presencia del retrómero y aún se desconoce la relación entre el reciclaje de proteínas y el establecimiento de la infección.

Por lo que es necesario estudiar la función del retrómero, especialmente de la proteína central de este complejo, EhVps35, con el fin de demostrar la participación del retrómero en el reciclaje de proteínas y su relación con los mecanismos de virulencia de *E. histolytica*. Lo cual, podría contribuir al desarrollo de nuevos fármacos contra la amebiasis.

3. HIPÓTESIS

En *E. histolytica* la proteína EhVps35 participa en el reciclaje de proteínas, por lo que se relaciona con múltiples procesos celulares.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la participación de EhVps35 en el reciclaje de proteínas y su impacto en los mecanismos de virulencia de *E. histolytica*.

4.2 Objetivos particulares

- Investigar la localización de la proteína EhVps35 en trofozoítos en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis.
- Identificar las proteínas que interaccionan con EhVps35.
- Evaluar la participación de EhVps35 en el reciclaje de proteínas.
- Estudiar el papel de EhVps35 en la adhesión, la fagocitosis, la migración y virulencia *in vivo* usando trofozoítos mutantes.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

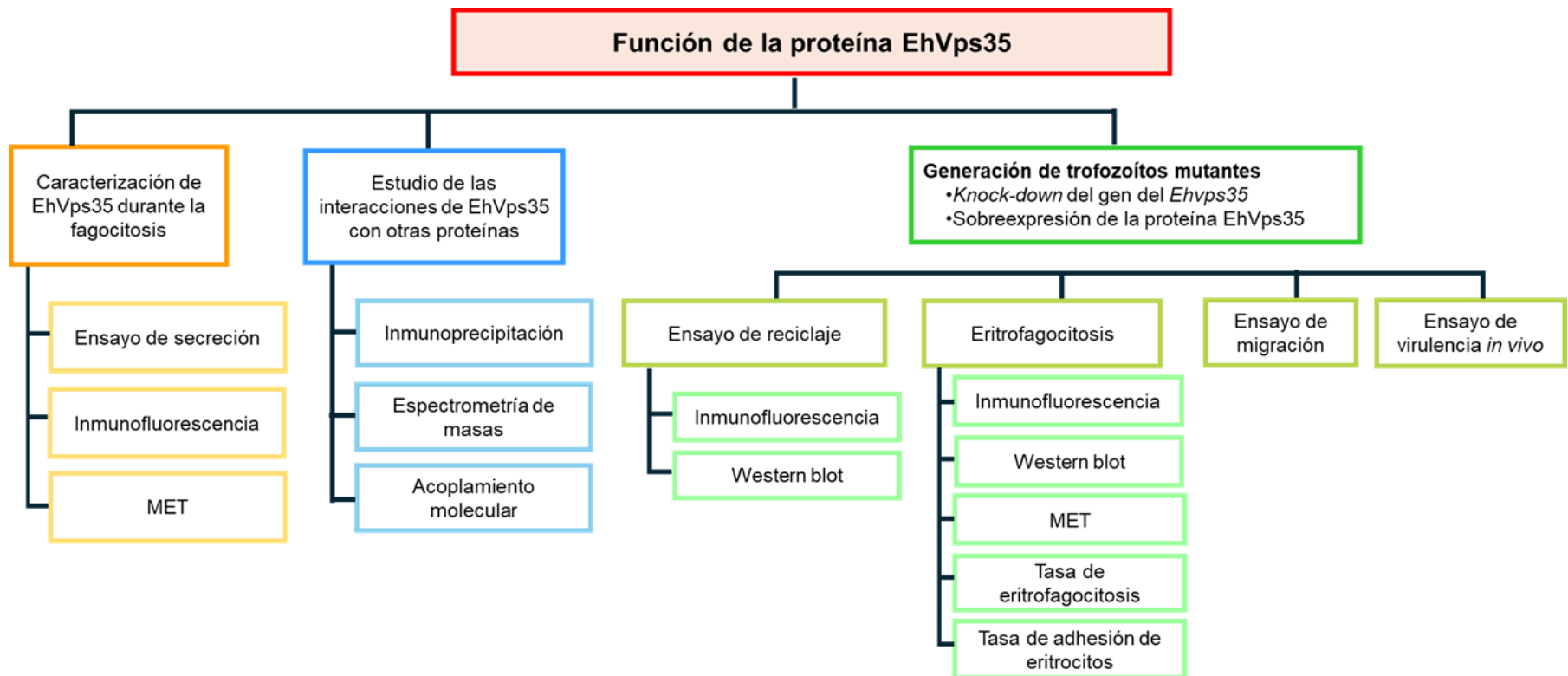


Figura 12. Estrategia experimental.

Se realizó la caracterización de EhVps35 en trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS con ensayos de secreción, inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión (MET). La identificación de las interacciones de EhVps35 con otras proteínas se realizó con ensayos de inmunoprecipitación, espectrometría de masas y acoplamiento molecular *in silico*. Se analizó la función de EhVps35 en el reciclaje de proteínas, mediante trofozoítos mutantes en los que se afectó la expresión de EhVps35. Adicionalmente, los trofozoítos mutantes fueron utilizados para estudiar la localización celular y cantidad de la proteína blanco de reciclaje, EhVps35 y otras proteínas que participan en la eritrofagocitosis; así como para estudiar la virulencia de *E. histolytica* con ensayos de eritrofagocitosis, migración y virulencia *in vivo*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS (Orozco, *et al.*, 1980) fueron cultivados en un medio axénico TYI-S-33 a 37 °C (Diamond, *et al.*, 1978) suplementado con 10% de suero bovino, una mezcla de vitamina Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de penicilina (Lakside) y 1.4 mg/ml de estreptomicina (Lakeside).

6.2 Viabilidad celular

Previo al uso de trofozoítos en los ensayos antes mencionados se verificó la viabilidad celular empleando una tinción con azul tripán al 0.2% en PBS 1X (Bañuelos *et al.*, 2012). El porcentaje de viabilidad en cada experimento fue obtenido el conteo de 100 células utilizando una cámara de Neubauer. Las células que fueron teñidas con el colorante azul tripán se consideraron muertas. Los valores obtenidos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6.

6.3 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados por 10 min en hielo para revertir la adhesión a cualquier sustrato. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó a 1 700 rpm por 7 min (centrífuga Neofuge 1600R). La pastilla obtenida se resuspendió en PBS 1X y se centrifugó en las mismas condiciones, la nueva pastilla se resuspendió en una mezcla de inhibidores de proteasas con la siguiente proporción: 1 ml de PHMB 100 mM por cada 30 millones de trofozoítos de *E. histolytica*, 25 µl de E-64 1 mg/ml por cada 10 millones de amibas y 20 µl del cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM, benzamidina 49 mM, aprotinina 0.087 mM, peptatina A 0.1777 mM, leupeptina 0.2858 Mm y E-64 0.6824 mM) por cada 10 millones de amibas. Después, la muestra se incubó en nitrógeno líquido por 5 min y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Antes de ser empleadas, las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro NanoDrop™ Life (Thermo Scientific) y 50 µg de la muestra se visualizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes

(SDS-PAGE), para lo cual, de forma previa las muestras se incubaron a 100 °C por 5 min, con un volumen de buffer de muestra 2X (Tris-base 0.125 M a pH 6.8, SDS 4%, glicina 20%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.1%).

6.3 Ensayos de western blot

Una muestra de 50 μ g de los extractos proteicos, analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%, para lo que de forma previa las muestras se incubaron a 100 °C por 5 min, con un volumen de buffer de muestra 2X (Tris-base 0.125 M a pH 6.8, SDS 4%, glicina 20%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.1%). Después, el gel de poliacrilamida se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por 1 h con 15 min a 400 mA utilizando buffer de transferencia (Tris-base 0.025 M, Glicina 0.192 M, Metanol 10%) y el equipo Bio-Rad modelo Mini Trans-Blot® Cell. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se verificó mediante una tinción con rojo Ponceau (0.1% de rojo Ponceau y 1% de ácido acético). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloqueó con leche descremada al 5 % en PBS 1X por 16 h con agitación constante a 4 °C y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Los ensayos *western blot* se iniciaron con la incubación de la membrana de nitrocelulosa en una solución con anticuerpos primario en leche descremada al 5 % en PBS 1X por 16 h a 4 °C en agitación contante. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal en ratón α -His (1:500) (Roche), policlonal en ratón α -EhVps35 (1:500), policlonal en rata α -EhVps23 (1:500) (Galindo et al., 2021), EhTom1 (1:500) (Galindo, 2022), policlonal en hamster α -ADH (1:500) (Galindo et al., 2022), policlonal en conejo α -EhVps36 (1:500) (Díaz-Hernández et al., 2023), policlonal en en conejo α -CP112 (1:3000) (García-Rivera et al., 1999), policlonal en ratón α -EhVps32 (1:500) (Avalos-Padilla et al., 2015) y el monoclonal de ratón α -Actina (1:3000), donado por el Dr. Manuel Hernández, Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN. A continuación, se realizaron 6 lavados de 6 min con PBS 1X-Tween 20 a 0.05%. La membrana se incubó en una solución con anticuerpo secundario en leche al 5% en PBS 1X por una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Los anticuerpos secundarios

utilizados fueron los siguientes: α -IgG de ratón HRP (Zymed), α -IgG de rata HRP (Zymed), α -IgG de conejo (Zymed) y α -IgG de hamster (Zymed) en una dilución 1:10000. Finalmente, la membrana se lavó como se mencionó anteriormente y el revelado se realizó por el sistema ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE-Healthcare, RPN2132) en el equipo MicroChemi 4.2.

En algunos experimentos posterior al ensayo de *western blot*, se realizó un análisis densitométrico en cada muestra utilizando el programa ImageJ. Los valores obtenidos de cada muestra se normalizaron con respecto a los valores del control (actina o EhVps23) y a la condición basal: Los valores normalizados de la densitometría fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6, para determinar si existieron diferencias significativas entre las muestras.

6.4 Clonaciones de los fragmento *Ehvps35*_(1-445 pb), *Ehvps35*_(1-1428pb), *Ehvps35*_(1429-2274 pb) y el gen *Ehvps35*

6.4.1 Producción de cDNA de trofozoítos de *E. histolytica*

Un millón de trofozoítos de *E. histolytica* (HM1: IMSS) fueron empastillados como se mencionó antes, posteriormente se resuspendieron en 200 μ l de TRIzol® (Invitrogen). La mezcla homogenizada se almacenó a -70 °C hasta su uso. A la mezcla de trofozoítos y TRIzol® se le agregaron 30 μ l de cloroformo y se incubó por 3 min. Posteriormente, se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5402). Se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 500 μ l de isopropanol por cada mililitro de TRIzol® (Invitrogen). Se mezcló por inversión y se incubó por 10 min para ser centrifugado después a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5402). Se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó dos veces con 500 μ l de etanol al 75% y se centrifugó a 8 000 rpm por 5 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5402). La pastilla se resuspendió en 30 μ l de agua DEPC (agua con dietilpirocarbonato) para cuantificar el RNA en el espectrofotómetro NanoDrop™ Life (Thermo Scientific) y se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio usando 750 ng de la muestra.

Una vez verificado que la muestra no estaba degradada, se procedió a la producción de DNA complementario (cDNA). Finalmente, usando el kit “First Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR” (Thermo Scientific) en las condiciones descritas por el proveedor, se produjo a partir de RNA, el cDNA de *E. histolytica*.

6.4.2 Diseño de *primers*

Los *primers* se diseñaron usando la plataforma Primer3 y la secuencia del gen *Ehvps35* (NCBI: EHI_002990) de *E. histolytica*. Dichos *primers* flanquean las regiones correspondientes a 1-454 pb (*Ehvps35* (1-454 pb)), 1-1428 pb (*Ehvps35* (4-1501 pb)), 1429-2274 pb (*Ehvps35* (1428-2274 pb)) y el gen completo de *Ehvps35* (*Ehvps35* (1-2274 pb)).

Los *primers* se analizaron en el programa OligoAnalyzer 3.1 para descartar la formación de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros a la temperatura de alineamiento (T_M) de los mismos. A cada *primer* se le adicionó un par de nucleótidos cisteína o guanina hacia el extremo 5', además de la secuencia que reconocen las enzimas *KpnI* (*primer* sentido) o *BamHI* (*primer* antisentido) (Tabla 4). Además, al *primer* en sentido del gen *Ehvps35* y el fragmento *Ehvps35* (4-1501 pb) llevaron la secuencia codificante para HA después de la secuencia de reconocimiento de la enzima. Por último, se verificó la especificidad de los *primers* con un alineamiento de su secuencia en las bases de datos de NCBI y AmoebaDB.

6.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos *Ehvps35* (1-454 pb), *Ehvps35* (4-1512 pb), *Ehvps35* (1428-2274 pb) y el gen completo de *Ehvps35* (*Ehvps35* (4-2274 pb)) se hicieron usando el cDNA de *E. histolytica*, los *primers* sentido) y antisentido correspondientes (Tabla 4), así como el kit “One Taq® DNA Polymerase (BioLabs, M0480L). Para los ensayos de PCR se ocuparon las siguientes condiciones: temperatura inicial de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 30 seg), alineamiento de *primers* (T_M por 60 seg) y

amplificación (68°C por 1 min), terminando con una amplificación final de 5 min a 58 °C. La T_M utilizada para cada PCR corresponde a la temperatura citada en la Tabla 4.

Tabla 4. Primers diseñados para la amplificación de fragmentos del gen *Ehvps35*

		Enzima de restricción	Secuencia del primer	T _m (°C)	Producto (pb)
pNeo	<i>Ehvps35-ha</i>	S KpnI	CTGGTACCATG <u>TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT</u> AGTCGTCCACAACGAGA	67.3	2318
		A BamHI	GGGGATCCTTAAAGTTGAATGTCAGCAAAGTTAGTATTTTCTTGAGCTGAAATAGT		
	<i>Ehvps35_1-ha</i>	S KpnI	CTGGTACCATG <u>TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT</u> AGTCGTCCACAACGAGA	67.5	1547
		A BamHI	GGGGATCCTTACATTTCTGCATCTCCTCCAATTAATGGAAGTAATCTAC		
pL4440	<i>Ehvps35_S</i>	S KpnI	CCGGTACCATGAGTCGTCCACAACGAG	64.1	454
		A BamHI	GGGGATCCTGTTGGATGTTGAACCGCTC		
pColdI	<i>Ehvps35_C</i>	S KpnI	CCGGTACCGAGGAAGAAATTGGAGTTGATG		846
		A BamHI	GGGGATCCTTAAAGTTGAATGTCAGCAAAGTTAG		

Color azul: secuencia correspondiente a la etiqueta de HA

Secuencia subrayada: corresponde a la secuencia reconocida por la enzima de restricción *KpnI* o *BamHI*

S: primer sentido

A: primer antisentido

T_M: temperatura de alineamiento de los primers

6.4.4 Clonación de los fragmentos *Ehvps35*₍₁₋₄₅₄₎, *Ehvps35*₍₄₋₁₅₁₂₎, *Ehvps35*_(1429-2274 pb) y el gen *Ehvps35*₍₄₋₂₂₇₄₎ de *E. histolytica* en el vector *pJET1.2/blunt*

Se realizó un ensayo de PCR utilizando el kit “Q5® High-Fidelity DNA Polymerase” (BioLabs, M0491) según las especificaciones del proveedor. En los ensayos de PCR se ocuparon las siguientes condiciones: temperatura inicial de desnaturalización a 98 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos que incluyen desnaturalización (98 °C por 10 segundos), alineamiento de *primers* (T_M por 30 segundos) y amplificación (72°C por 1 min), terminando con la amplificación final de 2 min a 72 °C. La T_M utilizada para cada PCR corresponde a la temperatura citada en la tabla 4. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando como buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). El amplificado se visualizó por tinción de los geles con bromuro de etidio, después, la banda se cortó del gel de agarosa y se purificó con el kit “GeneJET Gel extraction” (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop™ Life (Thermo Scientific) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El DNA purificado se ligó al vector de clonación *pJET1.2/blunt* (Thermo Scientific) usando el kit “CloneJET PCR Cloning” (Thermo Scientific) según las especificaciones del proveedor y los productos de la ligación (*pJET1.2/Ehvps35_S*, *pJET1.2/Ehvps35_1-ha*, *pJET1.2/Ehvps35-ha*, *pJET1.2/Ehvps35_2*) se almacenarán a -20 °C hasta su uso. Los productos de ligación fueron empleados para transformar bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5α competentes.

6.4.5 Producción de bacterias *E. coli* competentes

Bacterias *E. coli* de la cepa DH5α, HT115, BL21 (DE3) o SoluBL21 (DE3) se cultivaron en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB: 10 g de triptona; 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 950 ml de agua desionizada) a 37 °C con movimiento constante (170 rpm) por 16 h. Posteriormente, se hizo un nuevo cultivo con 40 ml de medio LB, al que se le inocularon 400 µl de cultivo inicial. Dicho cultivo, se

mantuvo en las condiciones antes descritas, hasta una densidad óptica de 0.4 a 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se cosechó por centrifugación a 1 700 rpm a 4 °C por 5 min (centrífuga Neofuge 1600R), la pastilla se resuspendió en medio volumen de CaCl₂ 50 mM a 4 °C y se incubó durante 20 min a 4 °C. Terminando este tiempo la muestra se centrifugó en las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 50 mM por cada 10 ml de cultivo a 4 °C. Finalmente, las bacterias competentes se guardaron a 4 °C hasta su uso.

6.4.6 Transformación de bacterias competentes

Un volumen de 100 µl de bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5α, HT115, BL21(DE3) o SoluBL21 (DE3) se colocó en interacción con los productos de la reacción de ligación. La mezcla se incubó por 15 min a 4 °C, posteriormente se dió un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, seguido por una incubación a 4 °C por 5 min. Al término de este tiempo se adicionó 300 µl de medio LB y se incubó una hora a 37 °C en agitación (200 rpm).

Las bacterias transformadas se inocularon en una caja *Petri* con medio agar-LB con ampicilina a 100 µg /ml y se cultivaron por 16 h a 37 °C. Se verificó por PCR-*colony* que las bacterias tuvieran la construcción de interés. Específicamente, en el caso de construcciones con el vector *pJET1.2/blunt* (Thermo Scientific™), debido a la presencia de un gen letal en el sitio de clonación, solo las células que poseen los plásmidos recombinantes son capaces de sobrevivir, sin embargo en todos los casos se realizó una verificación por PCR-*colony*. El PCR-*colony* se realizó con el kit “One Taq® DNA Polymerase” (BioLabs, M0480L) en las condiciones antes descritas.

6.4.7 Purificación de vectores a partir de bacterias *E. coli* de la cepa DH5α

Una colonia de *E. coli* de la cepa DH5α verificada por PCR-*colony* positiva a la construcción de interés se cultivó en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina por 16 h a 37 °C con agitación constante (180 rpm). A continuación, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 14 000 rpm por 1 min a temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf 5415C). De la pastilla resultante se

extrajo el plásmido de interés utilizando el kit “QUIAGEN Plasmid Purification” (QUIAGEN), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, el plásmido purificado se resuspendió en 25 µl de agua libre de nucleasas, se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop™ Life (Thermo Scientific) y se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La muestra se guardó a -20 °C hasta su uso.

6.4.8 Ensayo de restricción enzimática de los vectores *pJET1.2/Ehvps35_S*, *pJET1.2/Ehvps35-ha*, *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* y *pJET1.2/Ehvps35_2*

La restricción de las construcciones *pJET1.2/Ehvps35_S*, *pJET1.2/Ehvps35-ha*, *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* y *pJET1.2/Ehvps35_2* se realizó con las enzimas *KpnI* y *BamHI Fast Digest* (Thermo Scientific). La mezcla de reacción fue la siguiente 2 µl de amortiguador Fast Digest 10X, 1 µg de DNA plasmídico, 1 µl de cada enzima, en un volumen final de 20 µl aforado con agua libre de nucleasas. La reacción se incubó por 16 h a 37 °C. Al producto de la digestión se agregó 5 µl de buffer Gel Loading Dye Blue 6X y analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA), que fue teñido con bromuro de etidio. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó del gel y purificó como se describió antes.

6.4.9 Ligación de los fragmento *Ehvps35*_(1-454 pb), *Ehvps35*_(1429-2274 pb), *Ehvps35*_(4-1512 pb) y el gen *Ehvps35*_(4-2274 pb) a los vectores de expresión *pL4440*, *pColdI* o *pNeo*

Los fragmentos *Ehvps35*_(1-454 pb), *Ehvps35*_(1429-2274 pb), *Ehvps35*_(4-1512 pb) y el gen *Ehvps35*_(1-2274 pb) digerido y purificado se ligó a su respectivo vector de expresión (*pL4440*, *pColdI* o *pNeo*) (Tabla 4), utilizando el kit “Rapid DNA ligation” (Thermo Scientific). Para lo cual se hizo una mezcla de 100 ng del vector de expresión digerido, 300 ng del inserto, 4 µl del amortiguador de ligación rápida 5X, 1 µl de la T4 DNA ligasa, en un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 22 °C por 5 min. El producto de la reacción de ligación se utilizó para la transformación de bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5α de la manera que ya se explicó antes y se realizó un PCR-colony, para verificar

la presencia de la construcción de interés. Finalmente, las construcciones *pL4440/Ehvps35_S*, *pColdI/Ehvps35_2*, *pNeo/Ehvps35-ha* y *pNeo/Ehvps35_1-ha* se purificó utilizando el kit “QUIAGEN Plasmid Purification” (QUIAGEN). *pL4440/Ehvps35_S* se utilizó para transformar bacterias competentes de *E. coli*, cepa HT115. *pColdI/Ehvps35_2* se empleó para transformar bacterias competentes de *E. coli* de la cepa SoluBL21 o BL21(DE3). Mientras las construcciones *pNeo/Ehvps35-ha* y *pNeo/Ehvps35_1-ha* se utilizaron para la transfección de trofozoítos de *E. histolytica*.

6.4.10 Secuenciación de los vectores de expresión

Para descartar la presencia de mutaciones y errores en el marco de lectura de la construcción *pColdI/Ehvps35_2*, *pL4440/Ehvps35_S*, *pNeo/Ehvps35-ha* y *pNeo/Ehvps35_1-ha* se realizó la secuenciación completa del inserto en cada vector mencionado, utilizando los *primers* descritos en la Tabla 5. La reacción de amplificación para la secuenciación se hizo con el kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Thermo Scientific), usando las especificaciones del fabricante.

La precipitación de la reacción de secuenciación, se realizó con 60 µl de etanol absoluto, que se incubó a temperatura ambiente por 30 min cubierta de la luz. Después, se centrifugó a 14 000 rpm durante 20 min (centrífuga Eppendorf 5402) y la pastilla se lavó dos veces con 250 µl de etanol al 70%. Para eliminar el sobrenadante se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min (centrífuga Eppendorf 5402) y se eliminó la totalidad del etanol. Finalmente, la muestra se envió a la Unidad de Secuenciación del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

Tabla 5. *Primers* utilizados para la secuenciación de los vectores *pColdI/Ehvps35_2*, *pL4440/Ehvps35_S*, *pNeo/Ehvps35* y *pNeo/Ehvps35_1*.

	Primers utilizados		Secuencia	T_M (°C)
<i>pColdI/Ehvps35_2</i>	pColdI	S	ACGCCATATCGCCGAAAGG	54
	pColdI	A	GGCAGGGATCTTAGATTCTG	
<i>pL4440/Ehvps35_S</i>	M13/pUC Forward	S	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	59
	L4440	A	AGCGAGTCAGTGAGCGAG	
<i>pNeo/Ehvps35-ha</i>	Ehvps35	S	CTGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGTCGTCCA CAACGAGA	67
	Ehvps35	A	GGGGGATCCTTAAAGTTGAATGTCAGCAAACCTTAGTATTTTCTTGAG CTGAAATAGT	
<i>pNeo/Ehvps35_1-ha</i>	Ehvps351	S	CTGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGTCGTCC ACAACGAGA	67
	Ehvps351	A	GGGGATCCTTACATTTCTGCATCTCCTCCAATTAATGGAAGTAATCTAC	

S: *primer* sentido

A: *primer* antisentido

T_M: temperatura de alineamiento de los *primers*

6.5 Inducción y purificación de las proteínas recombinantes EhVps35-N y EhVps35-C

6.5.1 Estandarización de la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes EhVps35-N y EhVps35-C

Las condiciones para la producción de las proteínas recombinante EhVps35-N (rEhVps35-N) y EhVps35-C (rEhVps35-C) se analizaron durante una cinética de inducción de bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rosetta (DE3) transformadas con las construcciones pColdI/*EhVps35*_(1-1428 pb) o pColdI/*Ehvps35_2*. Para lo cual las bacterias se cultivaron paralelamente en dos medios (LB y un medio complejo), ambos contaron con 100 µg/ml ampicilina y fueron incubados a 37 °C con agitación constante a 170 rpm hasta una densidad óptica de 0.8 a 600 nm.

La inducción de la producción de la proteína rEhVps35-N o rEhVps35-C se hizo por la adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tio-galactósido) hasta una concentración de 0.2 mM para BL21(DE3)/Rosetta(DE3) o 1 mM para SoluBL21(DE3) y una incubación en hielo por 20 min. El medio se incubó por 18 h a 16 °C en agitación constante (170 rpm), tomando muestras de 1 ml a las 4, 6, 8, 12, y 16 h de inducción. Las muestras tomadas del cultivo inducido se cosecharon por centrifugación a 14 000 rpm por 1 min (centrífuga Eppendorf 5402) y la pastilla se resuspendió con 50 µl de amortiguador de muestra 1X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.05% y β-mercaptoetanol 0.715 M). La muestra con el amortiguador de muestra 1X se colocó a 100 °C durante 5 min y se analizaron por medio de un SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie (0.05% azul de Coomassie, 5% metanol y 10% ácido acético). Además, se realizaron ensayos de *western blot* (sección 6.4) utilizando el anticuerpo primario α-His (Roche, 11 922 416 001) en una dilución 1:500, con lo cual se reconoce a la etiqueta de histidinas presente en las proteínas rEhVps35-N o rEhVps35-C.

6.5.2 Inducción de la expresión de la proteína rEhVps35-N

Bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) transformadas con las construcciones pColdI/*EhVps35*_(1-1428 pb) se cultivaron en 100 ml de medio complejo con 100 µg/ml ampicilina a 37 °C con agitación constante a 170 rpm por 16 h. Dicho cultivo se inoculó en el biorreactor New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 con 5 litros de medio complejo. El cultivo se dejó crecer por 12 h, tiempo después del que se le adicionó 0.4 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tio-galactósido) y se incubó a 16 °C por 18 h. El procedimiento de inducción se realizó con el material y apoyo del personal del laboratorio del Dr. Jaime Ortega López del departamento de Biotecnología del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

La biomasa obtenida se cosechó por centrifugación a 7 000 rpm por 20 min, la pastilla se pesó y almacenó a -70 °C hasta su uso. Una porción de la muestra fue utilizada para realizar un SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie (0.05% azul de Coomassie, 5% metanol y 10% ácido acético) con el fin de verificar la inducción y el resto fue utilizado para la purificación de la proteína rEhVps35.

6.5.3 Lisis y fraccionamiento celular de bacterias *E. coli* BL21(DE3) inducidas para la expresión de la proteína rEhVps35-N

La biomasa obtenida de la inducción de rEhVps35-N en bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis (NaCl 300 mM, Tris-HCl 50 mM, Lisozima 0.2 mM, PMSF 1 mM) por cada gramo de biomasa. La biomasa se resuspendió después de tres ciclos de congelación rápida (nitrógeno líquido) y descongelación en baño maría a temperatura ambiente. Después, se sonicaron en frío en el sonicador ultrasónico de punta Vibra-Cell Sonics^R dos veces a 60 % y 80% de amplitud, esto en ciclos de sonicación de 30 segundos. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min a 4 °C, el sobrenadante se almacenó como la fracción soluble de la lisis celular, mientras que una parte de la pastilla se almacenó como fracción insoluble de la lisis celular. La pastilla se sometió a dos protocolos para estandarizar el mejor proceso para obtener a rEhVps35-N en la fracción soluble. En el primer protocolo empleó una alta concentración de urea y

ciclos de sonicación de la biomasa (Galindo-Olea, 2022); mientras que en el segundo protocolo se empleó una baja concentración de urea y un proceso de congelación-descongelación (Qi et al., 2015)

El protocolo uno, inició con el procesamiento de la biomasa con tres lavados en la solución 1 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM), solución 2 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X-114 al 0.1%, Urea 2 M) y solución 3 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM). En cada lavado se resuspendió la pastilla en 5 ml de solución por cada gramo de biomasa inicial. Entre cada lavado, se realizó una sonicación en frío (sonicador ultrasónico de punta Vibra-Cell Sonics^R dos veces a 60 % y 80% de amplitud, en ciclos de sonicación de 30 segundos) y se centrifugó de 14 000 rpm por 20 min a 4 °C. La pastilla resultante del lavado con la solución 3 se resuspendió en el buffer de solubilización de cuerpos de inclusión (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 1 mM, Urea 8 M, imidazol 50 mM) en una relación de 5 ml por cada gramo de biomasa inicial, después se incubó por 16 h con agitación constante a 37 °C. Finalmente, se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min a 4 °C, el sobrenadante se etiquetó como fracción soluble de la solubilización de los cuerpos de inclusión y la pastilla se almacenó como fracción insoluble del procesamiento de los cuerpos de inclusión.

El segundo protocolo consistió en procesar la biomasa con tres lavados en la solución 1 (Tris-HCl 50 Mm, NaCl 300 mM, Triton X-100 2%, Urea 2 M), un lavado en la solución 2 (PBS a pH 7.4) y un lavado con solución 3 (PBS a pH 7.4, Urea 2 M). La pastilla resultante de los lavado se resuspendió en 5 ml de solución por cada gramo de biomasa inicial del buffer de solubilización de solución 3 (PBS a pH 7.4, Urea 2 M) y se centrifugó en 14 000 rpm por 20 min a 4 °C. La pastilla resusltante se resuspendió en 5 ml por cada gramo de biomasa inicial del buffer de solubilización (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, Triton X-100 2%, Urea 2 M), después se incubó por 16 h a -20 °C. Finalmente, se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min a 4 °C, el sobrenadante se etiquetó como fracción soluble de la solubilización de los cuerpos de inclusión y la pastilla se almacenó como fracción insoluble del procesamiento de los cuerpos de inclusión.

Una porción de las muestras del fraccionamiento celular se utilizó para realizar SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% que fueron teñidos con azul de Coomassie (0.05% azul de Coomassie, 5% metanol y 10% ácido acético), así como ensayos de *western blot* (sección 6.4) utilizando el anticuerpo primario α -His (Roche, 11 922 416 001).

6.5.4 Purificación de la proteína rEhVps35-N

La purificación de la proteína recombinante se realizó a partir de la fracción soluble, que resultó del proceso de la solubilización de los cuerpos de inclusión de las bacterias *E. coli* BL21(DE3) inducidas.

El aislamiento de la proteína recombinante se hizo a partir de la unión a la etiqueta de histidinas a las columnas HisTrap FF (GE Healthcare, 17531901). Dicha resina, antes de ser utilizada se lavó tres veces con 7 volúmenes de buffer de equilibrio (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 1 mM, urea 8 M e imidazol 5 mM). Luego, se colocó la muestra a una velocidad constante de 0.2 ml/min. El líquido colectado de la columna HisTrap FF se etiquetó como fracción no unida. La columna se lavó con 5 volúmenes con la solución 1 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 1 mM, urea 8 M e Imidazol 5 mM), solución 2 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 1 mM, urea 8 M, Triton X-114 al 0.1% e Imidazol 5 mM) y solución 3 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 1 mM, urea 8 M e Imidazol 50 mM). Por último, se realizó un lavado con 7 volúmenes del buffer de elución (Tris_HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 1 mM, urea 8 M e Imidazol 500 mM). Una porción de las muestras colectadas en cada lavado y la elución de la proteína recombinante fueron analizadas por SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie (0.05% azul de Coomassie, 5% metanol y 10% ácido acético), así como ensayos de *western blot* utilizando el anticuerpo primario α -His (Roche). Posteriormente, para obtener el rendimiento de la purificación antes realizada, se hizo la cuantificación de la proteína rEhVps35-N por comparación densitométrica.

La cuantificación de rEhVps35-N se realizó mediante la comparación de la densitometría entre la banda de interés y un estándar de concentración conocida, en un SDS.PAGE (Galindo-Olea, 2022). Brevemente, se utilizó BSA como proteína estándar en distintas concentraciones (25, 53, 82, 103, 128 y 159 ng), así como diversas diluciones de la proteína de interés. El gel fue teñido con azul de Coomassie y fofografiado con el fotodocumentador. Después, se utilizó el programa Image Lab 6.0.1 (BioRad) para realizar una regresión lineal con la curva estándar y la intensidad de píxeles de cada banda se extrapola a la intensidad de píxeles de la curva estándar para obtener la concentración de la proteína purificada.

6.6 Producción de anticuerpos policlonales α -EhVps35

Debido al bajo rendimiento en la purificación de la proteína recombinante rEhVps35-N y la ausencia de inducción en el caso de rEhVps35-C, se procedió a inocular el péptido N₃₀-ESEIMNAALNNKDLK-C₄₅ en ratones (cepa BALB/c) como lo describí en mi tesis de maestría (Díaz-Valdez, 2018) para obtener anticuerpos policlonales.

Se verificó el reconocimiento específico del suero obtenido de los ratones inmunizados, mediante un ensayo de *western blot*. Para lo que, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de extractos de proteína total de trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS), así como de bacterias *E. coli* cepa BL21(DE3) sin y con inducción para la producción de rEhVps35-N. El ensayo de *western blot* para el caso de lisados de trofozoítos se utilizó también α -actina como control de carga. El ensayo de *western blot* con extractos de bacterias *E. coli* cepa BL21 (sin inducción de rEhVps35-N) fue utilizado para verificar la ausencia de reconocimiento inespecífico.

6.7 Sobreexpresión de la proteína EhVps35-N y EhVps35 en *E. histolytica*

La inducción de la sobreexpresión del gen *Ehvps35*, así como el fragmento *Ehvps35* (1-1428 pb) correspondiente a la región amino de la proteína EhVps35

(EhVps35-N) en *E. histolytica*, se realizó mediante la transfección de trofozoítos con los vectores *pNeo/Ehvps35-ha* y *pNeo/Ehvps35_1-ha*.

El vector *pNeo/Ehvps35-ha* o *pNeo/Ehvps35_1-ha* se transfirió en trofozoítos de *E. histolytica* (HM1: IMSS) en medio M199 adicionado con 20 µg del vector de interés y 20 µl de SuperFect. El complejo SuperFect-vector se unió a la superficie celular y fue internalizado por endocitosis. Los trofozoítos transfectados fueron incubados durante 48 h a 37 °C y posteriormente, fueron tratados con concentraciones crecientes del antibiótico geneticina (G-418). Además, se realizó una transfección control con el vector *pNeo* sin inserto.

El cultivo simultáneo de trofozoítos transfectados con la construcción problema (*pNeo/Ehvps35-ha* o *pNeo/Ehvps35_1-ha*) y el vector *pNeo* sin inserto fueron sometidos gradualmente a concentraciones crecientes del antibiótico G-418, iniciando con 1 µg/ml en el medio de cultivo TYI-S-33 (Diamond, *et al.*, 1978) suplementado con 20% de suero bovino, una mezcla de vitaminas Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de penicilina (Lakside) y 1.4 mg/ml de estreptomina (Lakeside).

6.8 Knock-down del gen *Ehvps35* en trofozoítos de *E. histolytica*

La disminución de la síntesis de la proteína EhVps35 o *knock-down* en trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS, se realizó mediante la administración de RNA de doble cadena (dsRNA o double-stranded RNA, por sus siglas en inglés), los cuales fueron generados en bacterias *E. coli* de la cepa HT115 transformadas el vector *pL4440/EhVps35_S* utilizando el protocolo de Solis *et al.*, 2009.

6.8.1 Producción y purificación de RNAs de doble cadena específicos para el gen *Ehvps35*

La producción de los dsRNA correspondiente a la región *Ehvps35*_(1-154 pb) se realizó en bacterias *E. coli* de la cepa HT115 transformadas con el vector *pL4440/EhVps35_S*.

Las bacterias *E. coli* de la cepa HT115 se cultivaron en medio LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de tetraciclina, incubado a 37 °C con agitación constante a 170 rpm, hasta tener una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Al alcanzar la densidad necesaria, se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37 °C por 16 h en agitación. El cultivo se centrifugó a 7 000 rpm por 5 min (centrífuga Eppendorf 5402) y la pastilla se resuspendió en 10 ml de acetato de amonio 1 M y 10 ml de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8, donde se incubó por 15 min a 65 °C con agitación cada minuto. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó un volumen de isopropanol, para dejarse a -20 °C por 16 h. Se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5402), el sobrenadante se desechó y se realizaron dos lavados con etanol 70%, con centrifugaciones de 14 000 rpm por 10 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5402) entre cada lavado. La pastilla se resuspendió en 120 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop™ Life (Thermo Scientific).

La purificación de ácidos nucleidos obtenida, se liberó de DNA y RNA de cadena sencilla mediante la adición de 0.25 µl de DNasa recombinante libre de RNasa 10 U/ µl (Promega) y para la eliminación RNA de cadena sencilla se adicionó 0.25 µl RNasa A 4 mg/ml (Promega), esta reacción se realizó a 37 °C por 30 min. La precipitación de dsRNA se realizó con la adición de un volumen de isopropanol, donde se incubó a -20 °C por 16 h y se centrifugó a 14 000 rpm a 4 °C por una hora (centrífuga Eppendorf 5402). La pastilla se resuspendió en 200 µl de etanol al 75% en agua DEPC y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf 5402). La pastilla se resuspendió en 30 µl de agua DEPC y se cuantificó nuevamente para ser almacenada a -70 °C hasta su uso.

Adicionalmente como control negativo del silenciamiento se realizó la extracción de dsRNA en bacterias *E. coli* de la cepa HT115 transformadas con el vector *pL4440/gfp* (proporcionado por la Dra. Laurence A. Marchat Marchau).

6.8.2 Suministro de RNAs de doble cadena específicos para producir *knock-down* del gen *Ehvps35* en trofozoítos de *E. histolytica*

Se colocó en interacción 300 000 trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS) en medio TYI completo con 5 µg/ml de dsRNA extraído de bacterias *E. coli* de la cepa HT115 con la construcción *pL440/Ehvps35_S* o *pL440/gfp*. Esta interacción se mantuvo por 48, 72, 96 y 120 h a 37 °C para realizar una cinética del *knock-down* en el gen *Ehvps35*. Por último, los trofozoítos fueron centrifugados a 1 700 rpm por 7 min (centrífuga Neofuge 1600R) y se procedió a la extracción de proteína (resuspendidos en una mezcla de inhibidores de proteasas, antes descrito) y la verificación del *knock-down* por ensayos de *western blot*.

6.8.3 Verificación del *knock-down* del gen *Ehvps35* a nivel de proteína

El *knock-down* se verificó a nivel de proteína por ensayos de *western blot* utilizando extractos proteicos de trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS) tratados con dsRNA de interés (*Ehvps35-KD*) y sin tratamiento con dsRNA (trofozoítos control). Los ensayos de *western blot* se realizaron con los anticuerpos primario α-EhVps35 (1:500) y α-actina(1:3000). Por último, se procedió a realizar el análisis densitométrico antes descrito (sección 6.3).

6.9 Determinación de la función de EhVps35

La función de EhVps35 se dilucidó mediante el uso de trofozoítos con *knock-down* del gen *Ehvps35*. Dichos trofozoítos, se utilizaron para realizar un ensayo de reciclaje con marcaje de proteínas superficiales con biotina y ensayos que evalúan los principales mecanismo de virulencia de *E. histolytica*.

6.9.1 Inmunoprecipitación

El ensayo de inmunoprecipitación se realizó como se describe en Avalos-Padilla et al., (2015). Brevemente, 100 µl perlas de agarosa acopladas a la proteína G recombinante o rProtein G (Invitrogen) se incubaron con 100 µg anticuerpo α-EhVps35 o suero preinmune por 16 h a 4°C en agitación suave. Después, las perlas se incubaron con BSA al 0.5% en PBS 1X por 30 min en agitación a 4 °C

y se realizaron tres lavados con 1ml PBS 1X y las perlas se incubaron con 1 mg extractos totales de trofozoítos en condiciones basales por 16 h a 4°C en agitación suave. Posteriormente, las perlas se lavaron tres veces con 500 µl de PBS 1X y centrifugaciones de 2 000 rpm por 3 min (centrífuga Eppendorf 5402), se eliminó el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 30 µl de inhibidores y 30 µl de buffer de muestra 2X. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% que fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para ensayos de *western blot*, utilizando los anticuerpos α-EhVps35, α-EhTom1, α-EhVps23, α-EhVps36, α-EhADH, α-EhVps32, α-Hgl Gal/GalNac y α-Actina.

6.9.2 Análisis de espectrometría de masas LC-ESI-HDMSE

Muestras procedentes del ensayo de inmunoprecipitación antes descrito, fueron procesadas para un ensayo de SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% que se tiñeron con azul de Coomassie y fueron enviadas para su análisis por espectrometría de masas a la Unidad de proteómica del Cinvestav-Unidad Zacatenco. Cada carril se cortó y digirió enzimáticamente de acuerdo con el protocolo de Ramírez-Flores et al. (2019). Posteriormente, los péptidos se cargaron en la precolumna Symmetry C18 Trap V/M (Waters); 180 µm × 20 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 5 µm y desalado usando como fase móvil A (0,1% de ácido fórmico en H₂O) y fase móvil B (0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo) bajo las siguientes condiciones, gradiente isocrático: 99.9 % de fase móvil A y 0,1% de fase móvil B a un flujo de 5 µl/min durante 3 min. Luego, los péptidos se cargaron y separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters); 75 µm × 150 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 1,8 µm, utilizando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters) con las mismas fases móviles bajo el siguiente gradiente: 0 min 7% B, 121,49 min 40% B, 123 a 126,46 min 85% B, 129 a 130 min 7% B, a un flujo de 400 nL min y 45 °C. Los datos de los espectros se adquirieron en un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización y separación de movilidad iónica Synapt G2-Si (Waters) utilizando un enfoque de adquisición independiente de los datos a través del modo HDMSE (Waters). Los archivos sin procesar generados que contienen

espectros MS y MS/MS se desconvolucionaron y compararon utilizando el software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 (Li et al., 2009), así como la base de datos de *E. histolytica* (Uniprot). Todas las identificaciones tuvieron una confiabilidad $\geq 95\%$.

La base de datos depurada fue analizada por Ausencio Galindo Olea utilizando: PANTHER Classification System (<https://www.pantherdb.org/about.jsp>), GeneOntology (GO) análisis (<http://geneontology.org/>) y se comparo múltiples análisis proteómicos de *E. histolytica*. El análisis GO se realizó con los 10 términos GO enriquecidos más significativos en las ramas de proceso biológico, función molecular y componente celular. Todos los valores P estadísticamente significativos fueron normalizados con un logaritmo negativo base 10 para ser graficados.

6.9.3 Obtención de un modelo tridimensional de EhVps35 y EhTom1

El modelo tridimensional (3D) de EhVps35 se obtuvo en el servidor I-TASSER utilizando los cristales de Vps35 de *Mus musculus* (PDBID:6VAB:B) y *H. sapiens* (PDB:7BLN:C) como plantilla. Mientras el modelo 3D de EhTom1 se realizó utilizando el servidor I-TASSER y el dominio VHS del cristal de Tom1 de *H. sapiens* como plantilla. Los modelos 3D se refinaron gracias a la colaboración con Dra. Maricela Sarita Montaña Valdez, quien a través de 200 ns de simulación de dinámica molecular (MDS, por sus siglas en inglés *molecular dynamics stimulation*) by NAMD2.8 (Phillips et al., 2020) con el campo de fuerza CHARMM36 obtuvo las topologías de las proteínas EhVps35 y EhTom1 (Huang y Mackerell, 2013). A los modelos TIP3 se aplicaron las moléculas de agua, utilizando el complemento psfgen en el programa VMD (Humphrey et al., 1996). Posteriormente, se añadieron 64 480 moléculas de agua y 12 iones de sodio para neutralizar el sistema, que se minimizó durante 10 000 pasos, seguidos de una equilibración en condiciones de temperatura y presión constantes (NPT) durante 1 ns con los átomos de proteína y lípidos restringidos. Después, se corrió la DMS por 200 ns, considerando a EhVps35 o EhTom1 como una proteína soluble, sin

restricciones de posición en condiciones de contorno periódico (PBC) y utilizando un ensamblaje de NPT a 310 K.

6.9.3 Ensayos de acoplamiento molecular *in silico*

Los modelos 3D para EhVps23, EhVps32 y EhADH (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020), así como los modelos obtenidos en este trabajo para EhTom1 y EhVps35 fueron utilizados para realizar ensayos de acoplamiento molecular. Los ensayos de acoplamiento molecular proteína-proteína se realizó empleando diferentes conformaciones con el servidor ClusPro (Comeau et al., 2004; Kozakov et al., 2013), gracias a la colaboración con la Dra. Maricela Sarita Montaña Valdez. Las conformaciones con el clúster más alto y la energía más baja, fueron analizados en el servidor PDBSum (Laskowski et al., 1997), mientras que la visualización del modelo 3D se realizó mediante el programa VMD (Humphrey et al., 1996).

6.9.4 Obtención de eritrocitos humanos

A partir de una muestra de sangre periférica obtenida por punción venosa se aislaron eritrocitos. Dicha muestra de sangre se colocó en interacción con el anticoagulante Alsever (glucosa 2.05%, cloruro de sodio 0.42%, ácido cítrico 0.055%) en una relación volumen/volumen. La solución Alsever se utilizó para realizar tres lavados, con centrifugaciones a 3 000 rpm por 5 min (centrífuga Neofuge 1600R), entre cada lavado se eliminó el sobrenadante (suero) y la fase intermedia (leucocitos). De los eritrocitos aislados se tomó una muestra para realizar una dilución 1:1000 en PBS 1X estéril, de esta solución se tomó 10 µl para realizar el conteo en una cámara de Neubauer usando la siguiente formula:

$$\left(\frac{\text{No. eritrocitos}}{5}\right) \times (25 \times 10\,000 \times \text{Factor de dilución}) = \text{eritrocitos/ml}$$

Por último, los eritrocitos cuantificados fueron suspendidos nuevamente en Alsever y se almacenaron hasta su uso a 4 °C.

6.9.5 Cuantificación de la eritrofagocitosis

La capacidad de ingesta de eritrocitos fue cuantificada en trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS control y *Ehvps35*-KD. Los trofozoítos fueron incubados en agitación suave con eritrocitos en una proporción 1:25, en medio TYI sin suero a por 5 y 30 min a 37 °C. Los eritrocitos no ingeridos por las amibas se lisaron con agua fría. Los trofozoítos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% a 37 °C por 40 min. Posteriormente, se realizó una tinción Novikoff (Novikoff et al., 1972) que requirió la incubación en una solución 3-3' diaminobencidina (Sigma) 2 mg/ml en solución amortiguadora 2-amino, 2 metilpropanodiol 0.5 M pH 9.7 por 30 min a 37 °C. Después, se realizaron 4 lavados con PBS 1X, centrifugando por 3 min a 1700 rpm (Eppendorf 5415C). Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado en experimentos independientes y se tomaron imágenes representativas. Se contaron los eritrocitos ingeridos en 100 trofozoítos al azar en cada experimento y los resultados fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6, para determinar si existieron diferencias significativas entre las muestras.

6.9.6 Cuantificación de la adhesión

La capacidad de adhesión de eritrocitos fue cuantificada en trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS control y *Ehvps35*-KD. Los trofozoítos fueron incubados en agitación suave con eritrocitos en una proporción 1:25, en medio TYI sin suero a por 5 y 30 min a 4 °C. Los trofozoítos se fijaron con con glutaraldehído al 2.5% a 37 °C por 40 min y se tiñeron con la técnica Novikoff (Novikoff et al., 1972) antes descrita. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicados independientes y se tomaron imágenes representativas. Se contaron los eritrocitos adheridos en 100 trofozoítos al azar en cada experimento y los resultados fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6.

6.9.7 Ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza analizados por western blot

Trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS en interacción con eritrocitos en relación 1:25 se incubaron en medio TYI sin suero a 37 °C por 2 min, después de este tiempo se les agregó una mezcla de medio TYI sin suero con agua estéril (1

volumen de TYI por 2 volúmenes de agua) y se incubó por 7 min a temperatura ambiente para causar la hemólisis de los eritrocitos no fagocitados. Después, se centrifugó a 1 700 rpm por 7 min (centrífuga Neofuge 1600R) a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de amibas se resuspendió en medio TYI sin suero a 37 °C y se dejó nuevamente a 37 °C cada condición por 3, 13, 18, 28, 58 o 88 min. Se centrifugó a 1 700 rpm por 7 min (centrífuga Neofuge 1600R) y eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en una mezcla de inhibidores de proteasas como se describe antes (Sección 6.2). Los extractos proteicos se analizaron con ensayos de *western blot* utilizando los siguientes anticuerpo primario: α -EhVps35 (1:500) o α -actina (1:3000). La actina fue utilizada como control para realizar el análisis densitométrico como se describe antes (Sección 6.3).

6.9.8 Ensayos de eritrofagocitosis para inmunofluorescencia

Los ensayos de eritrofagocitosis se realizaron con trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS en medio TYI sin suero incubadas sobre un cubreobjetos estéril por 10 min a 37 °C, para promover la adhesión de estos. Los trofozoítos adheridos se incubaron con eritrocitos en proporción 1:25 por los tiempos analizados (2 y 30 min) a 37°C en medio TYI. Finalizado este tiempo, las muestras se procesaron para ensayos de inmunofluorescencia.

Los ensayos de eritrofagocitosis por pulzo y caza se realizaron con trofozoítos en interacción con eritrocitos en proporción 1:25 por 2 min a 37°C. Después, los eritrocitos no ingeridos fueron eliminados con un lavado de medio TYI sin suero con agua estéril en una relación volumen/volumen a 37 °C para causar la hemólisis de los eritrocitos no fagocitados. Los trofozoítos se incubaron por 3, 13, 28 y 58 min en medio TYI sin suero a 37 °C. Finalizando este tiempo, las muestras se procesaron para ensayos de inmunofluorescencia.

Adicionalmente, se hicieron preparaciones con trofozoítos en condiciones basales (0 min) para cada cinética de eritrofagocitosis. En algunos experimentos se realizó una tinción de organelos ácidos, utilizando LysoTracker™ Blue DND-

22 (Invitrogen) (2 µg/ml) at 37°C for 2 h. En los ensayos en los que se requirió frenar la síntesis *de novo* de proteínas, se realizó una incubación de trofozoítos por 30 min a 37°C con 100 µg/ml de cicloheximida (CHX), después de este tiempo los trofozoítos fueron lavados con PBS 1X y se verificó la viabilidad de las células.

6.9.9 Ensayos de inmunofluorescencia

La preparación se fijó con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 40 min a 37 °C, después, se lavó tres veces con PBS 1X y se permeabilizó con una solución 0.2% Tritón X-100 en PBS 1X por 10 min. Después, se realizó un lavado con PBS 1X y se bloqueó por una hora con 10% de suero fetal bovino en PBS 1X. A continuación, se lavó una vez con PBS 1X y se incubó por 16 h en anticuerpos primarios a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: α-EhVps35 de ratón (1:50), α-biotina de ratón (1:15), α-EhADH de conejo (1:50), α-EhVps23 de rata (1:50), α-Gal/GalNac de ratón (1:50), α-EhTom1 de ratón (1:50) y α-EhVps36 (1:50). En algunos experimentos se utilizó α-EhVps35 marcado con FITC fluorochrome kit (Molecular Probes-Thermo Fisher). Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS 1X. Los anticuerpos secundarios (α-IgG acoplado a un fluorocromo) se incubaron a 37 °C por 30 min. Se realizaron tres lavados con PBS 1X y después se tiñeron los núcleos con DAPI (declorhidrato de 4', 6'-diamido-2-fenilindo) con una incubación de 5 min a temperatura ambiente, seguido de cuatro lavados con PBS 1X. Además, en algunos experimentos se realizó la tinción de la actina filamentosa (F-actina) utilizando una incubación con faloidina-rodamina (Invitrogen) por 20 min at 37°C como lo describe el proveedor. Finalmente, las muestras se colocarán sobre portaobjetos limpios y estériles, al que se le adicionó 10 µl de medio de montaje Vectashield (Vector Lab). Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las muestras fueron visualizadas bajo un microscopio confocal Leica TCS-SPE DMI4000 1st Gen con el *software* del fabricante (Leica Microsystems CMS GmbH).

6.9.10 Microscopía electrónica de transmisión

Los experimentos de microscopía electrónica de transmisión con inmunomarcaje se realizaron como lo reportó Bolaños et al. (2016) y Talamás-Lara et al. (2021).

Trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS, en condiciones basales y con 5 min de eritrofagocitosis fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5% (volumen/volumen) diluido en PBS 1X por una hora a temperatura ambiente. Después, las muestras se embebieron en resina LR White (London Resin Co) que se polimerizó en luz UV a 56 °C por 16 h. La resina polimerizada fue cortada en secciones de un grosor aproximado de 60 nm, que se montó en rejillas de níquel recubiertas con *formvar* (Agar Scientific) y se les adicionó el anticuerpo policlonal α -EhVps35 (1:50), α -EhVps23 (1:50) o α -EhADH (1:50) en el que se incubó por 16 h. A continuación, la muestra se incubó con el anticuerpo secundario respectivo (1:50) acoplado a partículas de oro coloidal de 20, 10 o 40 nm (Ted Pella Inc) por 16 h. Finalmente, las muestras se analizaron en el microscopio de transmisión electrónica Joel JEM-1011 con la ayuda del Dr. Daniel Talamás Lara y la Bióloga Lizbeth Salazar Villatoro.

6.9.11 Ensayo de sensibilidad a la cicloheximida

La cicloheximida es un fármaco utilizado para frenar la síntesis *de novo* de proteínas, sin embargo, debido a que este fármaco fue utilizado por primera vez en trofozoítos *Ehvps35*-KD, se realizó un ensayo de sensibilidad de las células a dicho fármaco. Trofozoítos control y *Ehvps35*-KD se incubaron por 30 min, 2, 4, 6 y 8 h a 37°C con 100 μ g/ml de cycloheximida (CHX) como se reportó previamente (Hertz et al., 2014; Hendrick et al., 2016; Sharma et al., 2023). Después de este tiempo, los trofozoítos fueron lavados con PBS 1X. Finalmente, se verificó la viabilidad de las células empleando una tinción con azul tripán al 0.2% en PBS 1X y se realizó una cuantificación en cámara de Neubauer de 100 células en cada uno de los tres experimentos independientes (Bañuelos et al., 2012). Los resultados fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6.

6.9.12 Ensayo de reciclaje de proteínas de la membrana plasmática en trofozoítos de *E. histolytica*

La función de la proteína Vps35 en otros organismos, al pieza central del complejo proteico retrómero, es regular la formación de este complejo; además, generalmente Vps35 lleva a cabo el reconocimiento de las proteínas recicladas

por el retrómero. Con el propósito de determinar si EhVps35, al igual que sus homólogas, recicla proteínas asociadas a la membrana plasmática, se realizó el marcaje de proteínas superficiales con biotina en un ensayo de reciclaje (Roberts et al., 2001; Ivaska et al., 2002). Brevemente, el ensayo se inició con la incubación de trofozoítos de *E. histolytica* control y *Ehvps35*-KD en medio TYI sin suero por una hora a 37 °C. Posteriormente, los trofozoítos fueron incubados en 0.5 mg/ml de Sulfo-NH-SS-Biotina en PBS por 30 min a 4 °C. Después, se realizaron 2 lavados con PBS 1X a 4°C, centrifugando por 3 min a 1700 rpm (Eppendorf 5415C). La internalización de las proteínas marcadas con biotina en la membrana plasmática se promovió con la incubación en medio TYI con suero a 37 °C por 15 min. Para eliminar la marca de biotina presente en las el NH₄ libre de las proteínas en la membrana plasmática, se realizó una incubación por 30 min a 4°C con DTT 100 mM (Bian et al., 2023), después, se realizaron dos lavado de los trofozoítos en PBS 1X a 4°C para eliminar cualquier resto de DTT en el medio, centrifugando por 3 min a 1700 rpm (Eppendorf 5415C). Por último, para observar el regreso o reciclaje de las proteínas marcadas con biotina previamente internalizadas, los trofozoítos se incubaron en medio TYI con suero a 37 °C por 20 o 40 min, tiempo después del cual, se inició el procesamiento para microscopía confocal. Se realizó la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en la región cercana a la membrana plasmática, utilizando el programa ImageJ. Los valores obtenidos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6.

6.9.13 Ensayos de secreción

El ensayo de secreción se realizó como se describe en Bolaños et al. (2016). Brevemente, se utilizaron 3×10^6 trofozoítos lavados tres veces con PBS 1X, centrifugando por 3 min a 1700 rpm (Eppendorf 5415C). Posteriormente, los trofozoítos se incubaron por 2 h a 37 °C en 200 µl de PBS 1X con 1 mg/ml de E63 (Sigma) y cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Para obtener las moléculas secretadas en el sobrenadantes, la muestra se centrifugó a 1700 xg por 10 min y la pastilla fue procesada como se describió antes (Sección 6.2).

Finalmente, las muestras se analizaron por *western blot* usando los siguientes anticuerpos: α -EhVps35, α -EhCP112 y α -Actina.

6.9.14 Purificación de vesículas secretadas

Los productos de secreción se procesaron para purificar las vesículas extracelulares como lo reportó Théry et al. (2006). Brevemente, los productos de secreción se centrifugaron a 10 000 xg por 30 min para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100 000 xg durante 70 min para sedimentar las vesículas. El sedimento se lavó con un volumen de PBS 1X y se centrifugó nuevamente en las condiciones antes descritas. La pastilla resultante se analizó por microscopía electrónica de transmisión como se describió antes (Sección 6.9.10). Dichas muestras fueron obtenidas y procesadas por la Bióloga Lizbeth Salazar Villatoro y el Dr. Ausencio Galindo Olea.

6.9.15 Ensayo de migración

El ensayo de migración se realizó por triplicado como se describe en Bolaños et al. (2016). Brevemente, se utilizaron 7.5×10^4 trofozoítos control o *Ehvps35-KD* en ayuno por una hora, incubándolos en medio TYI sin suero a 37 °C. Después, los trofozoítos fueron colocados en la parte superior del transwell (poro de 5 μ m de diametro, Costar); en la parte inferior del transwell se colocaron 500 μ l de suero fetal bovino. Los trofozoítos se incubaron por 3 h a 37 °C y se cuantificaron los trofozoítos que migraron a la parte inferior del transwell, utilizando una cámara de Neubauer. Los resultados fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6.

6.9.16 Amebiasis experimental

El ensayo de amebiasis experimental se realizó como se describe en Pais-Morales et al. (2016), utilizando hámsteres (*Mesocricetus auratus*) adultos de 4 semanas de edad con un peso de 40 ± 5 g. Los hámsteres se anestesiaron con isofluorano al 3% en un inicio y al 1.5% del mismo anestésico durante todo el proceso quirúrgico. La superficie abdominal de los hámsteres fue afeitada y se

hizo una incisión longitudinal en la pared abdominal para exponer la vena porta y el hígado. Trofozoítos (2.5×10^6 en 100 μ l de TYI-S-33) de cada grupo (control o *Ehvps35-KD*) fueron inoculados intraportalmente en los animales. Siete días después, los hámsteres se sacrificaron con una sobredosis del mismo anestésico.

6.10 Análisis estadísticos

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

6.11 Manejo ético de los animales

El comité institucional de ética acerca del uso y cuidado de animales, revisó y aprobó el protocolo del uso y cuidado de los animales: dentro de los que se incluyen ratones, conejos, ratas y hámsters utilizados en experimentos de virulencia *in vivo* (Numero de protocolo 0225-16), establecido en el documento CICUAL 001, en el cual se especifica que nuestra institución cumple la NOM-062-ZOO-1999 que se ocupa de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, dadas por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la cual verifica el cumplimiento de los lineamientos/regulación internacional para el uso y cuidado de los animales usados en el laboratorio y ha verificado y aprobado el cuidado de los animales en Cinvestav (Número de verificación aprobada:BOO.02.03.02.01.908).

7. RESULTADOS

7.1 Inducción de la proteína rEhVps35-C

7.1.1 Clonaciones del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) en el vector *pColdI*

La producción de la proteína rEhVps35-C (región carboxilo de EhVps35) requirió inicialmente del diseño de *primers* específicos que amplificaron la región 1429 a 2274 pb del gen *Ehvps35* (fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb)) con las secuencias de reconocimiento para las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) fue amplificado mediante PCR punto final, usando cDNA de trofozoítos de *E. histolytica*, cepa HM1: IMSS obteniendo un amplificado de 846 pb. Adicionalmente, se verificó en el control negativo (agua libre de nucleasas) la ausencia de productos de amplificación bajo las mismas condiciones (Figura 14, A). Una vez estandarizadas las condiciones del ensayo de PCR, se realizó una segunda amplificación del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) usando una enzima polimerasa de alta fidelidad Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, M0491), para evitar la introducción de mutaciones durante la amplificación de dicho fragmento. El ensayo de PCR con la enzima de alta fidelidad produjo un amplificado único y correspondiente al tamaño esperado de 846 pb (Figura 13, A), el cual fue purificado del gel de agarosa para clonarlo en el vector *pJET1.2/blunt*, con el que se transformaron bacterias *E. coli* cepa DH5 α .

Colonias de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_2* fueron aisladas. Posteriormente, se eligieron las colonias que tenían la construcción *pJET1.2/Ehvps35_2* por medio de ensayos de PCR-*colony* en los que se observó un amplificado de 846 pb (Figura 13, B). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pJET1.2/Ehvps35_2*. Se realizó la digestión de *pJET1.2/Ehvps35_2* usando las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El ensayo de digestión enzimática reveló la liberación del inserto, correspondiente al fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) de 846 pb y un segundo fragmento de alrededor de 2974 pb, el cual corresponde al vector *pJET1.2/blunt* (Figura 13, C). Además, se realizó la digestión del vector de expresión, *pColdI*, utilizando las enzimas *KpnI* y *BamHI*

(Figura 13, C). Finalmente, los productos de la digestión enzimática (el inserto liberado y el vector de expresión) fueron purificados y ligados para formar la construcción *pColdI/Ehvps35_2*. La construcción purificada fue usada para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α . Nuevamente, se eligieron las colonias con la construcción *pColdI/Ehvps35_2* utilizando ensayos de PCR-*colony*, en los que se obtuvo un amplificado de 846 pb (Figura 13, D). La colonia 2 con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pColdI/Ehvps35_2*.

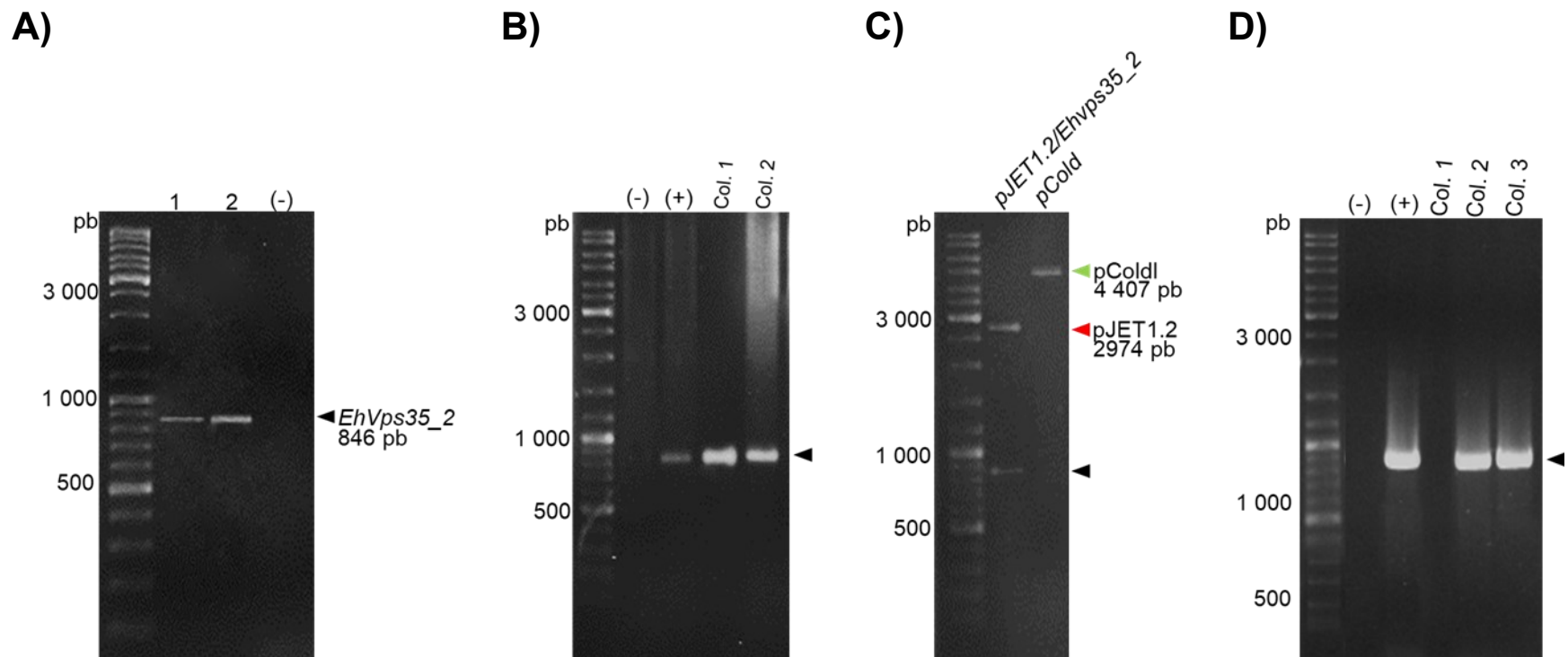


Figura 13. Clonaciones del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) en el vector *pColdI*.

A) Producto de la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) del gen *Ehvps35* analizado mediante PCR en punto final, usando una polimerasa convencional (carril 1) y una polimerasa de alta fidelidad (carril 2) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. B) PCR-colony de bacterias *E. coli* de la cepa DH5α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_2* en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. C) Digestión de la construcción *pJET1.2/Ehvps35_2* usando las enzimas *KpnI* y *BamHI* para la liberación del inserto (flecha negra) y del vector *pJET1.2* (flecha roja) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Además, se realizó una digestión enzimática con las mismas enzimas para el plásmido *pColdI* (flecha verde) que fue purificado para la ligación al inserto liberado. D) PCR-colony de bacterias *E. coli* de la cepa DH5α transformadas con el vector *pColdI/Ehvps35_2*, en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control negativo (-): agua libre de nucleasas. Control positivo (+): cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS.

7.1.2 Inducción de la proteína rEhVps35-C

Bacterias *E. coli* de las cepas BL21 (DE3), SoluBL21 y Rossetta (DE3) fueron transformadas con la construcción *pColdI/Ehvps35_2*. La cepa BL21 (DE3) se utilizó debido a que previamente se había observado en ella la inducción de la región amino de la proteína EhVps35 (rEhVps35-N) (Díaz-Valdez, 2018). La cepa SoluBL21, fue elegida porque esta cepa se ha reportado que promueve la inducción de proteínas recombinantes principalmente de fracción soluble. Finalmente, se utilizó la cepa Rosetta (DE3), una cepa de *E. coli* utilizada para la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones rara vez utilizados en bacterias de esta cepa, ya que el análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) correspondiente a rEhVps35-C, identificó 22 codones raros para las bacterias *E. coli* (Figura 14).

La presencia de la construcción *pColdI/Ehvps35_2* en las bacterias *E. coli* BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rossetta (DE3) transformadas fue verificada por ensayos de PCR-*colony* en los que se observó un amplificado de 846 pb (Figura 15).

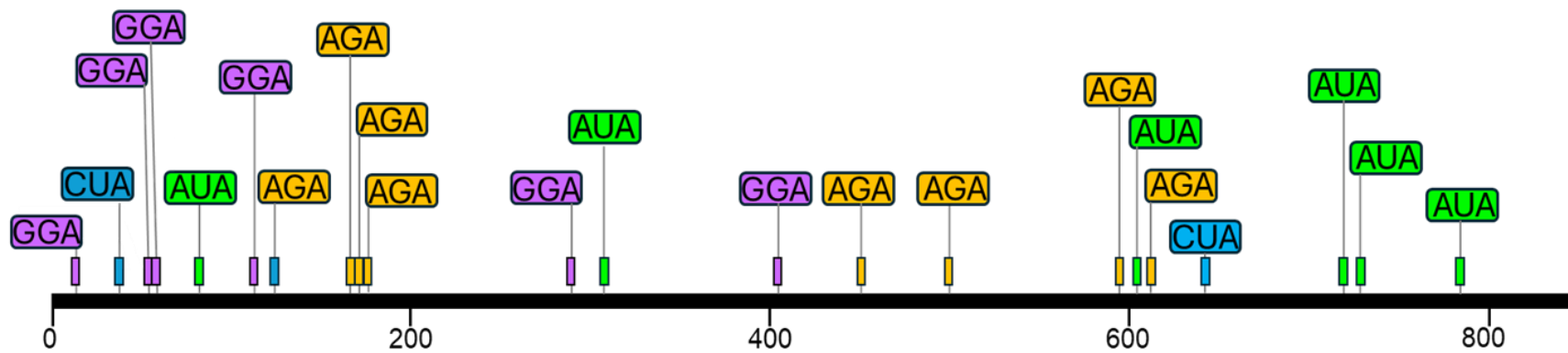


Figura 14. Identificación de codones raros para *E. coli* en la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína rEhVps35-C.

Búsqueda de codones raros en *E. coli* en la secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína rEhVps35-C. Se identificaron seis codones GGA correspondientes al aminoácido glicina, ocho codones de AGA correspondiente al aminoácido arginina, seis codones de AUA correspondientes al aminoácido isoleucina y dos codones de CUA correspondientes al aminoácido leucina.

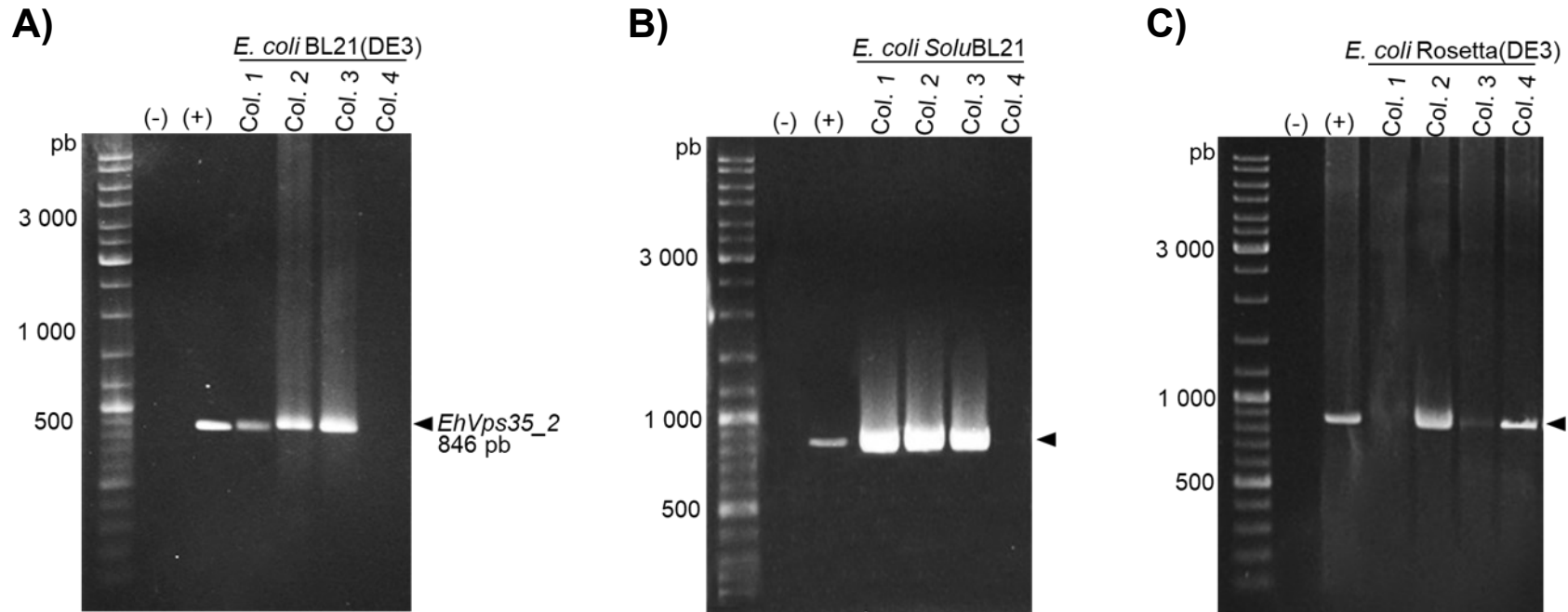


Figura 15. PCR-colony de las bacterias *E. coli* transformadas con la construcción *pColdI/Ehvps35_2*.

A) PCR-colony para la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) de la cepa *E. coli* BL21(DE3) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. B) PCR-colony para la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) de la cepa *E. coli* BL21(DE3) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro. C) PCR-colony para la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(1429-2274 pb) de la cepa *E. coli* BL21(DE3) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro. Control negativo (-): agua. Control positivo (+): cDNA de *E. histolytica*.

Se seleccionaron múltiples colonias de las bacterias *E. coli* de las cepas BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rossetta (DE3) con la construcción *pColdI/EhVps35_2*, para ser cultivadas hasta una densidad óptica de 0.6. Posteriormente, se inició la inducción para la producción de rEhVps35-C, agregando IPTG (concentración final de 0.2 mM) e incubando a 16 °C en agitación por 16 h. Muestras de cada cultivo de bacterias previo a la adición de IPTG y después de 16 h de inducción fueron analizadas en SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. No se observó ninguna banda diferencial entre las bacterias sin inducción e inducidas al examinar el SDS-PAGE (la banda la rEhVps35-C teóricamente se esperaba en 32 kDa) teñido con azul de Coomassie (Figura 16, A-C). Por lo que, se procedió a realizar una cinética de inducción de 8 y 16 h, que fue analizada por *western blot*. Usando como control positivo de la inducción, bacterias BL12 (DE3) transformadas con la construcción *pColdI/EhVps35_(1-1428 pb)* e inducidas para la producción de rEhVps35-N, como lo reporté en mi tesis de maestría (Díaz-Valdez, 2018). Los productos de dichas inducciones fueron procesados para su análisis por *western blot*, ensayo que permite identificar la etiqueta presente en la región amino de las proteínas recombinantes EhVps35-C y EhVps35-N mediante el uso del anticuerpo α -His. Sin embargo, no se observó reconocimiento del anticuerpo α -His en extractos los proteicos procedentes de bacterias inducidas para la producción de rEhVps35-C (Figura 17). Mientras, en el control (extractos de bacterias inducidas para la producción de rEhVps35-N), se observó un reconocimiento de la etiqueta de histidinas (Figura 17). Por lo que, el ensayo de western blot corroboró la ausencia de producción de la proteína rEhVps35-C, al descartar una inducción de rEhVps35-C imperceptible al visualizar el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie en las tres cepas utilizadas, posiblemente debido a la presencia de múltiples codones raros para *E. coli*.

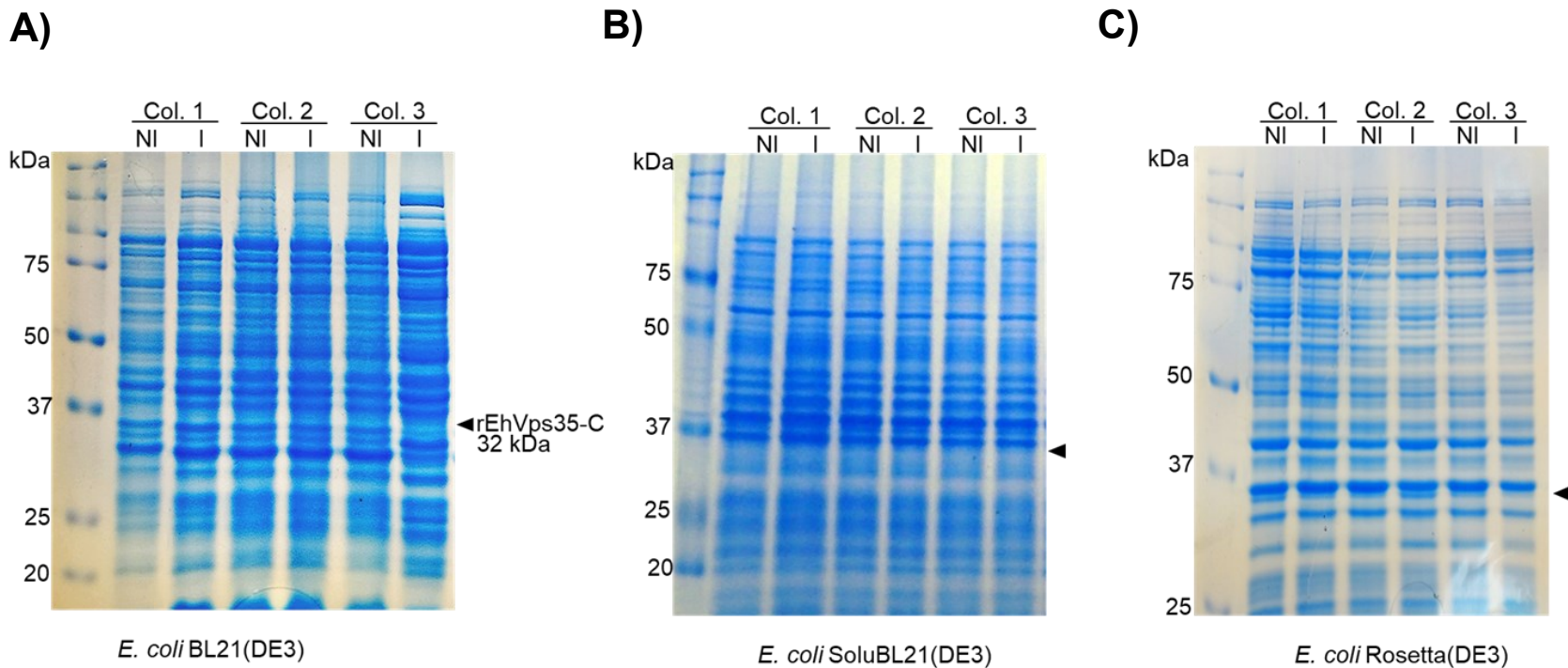


Figura 16. Inducción de la proteína rEhVps35-C en bacterias *E. coli* de las cepas BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rosetta (DE3).

A) inducción de la proteína rEhVps35-C por la adición de 0.2 mM o 1 mM IPTG en bacterias *E. coli* BL21 (DE3), analizado en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. B) Inducción de la proteína rEhVps35-C por la adición de 0.2 mM IPTG en bacterias *E. coli* SoluBL21 (DE3), analizado en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. C) Inducción de la proteína rEhVps35-C por la adición de 0.2 mM IPTG en *E. coli* Rosetta (DE3), analizado en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. NI: no inducida. I: inducida. La proteína rEhVps35-C tiene un peso esperado de 32 kDa (triángulo negro).

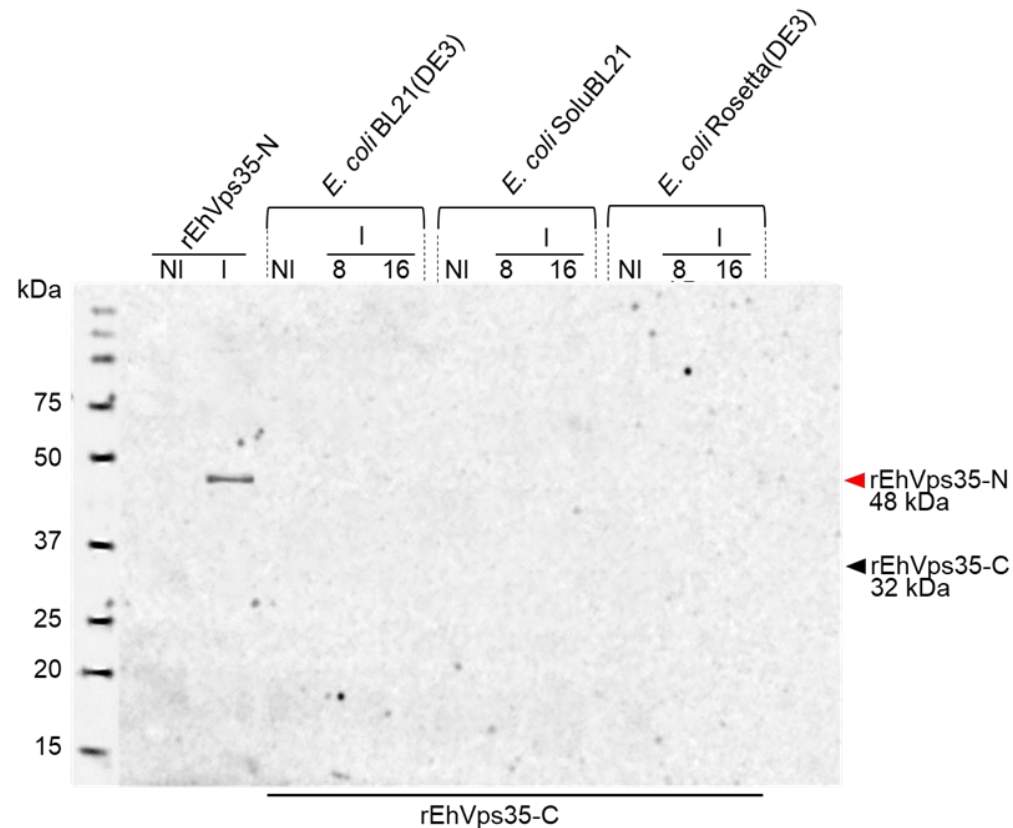


Figura 17. Cinética de la inducción de EhVps35 en bacterias *E. coli* de las cepas BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rosetta (DE3).

Inducción de la proteína rEhVps35-C por la adición de 0.2 mM o 1 mM IPTG en bacterias *E. coli* BL21 (DE3), SoluBL21 (DE3) y Rosetta (DE3) se siguió por 8 y 16 h de incubación a 16 °C en agitación. Muestras la cinética de inducción de rEhVps35-C en las tres cepas de *E. coli* fueron analizadas por *western blot* utilizando el anticuerpo α -His, específico para el reconocimiento de la etiqueta de histidinas presente en la región amino de la proteína recombinante. Las muestras procedentes de la inducción de rEhVps35-N fueron usadas como un control positivo de inducción. NI: no inducida. I: inducida. La proteína rEhVps35-C tiene un peso esperado de 32 kDa (triángulo negro); mientras, la proteína rEhVps35-N tiene un peso de 48 kDa (triángulo rojo).

7.2 Purificación de la proteína rEhVps35-N

7.2.1 Inducción de rEhVps35-N en bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) y SoluBL21 (DE3)

Bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) y SoluBL21 (DE3) transformadas con la construcción *pColdII/EhVps35*_(1-1428 pb) fueron inducidas para la producción de rEhVps35-N por 16 h. Muestras de la inducción de ambas cepas fueron procesadas para ser analizadas por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (Figura 18). Debido a que la cepa BL21 (DE3) obtuvo un mejor rendimiento en la inducción de la proteína rEhVps35 en comparación con la cepa SoluBL21 (DE3), en adelante, todos los experimentos fueron realizados únicamente con la cepa BL21 (DE3).

Se procedió a analizar diferentes condiciones para la inducción de rEhVps35 con el fin de estandarizar las condiciones óptimas para la inducción de dicha proteína recombinante. En primer lugar, se realizó una cinética de inducción de rEhVps35, tomando una muestra de la biomasa en inducción después de 4, 6, 8, 12 y 16 h de la adición de IPTG. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. La mejor inducción se obtuvo después de las 4 h de inducción por la adición de IPTG en el medio (Figura 19). Debido a que un menor tiempo de inducción también representa una menor cantidad de biomasa y por ende un bajo rendimiento de la inducción (Studier, 2005), se procedió a realizar la inducción de rEhVps35 comparando dos medios, medio LB y el medio de auto inducción, ya que este último se ha probado que produce mayor inducción de proteínas recombinantes que la inducción por adición de IPTG (Studier, 2005). Al comparar la inducción de rEhVps35 obtenida en medio LB con IPTG contra el medio de autoinducción, se obtuvo una mejor inducción en el medio LB adicionado con IPTG (Figura 20).

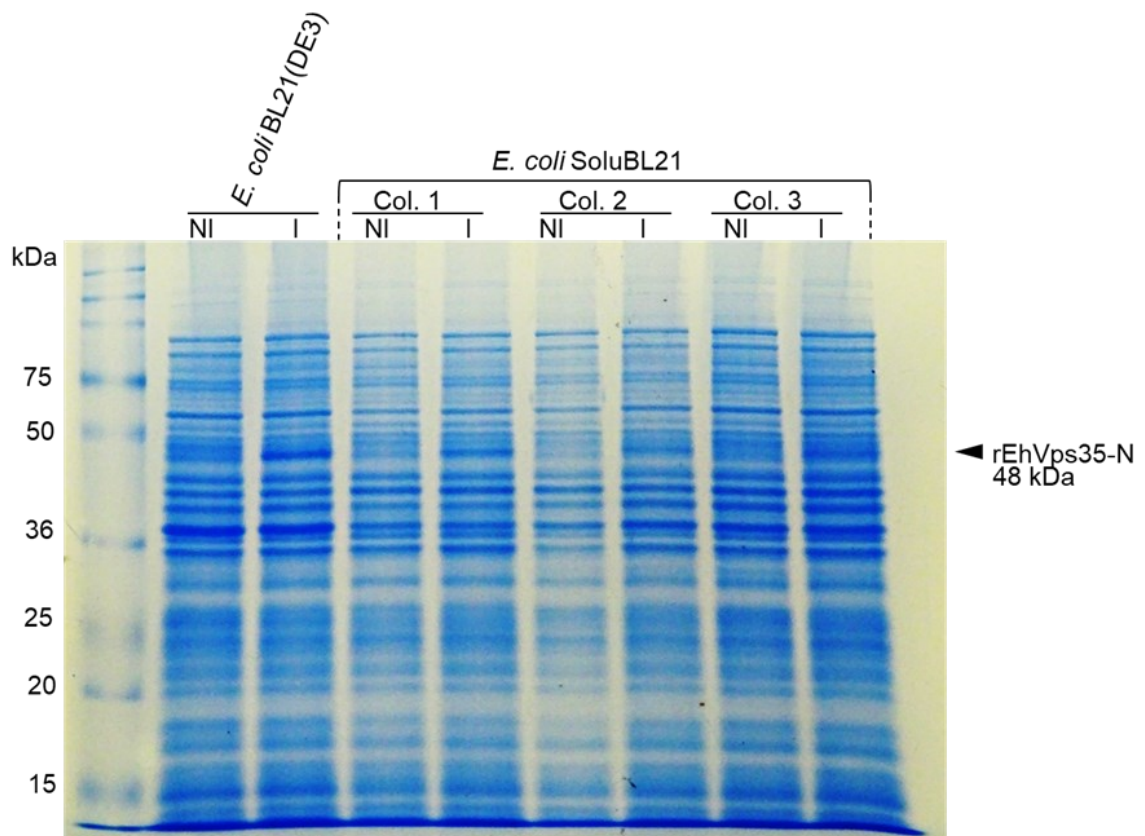


Figura 18. Comparación de la inducción de la proteína rEhVps35-N en bacterias *E. coli* de las cepas BL21(DE3) y SoluBL21(DE3).

La inducción de la proteína rEhVps35-N por la adición de 0.2 mM o 1 mM IPTG en bacterias *E. coli* BL21(DE3) y SoluBL21(DE3), se realizó a 16°C en agitación constante por 16 h. Muestras de la inducción con ambas cepas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. La proteína rEhVps35-N tiene un peso de 48 kDa.

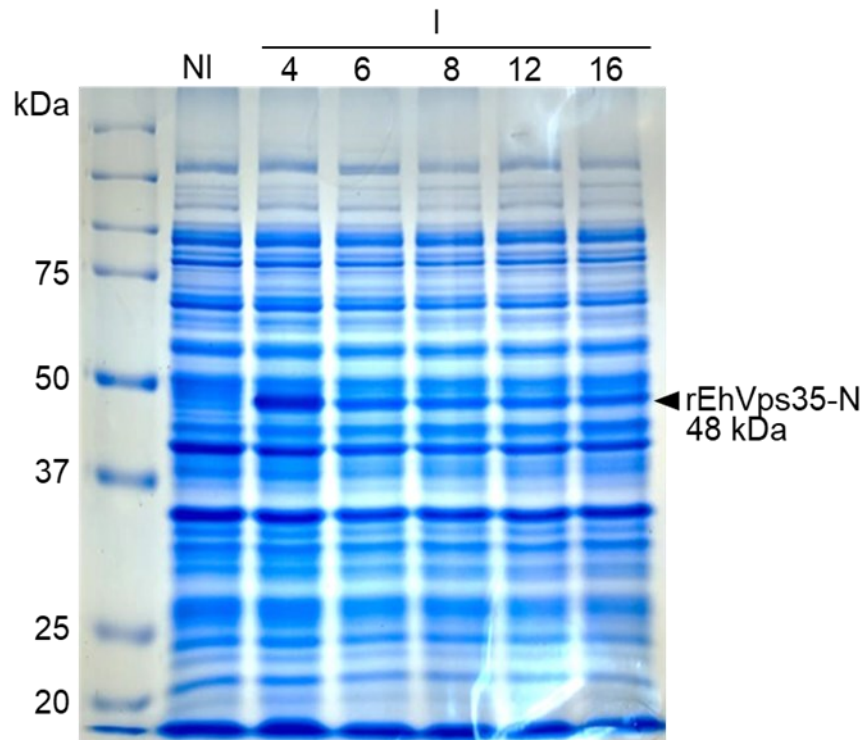


Figura 19. Cinética de la inducción de la proteína rEhVps35-N en bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3).

Muestras de inducción de la proteína rEhVps35-N por la adición de 0.2 mM IPTG en bacterias *E. coli* BL21(DE3) a 16°C en agitación constante por 4, 6, 8, 12 y 16 h, analizado en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. La proteína rEhVps35-N tiene un peso de 48 kDa.

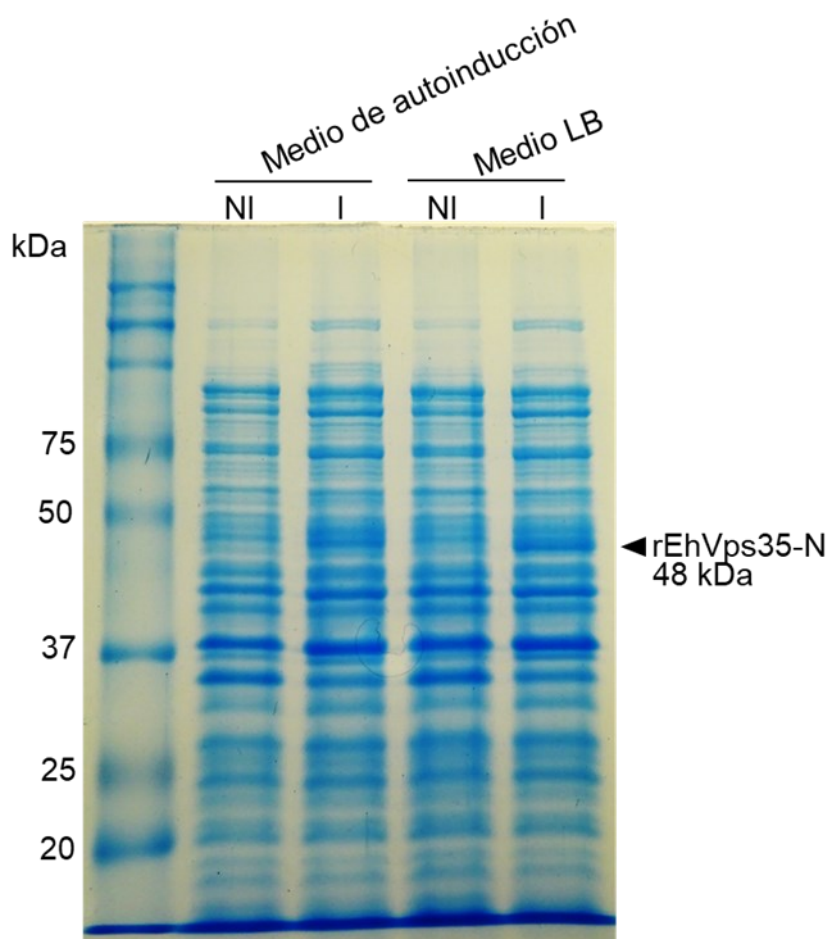


Figura 20. Comparación de la inducción de rEhVps35 en bacterias *E. coli* BL21(DE3) en dos medios: medio de autoinducción y medio LB con IPTG.

Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con azul de Coomassie de la inducción de la proteína rEhVps35 en bacterias *E. coli* BL21(DE3) por 16 h en agitación en dos medios: medio de autoinducción a 37 °C y medio LB adicionado con 0.2 mM IPTG a 16 °C. La proteína rEhVps35-N tiene un peso de 48 kDa.

7.2.2 Purificación de rEhVps35-N en bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3)

La inducción de la proteína rEhVps35-N se realizó en el biorreactor New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 con 5 litros de medio adicionado con IPTG y bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) transformadas con la construcción *pColdI/Ehvps35*_(1-1428 pb) como se mencionó antes en materiales y métodos. Muestras del cultivo bacteriano fueron tomadas antes de la adición del IPTG y al finalizar el tiempo de inducción. Las muestras de biomasa fueron analizadas por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, en el que se observó una banda diferencial en la muestra de bacterias inducidas de 48 kDa, correspondientes a la proteína rEhVps35-N (Figura 21, A). El procesamiento de la biomasa bacteriana para la obtención de la proteína rEhVps35-N en la fracción soluble se realizó por dos protocolos: el primero con una baja concentración de urea y congelaciones-descongelación; y el segundo método con una alta concentración de urea y ciclos de sonicación. Muestras obtenidas de los protocolos para la solubilización de rEhVps35-N fueron analizadas por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (Figura 21, B y C). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando altas concentraciones de urea (Figura 21, C).

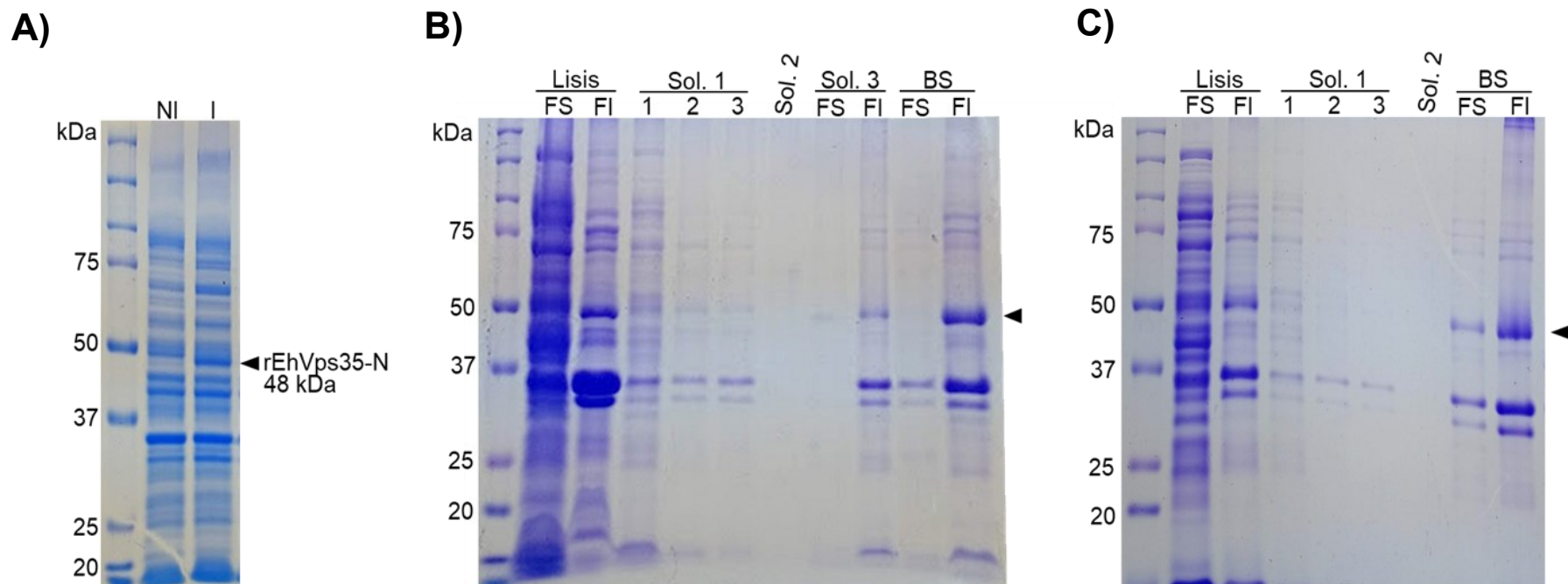


Figura 21. Fraccionamiento celular de biomasa obtenida de la inducción de rEhVps35-N en bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) en el biorreactor New Brunswick BioFlo/CelliGen 115.

SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie del procesamiento de la biomasa para la obtención de la proteína rEhVps35-N en fracción soluble. A) Muestras de biomasa obtenidas antes y después de la adición de IPTG para la inducción de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) en el medio de cultivo complejo utilizando 0.2 mM IPTG en incubación a 16 °C por 18 h en agitación. B) Procesamiento de 10 g de biomasa para su fraccionamiento celular y posterior solubilización de los cuerpos de inclusión utilizando una baja concentración de urea (2 M) y ciclos de congelación-descongelación. C) Procesamiento de 10 g de biomasa para su fraccionamiento celular y posterior solubilización de los cuerpos de inclusión utilizando una alta concentración de urea (8 M) y sonicación. NI: no inducida. I: inducida. FS: Fracción soluble. FI: Fracción insoluble. Sol: solución. BS: Buffer de solubilización.

La proteína rEhVps35 obtenida de la solubilización de cuerpos de inclusión fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas HisTrap FF. Las muestras tomadas a lo largo de todo el proceso de purificación de rEhVps35-N fueron analizadas por un SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie. Se observó una baja unión de la proteína rEhVps35-N a la columna, ya que se presentó una banda correspondiente al peso de la proteína de interés, en la fracción no unida similar a la banda observada en la muestra inicial. Esta banda no disminuyó con el aumento en el número pases de la muestra por la columna de afinidad. Sin embargo, el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (Figura 22, A) y *western blot* (Figura 22, B) mostraron a la proteína rEhVps35-N en los eluidos 1, 2, 3, 4 y 5.

La cuantificación de la proteína rEhVps35-N purificada se realizó por comparación densitométrica de distintas diluciones del eluidos 2, así como cantidades conocidas de una proteína estándar (BSA fracción V) analizadas en un SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Imágenes de dichos geles fueron procesadas en el programa Image Lab 6.0.1 (BioRad) para medir la intensidad de píxeles en las bandas de interés y posteriormente se realizó una regresión lineal, con la que se calculó la concentración de la proteína rEhVps35-N (Figura 22, C). El valor de R obtenido de la regresión lineal fue mayor a 0.9, lo que indica que las diluciones de la proteína estándar se realizaron correctamente. La concentración de rEhVps35-N purificada fue de 0.2201 mg/ml del procesamiento de 50 g de biomasa.

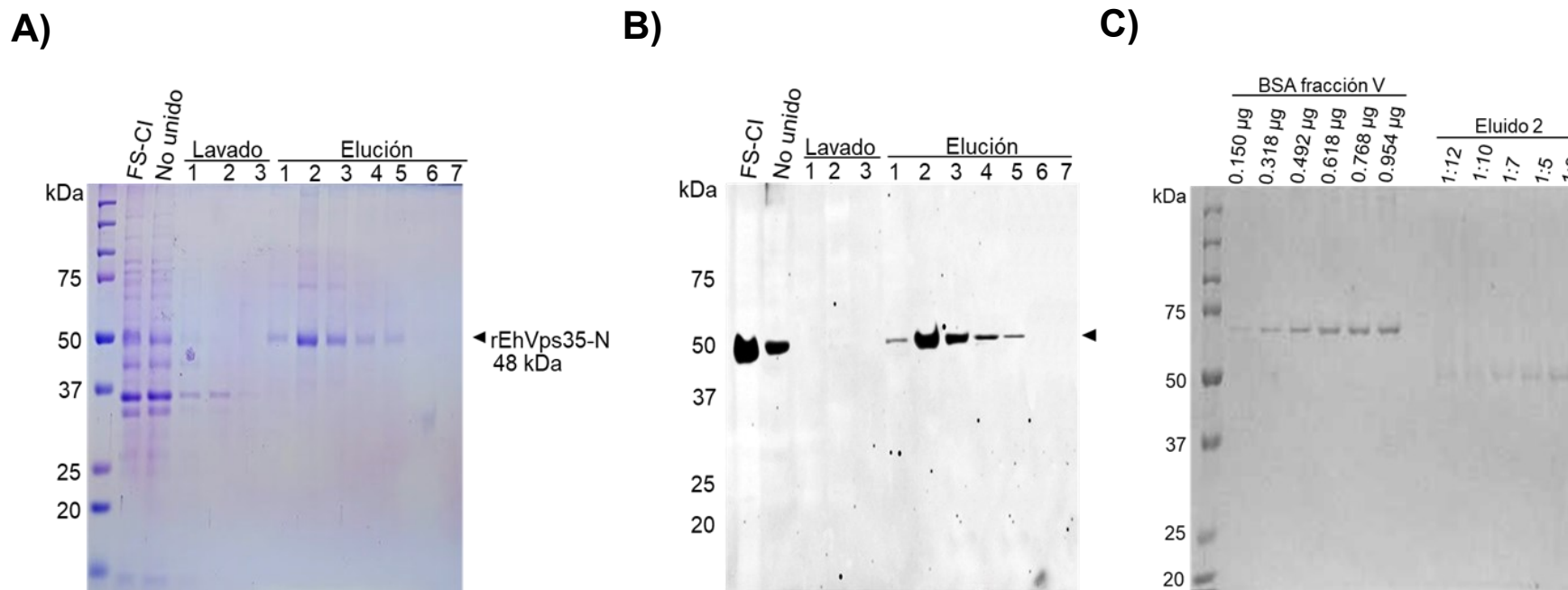


Figura 22. Purificación de rEhVps35-N utilizando las columnas HisTrap FF.

Fracción soluble de los cuerpos de inclusión con la proteína rEhVps35 pasada por una columna HisTrap FF con resina de níquel. Posteriormente la columna fue lavada múltiples veces con diferentes buffers y finalmente se separó la proteína de interés de la resina utilizando múltiples lavados con un buffer de elución. A) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie de las muestras obtenidas en cada paso de la purificación de la proteína rEhVps35-N utilizando la columna HisTrap FF. B) *Western blot* de las muestras obtenidas en cada paso de la purificación de la proteína rEhVps35-N con la columna HisTrap FF utilizando el anticuerpo α -His. C) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie de la proteína estándar (BSA fracción V) y diluciones del eluido 2. FS-CI: fracción soluble de los cuerpos de inclusión.

7.3 Producción de anticuerpos α -EhVps35

El protocolo de inmunización de rata planeado requería de la purificación mínima de 3.6 mg de rEhVps35-N. Sin embargo, la purificación de esta proteína tuvo un rendimiento de 0.2201 mg/ml del procesamiento de 50 g de biomasa, lo cual hizo inviable seguir esta estrategia debido a que la biomasa producida en el biorreactor de 5 litros no sería suficiente para purificar la cantidad requerida. Además, la problemática de salud mundial, pandemia COVID-19, transcurrió durante la realización de la purificación de rEhVps35, lo cual produjo freno en los experimentos. Por estas razones, se decidió realizar nuevamente la inmunización del péptido N₃₀-ESEIMNAALNNKDLSK-C₄₅ presente únicamente en la región amino de la isoforma C de EhVps35 (Figura 23, A y B), reportado por Díaz-Valdez (2018) para la producción del anticuerpo α -EhVps35. Siguiendo el protocolo de inmunización de ratones Balb/c con el péptido reportado por Díaz-Valdez (2018) se obtuvieron sueros inmunes recolectados en los sangrados realizados efectuados cada dos semanas. Se probó el reconocimiento de dichos sueros en ensayos de *western blot* y microscopía confocal.

Los sueros inmunes obtenidos con el anticuerpo α -EhVps35 reconocieron específicamente a la proteína recombinante rEhVps35-N en el peso esperado (48 kDa) en ensayos de *western blot* con extractos de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) inducidas para la producción de rEhVps35-N (Figura 23, C). La banda de 48 kDa también se reconoció con el anticuerpo dirigido a la etiqueta de histidina presente en la proteína rEhVps35-N (Figura 23, C). Mientras, en ensayos de *western blot* con lisados de *E. histolytica* se observó el reconocimiento de una sola banda con el peso previamente reportado para EhVps35 (71 kDa) (Figura 23, D). Adicionalmente, se verificó que no se tuviera reconocimiento del suero inmune en extractos totales de eritrocitos, ya que estos se ocuparon en ensayos posteriores de eritrofagocitosis.

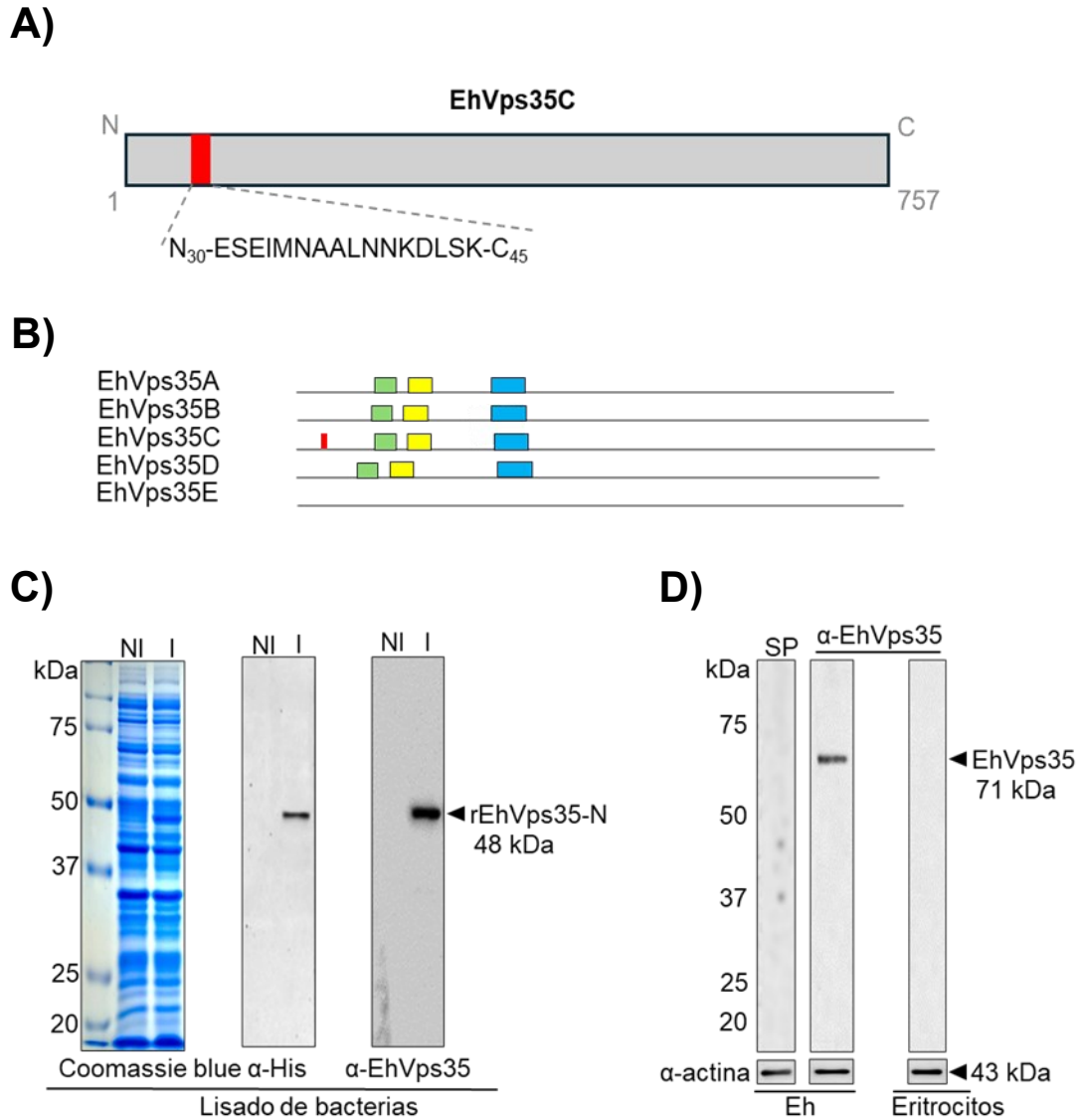


Figura 23. Reconocimiento del anticuerpo α -EhVps35 en ensayos de *western blot*.

Análisis del reconocimiento de sueros de ratones inmunizados con el péptido N₃₀-ESEIMNAALNNKDLSK-C₄₅ ubicado en la región amino de EhVps35C. A) Ubicación del péptido N₃₀-ESEIMNAALNNKDLSK-C₄₅ en la proteína EhVps35C. B) Esquema de las regiones conservadas en las cinco isoformas de la proteína EhVps35 (cuadro verde, cuadro amarillo y cuadro azul) y la ubicación del péptido usado para producción del anticuerpo α -EhVps35. C) Reconocimientos del anticuerpo α -EhVps35 (1:500) en ensayos de *western blot* realizados con lisados de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) inducidas para la producción de la proteína rEhVps35-N, lisados de trofozoítos de *E. histolytica* y lisados de eritrocitos. NI: bacterias no inducidas. I: bacterias inducidas. Eh: lisados de trofozoítos de *E. histolytica*. SP: suero preinmune. α -His: control positivo en lisados bacterianos inducidos para la producción de rEhVps35-N. α -actina: control positivo en lisados de trofozoítos.

Los sueros inmunes con el anticuerpo α -EhVps35 fueron utilizados en ensayos de microscopía confocal a una dilución 1:50 en muestras fijadas de los trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS en condiciones basales. El reconocimiento del anticuerpo α -EhVps35 mostró un patrón similar al descrito por Díaz-Valdez (2018) (Figura 24, A). La proteína EhVps35 se distribuyó principalmente en el citoplasma con algunos cúmulos en esta región y en cúmulos puntuales cerca de la membrana plasmática (Figura 24, A). Debido a la aparente localización de EhVps35 hacia la membrana plasmática y el previo reporte de esta proteína en aislados de fracciones celulares correspondientes a la membrana plasmática por Biller et al. (2014), se realizaron ensayos de microscopía confocal con trofozoítos no permeabilizados. Este ensayo corroboró la presencia de EhVps35 en la región externa de la membrana plasmática (Figura 24, A). Adicionalmente, se verificó que no hubiera reconocimiento del suero inmune en eritrocitos fijados y permeabilizados, procesados para microscopía confocal, utilizando la misma dilución del anticuerpo α -EhVps35. Como se esperaba, no se observó reconocimiento del suero inmune en dichas muestras (Figura 24, B).

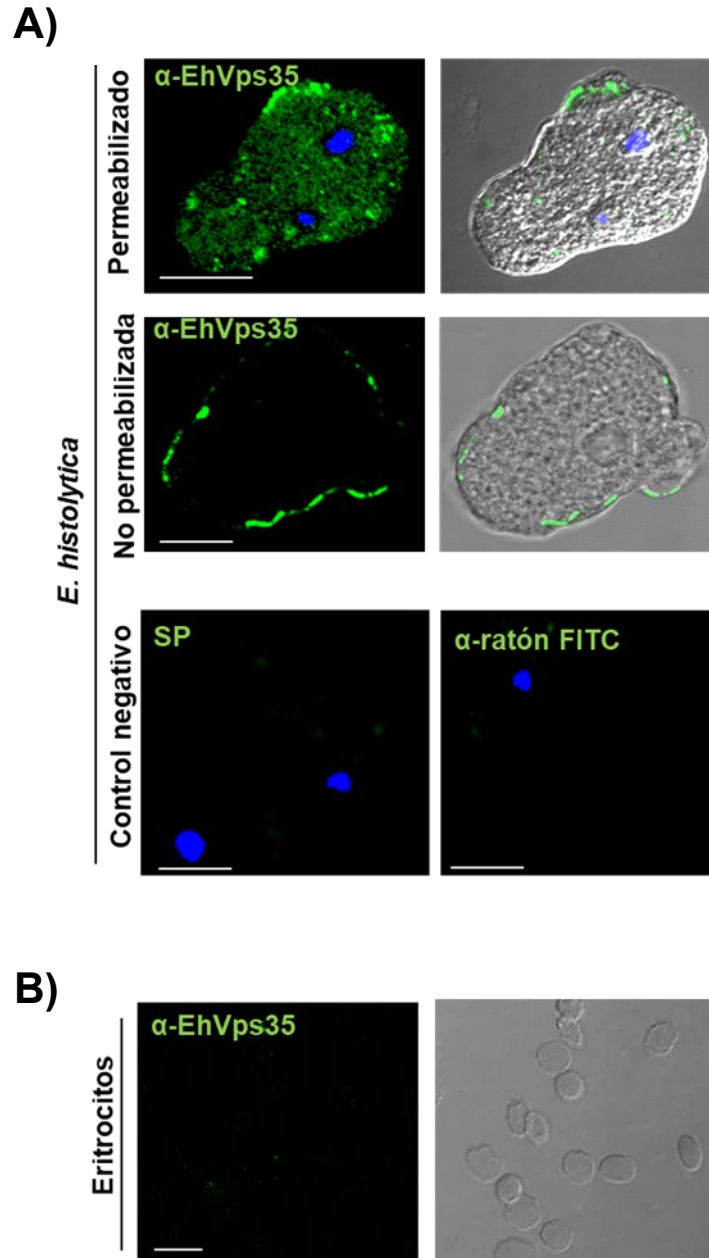


Figura 24. Reconocimiento del anticuerpo α - EhVps35 en ensayos de microscopía confocal.

Análisis del reconocimiento del anticuerpo α -EhVps35, procedente de sueros de ratones inmunizados con el péptido N30-ESEIMNAALNNKDLK-C45 ubicado en la región amino de EhVps35 en ensayos de microscopía confocal. A) Trofozoítos permeabilizados y no permeabilizados procesados para microscopía confocal, utilizando el anticuerpo primario α -EhVps35 y el anticuerpo secundario α -ratón FITC. Control negativo: suero preinmune (SP) y muestras procesadas únicamente con el anticuerpo secundario (α -ratón FITC). B) Eritrocitos procesados para microscopía confocal permeabilizados e incubados con el anticuerpo primario α -EhVps35 y el anticuerpo secundario α -ratón FITC.

7.4 Disminución de EhVps35 en trofozoítos estimulados con eritrocitos

Con el fin de analizar la posible participación de la proteína EhVps35 en la eritrofagocitosis, se realizaron ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza, utilizando trofozoítos estimulados con eritrocitos con una relación 1:25 trofozoíto/eritrocitos, por 2 min de pulso a 37°C de pulso, seguidos de la eliminación de los eritrocitos no ingeridos y finalmente la incubación a 37 °C por distintos tiempos (3, 8, 23, 28 y 58 min) de caza. Lisados de trofozoítos fueron procesados para su análisis por *western blot* utilizando el anticuerpo α -EhVps35 (Figura 25, A). Los niveles expresión relativa de EhVps35 fueron determinados por densitometría, utilizando el programa ImageJ para cuantificar la intensidad de pixeles en las bandas de interés. Los datos de intensidad de pixeles de EhVps35 fueron normalizados con los datos de actina en cada tiempo de eritrofagocitosis y por último, con la intensidad de pixeles presente en EhVps35 en la condiciones basales. El análisis densitométrico de los ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza reveló la reducciones significativas en EhVps35 a partir de los 10 min (2+8 min) y hasta los 60 min analizados en este ensayo (Figura 25, B). Sin embargo, se observó una reducción perceptible visualmente desde el pulso de 2 min con eritrocitos.

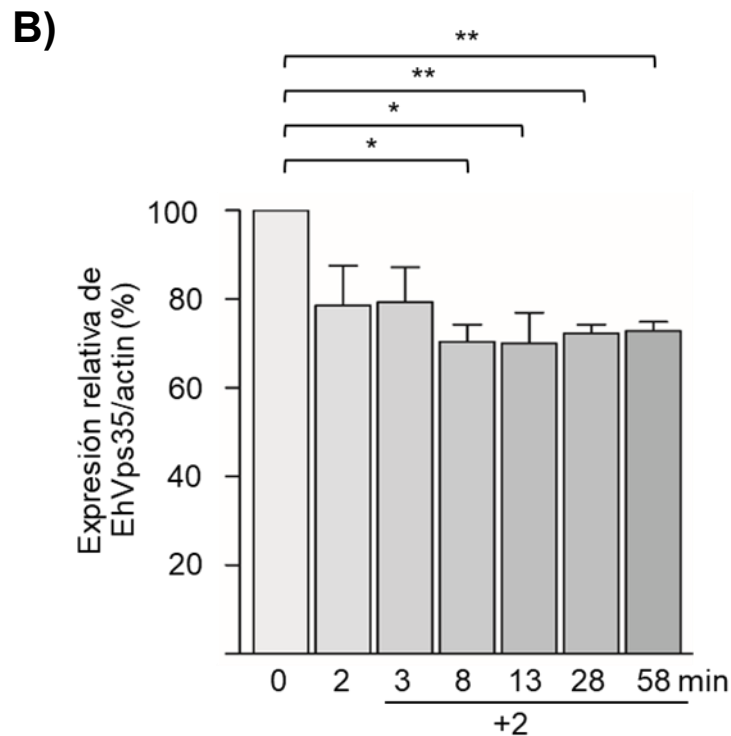
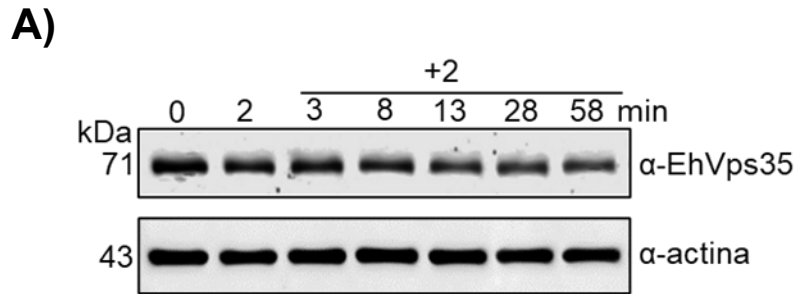


Figura 25. Expresión relativa de EhVps35 durante cinéticas de eritrofagocitosis.

Ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza con una relación 1:25 trofozoíto/eritrocitos, con un tiempo de 2 min a 37°C de pulso, seguidos de la eliminación de los eritrocitos no ingeridos y finalmente la incubación a 37 °C por distintos tiempos (3, 8, 23, 28 y 58 min) de caza. A) Extractos proteicos de trofozoítos procedentes de cinéticas de eritrofagocitosis fueron analizados por *western blot*. B) Análisis densitométrico de los ensayos de *western blot* de trofozoítos procedentes de cinéticas de eritrofagocitosis por pulso y caza. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $p < 0.001$.

7.5 El estímulo de trofozoítos con eritrocitos produce la relocalización de la proteína EhVps35

Debido a que EhVps35 presentó una disminución en los niveles de expresión de esta proteína en trofozoítos en una cinética de eritrofagocitosis por pulso y caza, se procedió a estudiar la ubicación de EhVps35 en las mismas condiciones. Trofozoítos fueron estimulados con eritrocitos (1:25 trofozoíto/eritrocitos) con un pulso de 2 min a 37°C de pulso, seguidos de la eliminación de los eritrocitos no ingeridos y finalmente incubados a 37 °C por distintos tiempos (3, 8, 23, 28 y 58 min) de caza. Los trofozoítos fueron procesados para su análisis por microscopía confocal e incubados con el anticuerpo primario α -EhVps35, seguido por el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a FITC y el núcleo de las células fue marcado con DAPI.

EhVps35 cambió de una localización mayoritaria en el citoplasma a la membrana plasmática y sobre los eritrocitos adheridos a los 2 min de incubación con eritrocitos (Figura 26). A los 5 y 15 min, la proteína EhVps35 se ubicó principalmente en fagosomas (Figura 26). A los 30 min de eritrofagocitosis, EhVps35 está principalmente rodeando algunos fagosomas y con tendencia a regresar a su condiciones basales (Figura 26). Adicionalmente, se observó una aparente disminución en la intensidad de fluorescencia después del estímulo con eritrocitos, lo cual concuerda con la disminución en los niveles de expresión relativa de esta proteína, a vistos en los ensayos de *western blot*.

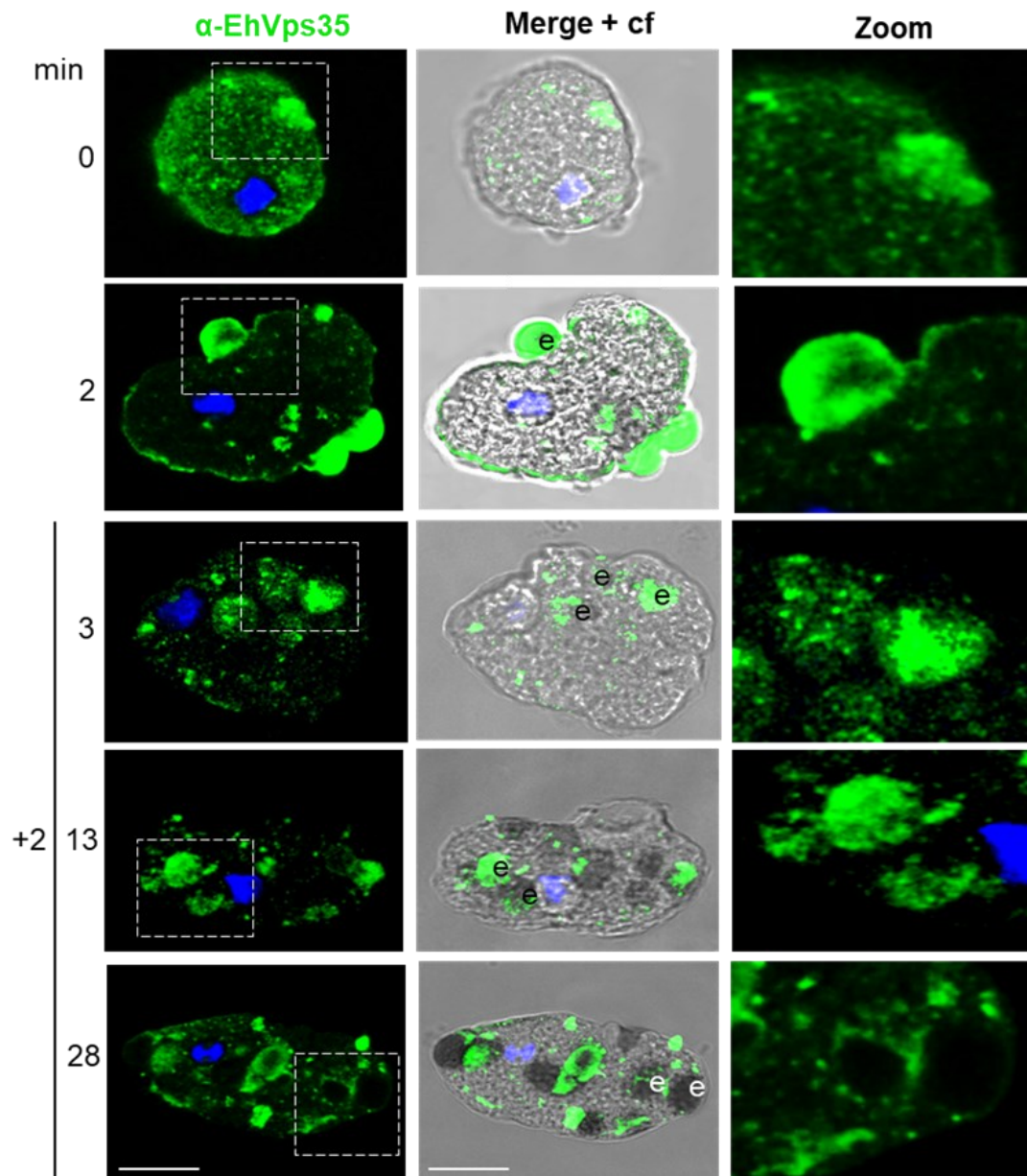


Figura 26. Localización de EhVps35 durante una cinética de eritrofagocitosis por pulso y caza.

Imágenes de microscopía confocal representativas de trofozoítos de *E. histolytica* incubados con eritrocitos (1:25 trofozoíto/eritrocitos) por 2 min (tiempo de pulso), después, se retiraron los eritrocitos no ingeridos y finalmente, los trofozoítos se incubaron a 37 °C por distintos tiempos (3,13,28 min) de caza. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario α -EhVps35, el anticuerpo α -IgG de ratón FITC, y una tinción de núcleo con DAPI (azul). Zoom: magnificaciones de las regiones marcadas por un cuadro de línea discontinua blanca. e: eritrocitos. Barra de escala, 10 nm.

Para estudiar con mayor detalle la localización de EhVps35, se procesaron trofozoítos en condiciones basales y después de 5 min de eritrofagocitosis para su análisis por microscopía electrónica de transmisión, utilizando el anticuerpo primario α -EhVps35 y el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a perlas de oro de 20 nm. En condiciones basales, EhVps35 se localizó en algunos puntos de la membrana plasmática (Figura 27, A y B). Sin embargo, EhVps35, se encuentra principalmente en la membrana de vesículas (Figura 27, C y D). Interesantemente, se visualizó una vesícula con una proyección en su membrana con marca de EhVps35, parecida a las reportadas durante el proceso de reciclaje del retrómero en otros organismos (Figura 27, C-E).

Al analizar las muestras procedentes de trofozoítos estimulados con eritrocitos por 5 min, EhVps35 se localizó en regiones de la membrana plasmática en contacto con los eritrocitos (Figura 28, A y B). Además, esta proteína se localizó en fagosomas en diferentes procesos de maduración. EhVps35 se localizó en una prolongación de la membrana de un fagosoma con un eritrocito (Figura 28, C y D). EhVps35, también se encontró en estructuras blancas de doble membrana dentro del fagosoma (Figura 28, E-J). Las estructuras blancas de doble membrana presentes en los fagosomas, previamente se han reportado en *E. histolytica* y podrían corresponder a la hemoglobina digerida dentro de estas estructuras vesiculares (Avalos-Padilla et al., 2015; Galindo et al., 2021). Sin embargo, dichas estructuras blancas también podrían ser procesos de remodelación de membrana requeridos para el reciclaje de proteínas que lleva a cabo el retrómero, lo cual concuerda con la presencia de EhVps35 en estas estructuras.

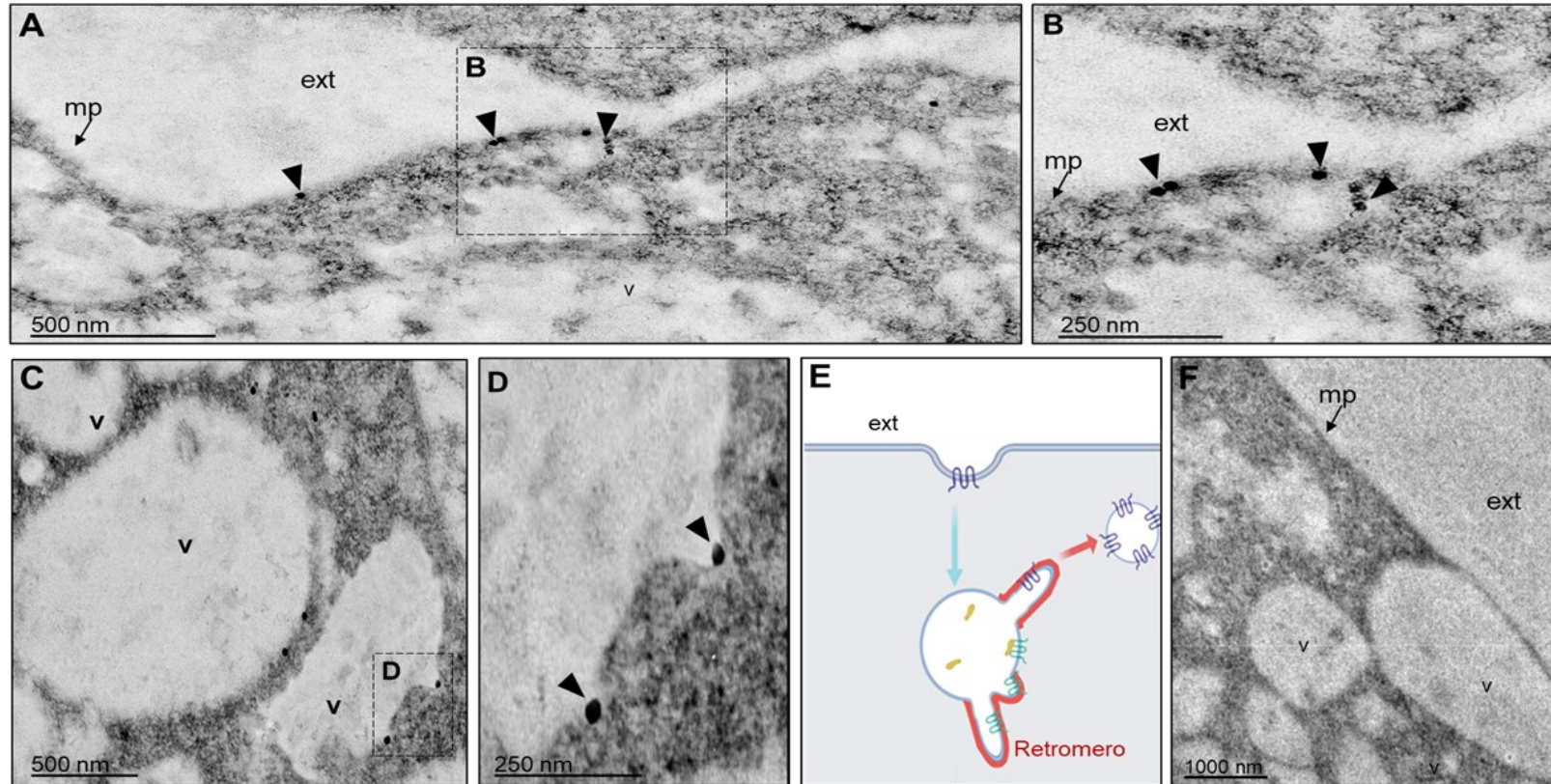


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica que muestran la localización de EhVps35 en trofozoítos de condiciones basales.

A-D) Trofozoítos procesados para microscopía electrónica de transmisión usando el anticuerpo α -EhVps35, seguido por el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a perlas de oro de 20 nm. En A y B se muestra a EhVps35 en la membrana plasmática. En C y D se muestra a EhVps35 en la membrana de vesículas. E) Esquema de estructuras tubulares clásicamente formadas durante el proceso de reciclaje mediado por el retrómero en otros organismos. F) Control negativo: trofozoítos procesados para microscopía electrónica de transmisión usando únicamente el anticuerpo secundario. Ext: espacio extracelular. v: vesícula. mp: membrana plasmática, señalada con una flecha. Triángulo negro: reconocimiento del anticuerpo α -EhVps35

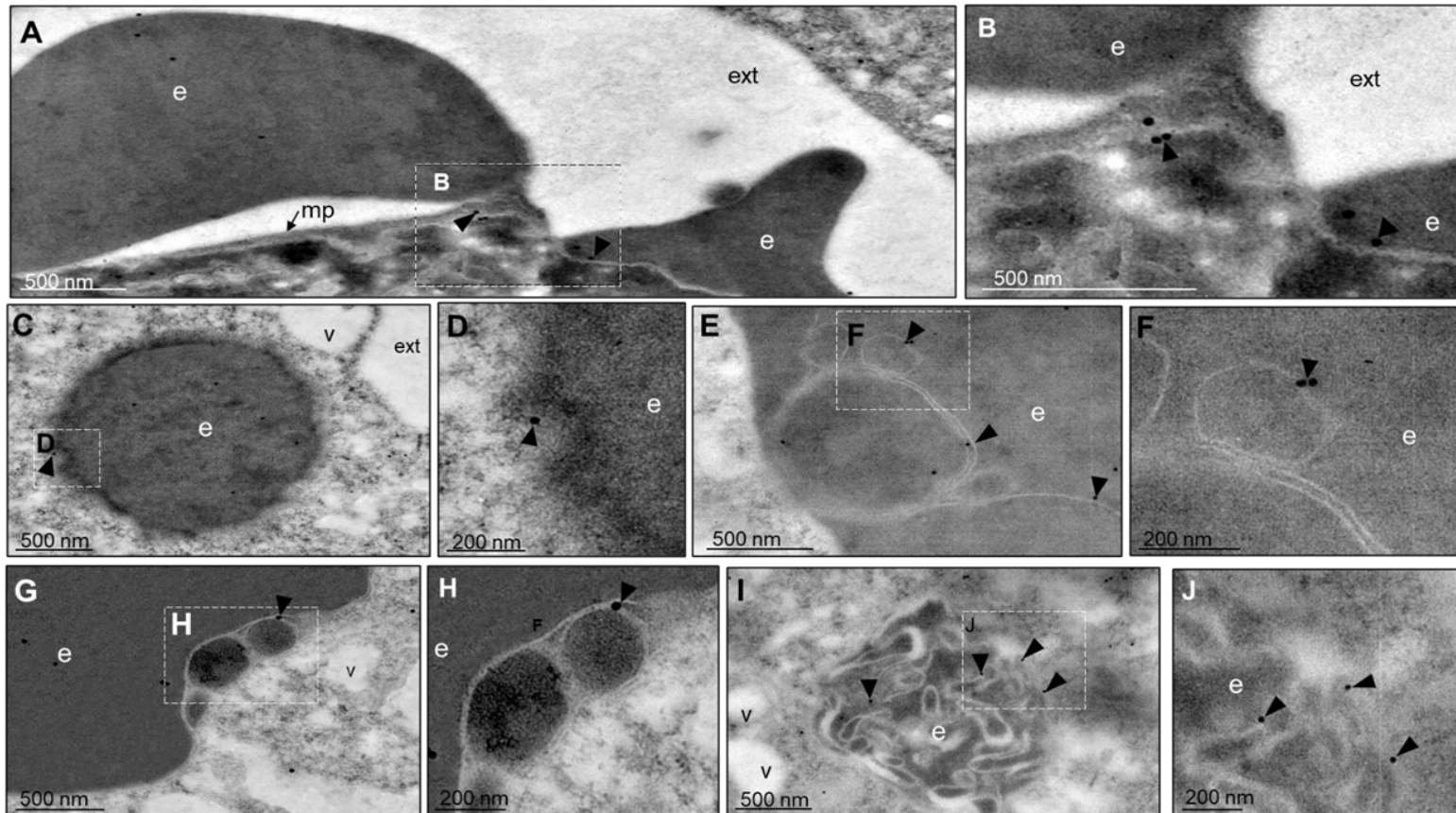


Figura 28. Imágenes de microscopía electrónica que muestran la localización de EhVps35 en trofozoítos estimulados con eritrocitos.

A-I) Trofozoítos a los 5 min de eritrofagocitosis, procesados para microscopía electrónica de transmisión usando el anticuerpo α EhVps35, seguido por el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a perlas de oro de 20 nm. En B se muestra a EhVps35 en la membrana plasmática. Al interior de la célula, en C-J la proteína EhVps35 se localizó en arreglos blancos con apariencia de doble membrana en los eritrocitos fagocitados. Ext: espacio extracelular. v: vesícula. mp: membrana plasmática. e: eritrocito. Triángulo negro: reconocimiento del anticuerpo α -EhVps35.

7.6 EhVps35 interacciona con múltiples proteínas asociadas al tráfico vesicular, secreción, motilidad, fagocitosis y citoesqueleto de actina

Debido al notorio cambio en la localización de EhVps35 durante la eritrofagocitosis se procedió a estudiar las proteínas con las que interacciona utilizando ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo α -EhVps35 y lisados de trofozoítos. El inmunoprecipitado obtenido se analizó por espectrometría de masas. La base de datos obtenida identificó a 607 proteínas, sin embargo, después del análisis de datos realizado en el software ProteinLinx Global Server (PLGS) v3.0.3 se redujeron a 300 proteínas, las cuales tenían $\geq 95\%$ de confiabilidad. Adicionalmente, la base de datos depurada fue analizada utilizando: PANTHER Classification System, GeneOntology (GO) análisis y una clasificación de acuerdo a múltiples análisis proteómicos de *E. histolytica*.

El análisis realizado en PANTHER Classification System dio como resultado que la mayor proporción de proteínas que interaccionan con EhVps35 son enzimas de interconversión de metabolitos (enzimas que convierten moléculas pequeñas en otras) y proteínas involucradas en la traducción de mRNA a proteína, ya que estas representan el 56% de las proteínas identificadas (Figura 30). Adicionalmente, se encontraron otros seis tipos de proteínas: moduladoras de la actividad proteica por unión (10 %), enzimas modificadoras de proteínas (enzimas que modifican directamente de forma covalente a otras proteínas) (8 %), proteínas del citoesqueleto (8 %), proteínas chaperonas (6 %), proteínas del metabolismo del RNA (3 %), proteínas scaffold/andamio (3 %), proteínas transportadoras (proteínas transmembranal que permite el paso de sustancias a través de la membrana plasmática) (3 %), proteínas de tráfico de membranas (proteínas en la membrana de vesículas, responsables de la acoplamiento/fusión de vesículas a otras membranas) (3 %) (Figura 29). Estos resultados sugieren que EhVps35 participa en múltiples funciones celulares, posiblemente por su función en el reciclaje proteínas. Sin embargo, no descartamos que también los resultados indiquen nuevas funciones aún no descritas, ya que algunas de estas proteínas no tienen procesos de reciclaje.

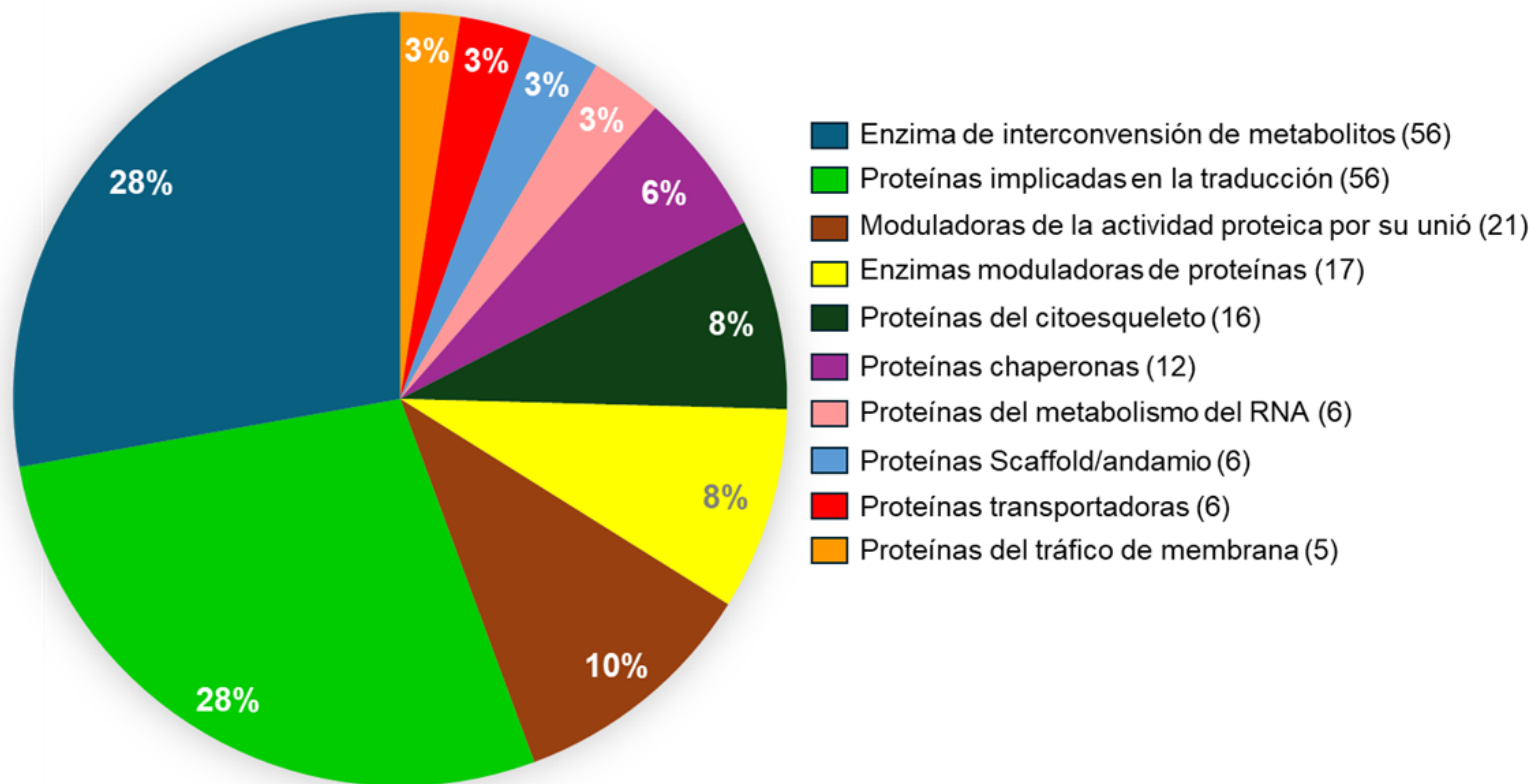


Figura 29. Clasificación obtenida en Panther Server de las proteínas que interaccionan con EhVps35.

Espectrometría de masas de ensayos de inmunoprecipitación realizados utilizando α -EhVps35 y lisados de trofozoítos. La base de datos obtenida fue analizada utilizando Panther Server y se graficó las tipos de proteínas obtenidas según su abundancia porcentual. A la derecha del gráfico se muestran las categorías por función presentes en la base de datos analizadas con el número de proteínas en cada categoría entre paréntesis.

El análisis GO organizó a las proteínas que interaccionan con EhVps35 por su ubicación celular, función molecular y proceso biológico, mediante el uso de análisis estadísticos para evaluar si la relación en las tres categorías es un evento azaroso o no, expresado como valor P y normalizado con un logaritmo negativo base 10. En el gráfico obtenido del análisis GO, se muestran las diez categorías enriquecidas con mayor significancia en las ramas de ubicación celular, función molecular y proceso biológico (Figura 30). De la clasificación basada en la ubicación celular, los datos indican que EhVps35 interacciona con proteínas intracelulares en complejos proteicos, organelos y estructuras no delimitadas por membranas como los ribosomas. Según la clasificación de proteínas por proceso biológico, las proteínas más enriquecidas fueron de unión no covalente, proteínas ribosomales, proteínas que regulan la integridad de complejos proteicos, proteínas relacionadas con el citoesqueleto y proteínas de unión a complejos proteicos u otras proteínas. La clasificación basada en procesos biológicos, agrupó a las proteínas que interaccionan con EhVps35 en proteínas relacionadas con la traducción de mRNA a proteína, procesos metabólicos, catabólicos y anabólicos, así como proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto y de unión al citoesqueleto. Por lo que, el análisis GO en resumen al igual que el análisis anterior, indica que las proteínas que interaccionan con EhVps35 son proteínas del citoplasma relacionadas con la traducción, procesos metabólicos y citoesqueleto.

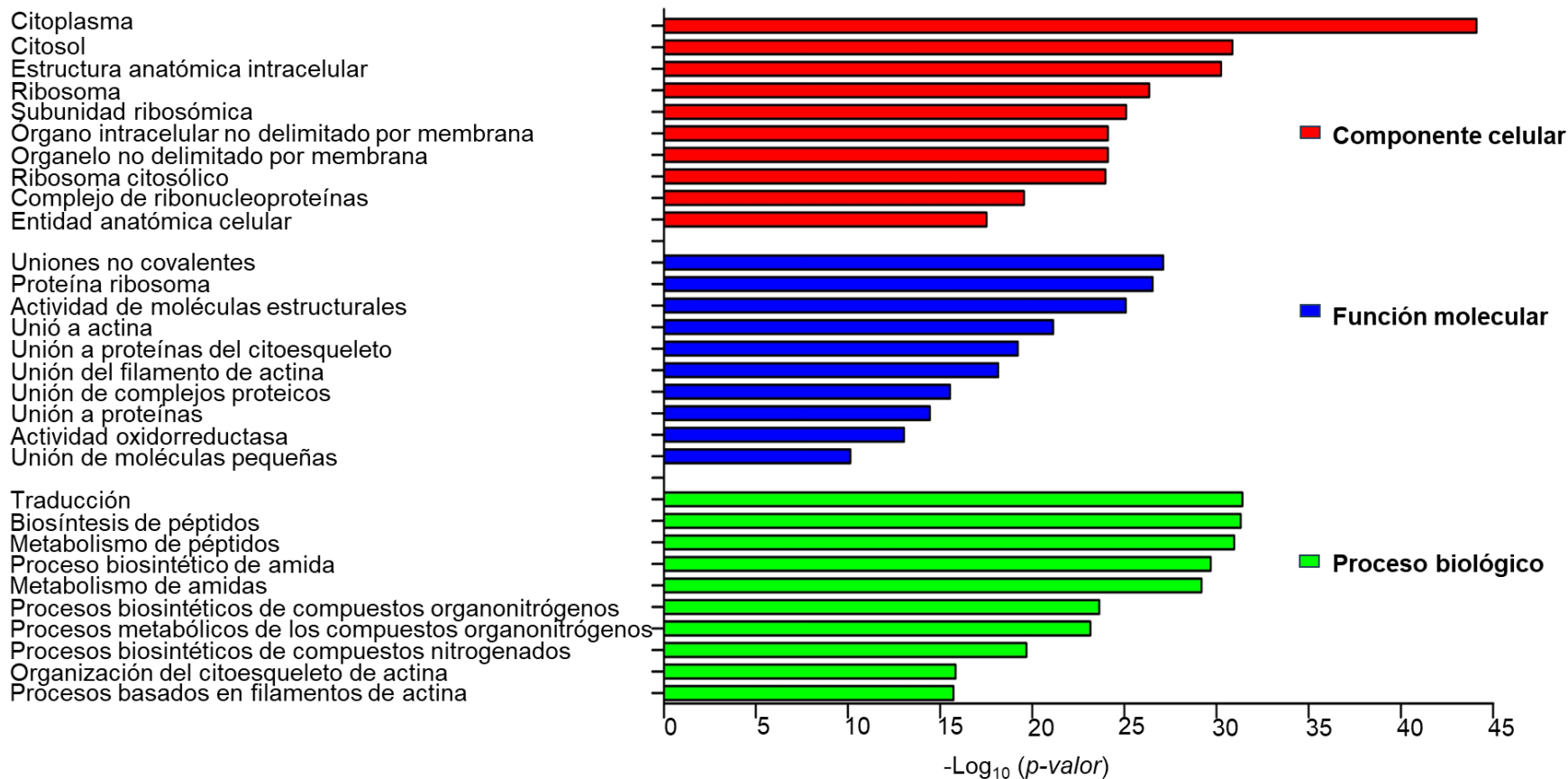
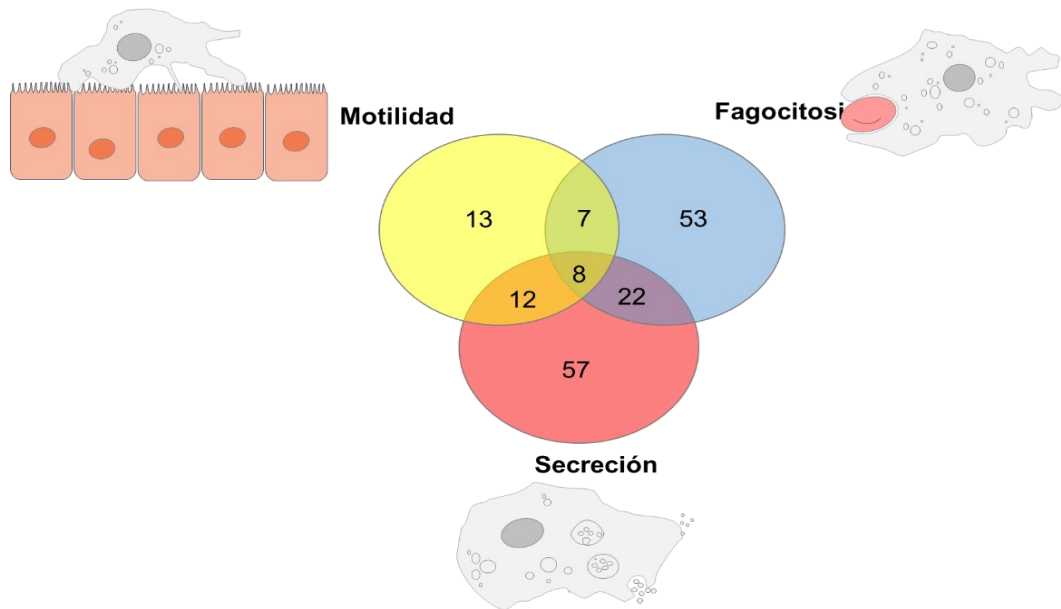


Figura 30. Análisis GO de las proteínas que interaccionan con EhVps35.

Gráfica de los valores P obtenidos del análisis GO de la base de datos de las proteínas obtenidas de ensayos de inmunoprecipitación utilizando α -EhVps35 y lisados de trofozoítos. Se presenta la normalización de los valores P utilizando el $-\log_{10}$. En las tres clasificaciones funcionales del análisis GO se presentan las 10 subclasificaciones con mayor significancia, organizadas de mayor a menor enriquecimiento de acuerdo con su valor P.

La comparación de la base de datos de proteínas que interaccionan con EhVps35 se realizó utilizando tres bases de datos proteómicas de *E. histolytica*: 1) análisis proteómicos realizados del aislamiento de pseudópodos para proteínas relacionadas con motilidad (Markiewicz et al., 2011); 2) análisis proteómicos del aislamiento de fagosomas para proteínas relacionadas con la fagocitosis (Okada y Nozaki, 2006; Watanabe et al., 2023); y 3) análisis proteómico del aislamiento de vesículas extracelulares para proteínas relacionadas con secreción (Sharma et al., 2020). De las 300 proteínas identificadas de la inmunoprecipitación de lisados de trofozoítos con α -EhVps35, se lograron relacionar con fagocitosis, secreción y motilidad a 172 proteínas (Figura 31, A). Siendo las proteínas relacionadas con secreción la mayor porción (99 proteínas), seguidas de las proteínas relacionadas con fagocitosis (90 proteínas) y finalmente las proteínas relacionadas con motilidad (40 proteínas) (Figura 31, A). Adicionalmente, la base de datos de las proteínas que interaccionan con EhVps35 se compara con análisis proteómico correspondiente a proteínas de unión a actina (ABPs, por sus siglas en inglés *Actin-binding proteins*), las cuales en conjunto con la actina son nombradas citoesqueleto de actina en *E. histolytica* (Manich et al., 2018; Rath y Gourinath, 2020). Se identificaron a 33 proteínas relacionadas al citoesqueleto de actina, las cuales, 12 son exclusivas del citoesqueleto de actina y 21 proteínas estaban relacionadas también con fagocitosis, secreción y motilidad (Figura 31, B)

A)



B)

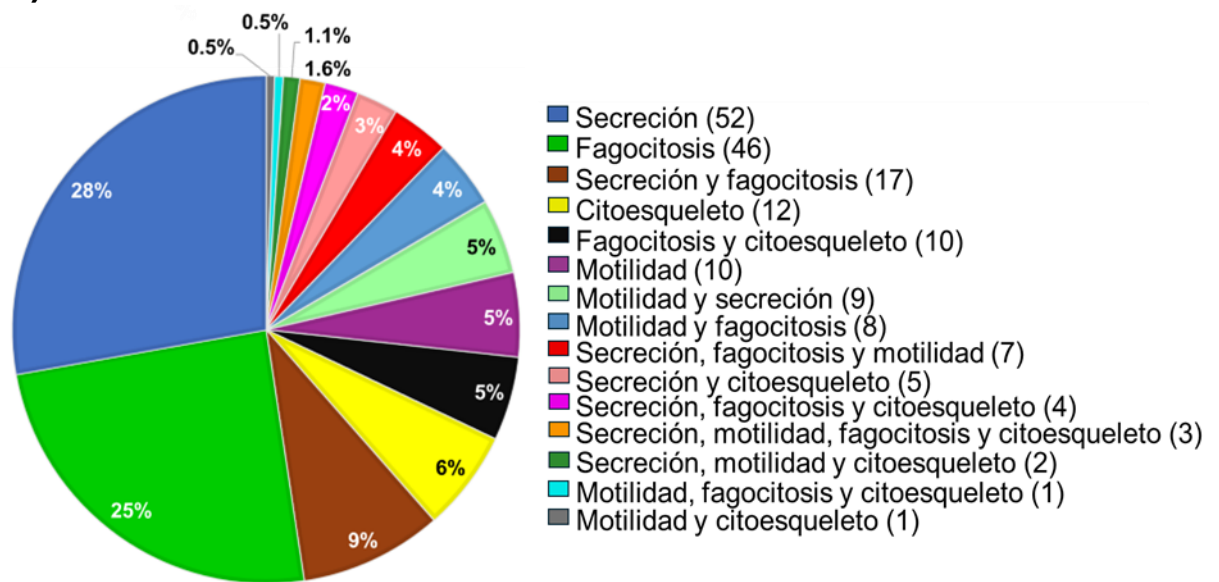


Figura 31. Proteínas que interaccionan con EhVps35 asociadas a fagocitosis, secreción, movilidad y citoesqueleto de actina.

Análisis de las proteínas identificadas por espectrometría de masas de ensayos de inmunoprecipitación realizados utilizando α -EhVps35 con lisados de trofozoítos. A) Diagrama de Venn de las proteínas que interaccionan con EhVps35, elaborado con las bases de datos de proteínas asociadas a fagocitosis, secreción y motilidad. B) Gráfica por abundancia porcentual de proteínas asociadas a fagocitosis, secreción, motilidad y citoesqueleto de actina en la base de datos de proteínas que interaccionan con EhVps35.

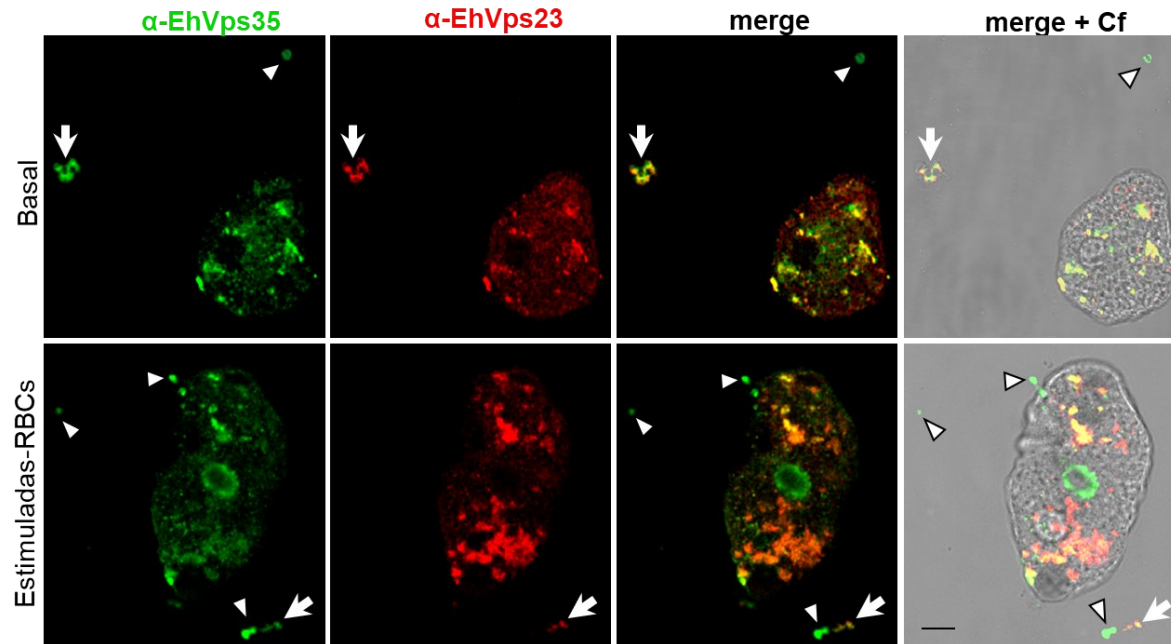
7.7 EhVps35 se secreta en vesículas extracelulares

Debido a la interacción de EhVps35 con múltiples proteínas asociadas a secreción en vesículas extracelulares, junto con el antecedente de la identificación de HsVps35 y EhVps35 en vesículas extracelulares por análisis proteómicos (Sharma et al., 2020; Tan et al., 2022), se procedió a estudiar la secreción de EhVps35 utilizando ensayos de microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión y ensayos de secreción.

Trofozoítos en condiciones basales y estimulados con eritrocitos (1:25 amiba/eritrocitos por 30 min) fueron procesados para su análisis por microscopía confocal utilizando α -EhVps35 y α -EhVps23, siendo esta última una proteína secretada en vesículas extracelulares de *E. histolytica* (Galindo et al., 2022). En los trofozoítos en condiciones basales, EhVps35 y EhVps23 co-localizaron en vesículas extracelulares y citoplasmáticas (Figura 32, A). Interesantemente, fue más común observar vesículas extracelulares en trofozoítos estimulados con eritrocitos (Figura 32, A).

Los ensayos de secreción corroboraron que EhVps35, presenta una disminución producto del estímulo con eritrocitos, como se observó en la sección 7.3. Además, EhVps35 estuvo presente en los productos de secreción en ambas condiciones, teniendo un aparente incremento en los productos de secreción de trofozoítos estimulados con eritrocitos. EhVps23, como se esperaba al igual que sus homologos en otros organismos podría ser un un marcador de vesículas extracelulares en otros organismos, ya que no mostró variaciones en su secreción durante este ensayo (Figura 32, B). En cuanto a los controles, se muestra un correcto reconocimiento de ambos, EhCP112, el control positivo, presente en los productos de secreción de ambas condiciones, mientras que actina, el control negativo, ausente en los productos de secreción (Figura 32, B).

A)



B)

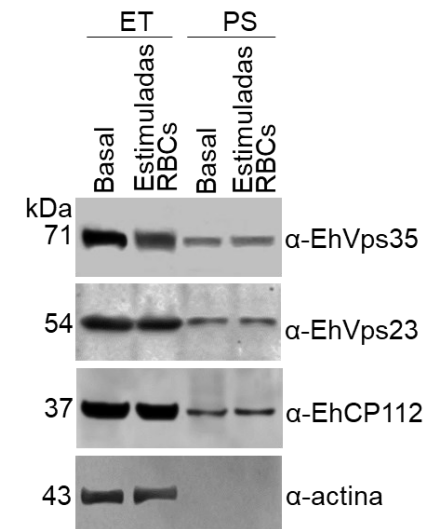


Figura 32. Las proteínas EhVps35 y EhVps23 se secretan en trofozoítos en condiciones basales y estimulados con eritrocitos.

Trofozoítos en condiciones basales y estimulados con eritrocitos por 30 min (estimulados-RBCs) fueron procesados para microscopía confocal y ensayos de secreción. A) Imágenes de microscopía confocal utilizando α -EhVps35 (verde) y α -EhVps23 (rojo) de trofozoítos no estimulados y estimulados. Triángulos blancos: vesículas extracelulares marcadas solo con EhVps35. Flecha blanca: vesículas extracelulares marcadas con EhVps35 y EhVps23. Barra de escala representa 10 nm. B) *Western blot* de los ensayos de secreción utilizando los anticuerpos α -EhVps35, α -EhVps23, α -EhCP112 y α -actina. Control positivo de secreción: α -EhCP112. Control negativo de secreción e integridad de los trofozoítos: α -actina. ET: muestras de extractos de trofozoítos. PS: productos de secreción.

Debido a la presencia de la proteína EhVps35 en productos de secreción, se procedió a analizar la presencia de esta proteína en los MVBs y las vesículas extracelulares de los trofozoítos. Ya que Vps35 en humanos, participa en la formación/liberación de exosomas, estructuras que proceden de la secreción de las vesículas intraluminales (ILVs, por sus siglas en inglés *Intraluminal vesicles*) contenidas en los MVBs (Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022). Adicionalmente, se analizaron a dos proteínas de la maquinaria ESCRT (EhVps23 y EhADH), ya que esta maquinaria es la responsable de la formación de los MVBs.

Trofozoítos en condiciones basales fueron procesados para su análisis en microscopía electrónica de transmisión, utilizando α -EhVps35 y α -IgG de ratón acoplado a partículas de oro de 20 nm. En las imágenes obtenidas de regiones cercanas a la membrana plasmática identificaron MVBs con presencia de EhVps35, específicamente en la membrana de dichas estructuras y en las ILVs (Figura 33, A-D). Para corroborar la presencia de EhVps35 en los MVBs, se realizó un nuevo ensayo de microscopía electrónica de transmisión utilizando los anticuerpos α -EhVps23 (10 nm) y α -EhVps35 (30 nm). Las proteínas EhVps35 y EhVps23 (ESCRT-I) se ubicaron en MVBs (Figura 33, F-I). Por lo que, se procedió a estudiar la secreción de EhVps35 en vesículas extracelulares realizando una purificación de estas estructuras para su análisis por microscopía electrónica de transmisión utilizando los anticuerpos α -EhVps23 (ESCRT-I), α -EhADH (proteína accesoria de ESCRT) y α -EhVps35. Se utilizó a dos proteínas de la maquinaria ESCRT para identificar vesículas extracelulares relacionadas con la secreción de ILVs, es decir, exosomas. Se obtuvieron imágenes de vesículas extracelulares con diámetros entre 32 a 297 nm. Dichas estructuras presentaron reconocimiento de las proteínas EhVps35 (20 nm), EhVps23 (10 nm) y EhADH (30 nm) en la membrana de vesículas extracelulares y dentro de las mismas (Figura 34). Es importante destacar que, es la primera vez que se reportan imágenes de la presencia de EhADH y EhVps35 en vesículas extracelulares. En algunas vesículas extracelulares se observó a la proteína EhVps35 junto con EhVps23 o EhADH, por lo que posiblemente EhVps35 se secreta en exosomas.

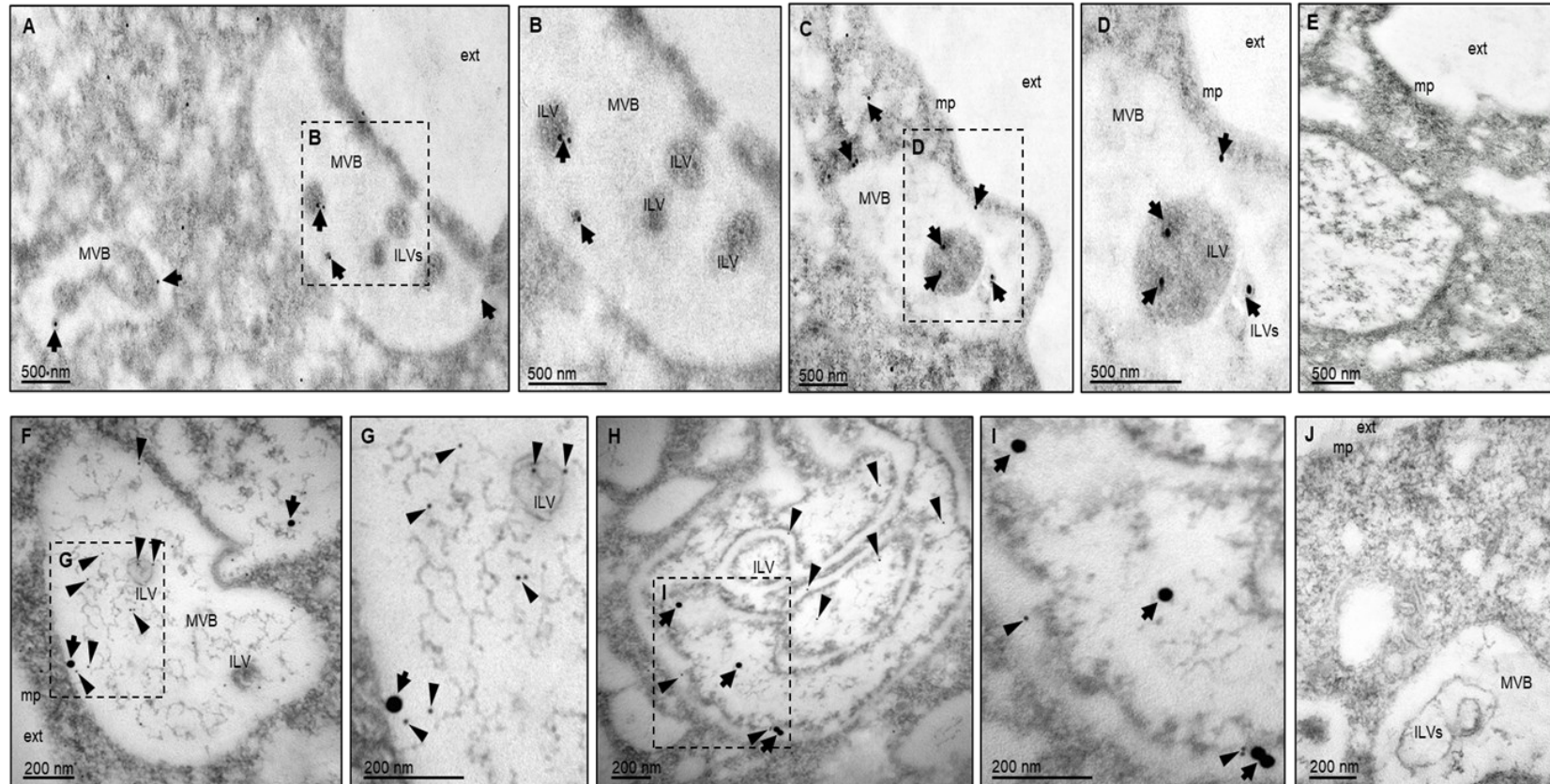


Figura 33. EhVps35 se localizó en MVBs en trofozoítos en condiciones basales.

Trofozoítos en condiciones basales fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión (MET). A-D) Imágenes de MET de trofozoítos con inmunomarcaje de EhVps35 utilizando α -EhVps35 y α -IgG de ratón acoplado a perlas de oro de 20 nm. Flecha negra: α -EhVps35 (20 nm). E) Control negativo: trofozoítos procesados para MET usando únicamente el anticuerpo secundario α -IgG de ratón (20 nm). F-I) Imágenes de MET de trofozoítos con inmunomarcaje de EhVps35 y EhVps23 utilizando α -EhVps35, α -EhVps23, α -IgG de ratón (30 nm) y α -IgG de rata (10 nm). C) Control negativo: trofozoítos procesados para MET usando únicamente con los anticuerpos secundarios α -IgG de ratón (30 nm) y α -IgG de rata (10 nm). Ext: espacio extracelular. v: vesícula. mp: membrana plasmática. Flecha negra: α -EhVps35 (30 nm). Triángulo negro: α -EhVps23 (10 nm).

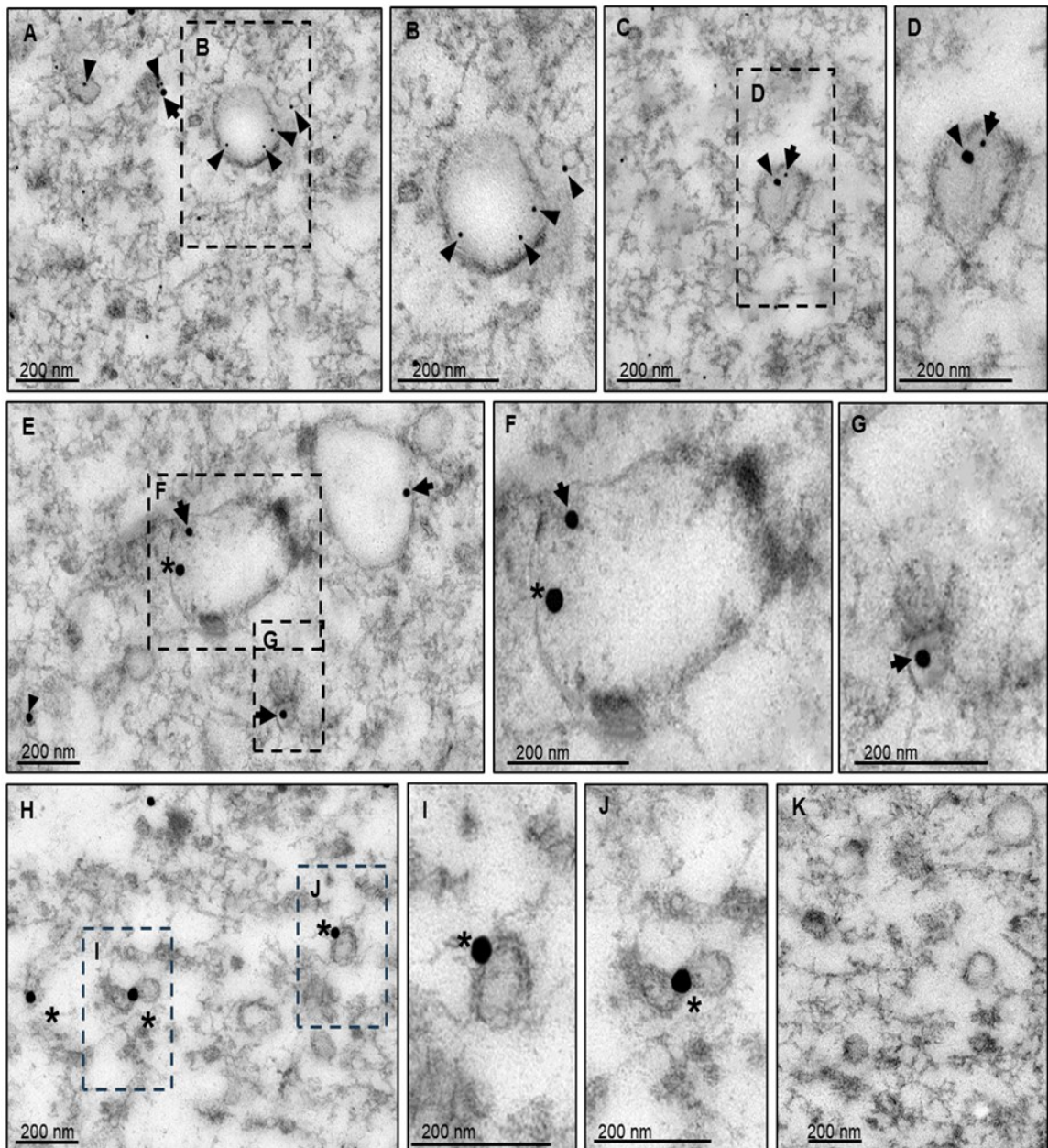


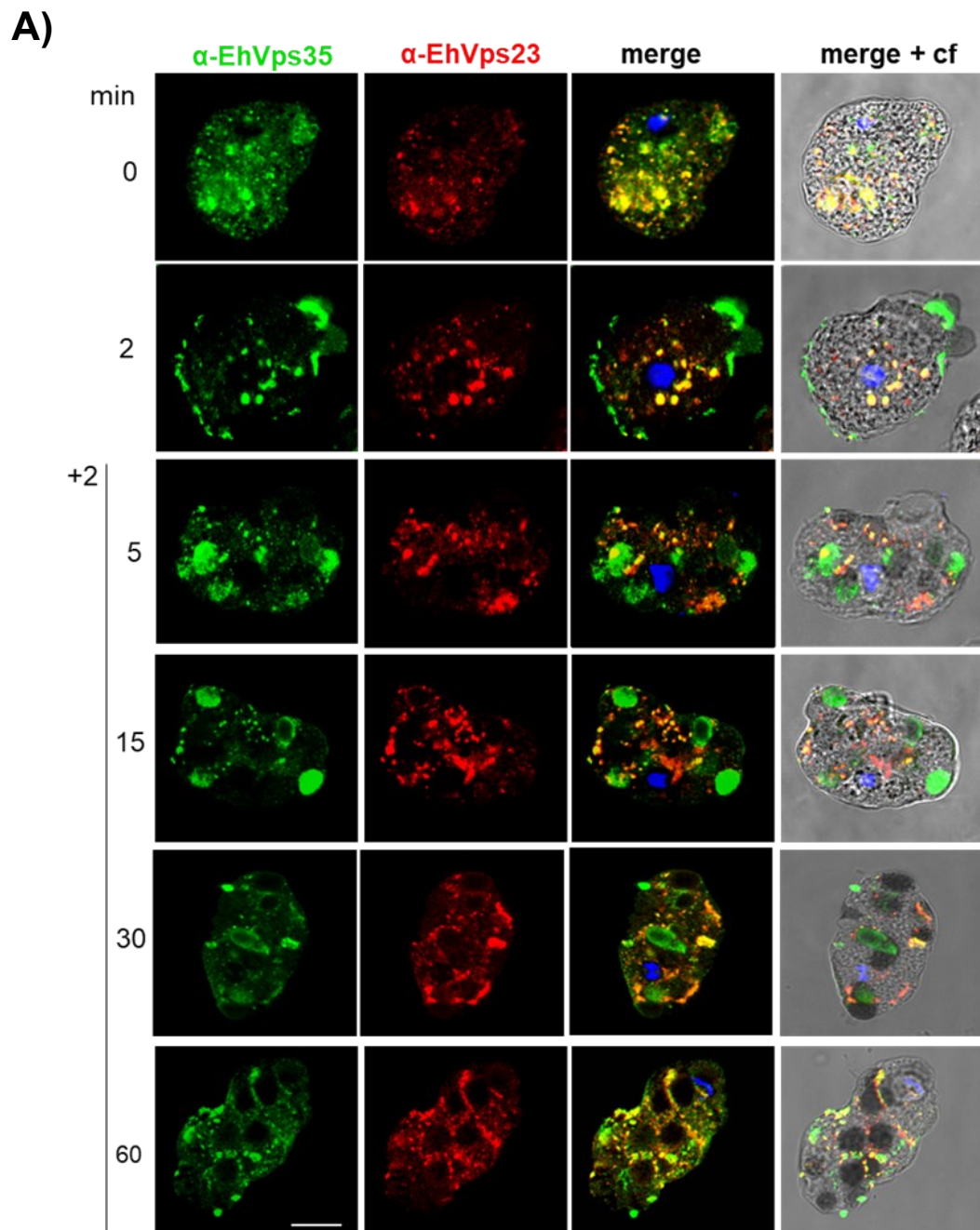
Figura 34. EhVps35 se secreta en vesículas extracelulares.

Vesículas extracelulares purificadas de trofozoítos en condiciones basales y procesadas para microscopía electrónica de transmisión (MET). A-D) Imágenes de vesículas extracelulares procesadas para MET utilizando α -EhVps35 (20 nm) y α -EhVps23 (10 nm). E-J) Imágenes de vesículas extracelulares procesadas para MET utilizando α -EhVps35 (20 nm) y α -EhADH (30 nm). K) Control negativo: vesículas extracelulares procesados para MET usando únicamente los anticuerpos secundarios. Flecha negra: α -EhVps35 (20 nm). Triángulo negro: α -EhVps23 (10 nm). Asterisco: α -EhADH (30 nm).

7.8 EhVps35 co-localizó con EhVps23 y EhADH durante la fagocitosis

Para analizar la localización de EhVps35 en los MBVs, se realizaron ensayos de microscopía confocal en trofozoítos durante una cinética de eritrofagocitosis para investigar la co-localización de EhVps35 con proteínas de la maquinaria ESCRT (EhVps23 y EhADH), las cuales participan en la formación de los MVBs.

Trofozoítos provenientes de ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza fueron procesados para microscopía confocal utilizando α -EhVps35 y α -EhVps23. En los trofozoítos en condiciones basales, EhVps35 y EhVps23 co-localizaron múltiples regiones del citoplasma. En trofozoítos estimulados con eritrocitos disminuyó la co-localización entre EhVps35 y EhVps23, recuperándose a niveles similares a las condiciones basales a los 60 min de eritrofagocitosis (Figura 35, A y B). A los 2 min de fagocitosis EhVps35 se localizó hacia las regiones de contacto con los eritrocitos, y co-localizó con EhVps23 puntualmente en algunas estructuras vesiculares en el citoplasma; mientras de los 5 a 30 min de fagocitosis ambas proteínas co-localizaron en algunos fagosomas. Por último, a los 60 min de fagocitosis EhVps35 y EhVps23 co-localizaron alrededor de algunos fagosomas. Al realizar la cuantificación de la co-localización utilizando la correlación de Pearson en los tiempos analizados de la cinética de fagocitosis, se observaron valores altos (>0.5) entre EhVps35 y EhVps23 en condiciones basales y a los 60 min de eritrofagocitosis, así como una reducción significativa en los tiempos de eritrofagocitosis intermedios con valores de correlación de Pearson entre 0.46 a 0.3 (Figura 35, B). Lo cual sugiere que EhVps35 y EhVps23 presentan una alta relación en condiciones basales y a los 60 min de fagocitosis



B)

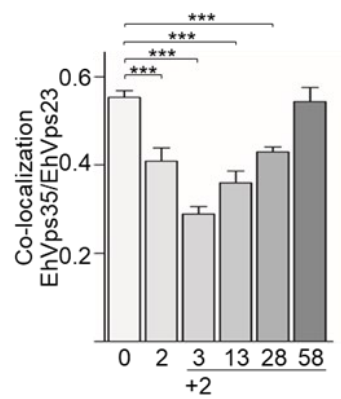
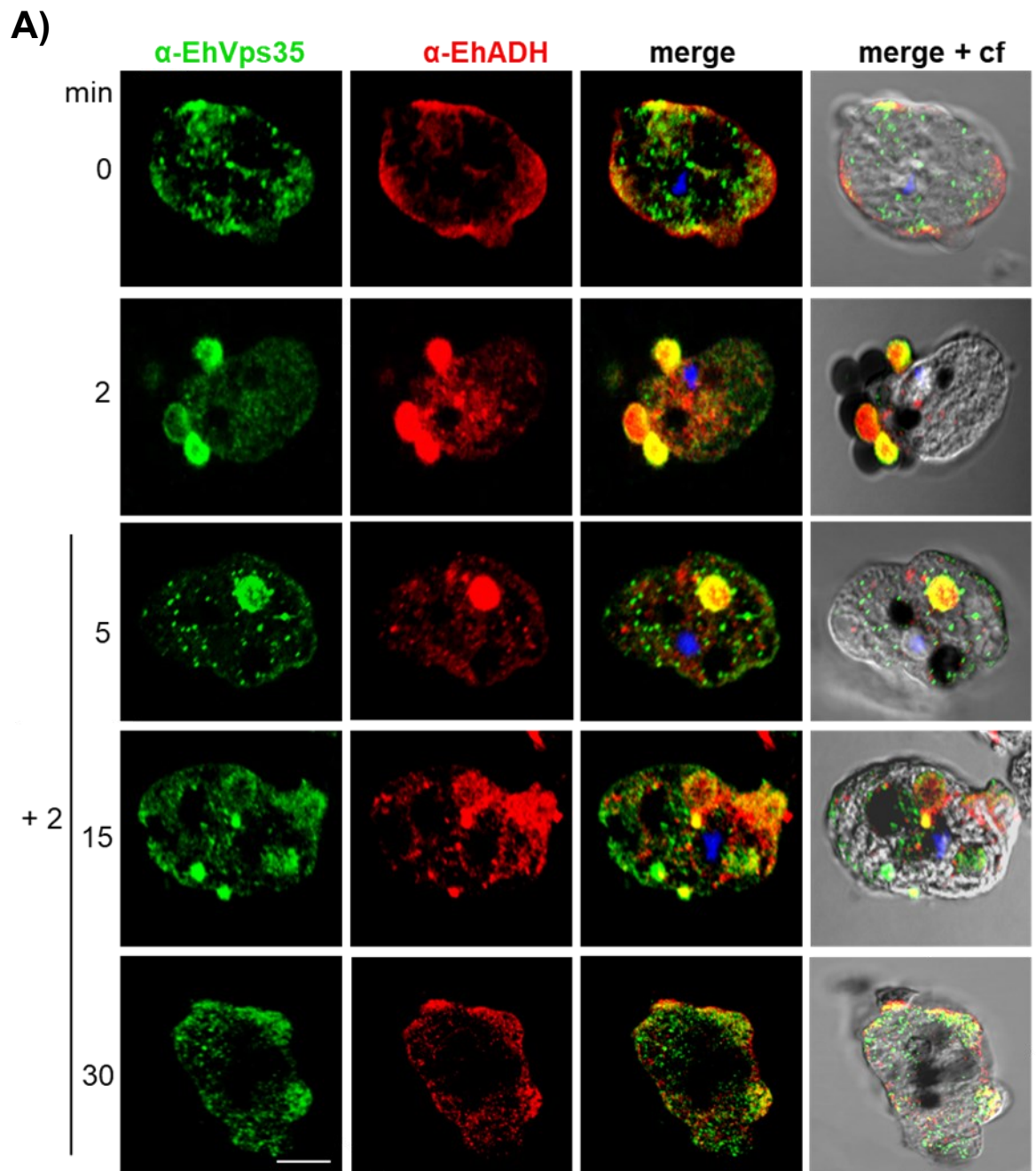


Figura 35. Co-localización de EhVps35 y EhVps23 durante la eritrofagocitosis.

Ensayo de eritrofagocitosis por pulso y caza, realizado con una incubación con eritrocitos por 2 min (tiempo de pulso), posterior eliminación de eritrocitos no ingeridos y finalmente, los trofozoítos se incubaron a 37 °C por distintos tiempos (3, 13, 28 y 58 min). A) Imágenes de microscopía confocal de trofozoítos procedentes de ensayos de eritrofagocitosis con inmunomarcage de EhVps35 (verde) y EhVps23 (rojo). DAPI: marcaje de núcleo en azul. Barra de escala, 10 μm . B) Co-localización entre EhVps35 y EhVps23 calculada utilizando el valor de correlación de Pearson. *** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza de trofozoítos HM1: IMSS procesados para microscopía confocal utilizando α -EhVps35 y α -EhADH mostraron la co-localización putual en la membrana plasmática de estas proteínas en condiciones basales (Figura 36, A). A los 2 min de fagocitosis, EhADH y EhVps35 co-localizaron hacia las regiones de contacto con los eritrocitos; mientras a los 5 y 15 min de fagocitosis EhADH y EhVps35 se observaron juntas en algunos fagosomas. Por último, a los 60 min de fagocitosis, EhADH se localizó nuevamente hacia la membrana plasmática, donde co-localizó en algunos puntos con EhVps35. Al realizar la cuantificación de la co-localización utilizando la correlación de Pearson en las imágenes de microscopía confocal de la cinética de fagocitosis. En condiciones basales y de los 5 a 30 min de fagocitosis se presentaron valores de correlación de Pearson entre 0.49 y 0.5, que indican moderados relación entre EhVps35 y EhADH (Figura 36, B). A los 2 min de fagocitosis se observaron valores de correlación de Pearson significativamente mayores (0.59), lo que sugiere una alta relación entre EhVps35 y EhADH en este tiempo de fagocitosis.

En algunos de los tiempos analizados se observaron estructuras parecidas a MVBs, las cuales fueron más evidentes a los 30 min de eritrofagocitosis. En la Figura 37 se muestra imágenes representativas con acercamientos a la ubicación de EhVps35 co-localizando con EhVps23 y EhADH en los MVBs.



B)

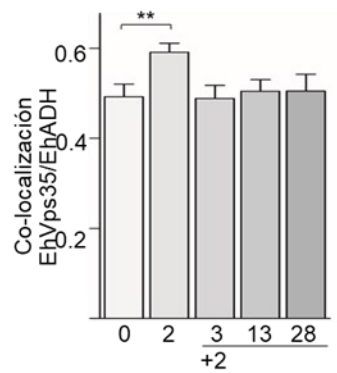


Figura 36. Co-localización de EhADH y EhVps23 durante la eritrofagocitosis.

Ensayo de eritrofagocitosis por pulso y caza, realizado con una incubación con eritrocitos por 2 min (tiempo de pulso), posterior eliminación de eritrocitos no ingeridos y finalmente, los trofozoítos se incubaron a 37 °C por distintos tiempos (3, 13 o 28 min). A) Imágenes de microscopía confocal de trofozoítos procedentes de ensayos de eritrofagocitosis con inmunomarcaje de EhVps35 (verde) y EhADH (rojo). DAPI: marcaje de núcleo en azul. Barra de escala, 10 µm. B) Co-localización entre EhVps35 y EhADH calculada utilizando el valor de correlación de Pearson. **p<0.01.

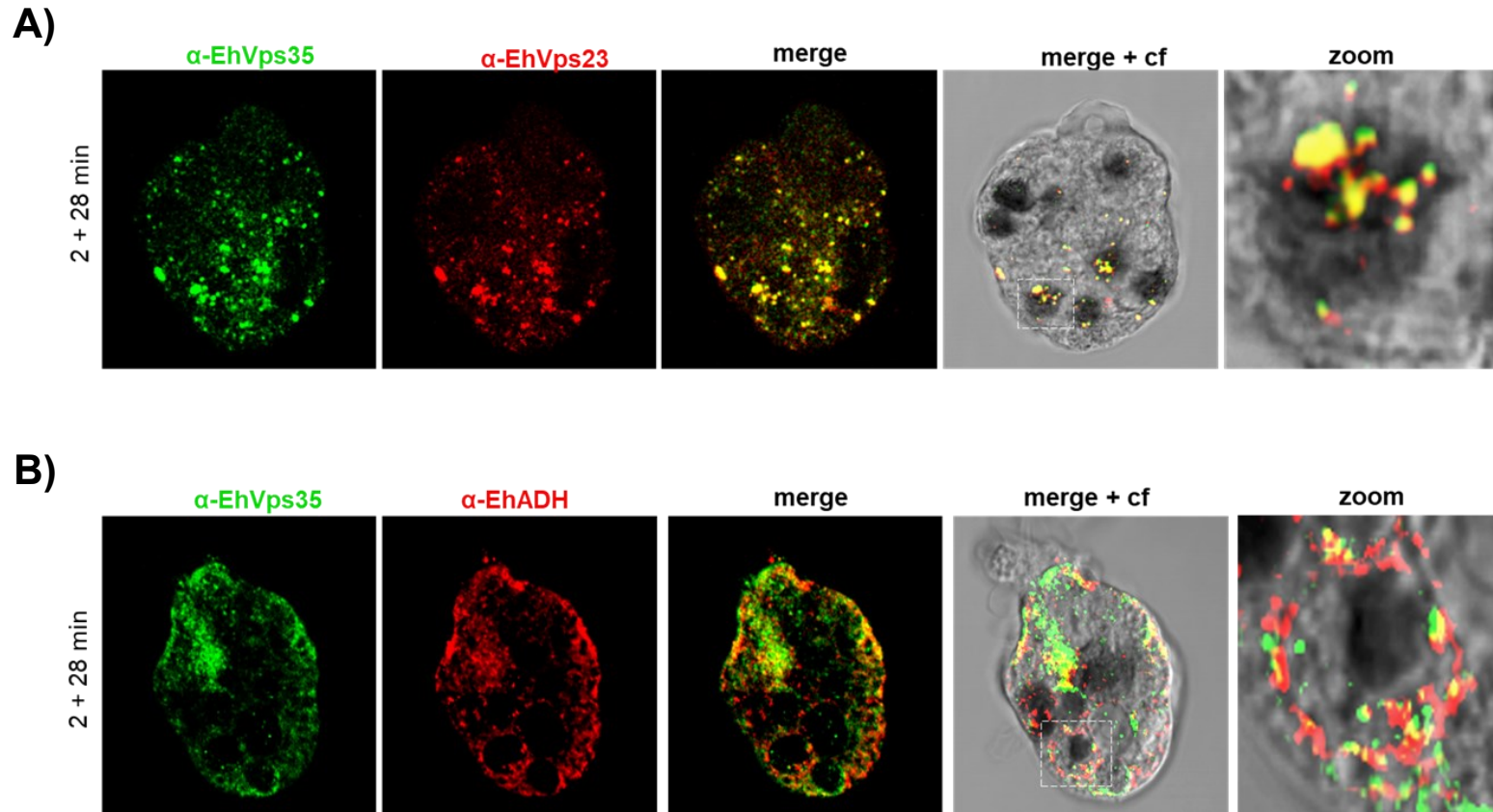


Figura 37. Co-localización entre EhVps35/EhVps23 y EhVps35/EhADH en MVBs.

Ensayo de eritrofagocitosis por pulso y caza, realizado con una incubación de 2 min (tiempo de pulso) con eritrocitos, posteriormente se eliminaron los eritrocitos no ingeridos y finalmente se realizó una incubación a 37°C por 28 min. A) Imágenes de microscopía confocal de trofozoitos procedentes de ensayos de eritrofagocitosis con inmunomarcaje de EhVps35 (verde) y EhVps23 (rojo). El recuadro con línea punteada corresponde a magnificaciones de regiones marcadas en A donde EhVps35 se localizó en cuerpos multivesiculares (MVBs). B) Imágenes de microscopía confocal de trofozoitos procedentes de ensayos de eritrofagocitosis con inmunomarcaje de EhVps35 (verde) y EhADH (rojo). El recuadro con línea punteada corresponde a magnificaciones de regiones marcada en B donde EhVps35 se ubicó en MVBs. Barra de escala, 10 μ m.

7.9 EhVps35 interacciona con EhTom1, EhVps23, EhVps32, EhADH, la subunidad pesada de Gal/GalNac y actina

El análisis *in silico* realizado en el programa STRING para predecir las interacciones de EhVps35 con otras proteínas, sugirió una posible interacción entre el retrómero y la maquinaria ESCRT, por la presencia de la proteína EhVps36 (ESCRT-II) (Díaz-Valdez, 2018). Adicionalmente, Galindo et al. (2022) reportó la presencia de dos proteínas retroméricas, EhVps35 y EhVps26, en proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo α -EhVps23, lo cual sugiere una relación entre la proteína EhVps23 (ESCRT-I) y el retrómero. Por estos antecedentes, se procedió a realizar ensayos de inmunoprecipitación utilizando α -EhVps35 y lisados de trofozoítos en condiciones basales. Como control de la inmunoprecipitación, se utilizó el suero preinmune de ratón (IgG de ratón) en la misma cantidad que el anticuerpo α -EhVps35. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por *western blot* utilizando los anticuerpos α -EhVps35, α -EhVps26, α -EhTom1, α -EhVps23, α -EhVps36, α -EhVps32, α -EhADH, α -Hgl y α -actina. Se verificó la presencia de EhVps35 y EhVps26, esta última por ser una proteína del retrómero que interacciona directamente con EhVps35 (Nakada-Tsukui et al., 2005). Los resultados evidenciaron la interacción directa o indirecta de EhVps35 con múltiples proteínas de la maquinaria ESCRT, específicamente con EhTom1 (ESCRT-0), EhVps23 (ESCRT-I), EhVps32 (ESCRT-III) y EhADH (proteína accesoria de la maquinaria ESCRT) (Figura 38). Adicionalmente, entre las proteínas inmunoprecipitadas estuvo presente la subunidad pesada (Hgl) de Gal/GalNac, una proteína transmembranal con un transporte rutinario entre la membrana plasmática y el citoplasma (Figura 38). También, se corroboró la relación de EhVps35 con el citoesqueleto de actina previamente observada en el análisis por espectrometría de masas de las proteínas inmunoprecipitadas utilizando α -EhVps35 con lisados de trofozoítos (Sección 7.5), ya que la proteína actina se identificó entre las proteínas inmunoprecipitadas en el ensayo de *western blot* (Figura 38).

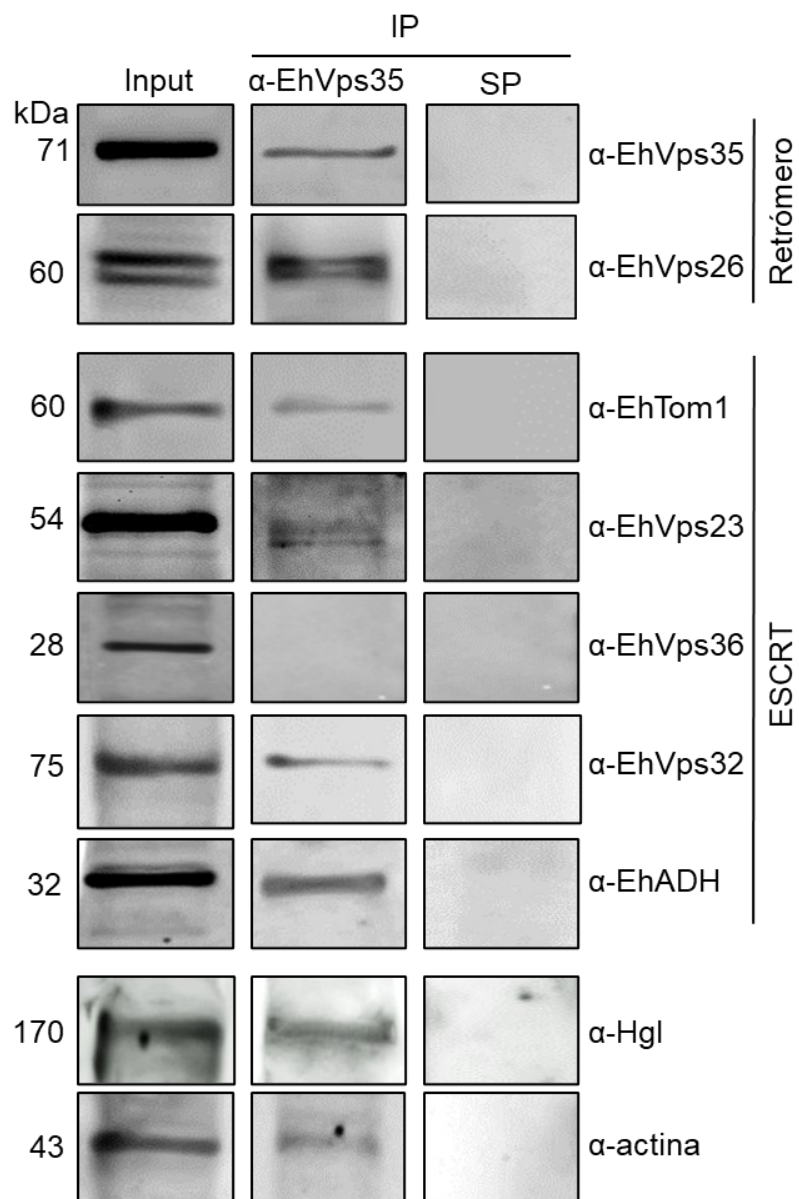


Figura 38. Ensayo de inmunoprecipitación utilizando α -EhVps35 analizado por *western blot*.

Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando α -EhVps35 o el suero preinmune de ratón (SP) con lisados de trofozoítos en condiciones basales. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por *western blot* utilizando los anticuerpos α -EhVps35, α -EhVps26, α -EhTom1 (ESCRT-0), α -EhVps23 (ESCRT-I), α -EhVps36 (ESCRT-II), α -EhVps32 (ESCRT-III), α -EhADH (proteína accesoria de la maquinaria ESCRT), α -Hgl (subunidad pesada de la lectina Gal/GalNac) y α -actina.

Los resultados obtenidos de la inmunoprecipitación fueron corroborados por ensayos bioinformáticos de acoplamiento molecular, para lo cual primero se realizó la obtención del modelo 3D de EhVps35 y EhTom1. La estructura 3D de EhVps35 que se obtuvo utilizando el servidor I-TASSER (Díaz-Valdez, 2018) y llevando a cabo una simulación de la dinámica molecular (DMS). El modelo 3D fue empleado para realizar un alinamiento estructural con el cristal HsVps35 (PDB: 7BLN:C), ensayo en el que se obtuvo un valor de desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés *root mean square desciation*) de de 1.07 Å. Sugiriendo, una gran homología estructural al del modelo 3D de EhVps35 con sus homólogos, ya que presenta una estructura de α -solenoides (Figura 39, A-C) (Hierro et al., 2007; Lucas et al., 2016). El modelo de 3D de EhVps35 se utilizó para realizar una DMS de 200 ns con el cual se obtuvo una trayectoria oscilante de ± 3 Å en su valor de RMSD (Figura 39, D); mientras los datos de radio de giro (R_g , por sus siglas en inglés *radius of gyration*) confirmaron que EhVps35 es una proteína extendida que se compactó a los 25, y 50 100 ns (Figura 39, E). Los valores de fluctuación cuadrática media (RMSF, por sus siglas en inglés *root mean square fluctuation*) mostraron un alto movimiento de las proteínas en la región N-terminal de los aminoácidos 1-199 y en la región C-terminal de los aminoácidos 501-757 (Figura 39, F).

La estructura 3D de EhTom1 que se obtuvo utilizando el servidor I-TASSER y el cristal del dominio VHS de HsTm1 (PDB:ELK1) (Galindo A., 2016). El modelo de 3D de EhTom1 se utilizó para realizar la DMS con el cual se obtuvo una trayectoria oscilante de ± 3 Å en su valor de RMSD (Figura 40, A); mientras los datos de R_g predijeron que EhTom1 se extiende los 20, 65, 81, 92 y 185 ns (Figura 40, B). Los valores RMSF mostraron regiones de alto movimiento dispersas por toda la proteína (Figura 40, C). El modelo 3D de EhTom1 obtenido de la DMS fue similar al reportado por Galindo A., (2016), una estructura compuesta por múltiples α -hélices que componen sus dominios (Figura 40, D).

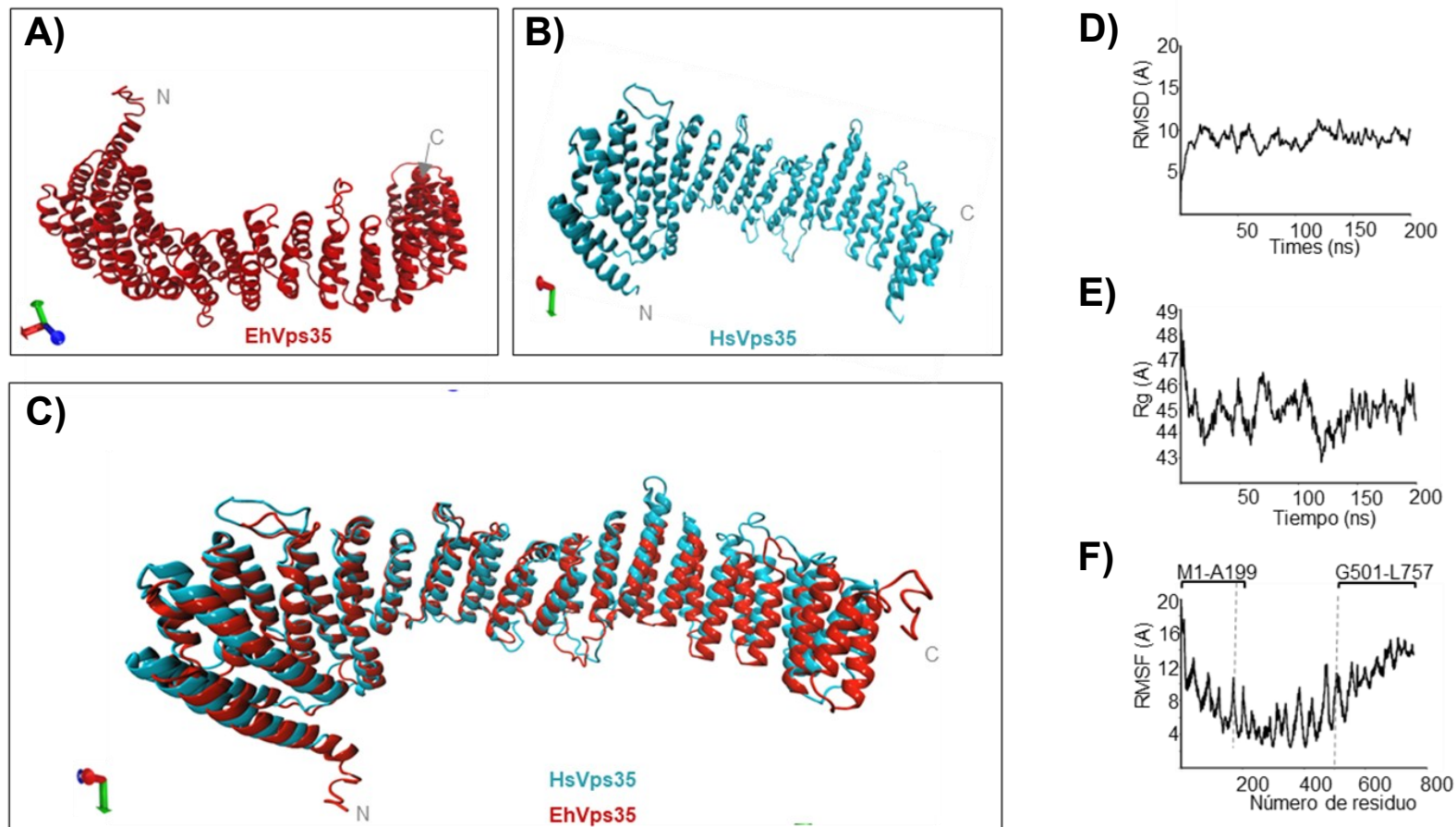


Figura 39. Simulación de la dinámica molecular del modelo 3D de EhVps35.

A) Modelo predictivo 3D de EhVps35 obtenido después de la simulación de la dinámica molecular (DMS). B) Modelo 3D de HsVps35. C) Alineamiento estructural entre EhVps35 y HsVps35. D) Desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés *root mean square desciation*). E) Radio de giro (Rg, por sus siglas en inglés *radius of gyration*). F) Fluctuación cuadrática media (RMSF, por sus siglas en inglés *root mean square fluctuation*). Los corchetes indican las regiones más flexibles.

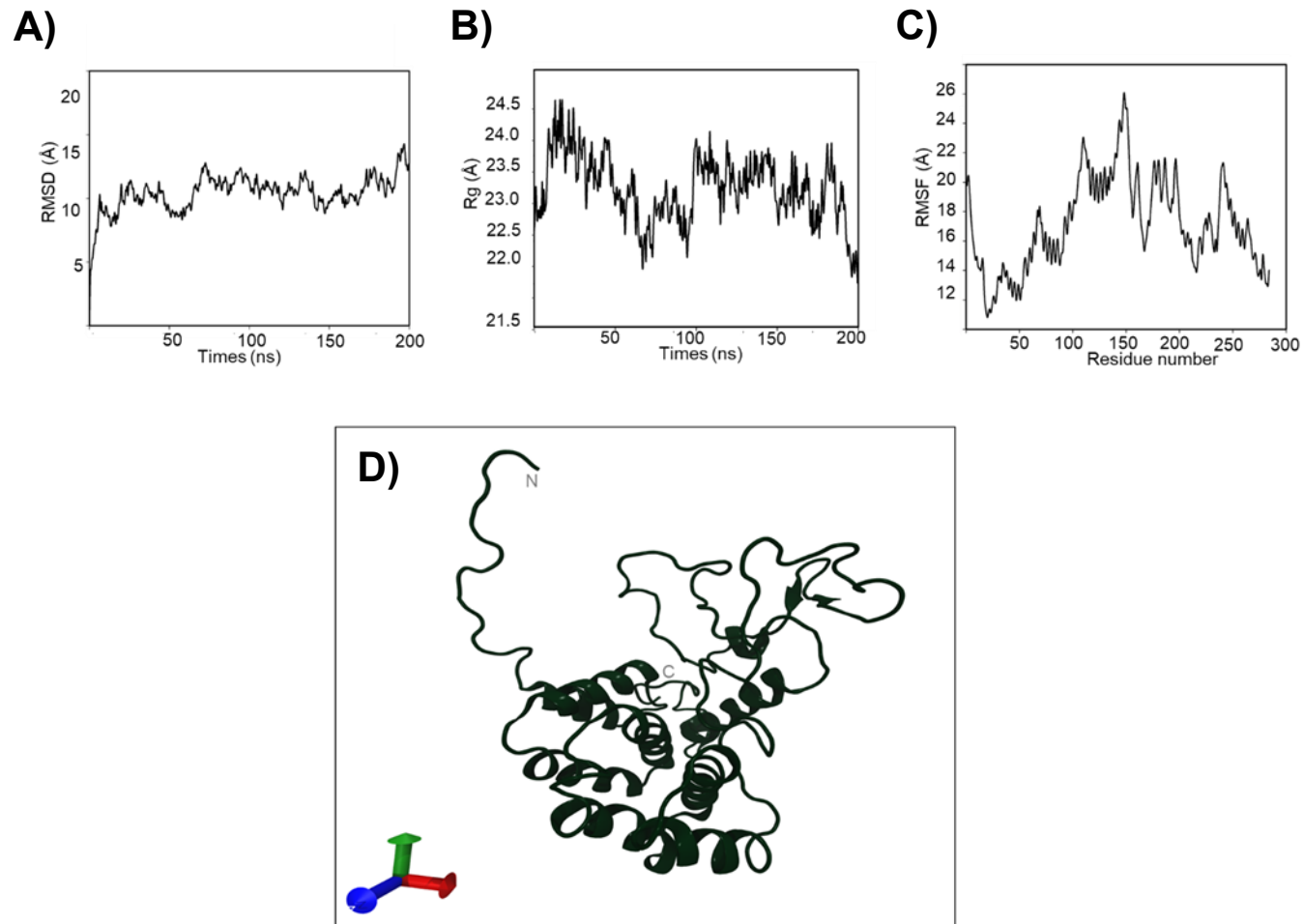


Figura 40. Simulación de la dinámica molecular del modelo 3D de EhTom1.

A) Desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés *root mean square desciation*) B) Radio de giro (Rg, por sus siglas en inglés *radious of gyration*). C) Fluctuación cuadrática media (RMSF, por sus siglas en inglés *root mean square fluctuation*). D) Modelo 3D de EhTom1 obtenido después de la simulación de la dinámica molecular (DMS).

Los acoplamientos moleculares entre EhVps35-EhTom1, EhVps35-EhVps23, EhVps35-EhVps32 y EhVps35-EhADH se realizaron utilizando el modelo 3D reportados para las proteínas EhVps23, EhVps32 y EhADH (Montaño et al., 2017; Galindo et al., 2022), así como los modelos 3D obtenidos para EhVps35 y EhTom1.

El acoplamiento molecular predijo una interacción EhVps35-EhTom1 con una energía libre global calculada en $\Delta G = -986.8$ (Figura 41). Los residuos predichos de EhVps35 que interaccionaron con EhTom1 fueron K65, Y68, Q75, D157, D209, R212, Q216, R220, Q223, N227, S266, K302, E311, E312, D316, P317 y R321 (Figura 43, A). Mientras que en EhTom1 fueron los residuos M1, L2, M3, N4, L5, L8, D175, E176, C177, E178, Q179, I181, C184, Q185, F186, L187, Y193, L197, R227 y D230. Los residuos R227 y D230 se localizaron en el dominio GAT de EhTom1 (Figura 43, B), que tiene unión a ubiquitina (Bañuelos et al., 2022). La mayoría de los residuos en EhTom1 que interaccionan con EhVps35 se localizaron entre los dominios VHS y GAT (Figura 42, A), sugiriendo que la unión EhVps35-EhTom1 no interfiere con la unión de EhTom1 a otras proteínas (Figura 42, B).

El análisis de acoplamiento molecular predijo una interacción EhVps35-EhVps23 con una energía libre de $\Delta G = -1082.46$ (Figura 41). Los residuos predichos en EhVps35 que interaccionaron con EhVps23 fueron R3, E13, E14, Q16, Y105, R109, E137, K147, K192, L197, R196, R202, D203, y C251 (Figura 42, A). Mientras, en EhVps23 los residuos fueron E49, R66, E93, Q142, Q144, N145, S146, T149, Q152, S188, S197, Q201, Y202, T336, S345 y Y490. Solo tres residuos de EhVps23 se ubicaron en el dominio UEV (E49, R66, y E94), y un residuo (Y490) en EhVps23 se ubicó en el dominio Vps23 core. La mayoría de los residuos predichos de EhVps23 se localizaron entre los dominios UEV y Vps23 core, sugiriendo que la interacción EhVps23-EhVps35 no interfiere con la unión de EhVps23 a otras proteínas de la maquinaria ESCRT o proteínas como la EhUbiquitina (EhUb) y LBPA (Figura 42, B) (Galindo et al., 2021). El dominio UEV de EhVps23 participa en la unión a EhUb, EhVps36, EhVps32, y EhADH

(Galindo et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2023); mientras que, en otros organismos, el dominio Vps23 core es responsable del reclutamiento de otras proteínas de la maquinaria ESCRT (Kostelansky et al., 2007).

El acoplamiento molecular predijo una interacción entre EhVps35-EhVps32 con una energía global libre de $\Delta G = -845.5$ (Figura 41). Los residuos predichos en EhVps35 que interaccionaron con EhVps32 fueron S2, R3, Q5, R6, D7, S8, V9, S12, Q16, K21, R25, y H69 (Figura 42, A). Mientras, los residuos en EhVps32 fueron D121, N126, N127, H131, L137, E139, D140, L141, Q142, D143, D145, E148, y L149, todos localizados en el dominio Snf7 de EhVps32. La mayoría de los residuos de EhVps32 (D121, N127, H131, L137, E139, D140, L141, Q142, D145 y E148) son los mismos que fueron predichos en el acoplamiento molecular entre EhVps32-EhVps23 (Figura 42, B) (Galindo et al., 2021). Sugiriendo que la interacción EhVps35-EhVps32 previene la interacción EhVps23-EhVps32, o que estas interacciones ocurren rápidamente.

El análisis de acoplamiento molecular predijo una interacción entre EhVps35-EhADH con una energía libre de $\Delta G = -920.6$ (Figura 41). Los residuos predichos en EhVps35 que interaccionan con EhADH fueron H271, E312, L315, D316, Q320, R321, N323, S329, y Y233 (Figura 42, A). Mientras, los residuos en EhADH fueron K98, K100, Y445, Y457, R663, Q673, Q674, P675, Y676, G679, T680, y N681. Sugiriendo que, la unión entre EhADH y EhVps35 no interfiere con el dominio Bro1 o el dominio de adhesión en EhADH, excepto por los residuos K98, K100, y Y457 localizados en el dominio Bro1 de EhADH (Figura 42, B). La mayoría de los residuos de EhADH se localizaron en la región carboxilo terminal después del dominio de adhesión.

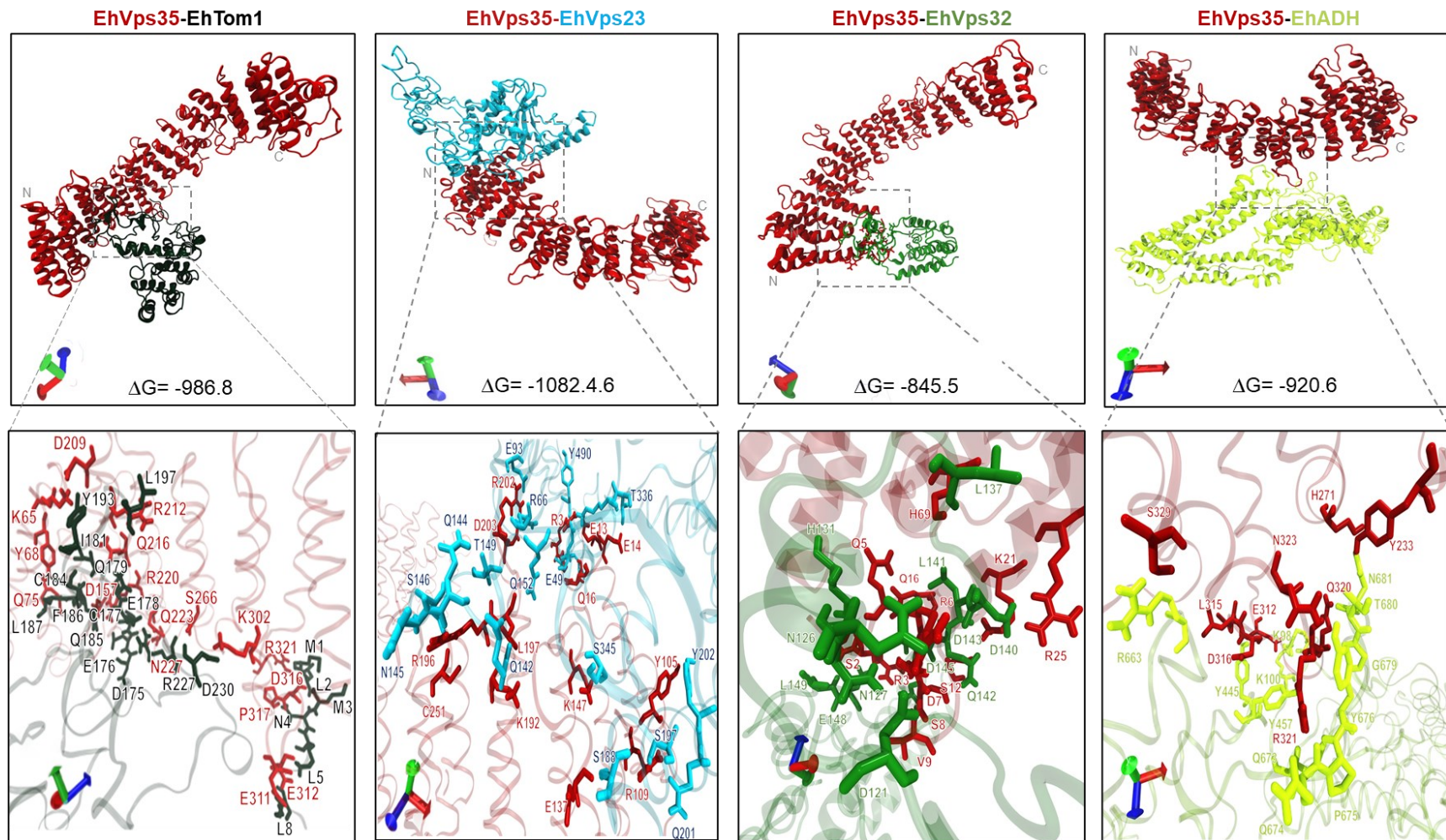


Figura 41. Acoplamiento molecular de EhVps35-EhTom1, EhVps35-EhVps23, EhVps35-EhVps32 y EhVps35-EhADH. Modelos 3D del acoplamiento molecular predicho para las proteínas EhVps35 (rojo), EhTom1 (negro), EhVps23 (azul) y EhADH (amarillo). El panel inferior representa una ampliación de los aminoácidos que participan en la interacción molecular.

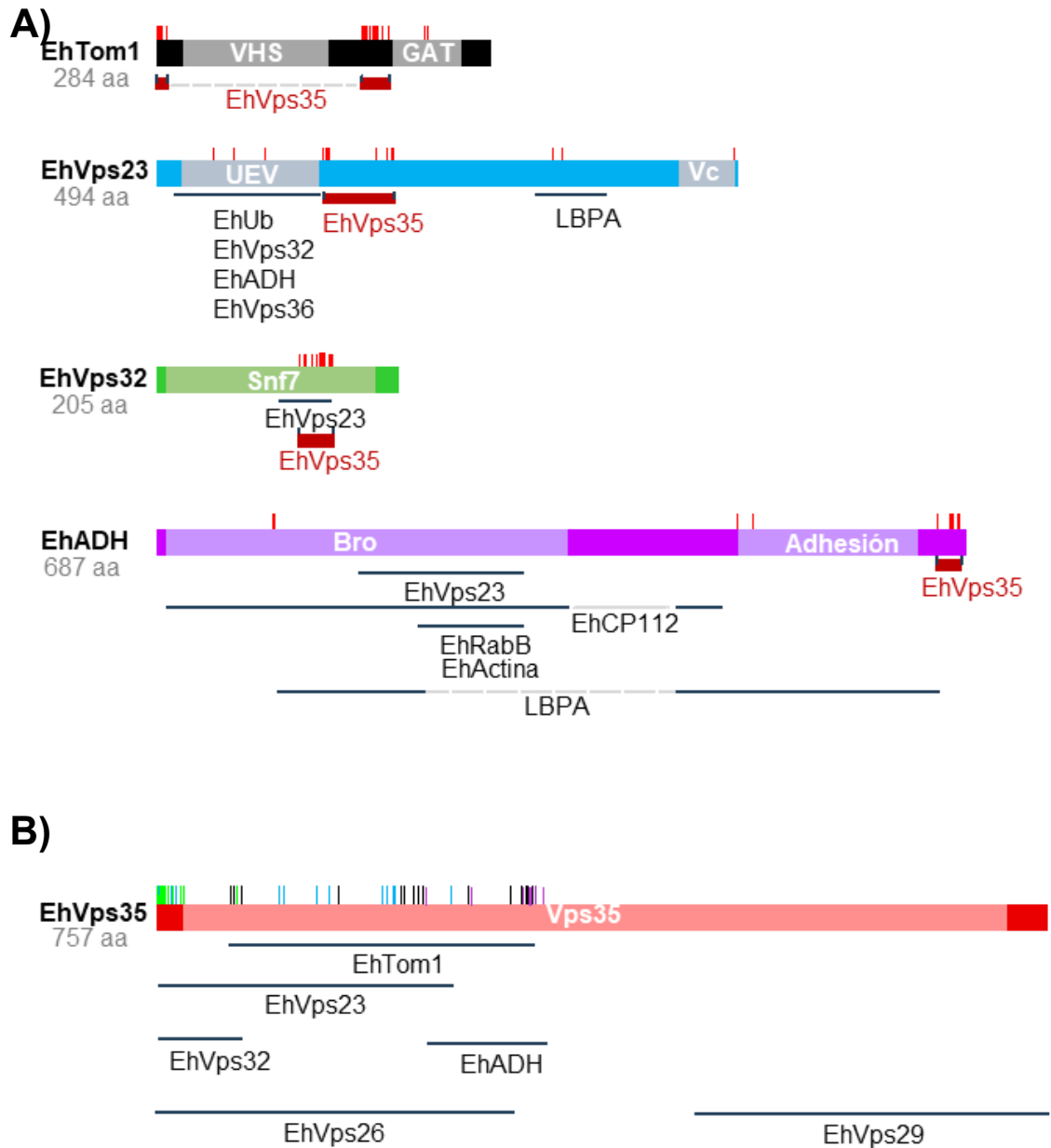


Figura 42. Esquema representativo de EhTom1, EhVps23, EhVps32, EhADH y EhVps35 con sus respectivos dominios y las regiones de interacción con otras proteínas.

A) Esquema de EhVps35 con la ubicación de los aminoácidos que interaccionan con EhTom1 (línea negra), EhVps23 (línea azul), EhVps32 (línea verde) y EhADH (línea amarilla), así como las regiones de interacción con otras proteínas reportadas en la literatura. B) Esquema de EhTom1, EhVps23, EhVps32 y EhADH con la ubicación de los aminoácidos que interaccionan con EhVps35 (líneas rojas), así como las regiones de interacción con otras moléculas reportadas en la literatura (Nakada-Tsukui et al., 2005; Castellanos-Castro et al., 2016a; Javier-Reyna et al., 2019a; Galindo et al., 2021; Galindo A., 2022; Díaz-Hernández et al., 2023).

7.10 Estandarización de la sobreexpresión de EhVps35 en trofozoítos

7.10.1 Clonación del gen *Ehvps35* en el vector *pNeo*

La clonación del gen *Ehvps35* en el vector *pNeo* requirió inicialmente del diseño de *primers* que amplifican el fragmento *Ehvps35*_(4 a 2274 pb) del gen *Ehvps35* con las secuencias de reconocimiento para las enzimas *KpnI* y *BamHI*. Adicionalmente, el *primer* sentido contiene la secuencia codificante de la etiqueta HA, por lo que el producto de PCR esperado fue de 2328 pb. El fragmento *Ehvps35*_(4-2274 pb) con regiones de reconocimiento de las enzimas de restricción y la etiqueta de HA (*Ehvps35-ha*) fue amplificado mediante una PCR punto final, usando cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS, obteniendo un amplificado de 2328 pb. Además, se verificó la ausencia de productos de amplificación en el control negativo (agua libre de nucleasas) (Figura 43, A). Una vez estandarizadas las condiciones del ensayo de PCR, se realizó una segunda amplificación de *Ehvps35-ha* usando la enzima polimerasa de alta fidelidad, Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, M0491), para evitar la introducción de mutaciones durante la amplificación de dicho fragmento. El ensayo de PCR con la enzima de alta fidelidad produjo un amplificado único y correspondiente al tamaño esperado de 2328 pb (Figura 43, A). El amplificado obtenido del ensayo de PCR con una enzima polimerasa de alta fidelidad fue purificado del gel de agarosa y fue clonado en el vector *pJET1.2/blunt*, con el que se transformaron bacterias *E. coli* cepa DH5 α .

Colonias de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35-ha* fueron aisladas. Posteriormente, se eligieron las colonias con la construcción *pJET1.2/Ehvps35-ha* utilizando ensayos PCR-*colony* (Figura 43, B). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pJET1.2/Ehvps35*. Se realizó la digestión de *pJET1.2/Ehvps35* usando las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El ensayo de digestión enzimática reveló la liberación del inserto correspondiente al fragmento *Ehvps35-ha* de 2328 pb y un segundo fragmento de alrededor de 2974 pb, el cual corresponde al vector *pJET1.2* (Figura 43, C). Además, se realizó una digestión

del vector de expresión, *pNeo-Ehtom1-ha* utilizando las enzimas *KpnI* y *BamHI* (Figura 43, C). Finalmente, los productos de la digestión enzimática (el inserto *Ehvps35* y el vector *pNeo*) fueron purificados y ligados para formar la construcción *pNeo/Ehvps35-ha*. La construcción purificada fue usada para transformar bacteria *E. coli* DH5 α . Nuevamente, se eligieron las colonias con la construcción *pNeo/Ehvps35-ha* utilizando ensayos de PCR-*colony*, en los que se esperaba un amplificado de 2328 pb (Figura 43, D). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pNeo/Ehvps35-ha*.

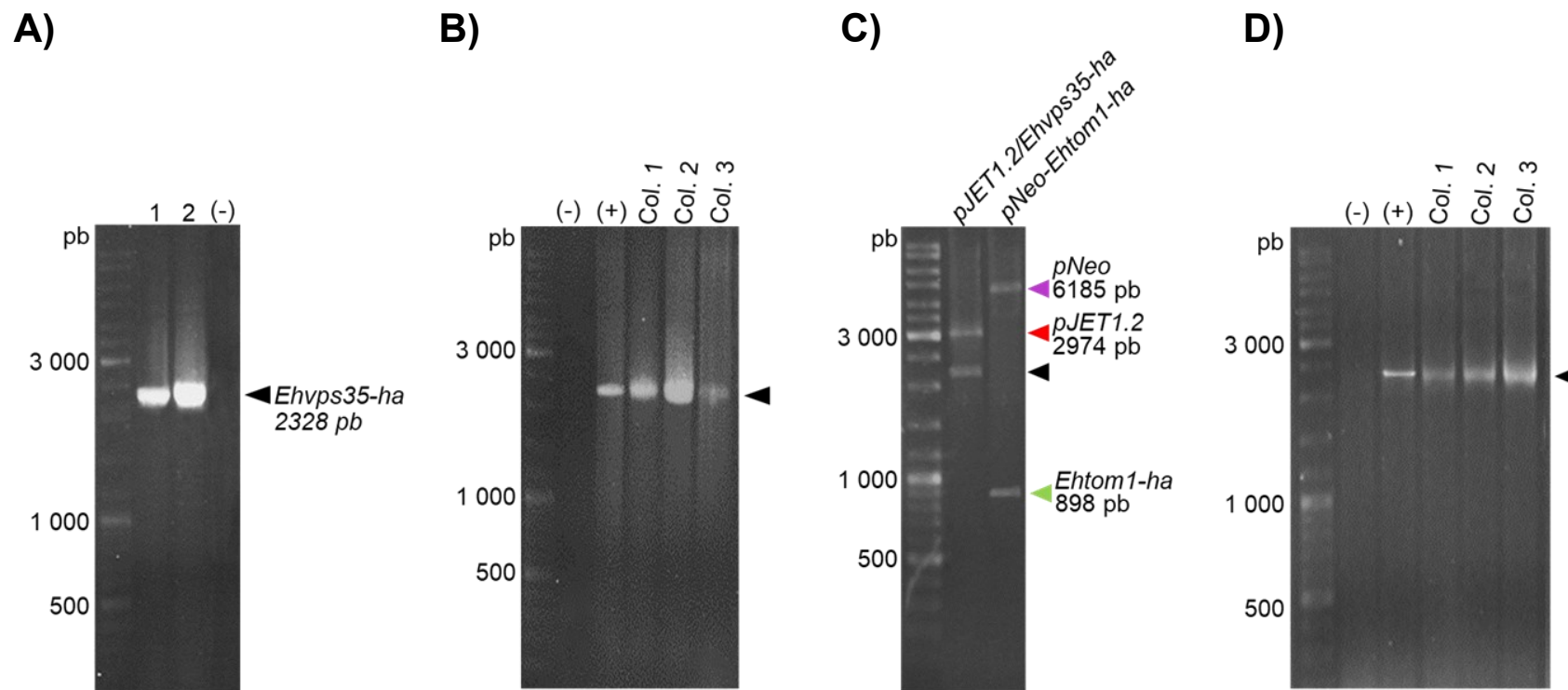


Figura 43. Clonación del gen *Ehvps35* en el vector *pNeo*.

A) Producto de la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(4-2274 pb) del gen *Ehvps35* mediante PCR en punto final, usando una polimerasa convencional (carril 1) y una polimerasa de alta fidelidad (carril 2) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. B) PCR-colony de bacterias *E. coli* DH5α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35-ha* en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. C) Digestión de las construcciones *pJET1.2/Ehvps35-ha* y *pNeo-Ehtom1-ha* usando las enzimas *KpnI* y *BamHI* en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El vector *pNeo* obtenido de la digestión enzimática fue purificado y ligado al inserto *Ehvps35-ha*. D) PCR-colony de bacterias *E. coli* DH5α transformadas con el vector *pNeo/Ehvps35-ha* en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control negativo (-): agua libre de nucleasas. Control positivo (+): cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS. Flecha negra: *Ehvps35-ha* en 2328 pb. Flecha roja: vector *pJET1.2* en 2974 pb. Flecha morada: vector *pNeo* en 6185 pb. Flecha verde: inserto *Ehtom1-ha* en 898 pb.

7.10.2 Clonación del fragmento *Ehvps35_1-ha* en el vector *pNeo*

La clonación de *Ehvps35_1-ha* en el vector *pNeo* requirió inicialmente del diseño de *primers* que amplifican el fragmento *Ehvps35* (4-1512 pb) del gen *Ehvps35*. Además, dichos el *primer* sentido contiene la secuencia reconocida por las enzimas *KpnI* y la secuencia codificante a la etiqueta HA; mientras el primer antisentido presenta la secuencia reconocida por la enzima *BamHI*. Por el diseño de los *primers*, el producto de PCR esperado es de 1547 pb. El fragmento *Ehvps35* (4-1512 pb) con regiones de reconocimiento de las enzimas de restricción y la etiqueta de HA (*Ehvps35_1-ha*) fue amplificado mediante una PCR punto final, usando cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS, obteniendo un amplificado de 1547 pb (Figura 44, A). En los ensayos de PCR, se verificó la ausencia de productos de amplificación en el control negativo (agua libre de nucleasas) (Figura 44, A). Una vez estandarizadas las condiciones del ensayo de PCR, se realizó una segunda amplificación de *Ehvps35_1-ha* usando la enzima polimerasa de alta fidelidad, Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, M0491). El ensayo de PCR con la enzima de alta fidelidad produjo un amplificado único y correspondiente al tamaño esperado de 1547 pb (Figura 44, A). El amplificado obtenido del ensayo de PCR con una enzima polimerasa de alta fidelidad fue purificado del gel de agarosa para clonarlo en el vector *pJET1.2/blunt*, con el que se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α .

Colonias de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* fueron aisladas. Posteriormente, se eligieron las colonias con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* empleando ensayos PCR-colony (Figura 44, B). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pJET1.2/Ehvps35_1-ha*. Se realizó la digestión de *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* usando las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El ensayo de digestión enzimática reveló la liberación del inserto, correspondiente al fragmento *Ehvps35_1-ha* de 1547 pb y un segundo fragmento de alrededor de 2974 pb, el cual corresponde al vector *pJET1.2* (Figura 44, C). Además, se realizó una digestión del vector de expresión, *pNeo-Ehtom1-ha* utilizando las enzimas *KpnI* y *BamHI* (Figura 44, C). Finalmente, los productos de

la digestión enzimática (el inserto *Ehvps35_1-ha* y el vector *pNeo*) fueron purificados y ligados para formar la construcción *pNeo/Ehvps35_1-ha*. La construcción purificada se usó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α . Nuevamente, se eligieron las colonias con la construcción *pNeo/Ehvps35_1-ha* utilizando ensayos de PCR-*colony*, en los que se esperaba un amplificado de 1547 pb (Figura 44, D). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pNeo/Ehvps35_1-ha*.

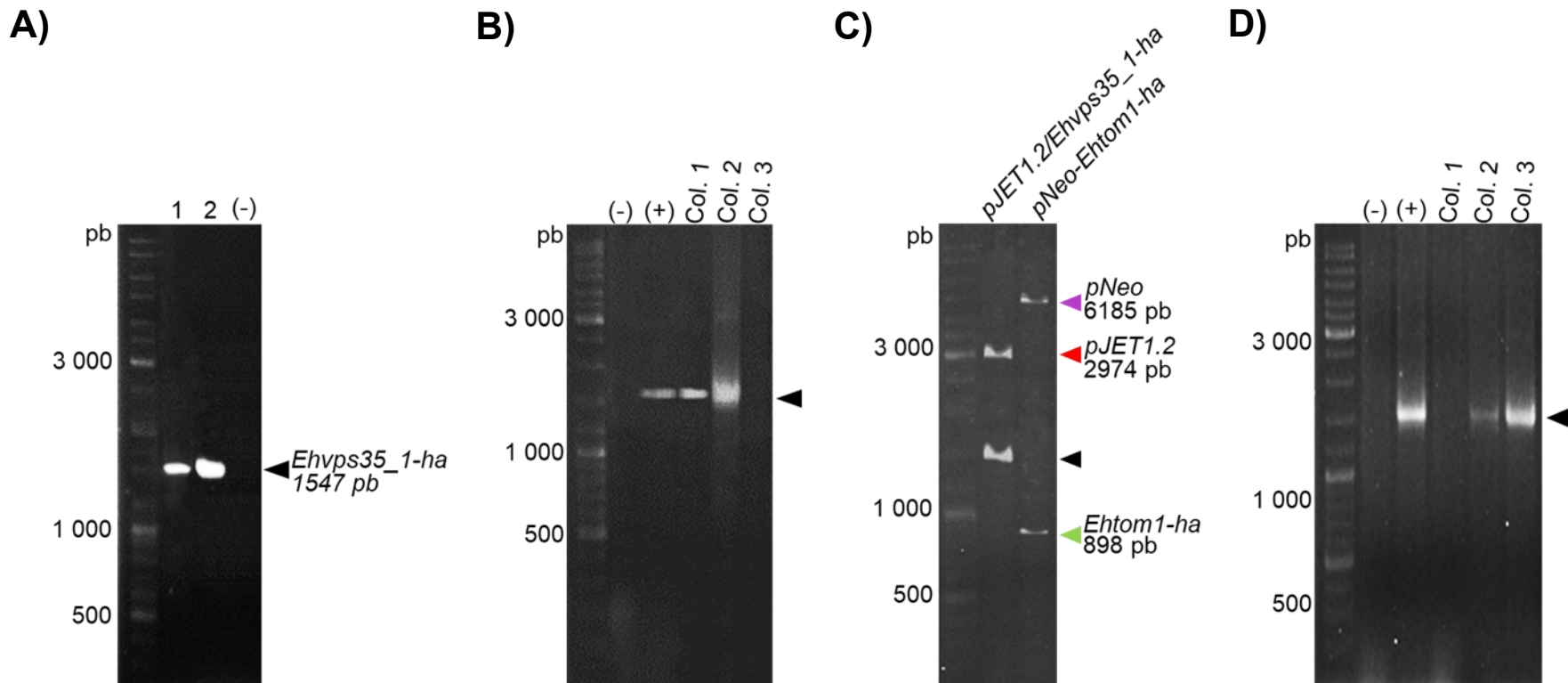


Figura 44. Clonación del fragmento *Ehvps35_1-ha* en el vector *pNeo*.

A) Productos de la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(4-1512 pb) del gen *Ehvps35* mediante PCR en punto final, usando una polimerasa convencional (carril 1) y una polimerasa de alta fidelidad (carril 2) analizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. B) PCR-colony de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* analizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. C) Digestión de las construcciones *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* y *pNeo-Ehtom1-ha* usando las enzimas *KpnI* y *BamHI*, analizadas en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El vector *pNeo* obtenido de la digestión enzimática fue purificado y ligado al inserto *Ehvps35_1-ha*. D) PCR-colony de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α transformadas con el vector *pNeo/Ehvps35_1-ha* analizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control negativo (-): agua libre de nucleasas. Control positivo (+): cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS. Flecha negra: inserto *Ehvps35_1-ha* en 1547 pb. Flecha roja: vector *pJET1.2* en 2974 pb. Flecha morada: vector *pNeo* en 6185 pb. Flecha verde: inserto *Ehtom1-ha* en 898 pb.

7.10.3 Transfección de trofozoítos con las construcciones *pNeo/Ehvps35-ha* y *pNeo/Ehvps35_1-ha*

La transfección de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS se realizó con la construcción *pNeo/Ehvps35-ha* para promover la sobreexpresión de la proteína EhVps35; o con la construcción *pNeo/EhVps35_1-ha* para promover la sobreexpresión de la región amino de la proteína EhVps35. Se utilizó como control la transfección con el vector *pNeo*. Los trofozoítos fueron cultivados con concentraciones crecientes del antibiótico G418 (antibiótico selector de transfección). Intrigantemente, pese a la repetición de la transfección no se logró obtener un cultivo estable, ya que los trofozoítos transfectados con la construcción *pNeo/EhVps35_1-ha* murieron a concentraciones superiores a 3 µg/ml de G418, mientras que los trofozoítos transfectados con la construcción *pNeo/Ehvps35-ha* murieron a concentraciones superiores a 8 µg/ml de G418.

7.11 Estandarización del knock-down del gen *Ehvps35* en trofozoítos

7.11.1 Clonación del fragmento *Ehvps35*_(1-438 pb) en el vector *pL4440*

La clonación del fragmento *Ehvps35_S* en el vector *pL4440* requirió inicialmente del diseño de *primers* que amplifican del fragmento *Ehvps35* _(1-438 pb) del gen *Ehvps35* con las secuencias reconocidas por las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El fragmento *Ehvps35* _(1-438 pb) con secuencias de reconocidas por las enzimas de restricción (*Ehvps35_S*) fue amplificado mediante una PCR punto final, usando cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS, obteniendo un amplificado de 454 pb. En dichos ensayos de PCR se verificó la ausencia de productos de amplificación en el control negativo (agua libre de nucleasas) (Figura 45, A). Una vez estandarizadas las condiciones del ensayo de PCR, se realizó una segunda amplificación del fragmento *Ehvps35_S* usando la enzima polimerasa de alta fidelidad, Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs, M0491). El ensayo de PCR con la enzima de alta fidelidad produjo un amplificado único y correspondiente al tamaño esperado de 454 pb (Figura 45, A). El amplificado obtenido del ensayo de PCR con una enzima polimerasa de alta fidelidad fue

purificado del gel de agarosa para clonarlo en el vector *pJET1.2/blunt*, con el que se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α .

Colonias de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_S* fueron aisladas. Posteriormente, se eligieron las colonias con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_S* utilizando ensayos PCR-*colony* (Figura 45, B). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pJET1.2/Ehvps35_S*. La construcción purificada fue digerida por las enzimas *KpnI* y *BamHI*. El ensayo de digestión enzimática reveló la liberación del inserto, correspondiente al fragmento *Ehvps35_S* de 454 pb y un segundo fragmento de alrededor de 2974 pb, el cual correspondió al vector *pJET1.2* (Figura 45, C). Además, se realizó una digestión del vector de expresión, *pL4440/gfp* utilizando las enzimas *KpnI* y *BamHI* (Figura 45, C). Finalmente, los productos de la digestión enzimática (el inserto *Ehvps35_S* y el vector *pL4440*) fueron purificados y ligados para formar la construcción *pL4440/Ehvps35_S*. La construcción purificada fue usada para transformar bacteria *E. coli* DH5 α . Nuevamente, se eligieron las colonias con la construcción *pL4440/Ehvps35_S* utilizando ensayos de PCR-*colony*, en los que se esperaba un amplificado de 454 pb (Figura 45, D). Una colonia con la construcción de interés fue propagada y procesada para la purificación de la construcción *pL4440/Ehvps35_S*.

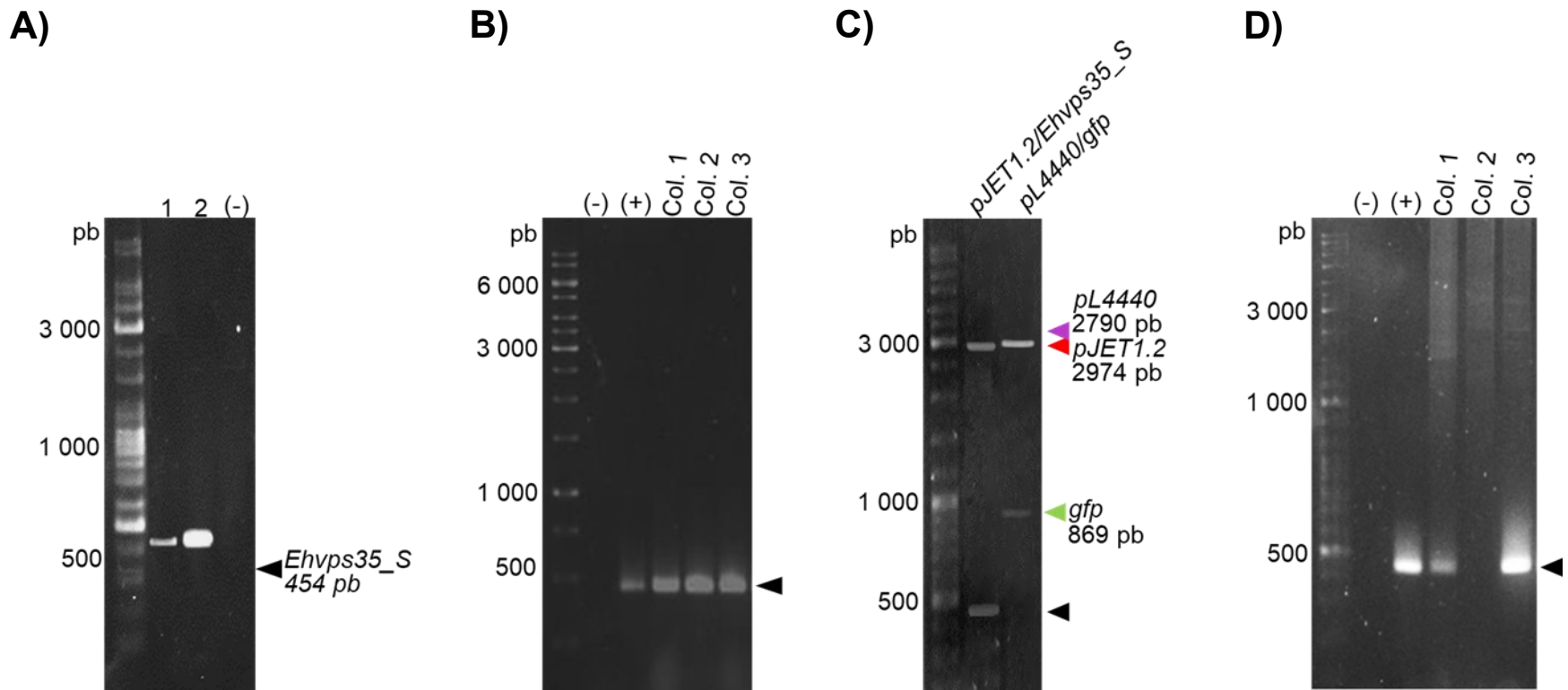


Figura 45. Clonación del fragmento *Ehvps35_S* en el vector *pL4440*.

A) Producto de la amplificación del fragmento *Ehvps35*_(1-438 pb) del gen *Ehvps35* mediante PCR punto final, usando una polimerasa convencional (carril 1) y una polimerasa de alta fidelidad (carril 2) analizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. B) PCR-colony de bacterias *E. coli* DH5α transformadas con la construcción *pJET1.2/Ehvps35_S* analizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. C) Digestión de las construcciones *pJET1.2/Ehvps35_S* y *pL4440/gfp* usado las enzimas *KpnI* y *BamHI* analizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El vector *pL4440* obtenido de la digestión enzimática fue purificado y ligado al inserto *Ehvps35_S*. D) PCR-colony de bacterias *E. coli* DH5α transformadas con el vector *pL4440/Ehvps35_S* analizada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Control negativo (-): agua libre de nucleasas. Control positivo (+): cDNA de trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS. Flecha negra: *Ehvps35_S* en 454 pb. Flecha roja: vector *pJET1.2* en 2974 pb. Flecha morada: vector *pL4440* en 2790 pb. Flecha verde: inserto *gfp* en 869 pb.

7.11.2 La administración de dsRNA-*Ehvps35* redujo la expresión de la proteína EhVps35 en trofozoítos

Bacterias *E. coli* de la cepa HT115 transformadas con la construcción *pL4440/Ehvps35_S* y *pL4440/gfp* fueron inducidas para la producción de dsRNA por la adición de IPTG como se describió en materiales y métodos. Los dsRNA específicos de la región 1 a 438 pb del gen *Ehvps35* (dsRNA-*Ehvps35*) y los dsRNA dirigidos a una proteína no relacionada con *E. histolytica* (dsRNA-*gfp*) fueron purificados y analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Dicho ensayo reveló una banda entre los 400 a 200 pb (Figura 46, A). No se observaron bandas contaminantes correspondientes a RNA (de una sola cadena) y DNA genómico.

El protocolo de *knock-down* se realizó administrando a trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS en el medio los dsRNA purificados a una concentración final de 5 µg/ml. Los dsRNA internalizados fueron procesados y produjeron una disminución en la traducción de mRNA a proteína de forma específica y transitoria (Figura 46, B). El primer ensayo de *knock-down* del gen *Ehvps35* fue realizado con 24 h de tratamiento (incubación en dsRNA); así como dos controles, trofozoítos sin tratamiento y tratados con dsRNA-*gfp*. Las muestras de lisados de trofozoítos sin tratamiento y tratados con dsRNA-*gfp* o dsRNA-*Ehvps35* (*Ehvps35*-KD) fueron procesados para ensayos de *western blot* utilizando los anticuerpos α-*Ehvps35* y α-actina. El análisis densitométrico de las imágenes de *western blot* no mostró diferencias significativas entre los trofozoítos sin tratamiento y tratados con dsRNA-*gfp*. Además, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD se observó una disminución significativa del 30 % en el reconocimiento de α-EhVps35, respecto a ambos controles (Figura 46, C).

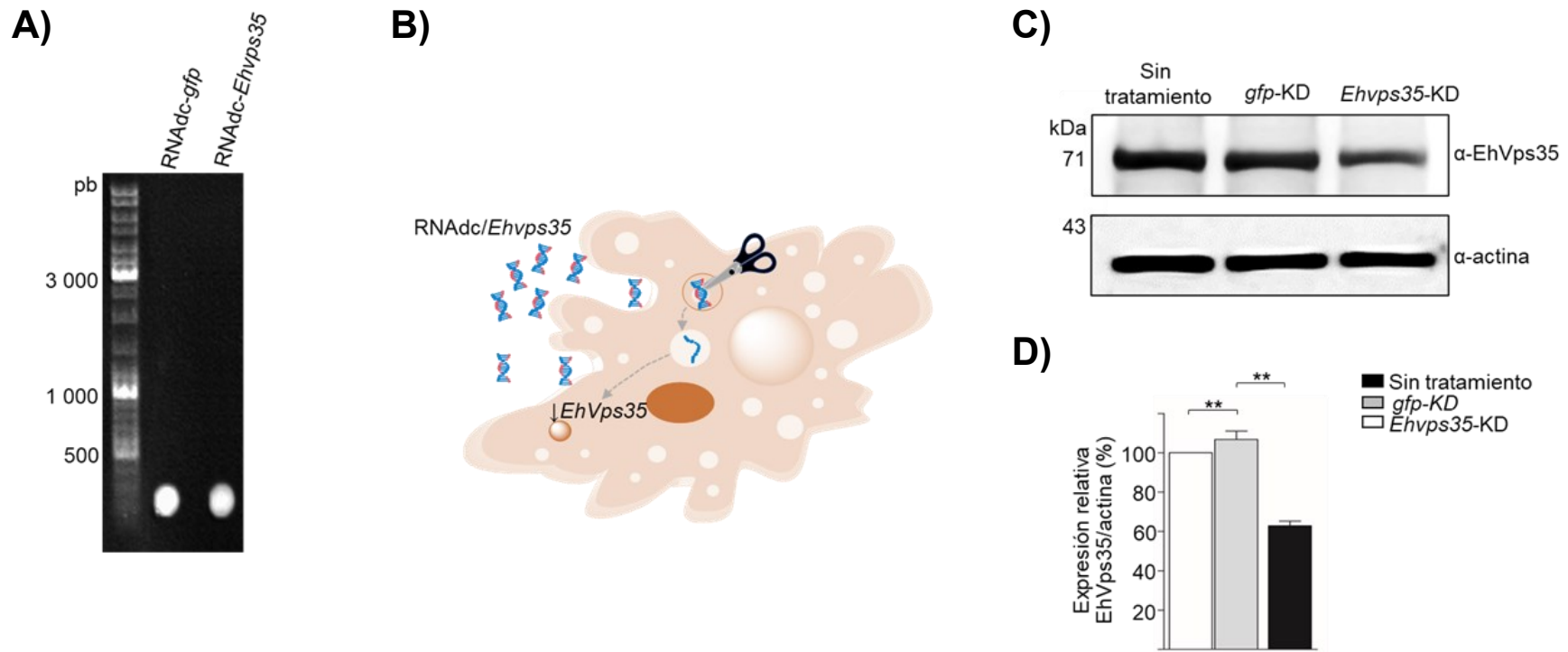


Figura 46. Purificación y administración de dsRNA-*Ehvps35* a trofozoítos de *E. histolytica*.

A) Bacterias *E. coli* HT115 transformadas con la construcción *pL4440/Ehvps35* se indujeron para la producción de dsRNA-*Ehvps35*. Los dsRNA producidos fueron purificados y analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. B) Esquema de la administración de dsRNA-*Ehvps35* a trofozoítos para el *knock-down* del gen *Ehvps35*. En el medio de cultivo se administraron dsRNA-*Ehvps35* a una concentración final de 5 µg/ml. Los trofozoítos internalizan los dsRNA que son procesados por la maquinaria celular, que producen RNAs de una cadena que se une al mRNA impidiendo la producción de la proteína EhVps35. C) Ensayo de *knock-down* utilizando 24 h de tratamiento con dsRNA-*gfp* (*gfp*-KD) o dsRNA-*Ehvps35* (*Ehvps35*-KD), además de trofozoítos sin tratamiento con dsRNA. Las muestras de lisados de trofozoítos sin tratamiento y tratados con dsRNA fueron analizados por *western blot*. D) Análisis densitométrico del reconocimiento por *western blot* de EhVps35, normalizado con el reconocimiento de actina. La gráfica muestra los resultados obtenidos de un experimento con tres réplicas técnicas. **p<0.01.

Posteriormente, se realizó una cinética del ensayo de *knock-down* utilizando trofozoítos sin tratamiento y tratados con dsRNA-*Ehvps35* por diferentes tiempos (24, 48, 72, 96, 120 y 168 h) para identificar el tiempo en el que ocurre la mayor disminución en la expresión de la proteína EhVps35. Lisados de trofozoítos control (sin tratamiento) y tratados con dsRNA-*Ehvps35* (*Ehvps35*-KD) fueron analizados por ensayos de *western blot* en los que observó una disminución significativa de EhVps35 desde las 24 h, tiempo en el que redujo la expresión de EhVps35 un 22% (Figura 47, A y B). La reducción en la proteína de interés fue más evidente y significativa a partir de las 48 h con una reducción del 58% (Figura 47, A y B). A pesar de tener una reducción mayor al 50% desde las 48 h de tratamiento con dsRNA-*Ehvps35* se realizó el seguimiento de la cinética de *knock-down* del gen *Ehvps35*, ya que este procedimiento es transitorio y fue relevante saber si la reducción en la expresión de EhVps35 se puede mantener por lo menos 168 h (7 días), tiempo utilizado para los ensayos de virulencia *in vivo* de *E. histolytica*. Entre las 48 y 72 h de tratamiento se mantuvo la disminución de EhVps35 en 58%, mientras que después de las 96 y hasta las 168 h de tratamiento se observó una mayor disminución de EhVps35 (66-74%) (Figura 47, A y B).

Debido a que la incubación de trofozoítos con dsRNA-*Ehvps35* produjo una reducción en la proteína EhVps35 mayor al 50% a partir de las 48 h de tratamiento, éstas fueron las condiciones empleadas en todos los experimentos subsecuentes utilizados en este trabajo que requirieron de trofozoítos *Ehvps35*-KD.

En cada ensayo de *knock-down* del gen *Ehvps35* se tomaron muestras de los trofozoítos *Ehvps35*-KD, para su análisis por microscopía confocal y *western blot*, con el fin de corroborar la reducción en la proteína EhVps35. El análisis densitométrico de los ensayos de *western blot* mostró una reducción promedio del 60% en EhVps35 (Figura 48, A y B), lo cual fue corroborado por el análisis de la intensidad de píxeles de las imágenes de microscopía confocal (Figura 48, C y D).

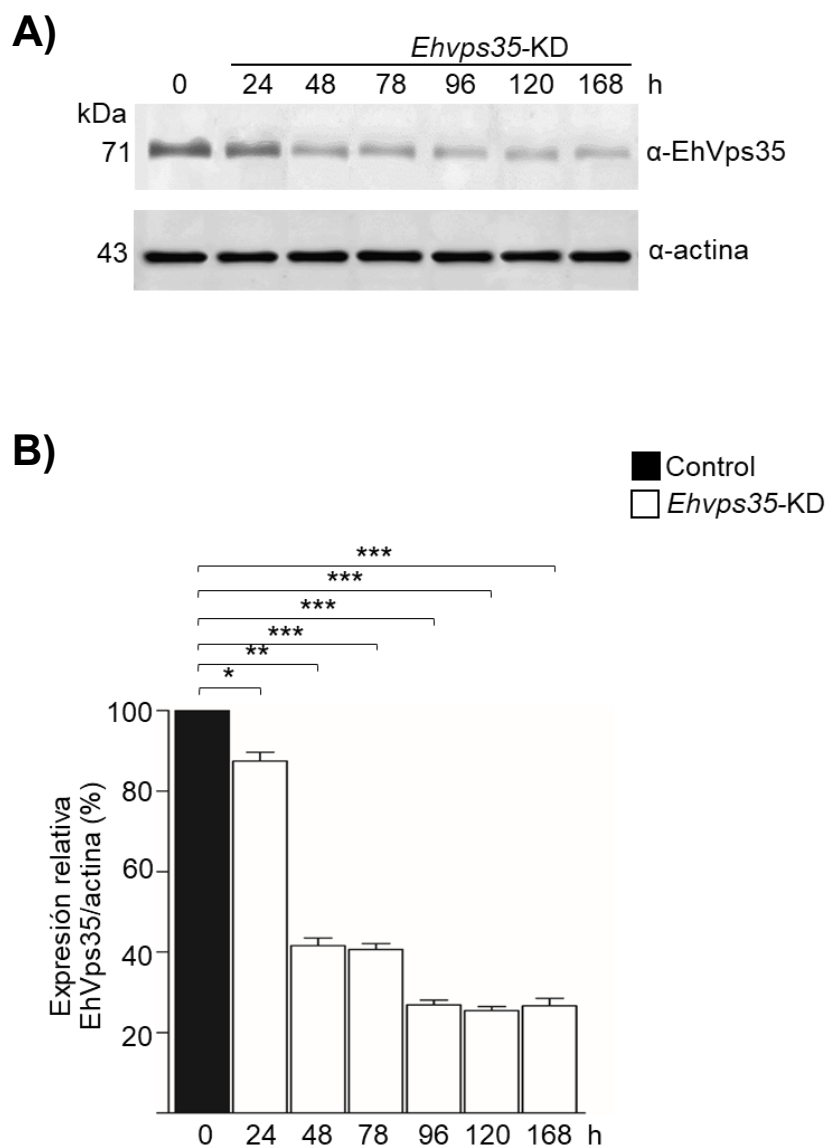


Figura 47. Cinética del *knock-down* del gen *Ehvps35* en trofozoítos de *E. histolytica*.

Trofozoítos HM1: IMSS control (sin tratamiento con dsRNA) e incubados con dsRNA-*Ehvps35* (*Ehvps35*-KD) a una concentración final de 5 μ g/ml. La incubación se realizó por 24, 48, 78, 96, 120 y 168 h a 37 °C. Muestras de los lisados obtenidos de los trofozoítos control y *Ehvps35*-KD fueron analizados por ensayos de *western blot* utilizando α -EhVps35 y α -actina. B) Análisis densitométrico del reconocimiento por *western blot* de EhVps35, normalizado con el reconocimiento de actina. La gráfica muestra los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

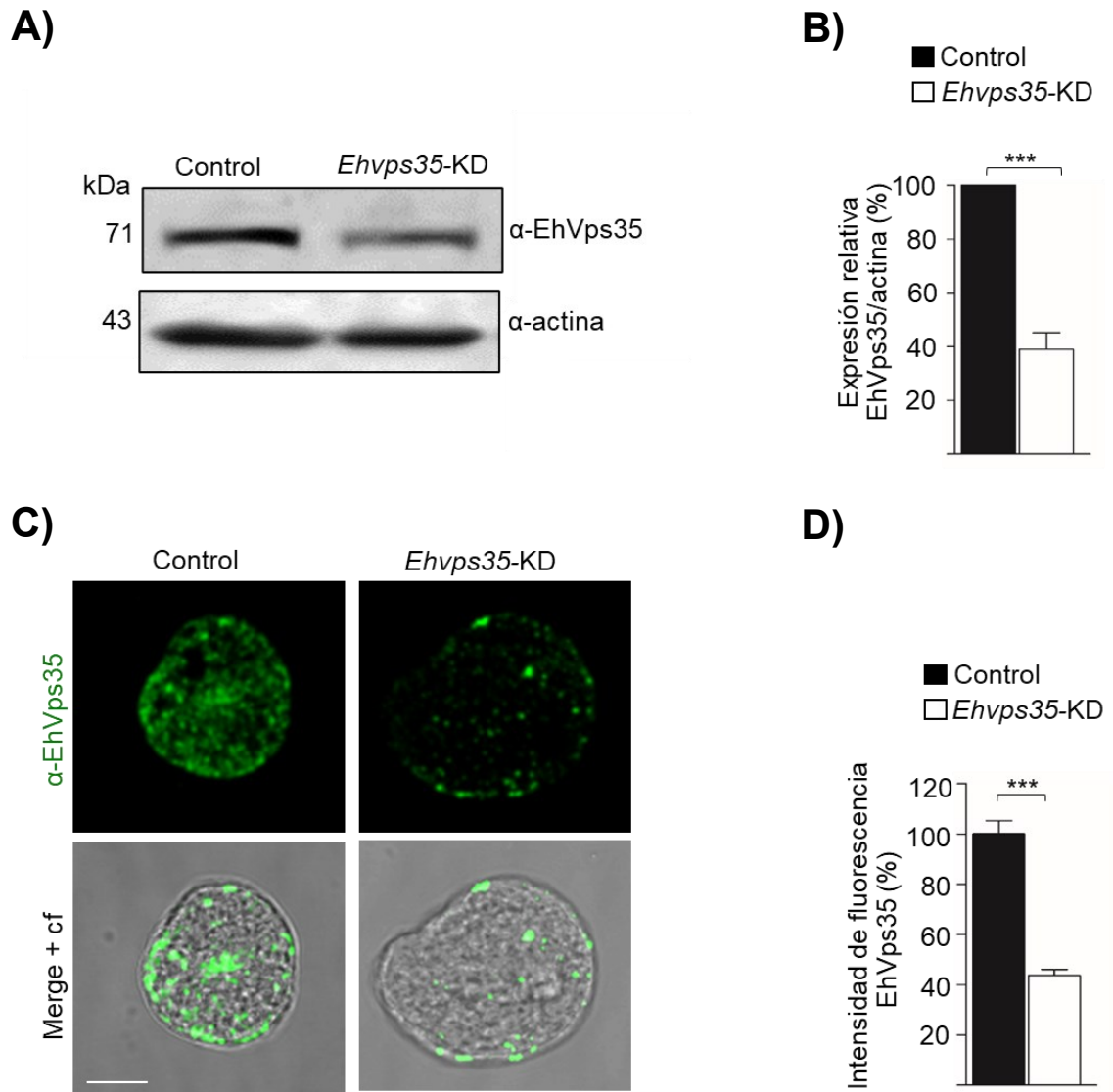


Figura 48. Análisis del *knock-down* del gen *Ehvps35* en trofozoítos.

Trofozoítos HM1: IMSS control (sin tratamiento con dsRNA) e incubados por 48 h con dsRNA-*Ehvps35* (*EhVps35*-KD) a una concentración final de 5 μ g/ml. A) Muestras de los lisados obtenidos de los trofozoítos control y *Ehvps35*-KD fueron analizados por ensayos de *western blot* utilizando α -EhVps35 y α -actina. B) Análisis densitométrico del reconocimiento por *western blot* de α -EhVps35, normalizado con el reconocimiento de α -actina. La gráfica muestra los resultados obtenidos de 10 experimentos independientes de *knock-down* del gen *Ehvps35*. C) Imágenes de microscopía confocal de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD, utilizando el anticuerpo α -EhVps35. D) Análisis de la intensidad de píxeles del reconocimiento de α -EhVps35 en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD. Los valores de intensidad de píxeles fueron normalizados con respecto al reconocimiento de α -EhVps35 en trofozoítos control. La gráfica muestra los resultados obtenidos de al menos 30 células en 10 experimentos independientes de *knock-down* del gen *Ehvps35*. *** p <0.001.

7.12 EhVps35 participa en el reciclaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática

La función del retrómero en otros organismos es el reciclaje de proteínas en la membrana endosomal hacia el aparato de Golgi o la membrana plasmática (Bonifacino y Hurley, 2008; Trousdale y Kim, 2015; Liu, 2016; Seaman, 2021), sin embargo, la función del retrómero en *E. histolytica* hasta esta tesis no se había demostrado. Para estudiar el efecto del *knock-down* del gen *Ehvps35* en el reciclaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática, se realizaron ensayos de reciclaje utilizando trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) analizados por microscopía confocal. Los ensayos de reciclaje se iniciaron marcando a las proteínas asociadas a la región externa de la membrana plasmática de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD con biotina (S-NHS-SS-Biotina). Resultado de este tratamiento las proteínas en la membrana plasmática de ambos grupos se marcaron uniformemente (Figura 49, A y B). Después, se favoreció la internalización de las proteínas biotiniladas con una incubación de los trofozoítos control y *Ehvps35*-KD a 37 °C (Figura 49, A). Por lo que, en los trofozoítos de ambos grupos se observó un aumento en el reconocimiento de proteínas biotiniladas en el citoplasma (Figura 49, B). Posteriormente, los trofozoítos de ambos grupos fueron tratados con DTT, para eliminar la marca de biotina en las proteínas biotiniladas que continuaban en la membrana plasmática, con el fin de observar únicamente las proteínas biotiniladas e internalizadas (Figura 49, A y B). Finalmente, los trofozoítos se incubaron a 37 °C para favorecer el tráfico vesicular y por ende el reciclaje de las proteínas biotiniladas e internalizadas (Figura 49, A). A los 20 y 40 min de incubación a 37 °C, en los trofozoítos control se observó a las proteínas biotiniladas principalmente en la membrana plasmática, mientras en los trofozoítos *Ehvps35*-KD, las proteínas biotiniladas se localizaron principalmente en el citoplasma (Figura 49, B y C).

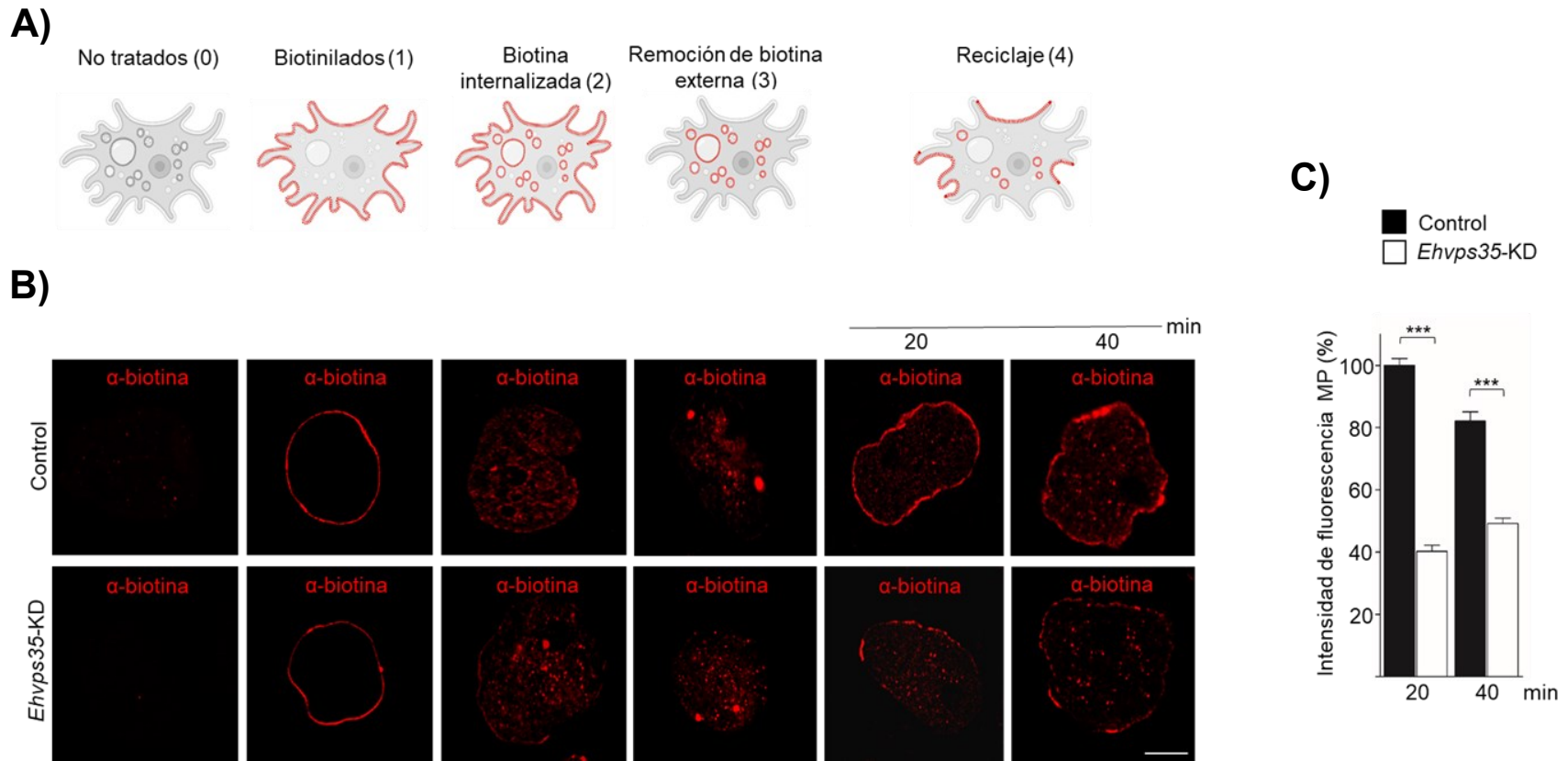


Figura 49. Reducción del reciclaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática en trofozoítos *Ehvps35-KD*.

A) Esquema del ensayo de reciclaje de proteínas biotiniladas en la membrana plasmática. 0: células no tratadas. 1: Marcaje de proteínas asociadas a la membrana plasmática por una incubación a 4 °C de trofozoítos en biotina. 2: Internalización de las proteínas biotiniladas por una incubación a 37°C de trofozoítos. 3: Eliminación de la marca de biotina en las proteínas en la membrana plasmática por una incubación a 4°C en DTT. 4: Reciclaje de proteínas biotiniladas hacia la membrana plasmática. Líneas rojas: proteínas biotiniladas. B) Imágenes de microscopía confocal de trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35-KD* (*knock-down* del gen *Ehvps35*) en cada paso de ensayo de reciclaje de proteínas biotiniladas. Barra de escala, 10 μm. C) Intensidad de fluorescencia medida en la membrana plasmática de los trofozoítos a 20 y 40 min de reciclaje de proteínas biotiniladas hacia la membrana plasmática. *** $p < 0.001$.

En los ensayos de reciclaje se usó como control trofozoítos sin tratamiento de ambos grupos, en los cuales no se observó reconocimiento del anticuerpo α -biotina (Figura 49, A y B). Además, en cada incubación de los ensayos de reciclaje se tomaron muestras de trofozoítos para verificar que la viabilidad celular fuera superior al 98 %, utilizando una tinción con azul tripán al 0.2% en PBS 1X (Bañuelos et al., 2012).

7.13 Los trofozoítos *Ehvps35*-KD tienen mayor sensibilidad a la cicloheximida

Para estudiar el posible efecto del *knock-down* del gen *Ehvps35* en el reciclaje de dos proteínas de *E. histolytica* asociadas a la membrana plasmática, primero se exploró la sensibilidad al fármaco cicloheximida (CHX), con el fin de eliminar a las proteínas sintetizadas *de novo* que están constantemente transportándose hacia la membrana plasmática, al igual que las proteínas recicladas. Además, se verificó que el uso de CHX no afectó la viabilidad celular en trofozoítos control o *Ehvps35*-KD en los ensayos posteriores.

Los ensayos de sensibilidad al fármaco CHX se realizaron incubando trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) con 100 μ g/ml de CHX por 60, 120, 150 y 240 min. Posteriormente, se obtuvo la viabilidad celular utilizando una tinción con azul tripán al 0.2% en PBS 1X (Bañuelos et al., 2012) (Figura 50, A). Entre los trofozoítos control, no tratados con CHX (0 min) y tratados con CHX (60, 120, 150 y 240 min) no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad celular (Figura 50, B). En cambio, los trofozoítos *Ehvps35*-KD mostraron una reducción significativa en la viabilidad celular del 40 al 60% aproximadamente a 150 y 240 min de tratamiento con CHX (Figura 50, B). Por tanto, en los experimentos posteriores que requirieron el uso de CHX, el tiempo transcurrido desde la incubación en CHX al procesamiento de los trofozoítos no excedió los 120 min, con el fin de tener una viabilidad celular superior al 98% en trofozoítos control y *Ehvps35*-KD.

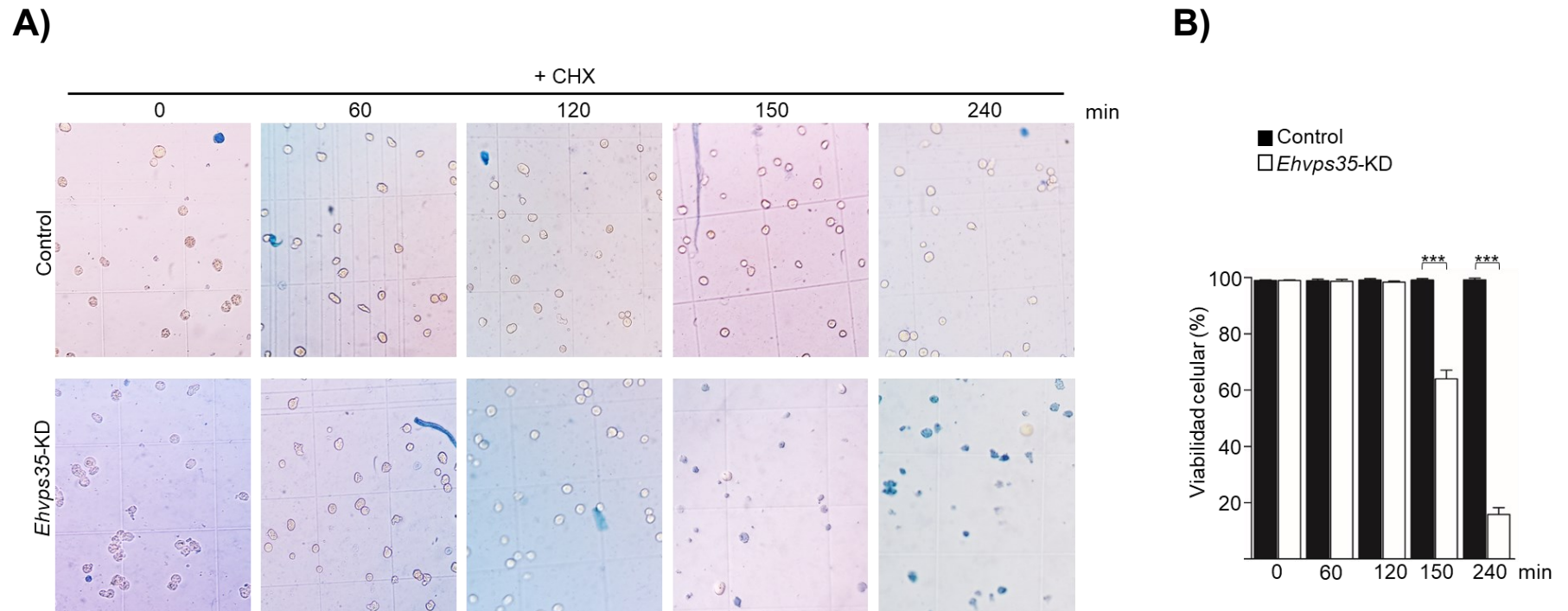


Figura 50. Reducción de la viabilidad en trofozoítos *Ehvps35*-KD tratados con cicloheximida.

Trofozoítos en condiciones basales incubados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (+CHX) por 0, 60, 120, 150 y 240 min. A) Imágenes representativas de microscopía óptica de trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) tratados con cicloheximida (+CHX) a diferentes tiempos teñidas con azul tripán al 2% en PBS 1X. B) Viabilidad celular cuantificada en cámara de Neubauer de 100 células en cada uno de los tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$.

7.14 EhVps35 participa en el reciclaje de las proteínas EhADH y la subunidad pesada de Gal/GalNac

Una vez confirmada la asociación de EhVps35 con EhADH y la subunidad pesada de (Hgl) Gal/GalNac por los ensayos de inmunoprecipitación, se procedió a investigar si el retrómero recicla estas proteínas utilizando trofozoítos *Ehvps35*-KD en ensayos de reciclaje realizados como se describió en la sección anterior.

La proteína EhADH es una proteína periférica con múltiples sitios de unión a membranas (Montaño et al., 2017) que tiene ciclos de internalización en estructuras vesiculares y retorno hacia la membrana plasmática (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Bañuelos et al., 2012), lo cual es característico de las proteínas recicladas por el retrómero (Bonifacino y Hurley, 2008; Trousdale y Kim, 2015; Liu, 2016; Seaman, 2021). Mientras, Hgl de Gal/GalNac, es una proteína transmembranal con un dominio citoplasmático y un dominio extracelular (Frederick y Petri, 2005; Seaman, 2021), características clásicas de una proteína reciclada por el retrómero (Bonifacino y Hurley, 2008; Trousdale y Kim, 2015; Liu, 2016; Seaman, 2021). Las proteínas EhADH y Hgl de Gal/GalNac se localizan principalmente hacia la membrana plasmática, por lo que para establecer el papel de EhVps35 en el reciclaje de estas proteínas, se analizó el efecto del *knock-down* del gen *Ehvps35* en la localización de ambas proteínas en trofozoítos en condiciones basales durante ensayos de reciclaje analizados por microscopía confocal. En los trofozoítos control se observó a EhADH y Hgl Gal/GalNac predominantemente en la membrana plasmática; mientras que, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD, ambas proteínas se localizaron dispersas en el citoplasma y en algunas regiones puntuales de la membrana plasmática (Figura 51). Posteriormente, el ensayo de reciclaje se realizó utilizando un previo tratamiento de CHX, con el fin de eliminar a las proteínas sintetizadas *de novo* que están constantemente transportándose hacia la membrana plasmática. En los trofozoítos control tratamiento con CHX fue más evidente la localización de EhADH y Hgl Gal/GalNac en la membrana plasmática. En cambio, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD, las proteínas EhADH y Hgl Gal/GalNac se ubicaron dispersas en el citoplasma (Figura 51).

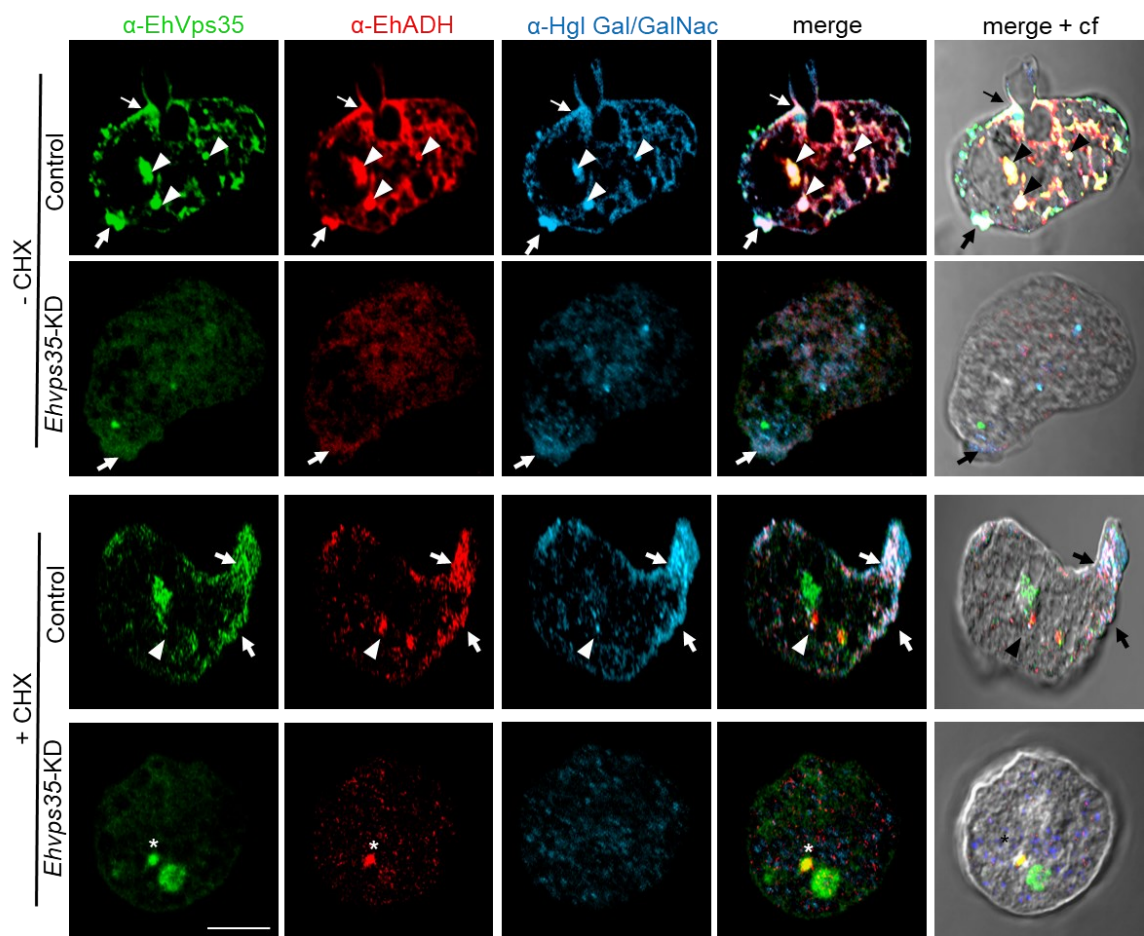
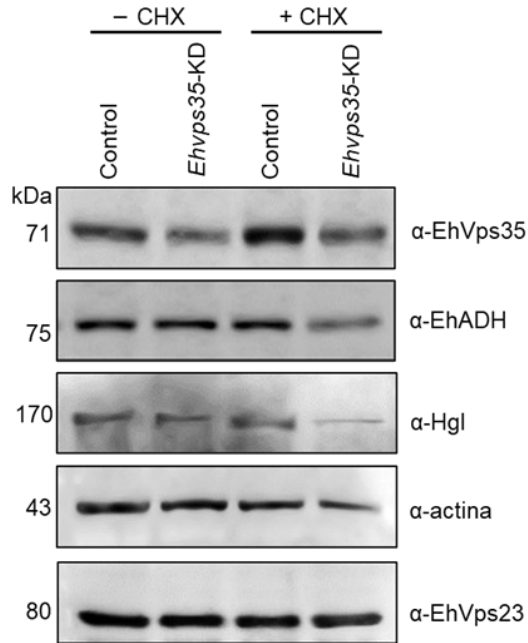


Figura 51. EhVps35 recicla a EhADH y Hgl Gal/GalNac.

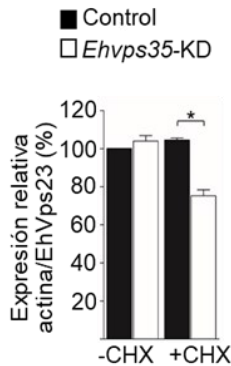
Imágenes representativas de microscopía confocal de EhVps35 (verde), EhADH (rojo) y Hgl Gal/GalNac (azul) después de un ensayo de reciclaje. -CHX: trofozoítos no tratados. +CHX: trofozoítos tratados con cicloheximida. Control: trofozoítos sin tratamiento con dsRNA. *Ehvps35*-KD: trofozoítos *knock-down* del gen *Ehvps35*. Flecha negra: co-localización de EhADH, Hgl Gal/GalNac y EhVps35 en la membrana plasmática. Triángulo negro: co-localización de EhADH, Hgl Gal/GalNac y EhVps35 en el citoplasma. Asterisco: co-localización de EhVps35 y EhADH en el citoplasma de trofozoítos *Ehvps35*-KD. Barra de escala, 10 μ m.

Por la aparente disminución de la intensidad de fluorescencia de EhADH y Gal/GalNac observada en las imágenes de microscopía confocal, se procedió a realizar ensayos de *western blot* con lisados de trofozoítos obtenidos de los ensayos de reciclaje utilizando tratamiento con CHX (Figura 52, A). Interesantemente, se observó una reducción en la proteína actina, el control típicamente usado para normalizar los análisis densitométrico, por lo que como control se utilizó a la proteína EhVps23, ya que esta proteína no presentó cambios en el reconocimiento de α -EhVps23 en las condiciones utilizadas (Figura 52, A y B). Como se esperaba, en los trofozoítos *Ehvps35-KD* se observó una reducción de la proteína EhVps35 con respecto trofozoítos control, sin embargo, no se observaron variaciones por el tratamiento con CHX (Figura 52, C). La proteína EhADH presentó una reducción significativa únicamente en los trofozoítos *Ehvps35-KD* tratados con CHX (Figura 52, D). En cambio, la subunidad Hgl de Gal/GalNac mostró una reducción significativa en trofozoítos *Ehvps35-KD* sin tratamiento, que fue más evidente en trofozoítos *Ehvps35-KD* tratados con CHX (Figura 52, E).

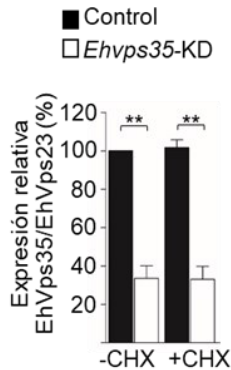
A)



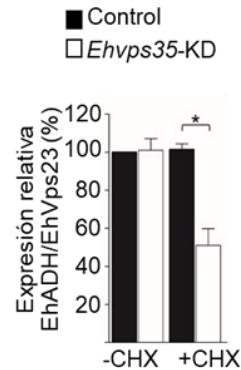
B)



C)



D)



E)

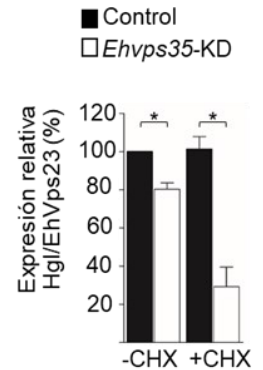


Figura 52. Ensayo de reciclaje de EhADH y Gal/GalNac analizados por *western blot*.

A) Trofozoítos tratados con cicloheximida (+CHX) y no tratados (-CHX) fueron utilizados para realizar ensayos de reciclaje, que fueron analizados por *western blot*. Control: trofozoítos sin tratamiento con dsRNA. *Ehvps35*-KD: trofozoítos *knock-down* del gen *Ehvps35*. B-E) Análisis densitométrico de las bandas mostradas en (A) normalizadas utilizando a la proteína EhVps23. * p < 0,05; ** p < 0,01.

7.15 En trofozoítos *Ehvps35*-KD, EhADH se localizó principalmente en vesículas ácidas

La proteína EhADH tiene un importante papel en el proceso de adhesión e internalización de los eritrocitos, por lo que, durante el proceso de fagocitosis, EhADH es internalizada y reciclada a la membrana plasmática aproximadamente a los 30 min de eritrofagocitosis (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Bañuelos et al., 2012). Por estos antecedentes, se procedió a analizar la localización de EhADH en trofozoítos tratados con CHX en condiciones basales y después de 2 o 30 min de fagocitosis. Adicionalmente, se realizó un marcaje de estructuras ácidas utilizando LysoTracker, ya que EhADH se ha reportado en algunas estructuras ácidas durante la fagocitosis, por lo que se especula qué parte de esta proteína se degrada y otra porción se recicla a la membrana plasmática (Castellanos-Castro et al., 2016b).

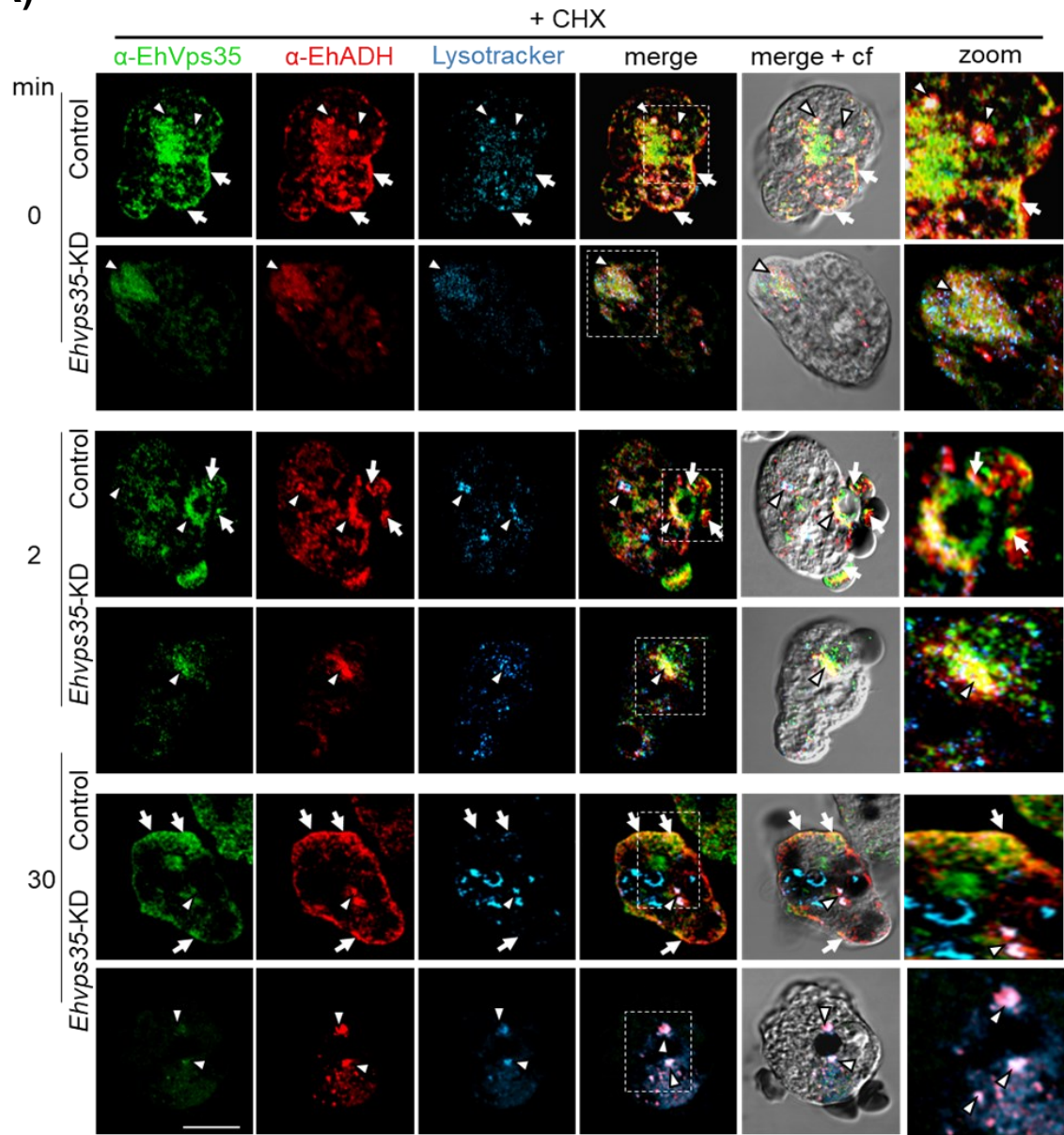
Las imágenes de microscopía confocal mostraron que en trofozoítos control en condiciones basales, EhADH y EhVps35 co-localizan en algunas regiones de la membrana plasmática y en estructuras ácidas (Figura 53, A). A los 2 min de fagocitosis, EhADH y EhVps35 co-localizaron hacia las regiones de contacto con los eritrocitos, además, en algunas regiones ambas proteínas co-localizaron en algunas estructuras ácidas en el citoplasma (Figura 53, A). A los 30 min de fagocitosis, EhADH y EhVps35 co-localizaron en la membrana plasmática y en algunas estructuras ácidas cercanas a fagosomas. En contraste, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD las proteínas EhADH y EhVps35 se ubicaron principalmente dispersas en el citoplasma, donde co-localizaron con estructuras ácidas (Figura 53, A).

Posteriormente, se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia para comprobar diferencias significativas en EhVps35, EhADH y estructuras ácidas durante la cinética de eritrofagocitosis entre trofozoítos control y *Ehvps35*-KD. Al igual que en previos experimentos, se observó una reducción en EhVps35 en los trofozoítos que fueron estimulados con eritrocitos. Adicionalmente, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD se observó una reducción significativa en EhVps35 de

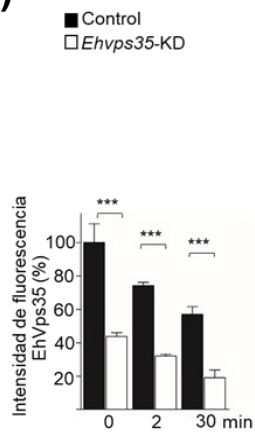
aproximadamente del 60% en la intensidad de fluorescencia respecto a trofozoítos control (Figura 53, B). En EhADH, se observó una reducción en la intensidad de fluorescencia de aproximadamente 20% en trofozoítos control, mientras que en trofozoítos *Ehvps35*-KD la reducción en la intensidad de fluorescencias fue mayor, ya que en condiciones basales se observó una reducción significativa de aproximadamente el 70%, llegando a disminuir hasta un 90% a los 30 min de fagocitosis, respecto de los trofozoítos control (Figura 53, C). Las estructuras ácidas teñidas por LysoTracker aumentaron por el estímulo con eritrocitos en trofozoítos control y *Ehvps35*-KD, sin embargo, también se presentó una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia de dichas estructuras en los trofozoítos *Ehvps35*-KD respecto los trofozoítos control (Figura 53, D).

Debido a la reducción en la intensidad de fluorescencia de EhADH se realizó una correlación de Pearson entre EhADH y las estructuras ácidas teñidas por LysoTracker (Figura 53, E). En los trofozoítos *Ehvps35*-KD, se presentó un aumento significativo en la co-localización entre EhADH/LysoTracker respecto a trofozoítos control. Ya que, en los trofozoítos control no se obtuvieron diferencias significativas durante la cinética de eritrofagocitosis al tener valores de correlación de Pearson bajos (0.32 a 0.35); mientras que, en los trofozoítos *EhVps35*-KD los valores de correlación de Pearson fueron altos (0.51 a 0.54) (Figura 53, E).

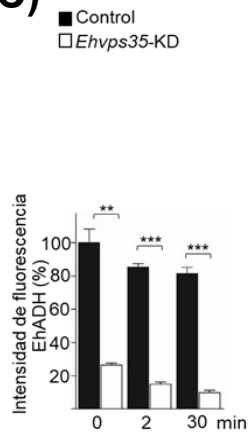
A)



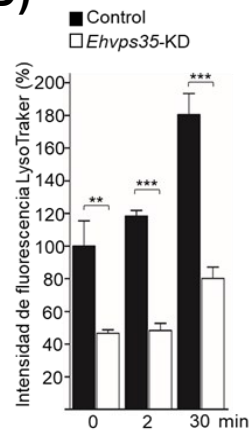
B)



C)



D)



E)

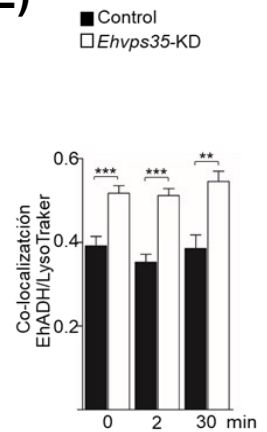


Figura 53. Reciclaje de EhADH durante la fagocitosis.

Trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) fueron tratados con cicloheximida (+CHX) y estimulados con eritrocitos por 2 y 30 min. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de EhVps35 (verde), EhADH (rojo) y LysoTracker (azul) durante una cinética de eritrofagocitosis. +CHX: trofozoítos tratados con cicloheximida. Control: trofozoítos sin dsRNA-*Ehvps35*. *Ehvps35*-KD: trofozoítos *knock-down* del gen *Ehvps35*. Flecha negra: co-localización de EhADH y EhVps35 en la membrana plasmática. Triángulo negro: co-localización de EhADH, LysoTracker y EhVps35 en el citoplasma. Barra de escala, 10 μ m. B-D) Análisis de la intensidad de píxeles del reconocimiento de α -EhVps35, α -EhADH y LysoTracker en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD. Los valores de intensidad de píxeles fueron normalizados con respecto a los valores de trofozoítos control en condiciones basales (0 min). E) Co-localización entre EhADH y LysoTracker calculada utilizando el valor de correlación de Pearson. *** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.16 En los trofozoítos *Ehvps35*-KD disminuyó la capacidad de fagocitosis

La fagocitosis se considera uno de los principales mecanismos de virulencia en trofozoítos de *E. histolytica* (Huston y Sateriale, 2011; Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016; Orozco et al., 1983). Debido a la interacción de EhVps35 con múltiples proteínas relacionadas con la fagocitosis, entre las que se encontraron proteínas de la maquinaria ESCRT, Hgl de Gal/GalNac, proteínas del citoesqueleto, CP2, CP5, entre otras. Además, ya que el *knock-down* del gen *Ehvps35* (*Ehvps35*-KD) en trofozoítos afectó la localización de EhADH y Gal/GalNac, proteínas ampliamente descritas por su papel en el proceso de fagocitosis (García-Rivera et al., 1982, 1999; Arroyo y Orozco, 1987; Marion et al., 2005; McCoy y Mann, 2005; Meza et al., 2006; Bañuelos et al., 2012; Emmanuel et al., 2015; Ocadiz-Ruiz et al., 2016), se procedió a estudiar la participación de EhVps35 en este proceso realizando ensayos para determinar la eficiencia en la adhesión y fagocitosis de células en los trofozoítos *Ehvps35*-KD

Los ensayos para determinar la tasa de adhesión de eritrocitos se realizaron con trofozoítos control y *Ehvps35*-KD incubados con eritrocitos durante 5 y 30 min a 4 °C. Posteriormente, los trofozoítos fueron fijados y se les realizó una tinción con diaminobencidina (tinción de Novikoff), para evidenciar los eritrocitos y con ello realizar la cuantificación de los eritrocitos adheridos por trofozoíto (tasa de adhesión) (Figura 54, A). Los trofozoítos *Ehvps35*-KD obtuvieron una tasa de adhesión de eritrocitos significativamente menor (aproximadamente 50% menos) a los trofozoítos control en los tiempos analizados. Si bien, en ambos grupos de trofozoítos, la adhesión aumentó a mayor tiempo de incubación con eritrocitos. A los 30 min, los trofozoítos *Ehvps35*-KD mostraron un aumento de aproximadamente 20% en su tasa de adhesión, mientras en trofozoítos control la tasa de adhesión aumentó al doble (Figura 54, B).

La tasa de fagocitosis de eritrocitos (eritrocitos fagocitados por trofozoíto) se determinó incubando trofozoítos control y *Ehvps35*-KD con eritrocitos por 5 y 30 min a 37 °C. Posteriormente, los eritrocitos no ingeridos fueron eliminados,

mientras los trofozoítos fueron fijados y los eritrocitos fueron evidenciados por una tinción de Novikoff, para realizar la cuantificación el número de eritrocitos ingeridos por trofozoíto (tasa de fagocitosis) (Figura 54, C). Los trofozoítos *Ehvps35*-KD obtuvieron una tasa de fagocitosis de eritrocitos significativamente menor (aproximadamente 60% menos) a los trofozoítos control. Sin embargo, en trofozoítos control y *Ehvps35*-KD se observó un aumento en su tasa de fagocitosis a mayor tiempo de incubación con eritrocitos. En los trofozoítos control aumentó aproximadamente 86%, mientras que en los trofozoítos *Ehvps35*-KD incrementó aproximadamente un 58% (Figura 54, D).

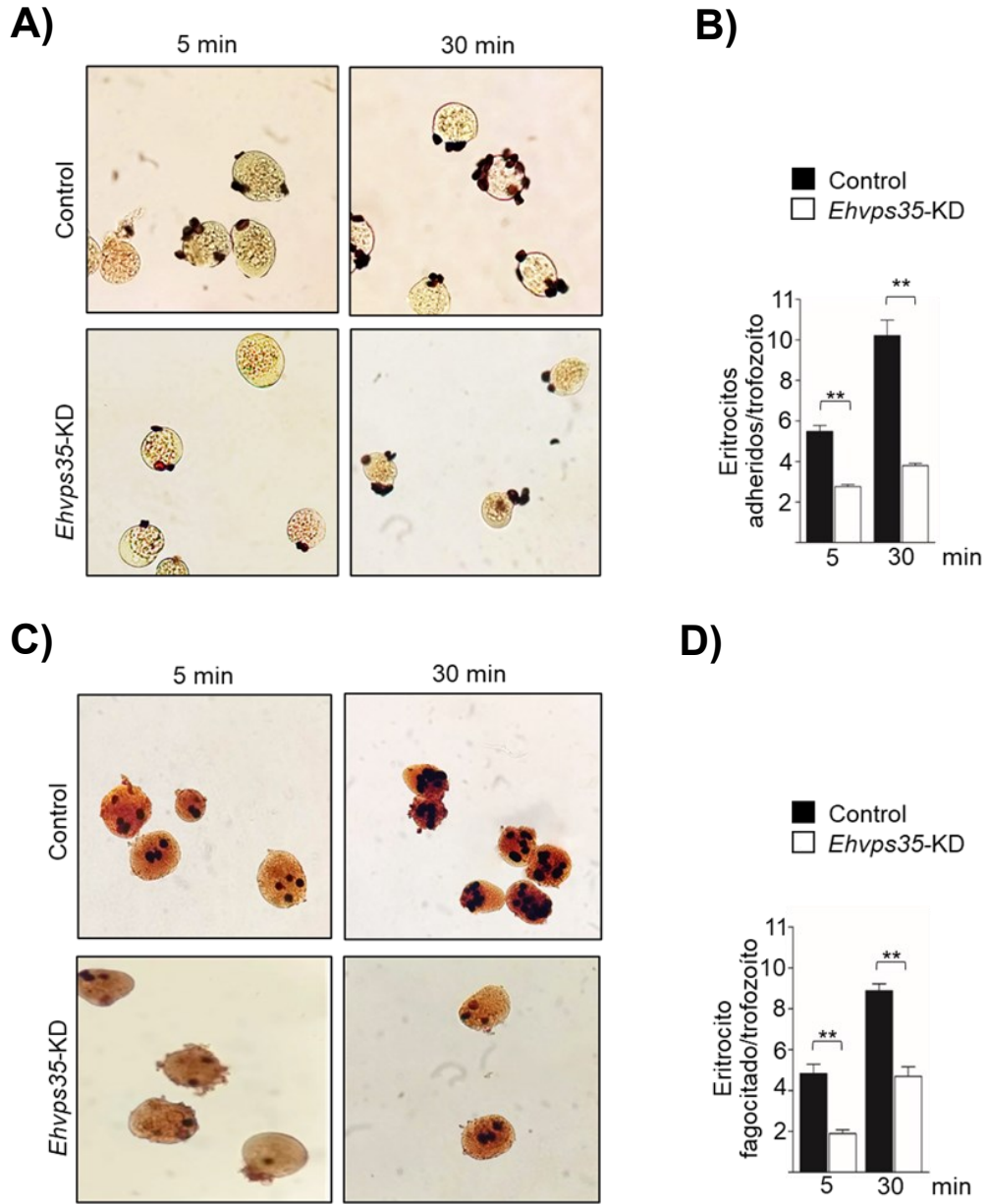


Figura 54. Reducción de la tasa de adhesión y fagocitosis en trofozoítos *Ehvps35-KD*.

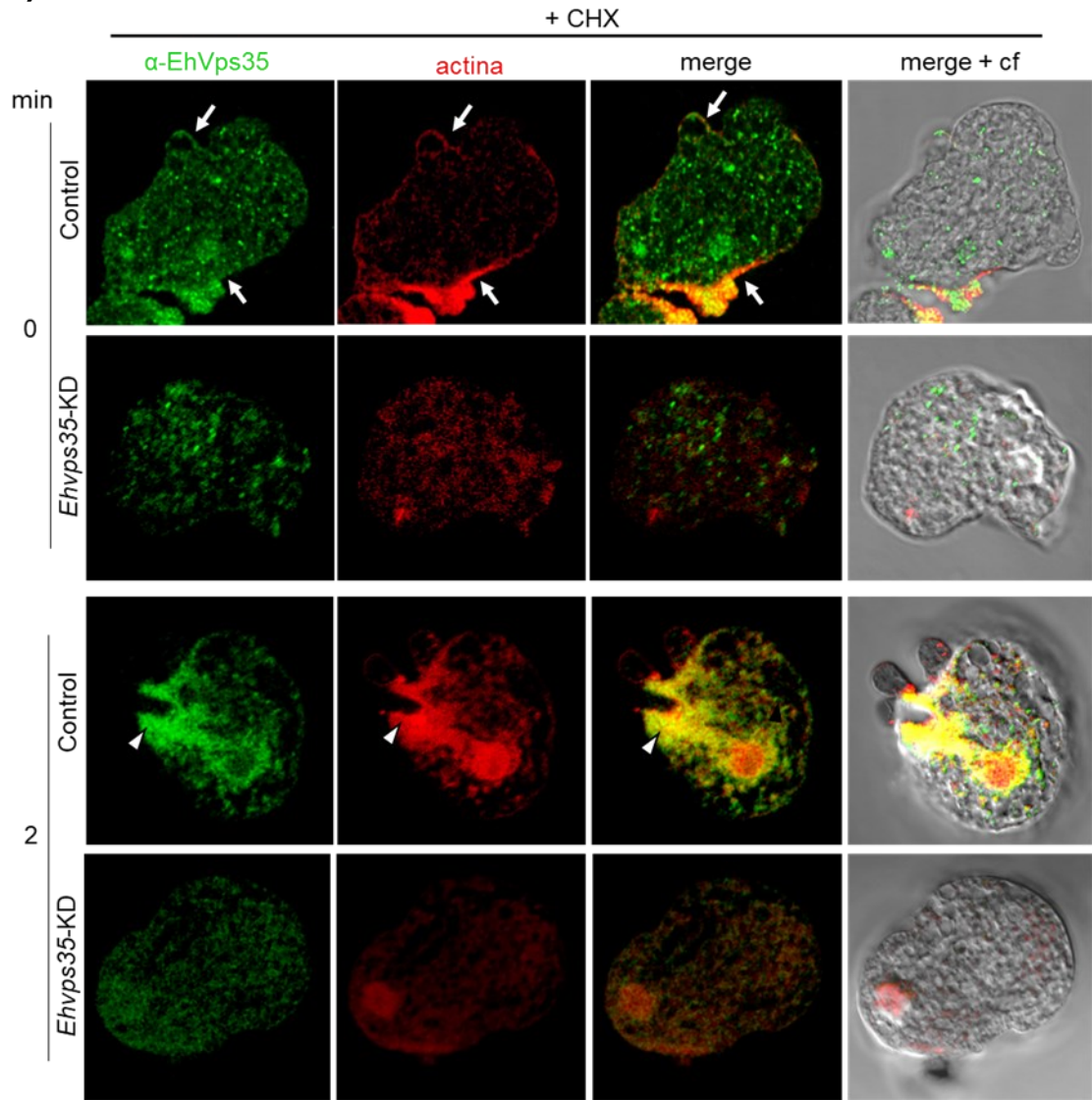
Trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35-KD* (*knock-down* del gen *Ehvps35*) fueron incubados con eritrocitos en una relación 1:25. A) Imágenes representativas de microscopía óptica de trofozoítos en interacción con eritrocitos a 4 °C por 5 y 30 min con tinción de Novikoff. B) Tasa de adhesión obtenida del número de eritrocitos por trofozoito. Se muestra el promedio de 100 trofozoítos analizados en tres experimentos independientes. C) Imágenes representativas de microscopía óptica de trofozoítos en interacción con eritrocitos a 37 °C por 5 y 30 min con tinción de Novikoff. B) Tasa de fagocitosis obtenida del número de eritrocitos por trofozoito. Se muestra el promedio de 100 trofozoítos analizados en tres experimentos independientes. ** $p < 0.01$.

7.17 Trofozoítos *Ehvps35*-KD presentan desestructuración de la F-actina

Se procedió a analizar los cambios en la estructuración de actina, estudiando la localización de la actina de tipo filamentosa (F-actina) debido a la reducción en la capacidad fagocítica en trofozoítos *Ehvps35*-KD y la reducción en actina observada en trofozoítos *Ehvps35*-KD tratados con CHX.

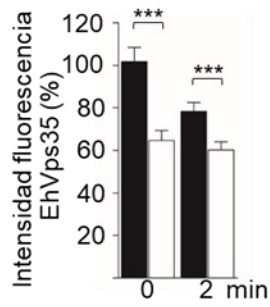
Ensayos de eritrofagocitosis se realizaron utilizando trofozoítos control y *Ehvps35*-KD tratados con CHX por 30 min e incubados con eritrocitos por 2 min a 37 °C. Posteriormente, los trofozoítos fueron procesados para microscopía confocal utilizando el anticuerpo α -EhVps35 y una tinción para actina filamentosa con faloidina-rodamina. En los trofozoítos control en condiciones basales, la F-actina se localizó principalmente en la membrana plasmática; mientras que, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD la F-actina se localizó dispersa en el citoplasma y en algunos puntos de la membrana plasmática. A los 2 min de fagocitosis en los trofozoítos control, la F-actina se localizó hacia las zonas en contacto con los eritrocitos, decorando canales y copas fagocíticas. En cambio, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD, no se observó la relocalización de la F-actina (Figura 55, A). Posteriormente, se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia y al igual que en previos experimentos se observó una reducción en la intensidad de fluorescencia de EhVps35 en trofozoítos que fueron estimulados con eritrocitos y en los trofozoítos *Ehvps35*-KD se observó una reducción significativa de EhVps35 (Figura 55, B). También se observó una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia de la F-actina en trofozoítos *Ehvps35*-KD (Figura 55, C). Adicionalmente, por los cambios en la localización de EhVps35 y F-actina se realizó la cuantificación de la co-localización utilizando la correlación de Pearson, lo cual mostró un aumento significativo de la co-localización entre EhVps35 y F-actina en los trofozoítos control por el estímulo con eritrocitos. En los trofozoítos *Ehvps35*-KD, se observó una reducción significativa en la co-localización entre EhVps35 y F-actina en condiciones basales y a los 2 min de fagocitosis, al tener valores de correlación de Pearson bajos (0.25 a 0.31) (Figura 55, D).

A)



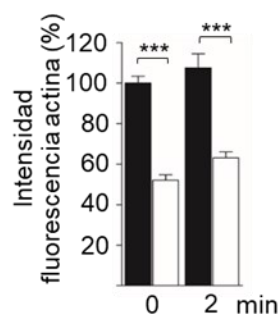
B)

■ Control
□ EhVps35-KD



C)

■ Control
□ EhVps35-KD



D)

■ Control
□ EhVps35-KD

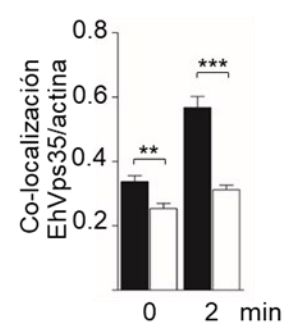


Figura 55. Desestructuración del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis en trofozoítos *Ehvps35*-KD.

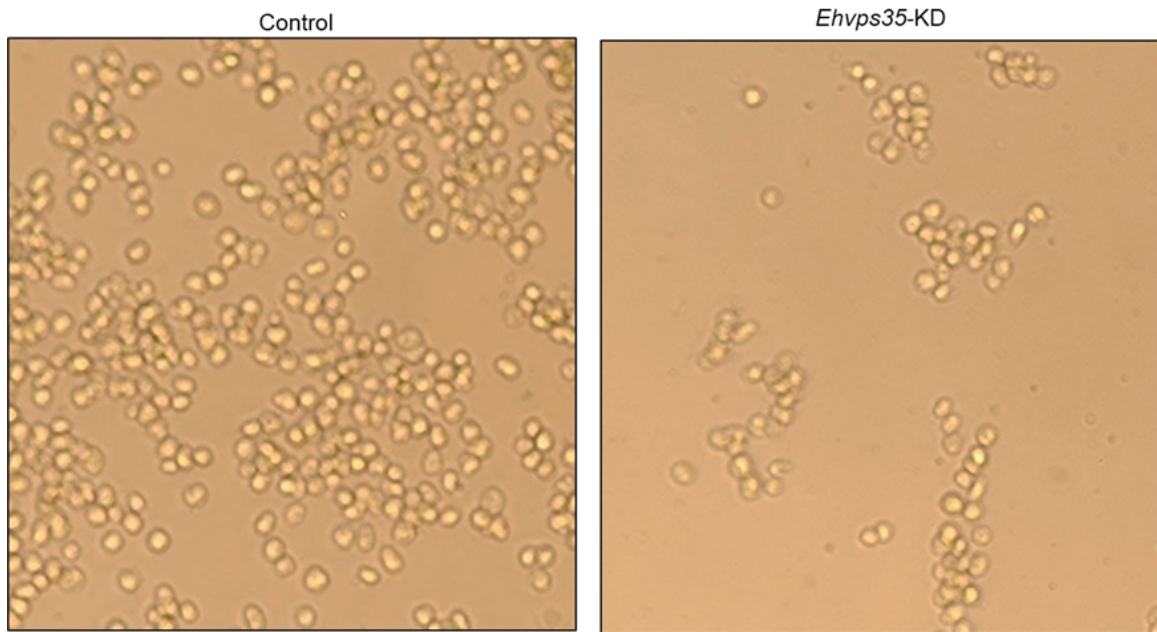
Trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) fueron tratados con cicloheximida (+CHX) en condiciones basales y estimulados con eritrocitos por 2 min. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de EhVps35 (verde) y actina filamentosa (F-actina) detectada por faloidina-rodamina (rojo). Flecha: co-localización de EhVps35 y F-actina en la membrana plasmática. Triángulo: co-localización de EhVps35 y F-actina en canal y copa fagocítica. Barra de escala, 10 μ m. B-C) Análisis de la intensidad de píxeles del reconocimiento de α -EhVps35 y faloidina-rodamina en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD. Los valores de intensidad de píxeles fueron normalizados con respecto a las condiciones basales. E) Coeficiente de Pearson para la co-localización de EhVps35 y F-actina. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.18 Trofozoítos *Ehvps35*-KD presentan una reducción en su capacidad de migración y formación del absceso hepático amebiano

Debido a la reducción en el reciclaje de proteínas de la membrana plasmática, así como una disminución en la capacidad de fagocítica y desestructuración de actina en *Ehvps35*-KD; se exploró el efecto del *knock-down* del gen *Ehvps35* en otros mecanismos de virulencia como la capacidad de migración, donde las proteínas del citoesqueleto de actina tienen un papel estelar. Los ensayos de migración se realizaron en placas Transwell colocando trofozoítos control y *Ehvps35*-KD en la cámara superior de los filtros Transwell y suero bovino en la cámara inferior como quimioatrayente. Después de 3 h de incubación se cuantificaron los trofozoítos en la cámara inferior. Los trofozoítos *Ehvps35*-KD mostraron una reducción significativa del 80% en su motilidad respecto a los trofozoítos control (Figura 56, A y B).

Se procedió a estudiar el efecto del *knock-down* del gen *Ehvps35* en la capacidad de formación del absceso hepático, ya que los trofozoítos *Ehvps35*-KD mostraron una reducción en la capacidad fagocítica y de migración. Los ensayos de virulencia *in vivo* se realizaron utilizando dos grupos de cinco hámsteres cada uno, inoculando trofozoítos control o *Ehvps35*-KD. Después de siete días, el hígado de los animales fue extraído, y analizado. Los trofozoítos *Ehvps35*-KD presentaron una reducción significativa del 80 % en el daño hepático respecto a los trofozoítos control (Figura 57, A y B).

A)



B)

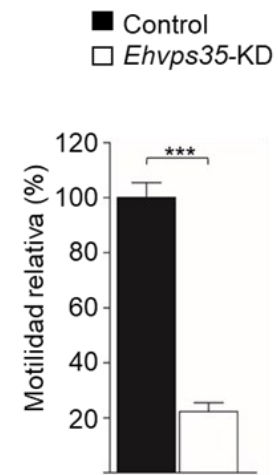


Figura 56. Los trofozoítos *Ehvps35*-KD presentan reducción en la motilidad.

Ensayos de migración con placas Transwell fueron realizados con trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) colocados en una cámara superior de los filtros Transwell y suero bovino en la cámara inferior como quimioatrayente. Después de 3 h, se realizó la cuantificación de los trofozoítos en la cámara inferior. A) Imágenes representativas de microscopía óptica de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD en la cámara inferior del filtro Transwell. B) Cuantificación de los trofozoítos en la cámara inferior. *** $p < 0.0001$.

A)



B)

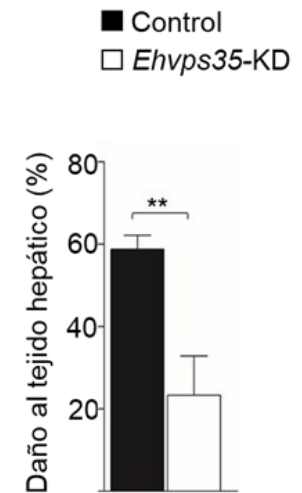


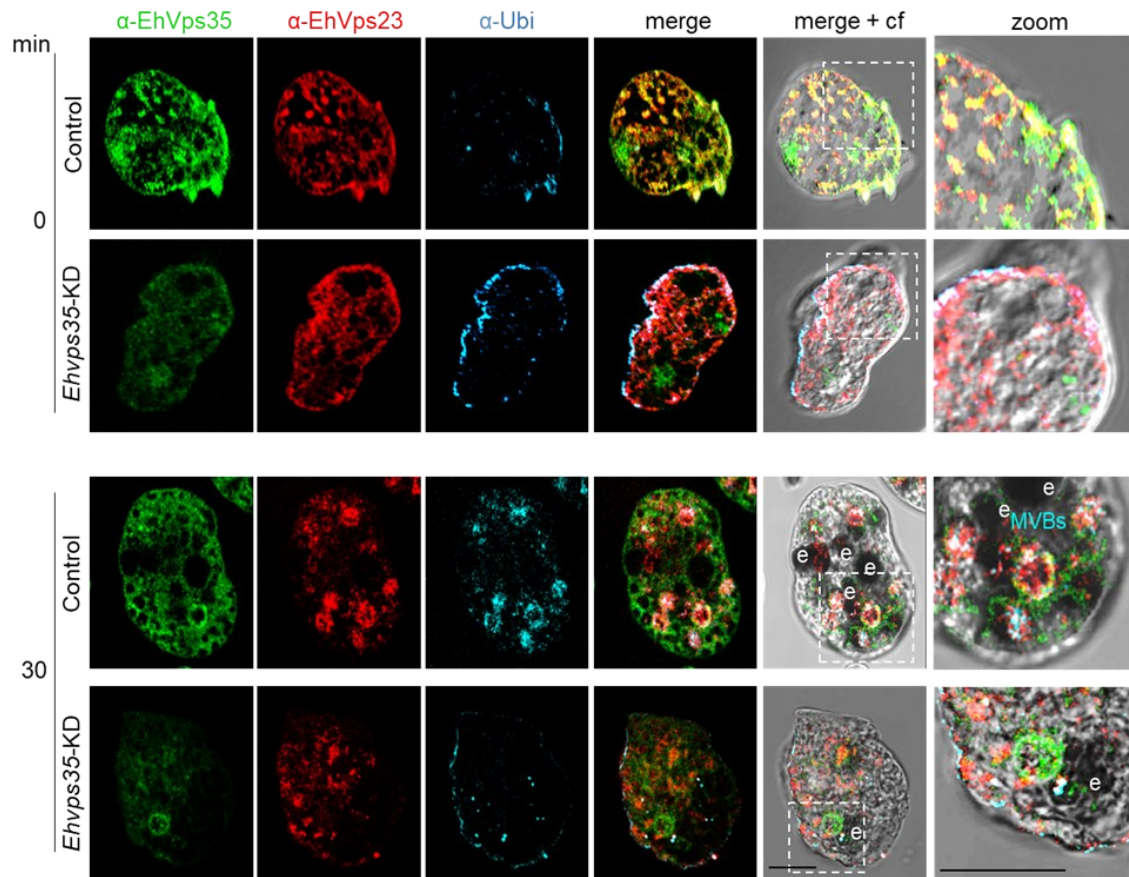
Figura 57. El *knock-down* del gen *Ehvps35* produjo la reducción en la virulencia *in vivo*.

Hámsteres fueron inoculados con trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) o *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*). Después de siete días, los hígados fueron extraídos y analizados. A) Imágenes de hígados de hámster a los siete días post inoculación con trofozoítos control o *Ehvps35*-KD. B) Porcentaje de tejido dañado en los hígados analizados. ** $p < 0.01$

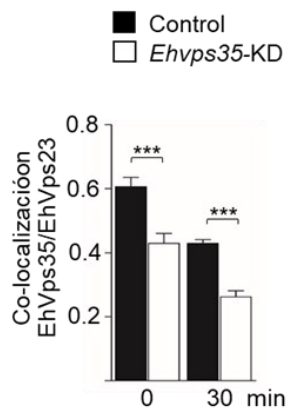
7.19 El *knock-down* del gen *Ehvps35* alteró la localización de EhVps23 y EhVps32

Se analizó la localización de EhVps23 y EhVps32, ya que en humanos HsVps35 junto con TSG101 y CHMP6 (homólogos de EhVps35, EhVps23 y EhVps32) participan en migración, secreción y proliferación celular (Zhang et al., 2018; Liu et al., 2020; Tan et al., 2022). La localización de EhVps35, EhVps23 y EhVps32 se analizó procesando para microscopía confocal trofozoítos control y *Ehvps35*-KD en condiciones basales y después de ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza, utilizando 30 min de eritrofagocitosis (2 min de pulso con eritrocitos y 28 min de caza). Adicionalmente, se analizó la localización de EhUb, debido a que EhVps23 se une a proteínas ubiquitinadas para reclutar a otros componentes de la maquinaria ESCRT (Galindo et al., 2021). Las imágenes de microscopía confocal mostraron que EhVps35 y EhVps23 en trofozoítos control, al igual que en ensayos previos, co-localizan en el citoplasma y en algunas regiones de la membrana plasmática. En trofozoítos *Ehvps35*-KD, se observó que EhVps23 se localizó principalmente en esta región. La proteína EhUb en trofozoítos control, se localizó en algunas regiones del citoplasma y en la membrana plasmática, donde co-localiza con EhVps23, como lo reportó Galindo et al., (2021); en cambio, en los trofozoítos *Ehvps35*-KD las proteínas EhUb y EhVps23 localizan principalmente en la membrana plasmática donde co-localizan. A los 30 min de fagocitosis, los trofozoítos control, se observaron múltiples MVBs decorados con EhVps35, EhVps23 y EhUb. En contraste, los trofozoítos *Ehvps35*-KD no presentaron MVBs decorados por EhVps23 y EhUb (Figura 58, A). Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la co-localización utilizando la correlación de Pearson, lo cual mostró un aumento significativo de la co-localización entre EhVps23/EhUb y una reducción significativa entre EhVps35/EhVps23 en los trofozoítos control por el estímulo con eritrocitos (Figura 58, B y C). En los trofozoítos *Ehvps35*-KD se observó una reducción significativa en la co-localización entre EhVps35/EhVps23; mientras que la co-localización entre EhVps23/EhUb en condiciones basales fue significativamente mayor que en trofozoítos control, pero no aumentó por el estímulo de eritrocitos, como ocurrió en los trofozoítos control (Figura 58, B-C).

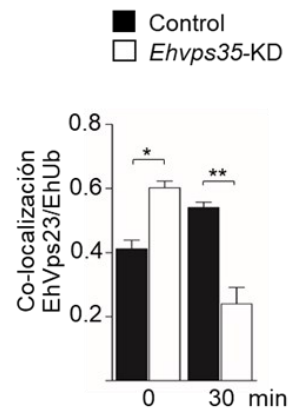
A)



B)



C)



D)

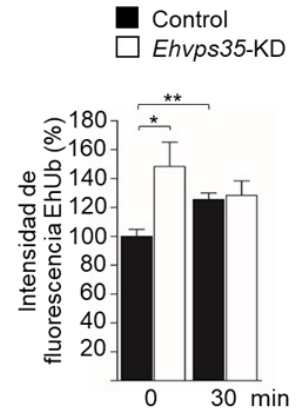
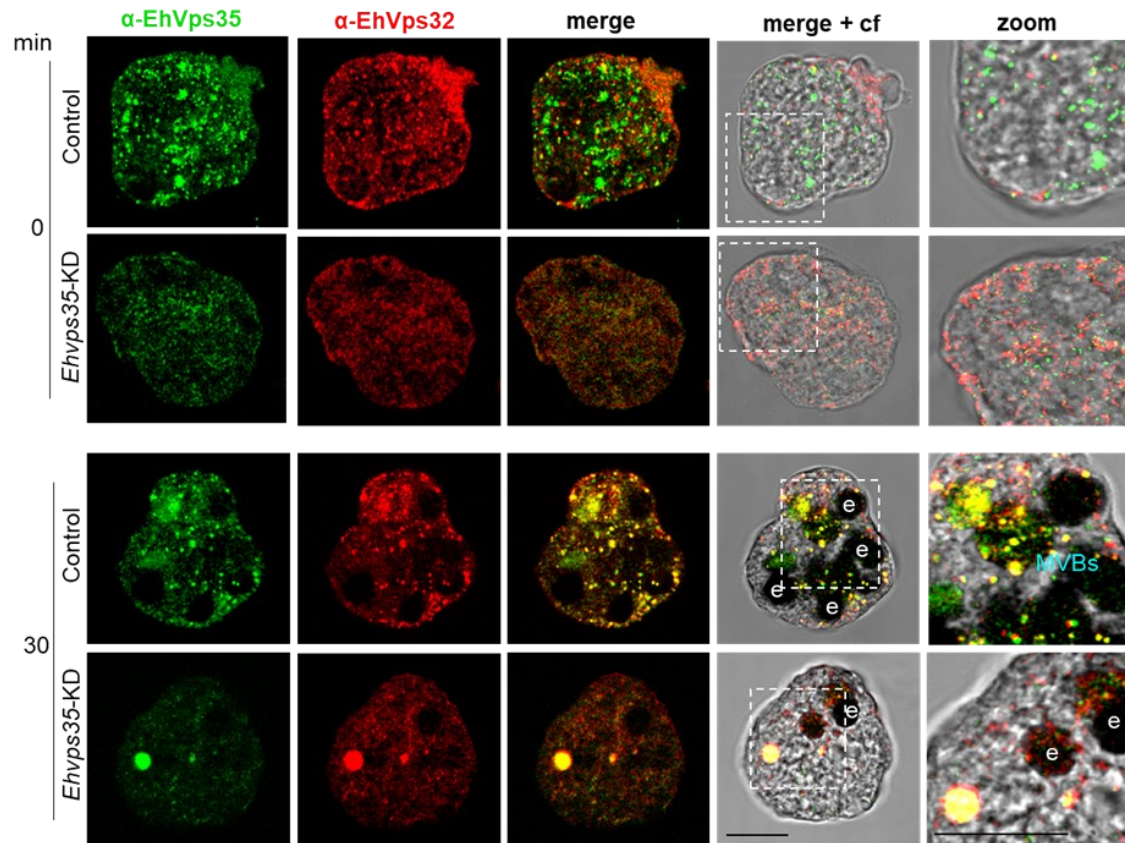


Figura 58. Trofozoítos *Ehvps35*-KD presentan alteraciones en la localización celular de EhVps23 y EhUb.

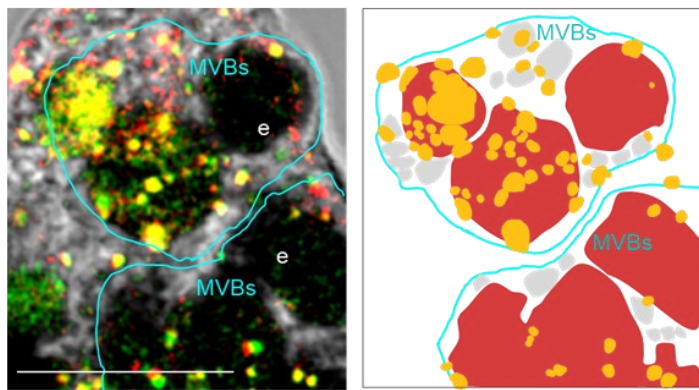
Trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) en condiciones basales y después de ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza (estimulados con eritrocitos de 2 min más 28 min de caza) fueron procesados para microscopía confocal. A) Imágenes de microscopía confocal de EhVps35 (verde), EhVps23 (rojo) y EhUb (azul). e: eritrocito. Barra de escala, 10 μ m. B-C) Coeficiente de Pearson para la co-localización EhVps35/EhVps23 y EhVps23/EhUb. D) Análisis de la intensidad de píxeles del reconocimiento de α -Ub en imágenes de microscopía confocal de trofozoítos control y *Ehvps35*-KD. Los valores de intensidad de píxeles fueron normalizados con respecto a los trofozoítos control en condiciones basales. * $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Debido a a la aparente ausencia de MVBs en trofozoítos *EhVps35*-KD se procedió a estudiar la localización de la proteína EhVps32, un marcador típico de MVBs (Avalos-Padilla et al., 2015, 2018; Galindo et al., 2021). Trofozoítos control y *Ehvps35*-KD en condiciones basales y después de 30 min de eritrofagocitosis (2 min de pulso más 28 min de caza) fueron procesados para microscopía confocal utilizando los anticuerpos α -EhVps35 y α -EhVps32. En trofozoítos control, EhVps32 se localizó hacia la membrana plasmática principalmente, donde co-localizó en algunos puntos con EhVps35. En los trofozoítos *Ehvps35*-KD la proteína EhVps32 se ubicó principalmente dispersa en el citoplasma y en algunos puntos de la membrana plasmática donde co-localizó con EhVps35. Después de 30 min de eritrofagocitosis, en los trofozoítos control, EhVps35 y EhVps32 co-localizan en MVBs y en estructuras vesiculares cercanas a la membrana plasmática (Figura 59, A y B). En contraste, en trofozoítos *Ehvps35*-KD, los MVBs no fueron visualizados y la co-localización EhVps35/EhVps32 se observó en estructuras vesiculares en el citoplasma (Figura 60, A). Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la co-localización entre EhVps35/EhVps32 utilizando la correlación de Pearson, lo cual mostró un aumento significativo de la co-localización entre EhVps35/EhVps32 en los trofozoítos control por el estímulo con eritrocitos (Figura 59, C). En los trofozoítos *Ehvps35*-KD se observó una reducción significativa en la co-localización entre EhVps35/EhVps32 respecto de los trofozoítos control, que a pesar del aumentar la co-localización entre EhVps35/EhVps32 por el estímulo de eritrocitos no alcanzó los niveles observados en los trofozoítos control (Figura 59, C).

A)



B)



C)

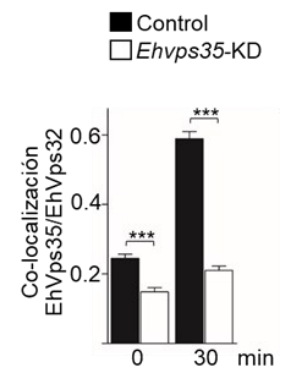


Figura 59. Trofozoítos *Ehvps35*-KD presentan alteraciones en la localización celular de EhVps32.

Trofozoítos control (sin tratamiento con dsRNA) y *Ehvps35*-KD (*knock-down* del gen *Ehvps35*) en condiciones basales y después de ensayos de eritrofagocitosis por pulso y caza (estímulo con eritrocitos de 2 min más 28 min de caza) fueron procesados para microscopía confocal. A) Imágenes de microscopía confocal de EhVps35 (verde) y EhVps32 (rojo). e: eritrocito. Barra de escala, 10 μ m. B) Esquema representativo de la imagen de microscopía confocal de trofozoítos control (panel a la izquierda) donde se señalan los MVBs (línea azul) rodeados de múltiples estructuras vesiculares (gris) y eritrocitos (rojo). C) Coeficiente de Pearson para la co-localización EhVps35/EhVps32. *** $p < 0.001$.

8. DISCUSIÓN

El retrómero es un complejo proteico ampliamente estudiado en humanos por su relación con enfermedades neurodegenerativas y recientemente con cáncer (Willnow et al., 2008; Sangaré et al., 2016; Brodin y Shupliakov, 2018; Zhang et al., 2018, 2020; Liu et al., 2020; Tan et al., 2022; Yu et al., 2023). El retrómero también ha sido estudiado en múltiples organismos en los que se ha relacionado con apoptosis, autofagia, endocitosis, degradación lisosomal, diferenciación celular, absorción de nutrientes, secreción, migración y proliferación celular (Chen et al., 2010; Tabuchi et al., 2010; Pocha et al., 2011; Sangaré et al., 2016; Zhou et al., 2016; Kvainickas et al., 2017a; Williams et al., 2018; Farmer et al., 2019; Liu et al., 2020; Filippone et al., 2021b, 2021a; Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022). Sin embargo, pese a la importancia del retrómero con múltiples procesos celulares, existen pocos estudios de este complejo proteico en parásitos protozoarios de importancia médica (*Nakada-Tsukui et al., 2005; Rivero et al., 2012; Miras et al., 2013; Krai et al., 2014; Sangaré et al., 2016; Iqbal et al., 2018; Gras et al., 2019*). Solo en *T. gondii* se ha descrito al retrómero como un factor clave en el proceso de invasión celular, al participar en la formación de organelos secretores (roptrias y micronemas) (*Sloves et al., 2012; Sangaré et al., 2016; Gras et al., 2019*). En *E. histolytica*, el parásito de interés para este trabajo, el retrómero se ha relacionado con la fagocitosis, por cambios en la localización de las proteínas EhVps26, EhVps29 y SNX1. Además, trofozoítos mutantes en EhVps26 y EhVps29 presentan alteraciones en la actividad total de las CPs, posiblemente por el reciclaje de sus receptores (*Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020*). Debido a la ausencia de estudios de EhVps35, el componente central del retrómero en *E. histolytica*, esta investigación se centró en el estudio de EhVps35 en el reciclaje de proteínas y su papel en diferentes mecanismos de virulencia.

La relevancia de este estudio radica en proporcionar evidencia sobre: i) la similitud estructural 3D de EhVps35 con HsVps35, ya que el modelo 3D obtenido después de DMS está constituido por un α -solenoides con movimiento clásico de

bisagra, al igual que sus proteínas homólogas, y; ii) la participación de EhVps35 en el reciclaje de proteínas hacia la membrana plasmática; iii) la interacción de EhVps35 con la subunidad Hgl Gal/GalNac y EhADH, e importantemente, se demostró que EhVps35, media el reciclaje de estas proteínas hacia la membrana plasmática; iv) la asociación de EhVps35 con múltiples proteínas del tráfico vesicular, citoesqueleto, fagocitosis, secreción y motilidad; v) la secreción de EhVps35 en vesículas extracelulares junto con EhVps23 y EhADH; vi) el efecto del estímulo con eritrocitos en la secreción de EhVps35 y EhVps23; vii) la desestructuración del citoesqueleto de actina por el *knock-down* del gen *Ehvps35*; viii) la interacción de EhVps35 con múltiples proteínas de la maquinaria ESCRT (EhTom1, EhVps23, EhVps32 y EhADH); ix) alteraciones en la localización de EhVps23, EhUb y EhVps32, así como la reducción en la formación de MVBs por el *knock-down* del gen *Ehvps35*; y x) la reducción en la fagocitosis, motilidad y formación del absceso hepático, lo cual sugiere que el retrómero tiene un papel clave para la invasión tisular.

La localización de EhVps35 concuerda con la distribución celular reportada en otros organismos (Oliviusson et al., 2006; Seaman, 2007, 2021; Bonifacino y Hurley, 2008), ya que principalmente se localizó en el citoplasma en estructuras vesiculares, al igual que otros componentes del retrómero en *E. histolytica* (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020). Adicionalmente, EhVps35 también se localizó en algunos puntos de la membrana plasmática. No es la primera vez que se reporta a una proteína del retrómero en la membrana plasmática, Biller et al., (2014) reportaron a EhVps35, EhVps26 y EhVps29 como proteínas superficiales en un análisis proteómico; mientras Kerr et al. (2005) reportaron a Vps35 y Vps26B de mamíferos en la membrana plasmática de lamelipodios. Si bien el papel del retrómero en la membrana plasmática no esta claro aún, por la re-localización de EhVps35 producto del estímulo con eritrocitos, se puede suponer que, además del reciclaje de proteínas hacia la membrana plasmática, el retrómero cumple funciones aún no descritas, ya que en *E. histolytica* la presencia de EhVps35 en la membrana plasmática fue clave para la estructuración de la F-actina, que da paso a la formación de canales

y copas fagocíticas. Aunque, al igual que lo sugiere Kerr et al. (2005), EhVps35 podría estar localizada en la membrana plasmática como un efecto colateral de su participación en el reciclaje de proteínas.

La desestructuración del citoesqueleto de actina en trofozoítos *Ehvps35-KD* se puede deber a: i) la reducción y localización aberrante de Gal/GalNac, un receptor superficial que regula la estructuración del citoesqueleto (Petri et al., 2002; Marion et al., 2005; Emmanuel et al., 2015; Pacheco-Sánchez et al., 2023); ii) la relación del retrómero con la polimerización de actina, planteada por Watanabe et al. (2020), ya que EhVps35 interacciona con AP2/3, un iniciador de la polimerización de actina que interacciona con EhVps35 y EhSNX1; y iii) la interacción de EhVps35 con 33 proteínas del citoesqueleto de actina que incluyen moduladoras del citoesqueleto de actina y la actina, por lo que la reducción de EhVps35 en los trofozoítos *Ehvps35-KD* podría estar alterando la señalización para la estructuración del citoesqueleto de actina. El papel del retrómero en la organización del citoesqueleto también se ha sugerido en otros organismos (Harbour et al., 2010; McGough et al., 2014; Zavodszky et al., 2014), aunque el mecanismo detrás de la relación del retrómero y el citoesqueleto no ha sido descrito.

El *knock-down* del gen *Ehvps35* (*Ehvps35-KD*) en trofozoítos también causó una disminución en el reciclaje de proteínas hacia la membrana plasmática, así como reducción en la fagocitosis, migración y formación del absceso hepático. Ya que, el retrómero recicla proteínas en otros organismos (Seaman, 2021), la reducción del reciclaje de proteínas en trofozoítos *Ehvps35-KD* fue un resultado esperado, que a su vez, explica la reducción en la tasa de adhesión y fagocitosis como un efecto de la ubicación aberrante de EhADH y Gal/GalNac, entre otras proteínas. La proteína EhADH se asocia a la membrana plasmática y funciona como una proteína de andamiaje para la polimerización de la maquinaria ESCRT; además, forma parte del complejo EhCPADH y tiene interacción con actina, EhRabB, LBPA, EhNPC1, EhNPC2, entre otras, que la hacen participar en la adhesión, fagocitosis y daño tisular (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999;

Bañuelos et al., 2012; Avalos-Padilla et al., 2015; Bolaños et al., 2016; Castellanos-Castro et al., 2016; Ocádiz-Ruiz et al., 2016; Javier-Reyna et al., 2019; Galindo et al., 2021). Mientras que, Gal/GalNac por su ubicación superficial es uno de los principales mecanismos de adhesión de *E. histolytica*; además participa en la reorganización del citoesqueleto, fagocitosis y daño tisular (Petri et al., 2002; Frederick y Petri, 2005; Marion et al., 2005; McCoy y Mann, 2005; Emmanuel et al., 2015; Pacheco-Sánchez et al., 2023).

La reducción en la fagocitosis observada en trofozoítos *Ehvps35*-KD, también puede deberse a la participación del retrómero en la biogénesis lisosomal con el transporte de hidrolasas hacia estructuras ácidas en *E. histolytica*, al igual que en otros organismos, como ha planteado Nakada-Tsukui et al. (2005) y Srivastava et al. (2017). Las imágenes de microscopía confocal sugirieron que EhVps35 participa en la formación de estructuras ácidas, ya que en trofozoítos *Ehvps35*-KD se observó una reducción en estas estructuras. Fenotipos similares, fueron reportados en *E. histolytica* por la inhibición del complejo proteico responsable de la acidificación celular, la ATPasa de tipo vacuolar (V-ATPasa, por sus siglas en inglés *vacuolar-type ATPase*), que a su vez disminuyó también la tasa de fagocitosis (Gilmartin et al., 2017). En *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y *Dictyostelium discoideum*, el retrómero es vital para la biogénesis lisosomal, ya que recicla una subunidad de la V-ATPasa, y células mutantes en proteínas del retrómero presentan una disminución de estructuras ácidas (Carnell et al., 2011; Finnigan et al., 2011; Maruzs et al., 2015; Ye et al., 2020). Además, entre las proteínas que interaccionan con EhVps35, se encontró a la subunidad A de la V-ATPasa (EHI_043010); lo cual, sugiere que en *E. histolytica* el retrómero también podría estar reciclando subunidades de la V-ATPsas, favoreciendo la rápida acidificación requerida durante la fagocitosis.

La identificación de representantes de la mayoría de los subcomplejos de la maquinaria ESCRT en los ensayos de inmunoprecipitación realizados con α -EhVps35 y lisados de trofozoítos, es el primer reporte de una interacción directa o indirecta entre el retrómero y la maquinaria ESCRT. Ya que en humanos y *D.*

melanogaster, solo se ha planteado la posible relación entre el retrómero y el ESCRT por un funcionamiento codependiente (Pannen et al., 2020; Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022). En *D. melanogaster*, el silenciamiento de Shrub (homólogo a EhVps32 del ESCRT-III), TSG101 (homólogo de EhVps23 del ESCRT-I) o Vps4 (proteína accesoria del ESCRT), causó alteraciones en la localización de dos proteínas del retrómero, Vps35 y Vps26, que a su vez suprimió el reciclaje de proteínas (Dukes et al., 2011; Pannen et al., 2020). Mientras, mutaciones en Vps35 o Vps26 causaron la acumulación de múltiples proteínas secretadas y una secreción aberrante de vesículas extracelulares, por lo que se relaciona al retrómero con la selección de proteínas en vesículas extracelulares, un proceso típicamente atribuido a la maquinaria ESCRT (Walsh et al., 2021). En células de humanos, el silenciamiento de Vps35 disminuyó la secreción de TSG101, y en general, disminuyó la liberación de vesículas extracelulares formadas por la maquinaria ESCRT (Tan et al., 2022). Los antecedentes de la función codependiente del retrómero y la maquinaria ESCRT concuerdan con las afectaciones en la localización de EhVps23 y EhVps32 (ESCRT-I y ESCRT-III, respectivamente) y la disminución de la formación de MVBs observadas en trofozoítos *Ehvps35-KD*. Si bien, no descartamos una posible alteración en GTPasas como EhRab5 y EhRba7 que afecten a ambos complejos como lo propone Pannen et al., (2020). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren, una afectación en el funcionamiento de la maquinaria ESCRT, producto del *knock-down* del gen *Ehvps35* por el incremento y la localización aberrante de EhUb. Este fenotipo también ha sido reportado en células que al precentan estructuras endosómicas tipo E por afectaciones en la función de la maquinaria ESCRT (Doyette et al., 2005; Pannen et al., 2020), mientras en células con una pérdida de la función de retrómero se produce una acumulación de proteínas ubiquitinadas en endosomas tipo E (Filippone et al., 2021b, 2021a). La marca de ubiquitina en proteínas es vital para el funcionamiento de la maquinaria ESCRT, ya que la ubiquitinación es clásicamente una señal de degradación reconocida por dominios en proteínas de los ESCRT-0, ESCRT-I y ESCRT-II, que inicia el reclutamiento de otros componentes del complejo ESCRT para llevar a cabo la formación de MVBs (Katzmann et al., 2001; Bilodeau et al.,

2002; Shih et al., 2002). Sin embargo, en *E. histolytica* solo dos proteínas cuentan con dominios de unión a ubiquitina, EhTom1 (ESCRT-0) y EhVps23 (ESCRT-I) (Galindo A., 2016; Galindo et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2023), con las cuales EhVps35 tiene interacción. EhVps23 y EhTom1 forman subdominios para el reclutamiento de otros componentes de la maquinaria ESCRT, lo cual es más evidente en trofozoítos estimulados con eritrocitos, en los que aumentó significativamente la co-localización de EhVps23/EhTom1 y EhVps23/EhUb, también aumentó la co-localización de EhVps23-EhVps32 y EhVps23-EhADH (Galindo A., 2016, 2022; Galindo et al., 2022). Sin embargo, en trofozoítos *Ehvps35-KD*, no se observó el aumento en la co-localización entre EhVps23 y EhUb después del estímulo con eritrocitos, lo cual sugiere que no se reclutaron otros componentes de la maquinaria ESCRT, como lo demostraron las imágenes de microscopía confocal al evidenciar las afectaciones en la localización de EhVps32, un componente de la maquinaria ESCRT-III que media la formación de las ILVs en los MVBs, estructuras poco frecuentes en estos trofozoítos mutantes.

Finalmente, la reducción en la migración y la formación del absceso hepático en los trofozoítos *Ehvps35-KD*, se relacionó directamente con la desestructuración del citoesqueleto de actina observada en estos trofozoítos. Aunque también puede deberse a una afectación en la función convergente del retrómero y la maquinaria ESCRT. En humanos, HsVps35, TSG101 y CHMP4 (homólogos de EhVps35, EhVps23 y EhVps32) afectan la capacidad de proliferación, migración y secreción en células cancerosas (Zhang et al., 2018; Liu et al., 2020; Tan et al., 2022). Debido a que, la metástasis en células cancerosas es similar al proceso de infección de *E. histolytica*, donde los trofozoítos pueden migrar del intestino a otro órgano (Orozco et al., 1994; Leroy et al., 1995), en este parásito, la disminución en su virulencia en trofozoítos *Ehvps35-KD* se relacionó con las afectaciones en la localización de las proteínas del complejo ESCRT, EhADH y EhVps23, las cuales afectan la capacidad de migración y formación del absceso hepático (Ocádiz-Ruiz et al., 2016; Galindo et al., 2022).

En suma, los resultados sugieren que EhVps35 participa en múltiples procesos de virulencia en *E. histolytica*, no solo reciclando proteínas hacia la membrana plasmática, ya que es necesaria para la estructuración del citoesqueleto de actina y el funcionamiento de la maquinaria ESCRT (Figura 60).

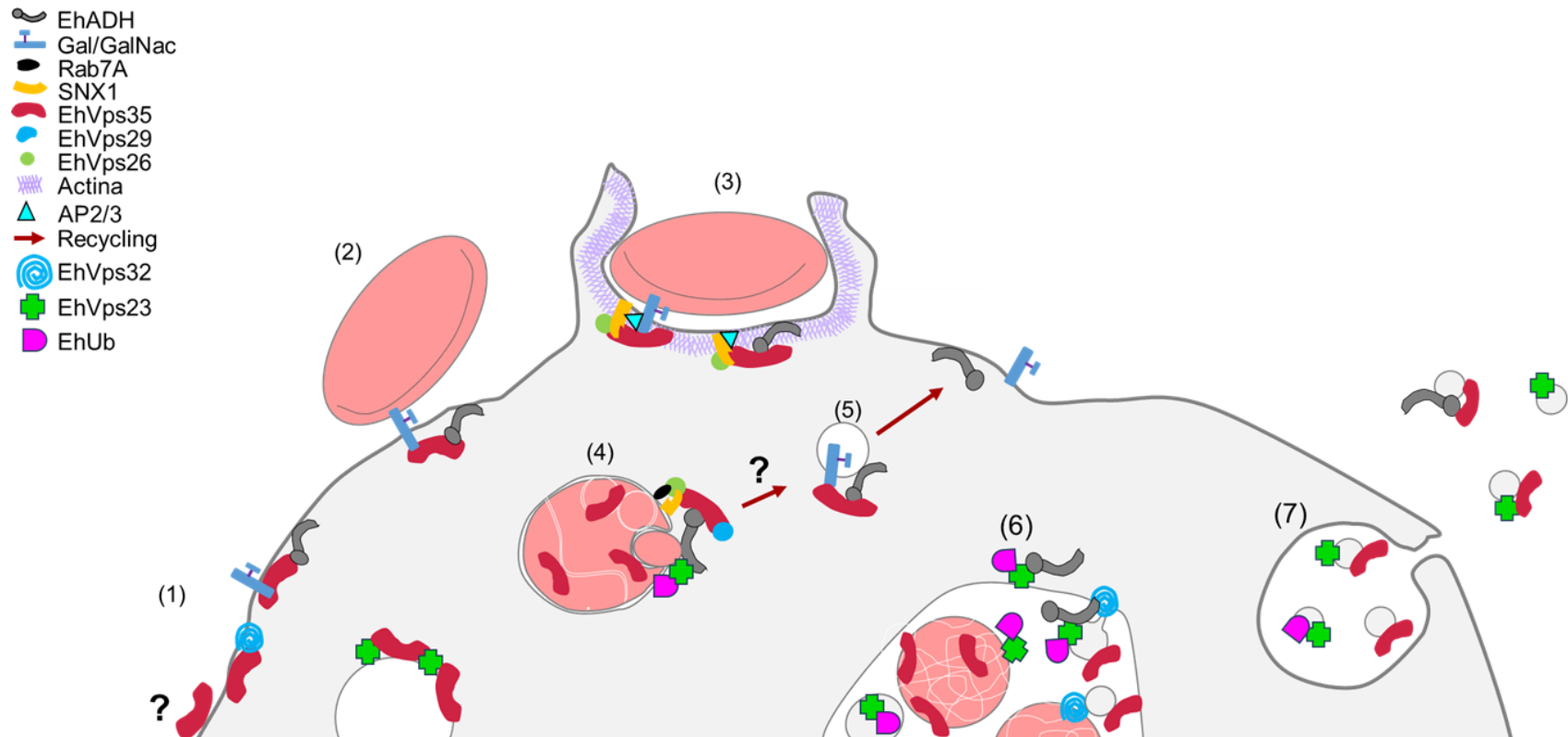


Figura 60. Modelo de la participación de EhVps35 en *E. histolytica*.

Localización de EhVps35 junto con otras proteínas del complejo ESCRT (EhVps23, EhVps32, EhADH) y la lectina Gal/GalNac durante la fagocitosis. 1) Ubicación de EhVps35 en condiciones basales co-localizando hacia la membrana plasmática con EhVps32, Gal/GalNac y EhADH. 2) Adhesión de eritrocitos al trofozoito de *E. histolytica*. 3) Formación de copa fagocítica con la presencia de EhVps35, EhADH, Gal/GalNac, F-actina, SNX1 y AP2/3. 4) EhVps35 se localiza en fagosomas junto con Rab7A, SNX1, EhVps26, EhVps29, EhADH, EhVps23 y EhUb. 5) Vesícula de reciclaje con EhADH y Gal/GalNac en dirección a la membrana plasmática. 6) Localización de EhVps35 en un MVB donde se esquematiza la formación de ILVs por acción del reclutamiento de EhVps23, que a su vez se une a EhADH y EhVps32 que inicia la polimerización de complejo ESCRT-III. 7) Expulsión de las ILVs con EhVps35.

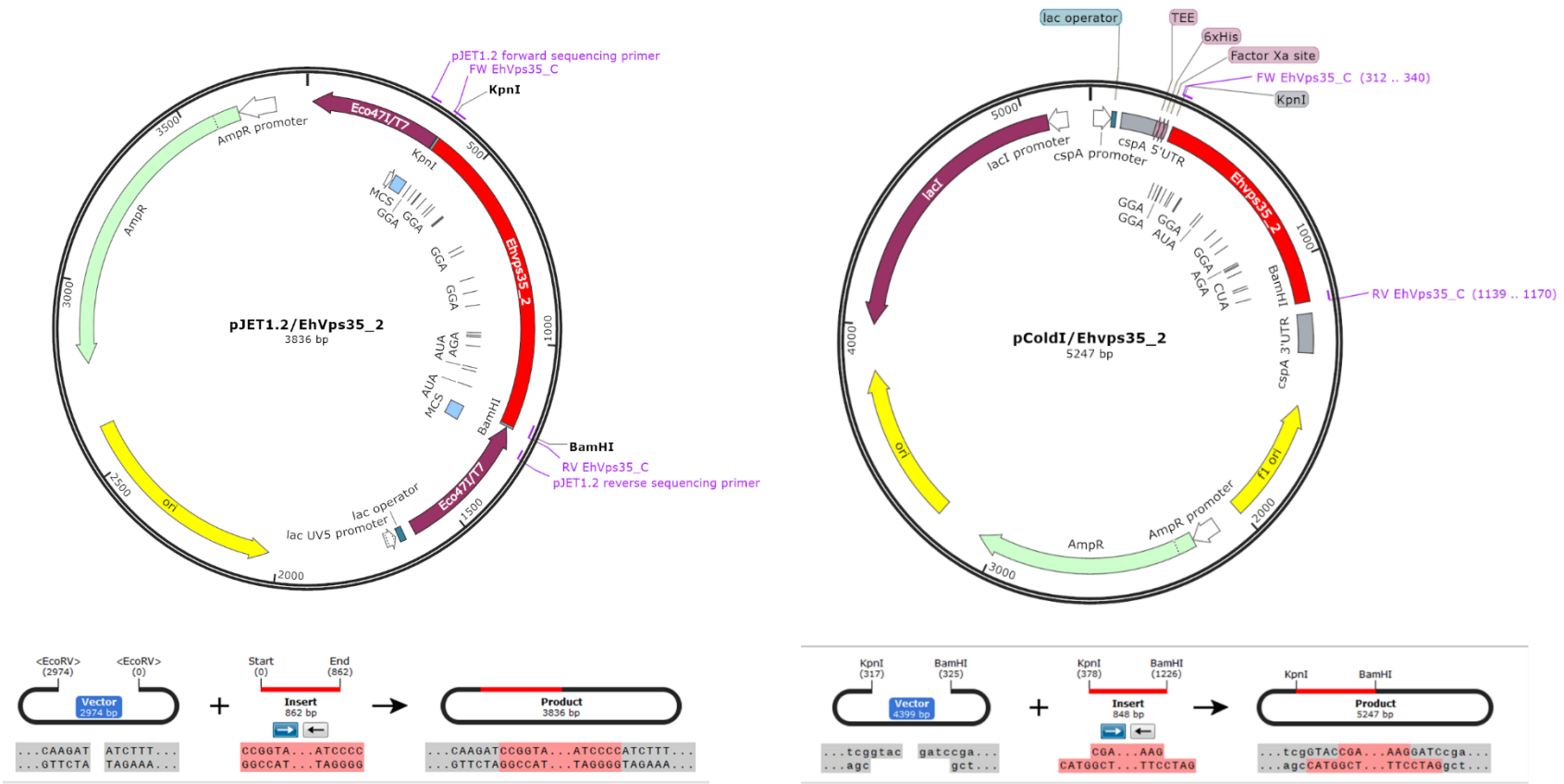
9. CONCLUSIONES

- EhVps35 participa en el reciclaje de proteínas hacia la membrana plasmática.
- EhVps35 recicla a EhADH y Gal/GalNac hacia la membrana plasmática.
- EhVps35 se localiza en MVBs, junto con EhVps23, EhADH y EhVps32.
- EhVps35 se secreta en vesículas extracelulares junto con EhVps23 y EhADH.
- Durante la eritrofagocitosis, se reducen los niveles de EhVps35.
- La secreción de EhVps35 tiene un aparente aumento por el estímulo con eritrocitos.
- La localización de EhVps35 se modifica por el estímulo con eritrocitos. EhVps35 en condiciones basales, se localiza dispersa en el citoplasma y en la membrana plasmática. Después del estímulo, EhVps35 se ubicó principalmente hacia las regiones de contacto con el eritrocito, en fagosomas y MVBs.
- La co-localización de EhVps35 con proteínas de la maquinaria ESCRT se modifica durante la fagocitosis. Disminuyó por la fagocitosis en el caso de EhVps23, y aumentó con EhADH y EhVps32.
- EhVps35 interacciona con al menos 172 proteínas, implicadas en la regulación o que conforman el citoesqueleto, así como proteínas que participan en fagocitosis, secreción y motilidad.
- EhVps35 interacciona con representantes del ESCRT-0 (EhTom1), ESCRT-I (EhVps23), ESCRT-III (EhVps32) y una proteína accesoria del ESCRT (EhADH).
- El *knock-down* del gen *Ehvps35* causa la localización aberrante de EhUb y múltiples componentes de la maquinaria ESCRT (EhVps23, EhVps32 y EhADH), así como la disminución en la formación de MVBs.
- EhVps35 es necesaria para la estructuración del citoesqueleto de actina.
- El *knock-down* del gen *Ehvps35* afecta negativamente múltiples mecanismos de virulencia al disminuir la tasa fagocítica, la migración y la formación del absceso hepático.

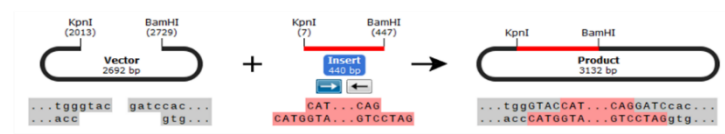
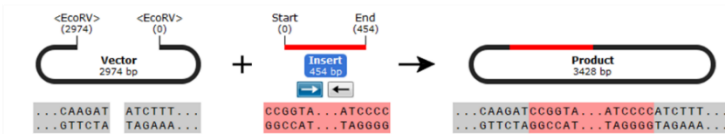
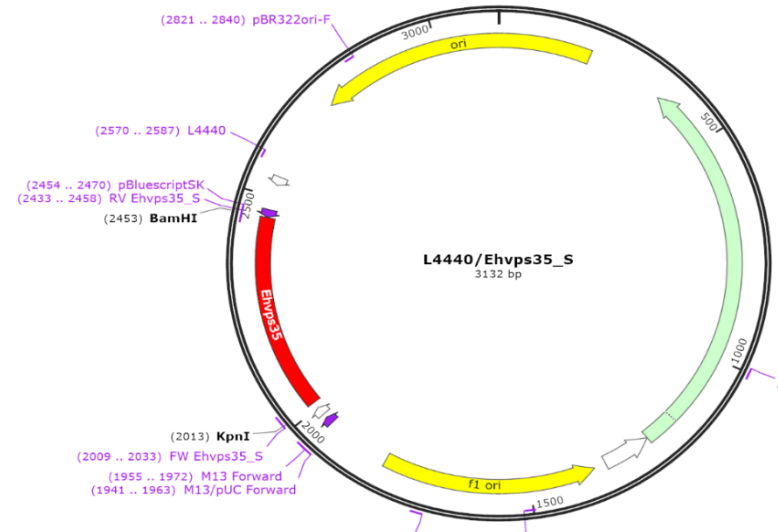
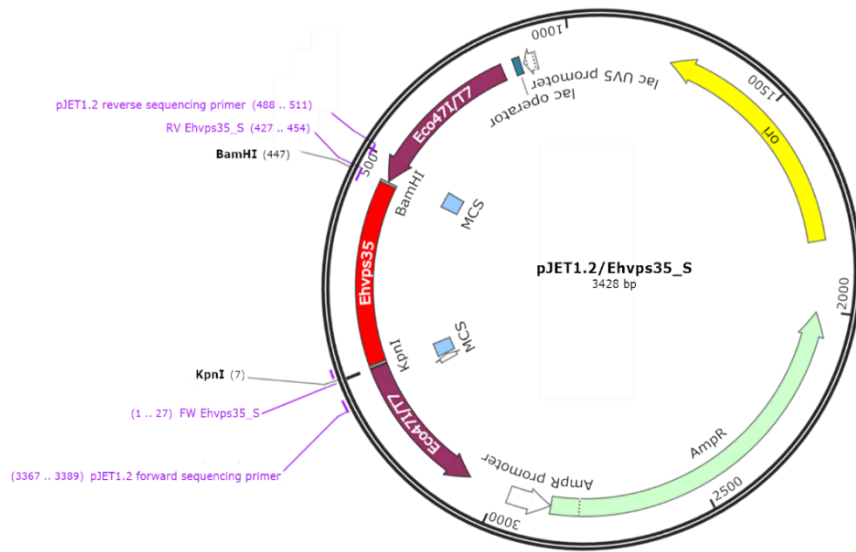
10. PERSPECTIVAS

- Determinar si el *knock-down* del gen *Ehvps35* afecta a otros componentes de la maquinaria ESCRT.
- Estudiar el mecanismo molecular por el que EhVps35 participa en la estructuración del citoesqueleto de actina y el reclutamiento de la maquinaria ESCRT.
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión de EhVps35 en el tamaño de las vesículas extracelulares secretadas, así como su efecto en la carga proteica en estas estructuras.
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión de EhVps35 en la fagocitosis y otros mecanismos de virulencia.
- Estudiar la función de EhVps35 en la membrana plasmática.

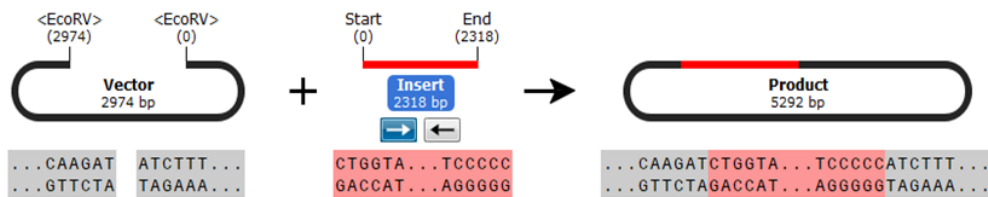
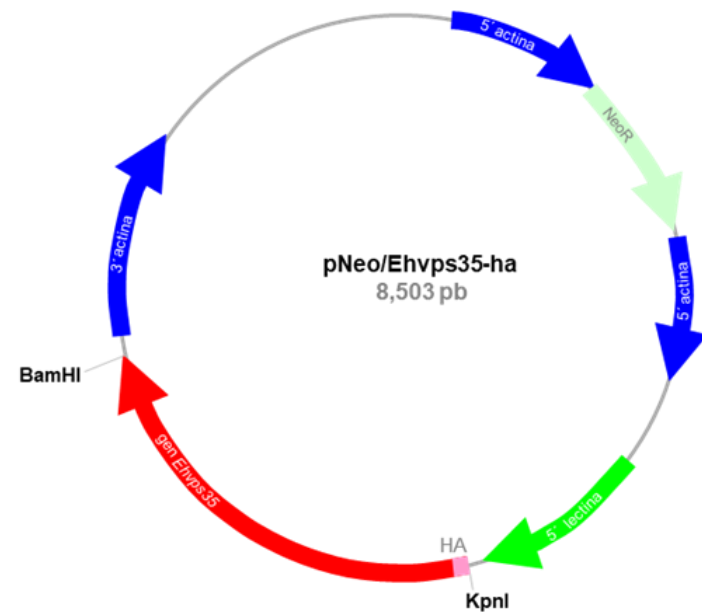
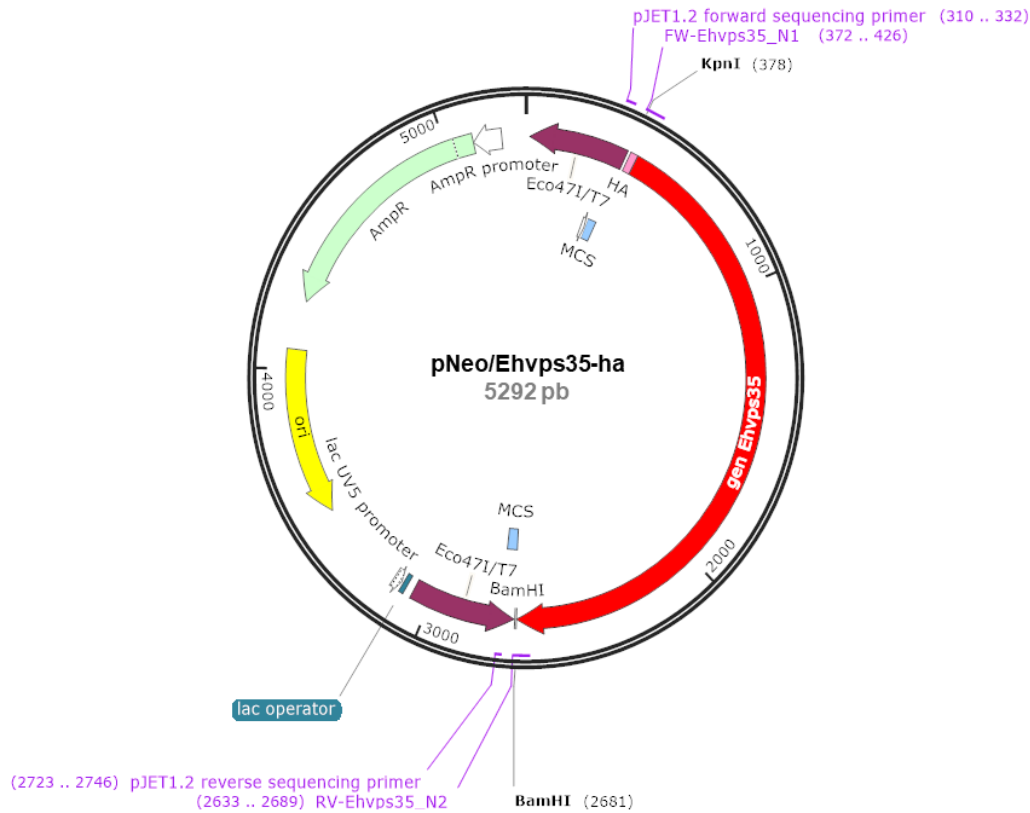
11.2 Mapa de los vectores pJET1.2/Ehvps35_2 y pColdI/Ehvps35_2



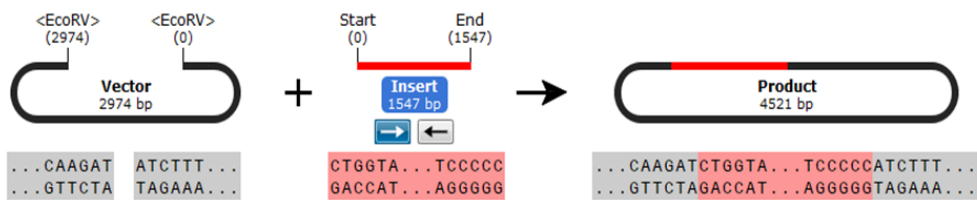
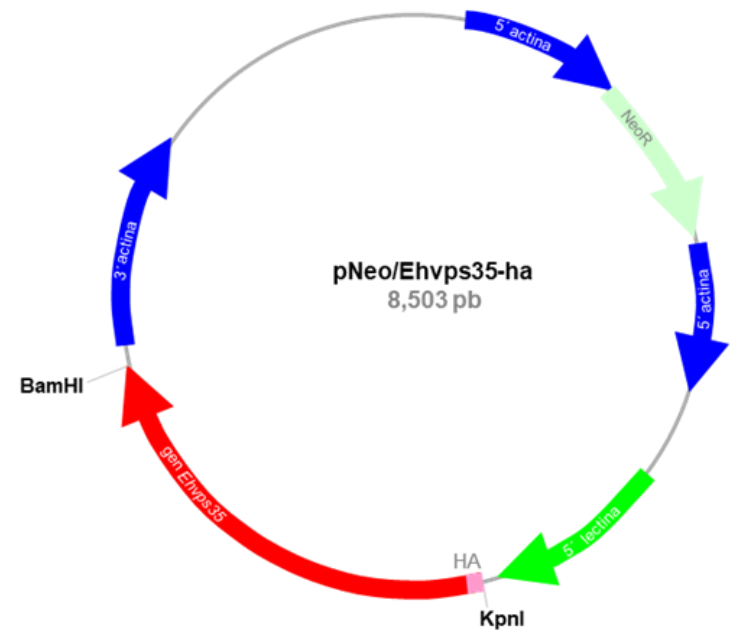
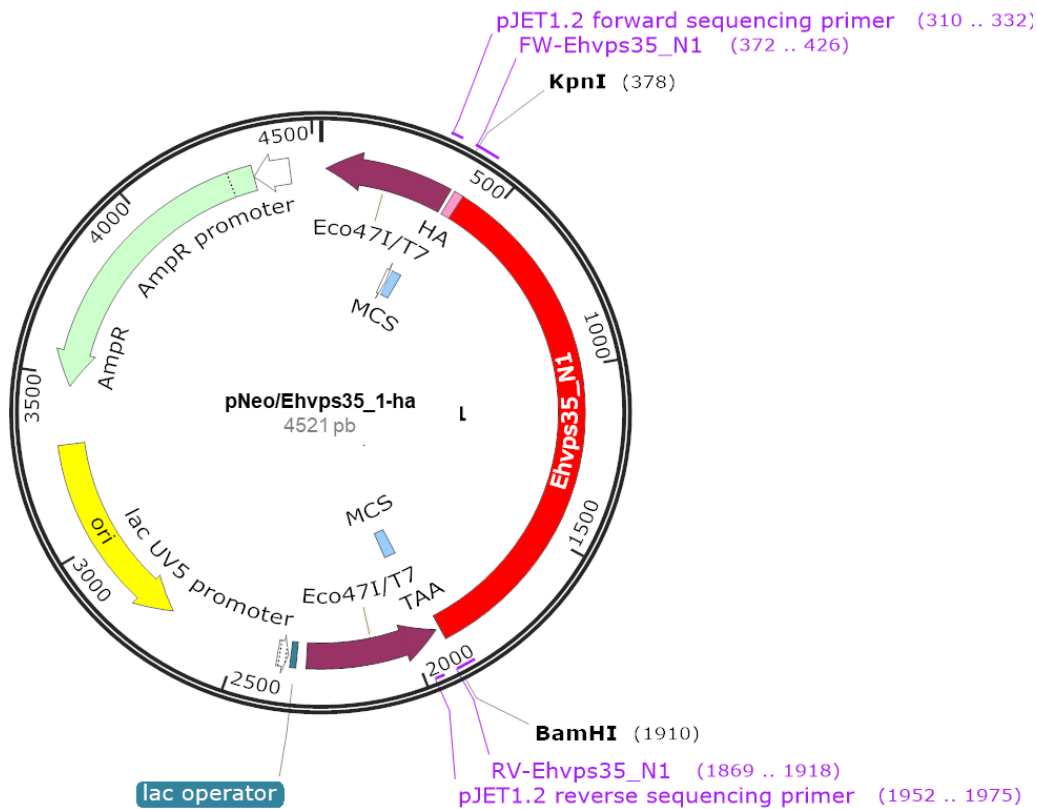
11.3 Mapa de los vectores pJET1.2/Ehvps35_S y pL4440/Ehvps35_S



11.4 Mapa de los vectores *pJET1.2/Ehvps35-ha* y *pNeo/EhVps35-ha*



11.5 Mapa de los vectores *pJET1.2/Ehvps35_1-ha* y *pNeo/EhVps35_1-ha*



11.6 Proteínas que interaccionan con EhVps35

Tabla 6. Proteínas que interaccionan con EhVps35 agrupadas por asociación a la fagocitosis*, secreción **, motilidad* y citoesqueleto de actina****.**

Núm. de acceso	Proteína	Función
EHI_186480	Factor 5A de iniciación de la traducción en eucariontes	Fagocitosis
EHI_009240	Tyrosine-tRNA ligase	Secreción
EHI_092640	Seryl-tRNA synthetase	Secreción y fagocitosis
EHI_175050	Aspartyl-tRNA synthetase	Secreción y fagocitosis
EHI_126920	AsparaginyI-tRNA synthetase	Secreción
EHI_007330	Subunidad β -hexosaminidase	Motilidad y fagocitosis
EHI_093900	DEAD/DEAH box helicasa	Secreción, motilidad y fagocitosis
EHI_011210 EHI_052400	Factor de elongación-1 α	Secreción y fagocitosis
EHI_047810	Lisina-ligasa de tRNA	Secreción y fagocitosis
EHI_005150	Proteína con el dominio TNase-like	Secreción
EHI_101240	Proteína con dominio de Nucleasa	Secreción
EHI_012360	Proteína ribosomal S14	Secreción
EHI_148820	Proteína ribosomal S24	Secreción
EHI_020300	Proteína ribosomal L15	Fagocitosis
EHI_127330	Proteína ribosomal L17	Secreción
EHI_035600	Proteína ribosomal L18a	Secreción
EHI_148850	Proteína ribosomal acida P0 60S	Secreción
EHI_068660	Proteína ribosomal 60S L5	Secreción
EHI_103310	Proteína ribosomal 60S L7a	Secreción
EHI_126140	Proteína ribosomal 60S L9	Motilidad
EHI_044810	Proteína ribosomal 60S L10	Fagocitosis
EHI_012480	Proteína ribosomal 60S L10a	Secreción y fagocitosis

EHI_030710	Proteína ribosomal 60S L12	Secreción
EHI_081410	Proteína ribosomal 40S uS2	Secreción, motilidad y fagocitosis
EHI_020280	Proteína ribosomal 40S S2	Secreción
EHI_008210	Proteína ribosomal 40S S3	Secreción
EHI_152080	Proteína ribosomal 40S S4	Secreción
EHI_020280	Proteína ribosomal 40S S6	Secreción
EHI_177470	Proteína ribosomal 40S S9	Secreción
EHI_148320	Proteína ribosomal 40S S10	Secreción
EHI_013890	Proteína ribosomal 40S S16	Secreción
EHI_135060	Proteína ribosomal 40S S17	Fagocitosis
EHI_131190	Proteína ribosomal 40S S25	Secreción
EHI_108610	Rab1A	Secreción, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_067850	Rab2C	Secreción y citoesqueleto
EHI_081330	Rab7B	Motilidad y fagocitosis
EHI_107250	Rab11B	Motilidad y fagocitosis
EHI_153690	RabC1	Motilidad y citoesqueleto
EHI_143650	RabC3	Secreción, motilidad, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_070730	RACC	Motilidad y fagocitosis
EHI_129750	Rho GTPasa	Motilidad, secreción, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_058090	RAP1	Secreción y motilidad
EHI_177520	RabX11	Motilidad, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_040310	RabX31	Motilidad
EHI_198330	Ras GTPasa	Fagocitosis

EHI_147570	Inhibidor del cambio de GDP de Rho	Fagocitosis
EHI_167060	Inhibidor α de la disociación del GDP de Rab	Fagocitosis y citoesqueleto
EHI_043010	V-ATPasa, subunidad A	Secreción y motilidad
EHI_124560	AP2M1	Fagocitosis
EHI_033710	Cisteína proteasa 2 (EhCP2)	Secreción, motilidad y fagocitosis
EHI_168240	Cisteína proteasa 5 (EhCP5)	Secreción y fagocitosis
EHI_164800	Familia 1 de las proteínas de unión a cisteína proteasas (CPBF1)	Secreción
EHI_008470 EHI_062490	EhVps26	Fagocitosis
EHI_002990	EhVps35	Secreción y fagocitosis
EHI_148790	Subunidad ligera de Gal/GalNAc	Secreción y motilidad
EHI_058330	Lectina inhibible por galactosa	Secreción
EHI_011870	Complejo endopeptidasa del proteosoma	Secreción
EHI_177320	Proteína de la subunidad P45 del proteosoma 26s	Secreción
EHI_163650	Proteína de la subunidad alfa del proteosoma	Fagocitosis
EHI_083270	Ubiquitina	Motilidad
EHI_164430	Actinina-like	Fagocitosis y citoesqueleto
EHI_186840	Proteína de unión a actina	Fagocitosis
EHI_152660	ARPC4	Secreción
EHI_164810	AP3D1	Secreción
EHI_045000	ARPC1	Secreción, motilidad y citoesqueleto
EHI_199690	ARPC2	Citoesqueleto
EHI_198930	ARP-3	Secreción y citoesqueleto

EHI_111050	ARP-2	Secreción y citoesqueleto
EHI_110180	Miosina II cadena pesada	Secreción, motilidad y citoesqueleto
EHI_083590	Coronina	Secreción, motilidad, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_010530	α -Tubulina	Secreción y citoesqueleto
EHI_080740	Filopodina	Secreción, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_104560	Cortexillina	Secreción, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_176140	Profilina-1	Secreción, fagocitosis y citoesqueleto
EHI_136150	Proteína de asociada a adenil ciclasa	Secreción y citoesqueleto
EHI_031410	Proteína de unión a GTP	Secreción y fagocitosis
EHI_110280	Proteína con dominios de dedos de zinc LIM	Fagocitosis y citoesqueleto
EHI_104630	Filamina 2	Secreción y motilidad
EHI_187110	Proteína activadora de Rho	Citoesqueleto
EHI-140120	Actina	Citoesqueleto
EHI_126190		
EHI-161200		
EHI_182900		
EHI-146140	α -actinina 1	Fagocitosis y citoesqueleto
EHI_164430		
EHI_189930	Proteínas con dominio C-terminal de unión a F-actina	Fagocitosis y citoesqueleto
EHI_103860		
EHI_004550		
EHI_086690		
EHI_010570		
EHI_187770	Bin1/Ehndophilina	Citoesqueleto

EHI_105330	coronina2/CRN12b	Citoesqueleto
EHI_194520	LimD	Citoesqueleto
EHI_096420	EhLIM-A	Citoesqueleto
EHI_159620	TolA	Citoesqueleto
EHI_052780	TolA-like	Citoesqueleto
EHI_201510	Clatrina cadena pesada	Secreción
EHI_201710		
EHI_201940		
EHI_136160	Calreticulina	Motilidad
EHI_120360	Grainina	Motilidad
EHI_167300	Grainina 1	Motilidad
EHI_167310	Grainina 2	Motilidad
EHI_009530	Piruvato fosfato diquinasa	Secreción y motilidad
EHI_150490	Alcohol dehidrogenasa	Secreción, motilidad y fagocitosis
EHI_166490		
EHI_125950		
EHI_098800	Alcohol dehidrogenasa 3	Secreción
EHI_023110	Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP	Fagocitosis
EHI_014030	Transhidrogenasa NAD(P)(+) translocadora de protones	Secreción y fagocitosis
EHI_098800	Proteína con dominio epimerasa/dehidratasa dependiente de NAD	Secreción
EHI_099700	Deshidrogenasa dependiente de NAD(FAD)	Secreción
EHI_084680	4-alfa-glucanotransferasa	Secreción y motilidad
EHI_197160	Sulfato adenililtransferasa	Motilidad y fagocitosis
EHI_133970	Proteína disulfuro-isomerasa	Secreción, fagocitosis y motilidad
EHI_005150	Proteína con dominio TNase-like	Secreción y fagocitosis
EHI_079300	Ligasa CoA de ácido graso de cadena larga	Secreción y fagocitosis
EHI_188180	Fosfoglicerato quinasa	Secreción y fagocitosis

EHI_030750	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2 tipo PPI	Secreción y fagocitosis
EHI_098290	Fosfotransferasa	Fagocitosis
EHI_050940	Fosfoglicerato mutasa	Fagocitosis
EHI_199660	Proteína de la familia PRA1	Secreción y fagocitosis
EHI_023500	Calmodulina	Secreción y fagocitosis
EHI_047800	No caracterizada	Secreción y fagocitosis
EHI_136440	Dipeptidil-peptidasa	Motilidad y fagocitosis
EHI_130700	Enolasa 1	Secreción y motilidad
EHI_052860 EHI_199590	Hsp70	Secreción y motilidad
EHI_196940 EHI_163480	Hsp90	Motilidad y fagocitosis
EHI_158240	3-cetoacil-CoA sintasa	Motilidad
EHI_076870	Esteroides 5-alfa reductasa	Motilidad
EHI_127030	Peptidasa-CP-C6	Motilidad
EHI_004600	Reductasa de hidroxilamina	Fagocitosis
EHI_007350	Proteína con dominio NECAP PHear	Fagocitosis
EHI_008380	Aminopeptidasa	Fagocitosis
EHI_024230	Cisteína sintasa A	Fagocitosis
EHI_025360	14-3-3 proteína 1	Fagocitosis
EHI_098280	14-3-3 proteína 2	Fagocitosis
EHI_033250	Proteína de unión a poliadenilato	Fagocitosis
EHI_068250	Adenosilhomocisteína	Fagocitosis
EHI_070720	Inositol-3-fosfato sintasa	Fagocitosis
EHI_048740	Nucleósido fosforilasa de purina	Fagocitosis
EHI_039480	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho	Fagocitosis
EHI_042170	Aminoacil-histidina dipeptidasa	Fagocitosis
EHI_080260	Proteína con dominio START	Fagocitosis
EHI_155440	Tioredoxina reductasa	Fagocitosis

EHI_110520	Subunidad β de glutamato sintasa	Fagocitosis
EHI_121780	Proteína de unión a potenciadora 1	Fagocitosis
EHI_125840	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	Fagocitosis
EHI_154450	Proteína con dominio ferredoxin 4Fe-4S	Fagocitosis
EHI_194600	Cofactor sulfatasa de molibdeno	Fagocitosis
EHI_183010	Proteína glicosiltransferasa-dolicil-difosfoligosacárido	Fagocitosis
EHI_198750	Proteína de unión a poliadenilato	Fagocitosis
EHI_130960	Nucleósido fosforilasa de purina	Fagocitosis
EHI_020330	No caracterizada	Fagocitosis
EHI_049620	Proteína fijadora de nitrógeno NifU	Fagocitosis
EHI_054530	Serina carboxipeptidasa	Fagocitosis
EHI_073470	Factor 1 de ribosilación de ADP 1	Fagocitosis
EHI_073650	Proteína quinasa activada por mitógeno	Fagocitosis
EHI_035730	No caracterizada	Fagocitosis
EHI_200840	Subunidad alfa del receptor de partículas de reconocimiento de señales (SRP- α)	Fagocitosis
EHI_110720	Proteína PCTP-like	Fagocitosis
EHI_118750	Proteína con dominio ADF-H	Fagocitosis
EHI_134960	Proteína 1S asociada a la quinasa de la fase S	Fagocitosis
EHI_044970	Enzima málica	Secreción
EHI_050550	Subunidad β 2 similar a la proteína de unión del nucleótido guanina	Secreción
EHI_051060	Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa	Secreción
EHI_060740	Proteína con dominio EF-hand de unión a calcio	Secreción
EHI_069560	Proteína con dominio MRH	Secreción

EHI_096830 EHI_138380	Glucógeno fosforilasa	Secreción
EHI_098360	Enzima desramificante del glucógeno	Secreción
EHI_098570	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	Secreción
EHI_110120	Fosfoglucomutasa	Secreción
EHI_118840	Metiltransferasa de histona-glutamina	Secreción
EHI_152340	Cinasa de etanolamina	Secreción
EHI_160980	No caracterizada	Secreción
EHI_165350	Malato dehidrogenasa	Secreción
EHI_166920	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 tipo PPI	Secreción
EHI_176970	Proteína Cdc48-like	Secreción
EHI_177990	Proteína con repeticiones ricas en leucina	Secreción
EHI_178960	Acetil-CoA sintetasa	Secreción
EHI_187020	Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa	Secreción
EHI_197480	Actoforina	Secreción
Otras		
EHI_012580	Proteína asociada a proteínas Vps	Tráfico vesicular
EHI_056100	Rab11D	Tráfico vesicular
EHI_026420	Rab5	Tráfico vesicular
EHI_164900	RabD2	Tráfico vesicular

* Okada & Nozaki, 2006; Watanabe et al., 2023

**Sharma et al., 2020

*** Markiewicz et al., 2011

****Manich et al., 2018; Rath & Gourinath, 2020

12. PUBLICACIONES



OPEN ACCESS

EDITED BY
Abhishek Jamwal,
University of Oxford, United Kingdom

REVIEWED BY
Tahir Hussain,
Iowa State University, United States
Pragyan Parimita Rath,
Jawaharlal Nehru University, India

*CORRESPONDENCE
Esther Orozco
✉ esther@cinvestav.mx

RECEIVED 15 December 2023
ACCEPTED 01 March 2024
PUBLISHED 26 March 2024

CITATION
Díaz-Valdez J, Javier-Reyna R, Montaño S,
Talamás-Lara D and Orozco E (2024)
EhVps35, a retromer component,
is involved in the recycling of the
EhADH and Gal/GalNac virulent
proteins of *Entamoeba histolytica*.
Front. Parasitol. 3:1356601.
doi: 10.3389/fpara.2024.1356601

COPYRIGHT
© 2024 Díaz-Valdez, Javier-Reyna, Montaño,
Talamás-Lara and Orozco. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

EhVps35, a retromer component, is involved in the recycling of the EhADH and Gal/GalNac virulent proteins of *Entamoeba histolytica*

Joselin Díaz-Valdez¹, Rosario Javier-Reyna¹, Sarita Montaño²,
Daniel Talamás-Lara³ and Esther Orozco^{1*}

¹Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional [CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional (IPN)], Mexico City, Mexico, ²Laboratorio de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, Mexico, ³Unidad de Microscopía Electrónica, Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional [CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional (IPN)], Mexico City, Mexico

The retromer is a highly conserved eukaryotic complex formed by the cargo selective complex (CSC) and the sorting nexin (SNX) dimer subcomplexes. Its function is protein recycling and recovery from the endosomes to conduct the target molecules to the trans-Golgi network or the plasma membrane. The protozoan responsible for human amoebiasis, *Entamoeba histolytica*, exhibits an active membrane movement and voracious phagocytosis, events in which the retromer may be fully involved. In this work, we studied the structure of EhVps35 the central member of the CSC retromeric subcomplex as it binds EhVps26 and EhVps29, the other two CSC members, allowing the position of the retromer in the membranes. We also studied the EhVps35 role in the recycling of virulence proteins, particularly those involved in phagocytosis. Confocal microscopy assays revealed that EhVps35 is located in the plasmatic and endosomal membranes and in the phagocytic cups and channels. In addition, it follows the target cell from the moment it is in contact with the trophozoites. Molecular docking analyses, immunoprecipitation assays, and microscopy studies revealed that EhVps35 interacts with the EhADH, Gal/GalNac lectin, and actin proteins. In addition, experimental evidence indicated that it recycles surface proteins, particularly EhADH and Gal/GalNac proteins, two molecules highly involved in virulence. Knockdown of the *EhVps35* gene induced a decrease in protein recycling, as well as impairments in the efficiency of adhesion and the rate of phagocytosis. The actin cytoskeleton was deeply affected by the *EhVps35* gene knockdown. In summary, our results revealed the participation of *EhVps35* in protein recycling and phagocytosis. Furthermore, altogether, our results demonstrated the concert of finely regulated molecules, including EhVps35, EhADH, Gal/GalNac lectin, and actin, in the phagocytosis of *E. histolytica*.

KEYWORDS

retromer, EhVps35, *Entamoeba histolytica*, EhADH (ALIX family), Gal/GalNac lectin, actin cytoskeleton, phagocytosis, recycling

1 Introduction

The eukaryotic canonical retromer is a cellular structure strongly involved in the endocytic-selecting-recycling pathway. In general, it is composed of five proteins that form two subcomplexes: the cargo selective complex (CSC) shaped by Vps26, Vps29, and Vps35 proteins and the SNX-BAR dimer (Vps5 and Vps17 in yeast) that tubulates the endosomal membrane. However, currently, novel functions for retromer proteins continue to be discovered (Bonifacino and Hurley, 2008; Tomavo et al., 2013; Sangaré et al., 2016; McNally et al., 2017; Gras et al., 2019; Huang et al., 2022). In humans, for example, the decreased retromer function has been implicated in neurodegenerative processes, causing Parkinson's and Alzheimer's disease (Zhang et al., 2018).

The Vps35 protein is considered as the retromer central component because it interacts with the other two CSC retromeric components and with proteins such as Rab7 (Ypt7 in yeast) that stabilizes the structure in the endosomal membrane (Seaman et al., 2009; Liu et al., 2012; Purushothaman et al., 2017). It is known that Vps35 participates in the retrograde transport from the endosome to the plasma membrane or the *trans*-Golgi network (TGN), recognizing the cargo proteins for recycling (Bonifacino and Hurley, 2008; Zhang et al., 2018). Silencing of the *vps35* gene inhibits signaling of the mitogen-activated protein kinase and the growth of melanoma cells (Zhou et al., 2016). Based on these findings, Vps35 has been proposed as a putative target for anticancer drugs (Zhou et al., 2016). Knockout of the *vps35* gene causes ultrastructural and functional alterations in lysosomes, leading to impaired autophagy (Cui et al., 2019). The accumulation of pathogenic proteins due to a dysfunctional Vps35 accounts for other physiological disorders (Wang and Bellen, 2015; Zhang et al., 2018; Cui et al., 2019; Huang et al., 2022).

In protozoa, the retromer complex has been poorly studied, although it is known that it differs from the canonical structure that was first described in yeast and then later in mammals (Koumandou et al., 2011). Future investigations on this cellular complex are necessary to yield additional insights into the mechanisms that could be involved in the virulence processes in protozoa. In *Toxoplasma gondii*, a parasite lacking SNX-BAR proteins, the retromer participates in the formation of rhoptyr and microneme secretory organelles, which are necessary for intracellular invasion (Tomavo et al., 2013; Gras et al., 2019). In *Entamoeba histolytica*, the protozoan responsible for human amoebiasis, the retromer is composed of the EhVps26, EhVps29, EhVps35, and EhSNX1 proteins (Nakada-Tsukui et al., 2005; Watanabe et al., 2020). *E. histolytica* trophozoites incessantly remodel their membrane during movement, phagocytosis, tissue invasion, and vesicular trafficking; thus, it is logical to assume that its non-canonical retromer is functional and probably participates in virulence processes.

In *E. histolytica*, the EhVps26, EhVps29, and EhVps35 proteins have been detected in phagosomes (Marion et al., 2005; Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020). In addition, live and immunofluorescence images showed that

EhSNX1 and EhVps26 were recruited to the trophocytic cups and tunnel-like structures (Watanabe et al., 2020), suggesting a role of the retromer in target cell ingestion. However, further studies are necessary to clarify the mechanisms that make possible or are required to elucidate the role that each retromer member plays in the full complex.

The aim of this work was to investigate the structure of EhVps35 and its functional role in the recycling of EhADH (a protein belonging to the ALIX family) and the Gal/GalNac lectin, which are both involved in target cell adhesion and in the phagocytic process. Our *in silico* analysis revealed that EhVps35 is a *bona fide* ortholog of the Vps35 proteins described in other eukaryotic systems. In addition, our experimental results using a trophozoite population with the *EhVps35* gene knocked down showed that this protein participates in plasma membrane protein recycling. Remarkably, we present here evidence that the EhADH protein and Gal/GalNac lectin are recycled by EhVps35. In addition, we found that this protein has an important role in the actin cytoskeleton structuring, which makes it a fundamental player in phagocytosis.

2 Materials and methods

2.1 *In silico* analysis of EhVps35

Homo sapiens and *Saccharomyces cerevisiae* Vps35 protein sequences (access Q96QK1 and P34110, respectively), retrieved from the UniProt database (<https://www.uniprot.org>), were used as query to search the *E. histolytica* Vps35 proteins (EhVps35) in the AmoebaDB database (<https://amoebadb.org/amoeba/app>). The structural domains of the candidates were identified using the SMART genomics server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and the KEGG server (<https://www.genome.jp/kegg/>). The predicted amino acid sequences of the five *E. histolytica* putative EhVps35 proteins (access C4M8Z4, C4M4G0, A0A8U0WP17, C4LWG4, and C4M3E8) were aligned with the orthologous sequences of *H. sapiens* (access Q96QK1), *S. cerevisiae* (access P34110), *Arabidopsis thaliana* (access Q7X659, F4I0P8, and A8R7K9), *Plasmodium falciparum* (access Q8IIQ6), *T. gondii* (access S7USD8), *Trypanosoma brucei* (access Q38C17), and *Giardia lamblia* (access Q6Y0Y2).

2.2 Plasmid constructs

The complementary DNA (cDNA) was obtained as described (Galindo et al., 2021). The *EhVps35*_{1-1,428 bp} and *EhVps35*_{1-543 bp} DNA fragments were PCR-amplified using cDNA as template and specific primers.

1. For *EhVps35*_{1-1,225 bp}: sense: 5'-CCGGTACCATGAGT CGTCCACAACGAGA-3'; antisense: 5'-GGGGATCCTT TATATCATCTGGTTGATCTTG-3'

2. For *EhVps35*_{1-543 bp}: sense: 5'-CCGGTACCATG AGTCGT CCACAACGAG-3'; antisense: 5'-GGGGATCCTGTGTG GATGTTG AACCGCTC-3'

Underlined sequences correspond to the enzyme restriction sites added to the primers. Fragments were cloned in *pColdI* to produce recombinant proteins tagged with 6× His and in *pL4440* for the silencing experiments. Thus, we generated the *pColdI/EhVps35*_{1-1,225 bp} and *pL4440/EhVps35* plasmids, respectively. The quality of the constructs was verified by restriction enzyme analysis and automatic DNA sequencing.

2.3 Expression of the His-Eh Vps35 recombinant protein

Escherichia coli BL21 (DE3) bacteria were transformed with the *pColdI/EhVps35*_{1-1,225 bp} plasmid to produce the His-tagged EhVps35_{1-476 aa} recombinant protein (rEhVps35). Protein expression was induced by 0.4 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) in Luria-Bertani (LB) medium for 16 h at 16°C. The identity and integrity of the purified rEhVps35 protein were verified by 10% SDS-PAGE and Western blot assays.

2.4 Antibodies

To generate mouse polyclonal antibodies against a specific EhVps35 peptide (N₃₀-ESEIMNAALNNKDLK-C₄₃), male Balb/c mice (from an already existing collection in UPEAL-CINVESTAV) were immunized with 80 μg of the peptide resuspended in TiterMax Gold adjuvant (1:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Thereafter, three more immunizations were performed at 15-day intervals, followed by bleeding to generate the α-EhVps35 antibody. Pre-immune serum was obtained before immunizations.

The other primary antibodies used were as follows: mouse monoclonal α-biotin (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), hamster α-EhADH (Galindo et al., 2022), mouse α-heavy subunit Hgl of Gal/GalNac lectin (kindly given by Dr. William A. Petri Jr., University of Virginia, Charlottesville, VA, USA), mouse α-Hist (Santa Cruz), mouse monoclonal α-human actin (kindly given by Dr. Manuel Hernandez, CINVESTAV IPN, Mexico), and rat α-EhVps23 (Galindo et al., 2021). As secondary antibodies, the following were used: horseradish peroxidase (HRP)-labeled α-hamster, α-rat, and α-mouse immunoglobulin G (IgG) (Zymed, San Francisco, CA, USA) for the Western blot assays and fluorescein isothiocyanate (FITC), Cy5, or the Pacific Blue α-mouse and Alexa 647 α-hamster IgG (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for the immunofluorescence assays.

2.5 *E. histolytica* cultures

E. histolytica trophozoites, strain HM1:IMSS, were asexually grown at 37°C in TYI-S-33 medium (Diamond et al., 1978) and harvested at the logarithmic growth phase. Afterward, the culture

flasks were chilled at 4°C and the trophozoites collected by centrifugation. All experiments reported here were performed at least three times in duplicate.

2.6 Western blot experiments

The trophozoite lysates (35 μg) were electrophoresed in 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with either α-EhVps35 (1:500), α-Hist (1:500), α-actin (1:3,000), α-Hgl Gal/GalNac lectin (1:100), α-EhADH (1:500), or α-EhVps23 (1:500) antibodies. The membranes were washed, incubated with the respective HRP-labeled secondary antibodies (1:1,000; Sigma), and revealed using the ECL Prime detection reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7 Laser confocal microscopy assays

Trophozoites were grown on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde at 37°C for 1 h, permeabilized (or not) with 0.2% Triton X-100, and blocked with 10% fetal bovine serum in phosphate-buffered saline (PBS). The preparations were incubated at 4°C overnight (ON) with the primary antibodies (1:50). For some experiments, α-EhVps35 labeled with a FITC fluorochrome kit (Molecular Probes/Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) was also used. The preparations were incubated with the corresponding secondary antibodies for 30 min at 37°C: FITC-labeled α-mouse IgG for α-EhVps35, Cy5-labeled α-mouse IgG for α-biotin, Pacific Blue-labeled α-mouse IgG for α-Hgl Gal/GalNac, and Alexa Fluor 647-labeled α-hamster IgG for α-EhADH. The nuclei were labeled with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min at room temperature (RT), and F-actin was detected by incubation with rhodamine phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 20 min at 37°C. All preparations were preserved using a VECTASHIELD antifade reagent (Vector, Newark, CA, USA). Subsequently, 0.5-μm laser sections were obtained and examined through a Carl Zeiss LMS 700 confocal microscope and then processed with ZEN 2009 Light Edition software (Zeiss, Jena, Germany). To evaluate the colocalization between molecules, Pearson's coefficients were obtained from at least 30 confocal images using ImageJ 1.45v software and the JACoP plug-in.

2.8 Phagocytosis assays

For the phagocytosis assays, the trophozoites were incubated at 37°C for 2, 5, and 30 min with red blood cells (RBCs; 1:25) from an already existing collection. At different times, the trophozoites were prepared for immunofluorescence (García-Rivera et al., 1982) and observed through a laser confocal microscope. Other preparations were stained using the Novikoff technique (Novikoff et al., 1972), and adhered or ingested RBCs were counted through a light microscope (Zeiss Axiolab) in 100 randomly chosen trophozoites. In other experiments (i.e., pulse-chase), the trophozoites were

incubated with RBCs for 2 min at 37°C. Afterward, the cell mixtures were washed with TYI/water (2:1) for 5 min at 37°C to remove the adhered and non-ingested RBCs. Subsequently, the cells were incubated at 37°C for different times (3, 13, 28, 58, or 88 min) and processed for Western blot or immunofluorescence assays.

To visualize the acidic structures, the trophozoites were incubated with LysoTracker™ Blue DND-22 (2 µg/ml; Invitrogen) at 37°C for 2 h and were then prepared for the immunofluorescence assays as described above. In other cases, to inhibit *de novo* protein synthesis, the trophozoites were incubated for 30 min at 37°C with cycloheximide (CHX; 100 µg/ml), washed with PBS, and then used for the experiments after verifying that the viability was greater than 98%, which was evaluated using trypan blue exclusion (0.2%) and examined under a light microscope (Bañuelos et al., 2012).

2.9 Transmission electron microscopy

The trophozoites in basal condition and those incubated for 5 min with RBCs (1:25) at 37°C were prepared for TEM as described (Talamás-Lara et al., 2021). Briefly, the trophozoites were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at RT, washed with PBS, and dehydrated with increasing concentrations of ethanol. After infiltration, the samples were embedded in LR White resin (London Resin Co., London, UK) and polymerized under UV at 4°C for 48 h to obtain thin sections (60 nm), which were mounted on Formvar-coated nickel grids followed by ON incubation at 4°C with the α -EhVps35 antibody (1:50). Thereafter, the samples were incubated ON with the corresponding secondary antibodies (1:50) conjugated to 20-nm gold particles (TED Pella Inc., Redding, CA, USA), contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and observed through a Joel JEM-1011 transmission electron microscope.

2.10 dsRNA-based *Ehvps35* gene silencing

The knockdown (KD) of the *Ehvps35* gene was performed using the bacterial expressed double-stranded RNA (dsRNA) that was soaked with the trophozoites as described (Solis et al., 2009). Briefly, HT115 bacteria were transformed with *pLA440/Ehvps35* and grown at 37°C in LB broth in the presence of ampicillin (100 mg/ml) and tetracycline (10 mg/ml) (Takiff et al., 1989). The expression of *Ehvps35* dsRNA was induced by 1 mM IPTG overnight at 37°C. The dsRNA was then isolated from bacteria using a TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. DNase I (Invitrogen) and RNase A (Ambion, Austin, TX, USA) were added to remove the single-stranded RNA (ssRNA) and double-stranded DNA (dsDNA) molecules. The *Ehvps35* dsRNA was washed with isopropanol and ethanol, analyzed using agarose gel electrophoresis, and its concentration determined by spectrophotometry. Finally, the trophozoites (3×10^4) in the TYI-S-33 medium were incubated with purified *Ehvps35* dsRNA molecules to a final concentration of 5 µg/ml and the cultures left for 48 h at 37°C, the time at which we previously determined was

the silencing effect. Cells growing under standard conditions (without dsRNA) were used as the control.

2.11 Recycling of biotinylated surface proteins

For the recycling assays, we followed the protocol described by Ivaska et al. (2002) and Roberts et al. (2001), with some modifications. The trophozoites were incubated for 1 h at 37°C in serum-free TYI medium and then washed once with cold PBS. The cell surface proteins were labeled with 0.2 mg/ml of EZ-Link™ sulfo-NHS-SS-cleavable biotin (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 4°C for 30 min (Biller et al., 2014). After this time, the trophozoites were washed with cold PBS and incubated in TYI complete medium at 37°C for 15 min to allow internalization of the labeled proteins. To remove labeling from the cell surface proteins, the trophozoites were incubated in 100 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 4°C, washed once with cold PBS, incubated again with TYI complete medium for 20 or 40 min at 37°C, and then observed through a laser confocal microscope.

For analysis of EhADH protein and Gal/GalNac lectin recycling, the protocol described above was followed, omitting the treatment with biotin and DTT and using an incubation step of 40 min at 37°C to follow the recycling of the proteins. Thereafter, the samples were processed to confocal microscopy using the antibodies and labeled secondary antibodies in order to follow the recycling of EhADH and Gal/GalNac. Moreover, for some experiments, the trophozoites were incubated with CHX (100 µg/ml) at 37°C for 30 min. Lastly, the samples were prepared for laser confocal microscopy and Western blot assays.

2.12 Three-dimensional model and molecular dynamics simulation of EhVps35

The three-dimensional (3D) model of EhVps35 was obtained on the I-TASSER server using the *Mus musculus* (PDBID:6VAB: B) and *H. sapiens* (PDB:7BLN:C) Vps35 as templates. The 3D model was refined through 200 ns of molecular dynamics stimulation (MDS) by NAMD2.8 (Phillips et al., 2020) with the force field CHARMM36 to create the topologies of the protein (Huang and Mackerell, 2013). The TIP3 model was applied for the water molecules. The system was solvated using the psfgen plug-in in the VMD program (Humphrey et al., 1996). Thereafter, 64,480 water molecules and 12 sodium ions were added to neutralize the system, which was minimized for 10,000 steps, followed by equilibration under constant temperature and pressure (NPT) conditions for 1 ns with the protein and lipid atoms restrained. Afterward, MDS was run for 200 ns, considering EhVps35 as a soluble protein, without position restraints under periodic boundary conditions (PBCs) and using an NPT ensemble at 310 K and 200 ns of MD simulation. The structures were visualized using the UCSF Chimera software. Once the best EhVps35 model was chosen, 3D structural alignment with the Vps35 from *H. sapiens* (PDB:7BLN:C) was developed to compare both proteins.

2.13 Protein–protein docking analysis

The published 3D predicted and refined structures (Montaño et al., 2017) of EhADH were used for docking experiments, whereas the 3D model of the EhVps35 protein was generated in this work. Snapshots were obtained using clustering analysis of the 200-ns MDS with the Carma software (Koukos and Glykos, 2013). Protein–protein docking was performed employing different conformers with the ClusPro server (Comeau et al., 2004; Kozakov et al., 2013). The conformers with the highest cluster members and the lowest energy were analyzed on the PDBSum server (Laskowski et al., 1997), while 3D model visualization was performed by the VMD program (Humphrey et al., 1996).

2.14 Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation was carried out using trophozoite lysates prepared in the presence of 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, and 100 mM protease inhibitors (i.e., PHMB, IA, NEM, and TLCK), followed by freeze–thawing cycles in liquid nitrogen and vortexing (Avalos-Padilla et al., 2015). In parallel, 200 μ l of the recombinant protein G-agarose (rProtein-G; Invitrogen) was incubated with 100 μ g of the mouse α EhVp35 antibodies or the pre-immune serum for 2 h at 4°C, with gentle stirring. Thereafter, the rProtein-G beads were washed with 0.5% bovine serum albumin (BSA) in PBS, followed by additional washes with PBS for 5 min, under gentle stirring, and centrifuged at $11,600 \times g$ for 2 min. The trophozoite lysates (1 mg) were pre-cleared with 200 μ l of rProtein-G (previously blocked with 2% BSA) and incubated for 2 h at 4°C under gentle stirring. The samples were then centrifuged at $11,600 \times g$ to obtain the supernatant that was added to the rProtein-G previously incubated with antibodies. The preparations were incubated ON at 4°C and the beads recovered by centrifugation. After washes with PBS, 60 μ l of 4 \times sample buffer (40% glycerol, 240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromophenol blue, and 5% β -mercaptoethanol) was added. The samples were boiled for 3 min and centrifuged again at $11,600 \times g$ for 2 min at 4°C. The supernatant (30 μ l) was loaded into 12% SDS-PAGE, subjected to Western blot assays, and revealed using the α -EhVps35, α -EhADH, α -Hgl Gal/GalNac, and α -actin antibodies.

2.15 Mass spectrometry analysis

Approximately 30 μ g of the immunoprecipitated proteins was enzymatically digested according to the protocol reported by Ramirez-Flores et al. (2019). Afterward, the peptides were loaded into the Symmetry C18 Trap V/M precolumn (Waters, Milford, MA, USA), 180 μ m \times 20 mm, 100-Å pore size, and 5- μ m particle size, and desalted using mobile phase A (0.1% formic acid in H₂O) and mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) under the following isocratic gradient: 99.9% mobile phase A and 0.1% mobile phase B at a flow of 5 μ l min⁻¹ for 3 min.

Subsequently, the peptides were loaded and separated on an HSS T3 C18 column (Waters), 75 μ m \times 150 mm, 100-Å pore size, and 1.8- μ m particle size, using a UPLC ACQUITY M-Class (Waters) with the same mobile phases under the following gradient: 0 min with 7% mobile phase B, 121.49 min with 40% mobile phase B, 123–126.46 min with 85% mobile phase B, and 129–130 min of 7% mobile phase B, at a flow of 400 nl min⁻¹ at 45°C. The spectra were acquired with a mass spectrometer using electrospray ionization and ion mobility separation with Synapt G2-Si (Waters) using a data-independent acquisition approach in HDMSE mode (Waters). The generated raw files containing the MS and MS/MS spectra were deconvoluted and compared using the ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 software (Li et al., 2009) against a reversed *E. histolytica* database (downloaded from UniProt). All identifications had a reliability $\geq 95\%$.

2.16 Statistical analysis

The values for all experiments were expressed as the mean and standard error of at least three independent assays carried out in duplicate. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism v5.01 software using paired Student's *t*-test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001).

2.17 Ethics statement

CINVESTAV fulfills the standard of the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999), “Technical Specifications for the Care and Use of Laboratory Animals,” based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (“The Guide,” 2011, NRC, USA, with Federal Register no. BOO.02.03.02.01.908) awarded by the National Service for Agrifood Health, Safety and Quality (SENASICA). This organization verifies the state of compliance of such NOM in Mexico and is under the Ministry of Agriculture and Rural Development. The Institutional Committee for Animal Care and Use (IACUC/Ethics Committee) from CINVESTAV, the regulatory office for research protocol approval involving the use of laboratory animals, reviewed and approved all animal experiments (protocol no. 0505-12, CICUAL 001).

3 Results

3.1 *E. histolytica* presents a non-canonical retromer

The canonical retromer in yeast and mammals is formed by Vps26, Vps29, Vps35, and SNX dimer (Vps5 and Vps17 in yeast and SNX1, SNX2, SNX5, and SNX6 in mammals). In contrast, only the EhVps26, EhVps29, EhVps35, and EhSNX1 proteins have been identified in *E. histolytica* (Nakada-Tsukui et al., 2005; Watanabe et al., 2020). In addition, unlike other SNX orthologs, EhSNX1 presents only the PX and not the BAR domain

(Figure 1A). From what is known so far, EhVps26 is the only retromer protein that binds to EhRab7A (Figure 1A) (Nakada-Tsukui et al., 2005), in contrast to the retromer of other species where Vps35 also interacts with Rab7 on the endosomal membranes (Figure 1A) (Seaman et al., 2009; Liu et al., 2012; Purushothaman et al., 2017).

In the *E. histolytica* genome, five EhVps35 isoforms (A–E) were found, but only two of them (EhVps35A and EhVps35C) were conserved in the complete PRLYL motif (Figure 1B), which allows the binding of Vps26 to Vps35 in yeast and mammalian cells. For this study, EhVps35C was selected as, so far, it is the only *E. histolytica* protein with experimental evidence of direct interaction with EhVps26 and EhVps29 (the other two proteins of the CSC complex) and it is translationally active (Marion et al., 2005; Nakada-Tsukui et al., 2005; Biller et al., 2014; Perdomo et al., 2015). However, the functionality of the other four EhVps35, found in AmoebaDB, cannot be discarded. In fact, there are reports on a functional Vps35 isoform without the complete PRLYL motif in *A. thaliana* (Jaillais et al., 2007; Hashiguchi et al., 2012; Zelazny et al., 2013).

3.2 EhVps35 is localized in the plasma membrane and in cytoplasmic vesicles

To study the cellular location and follow the movement of the EhVps35C (hereinafter EhVps35) protein in the trophozoites, we generated specific antibodies against an EhVps35 peptide (N₃₀-ESEIMNAALNN KDLISK-C₄₅) located at the amino terminal region of the protein and absent in other isoforms (Figures 2A, B). This polypeptide was commercially synthesized and injected into mice to generate antibodies (α-EhVps35). An EhVps35 fragment (1–476 amino acids) was also used to obtain the recombinant EhVps35 polypeptide (rEhVps35), labeled with a histidine tag (His-tag). The rEhVps35 was used to verify the specific recognition of the α-EhVps35 antibody in the Western blot assays. The α-Hist and α-EhVps35 antibodies recognized the same 48-kDa band in the lysates obtained from transformed bacteria (Figure 2C). Similarly, the α-EhVps35 antibody recognized a 71-kDa band in the trophozoite lysates (Figure 2C). The expected molecular weight of the EhVps35 protein, calculated from its amino acid

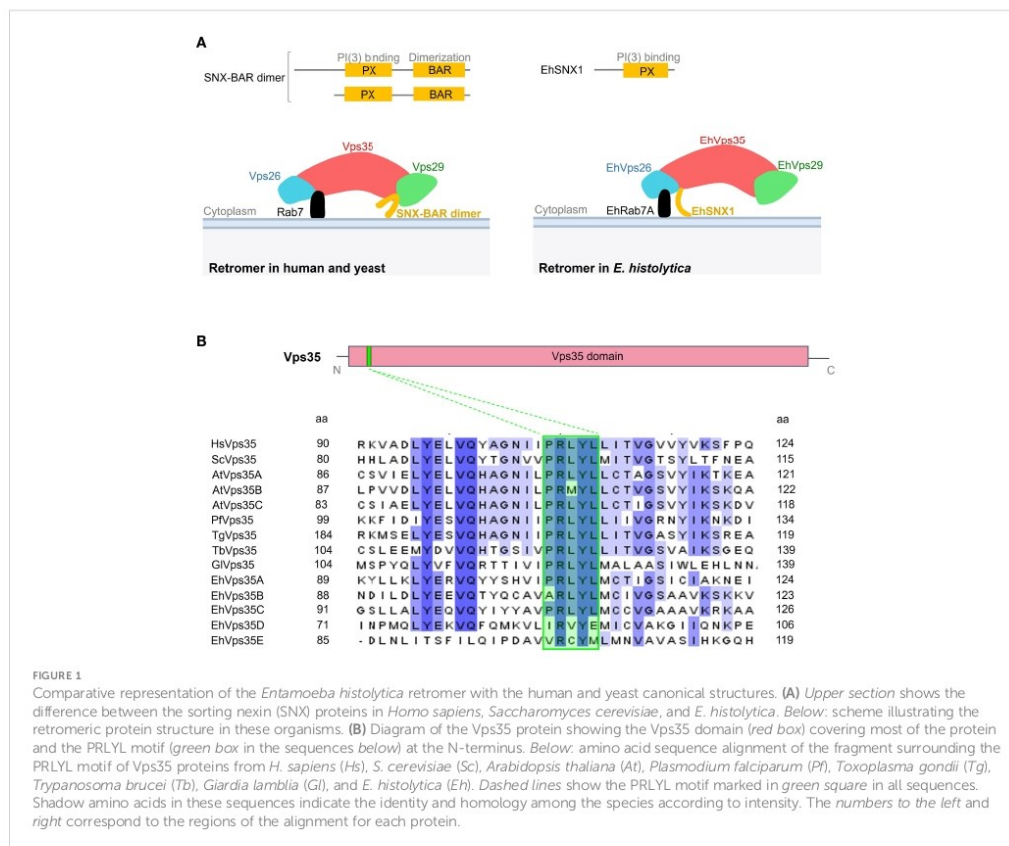
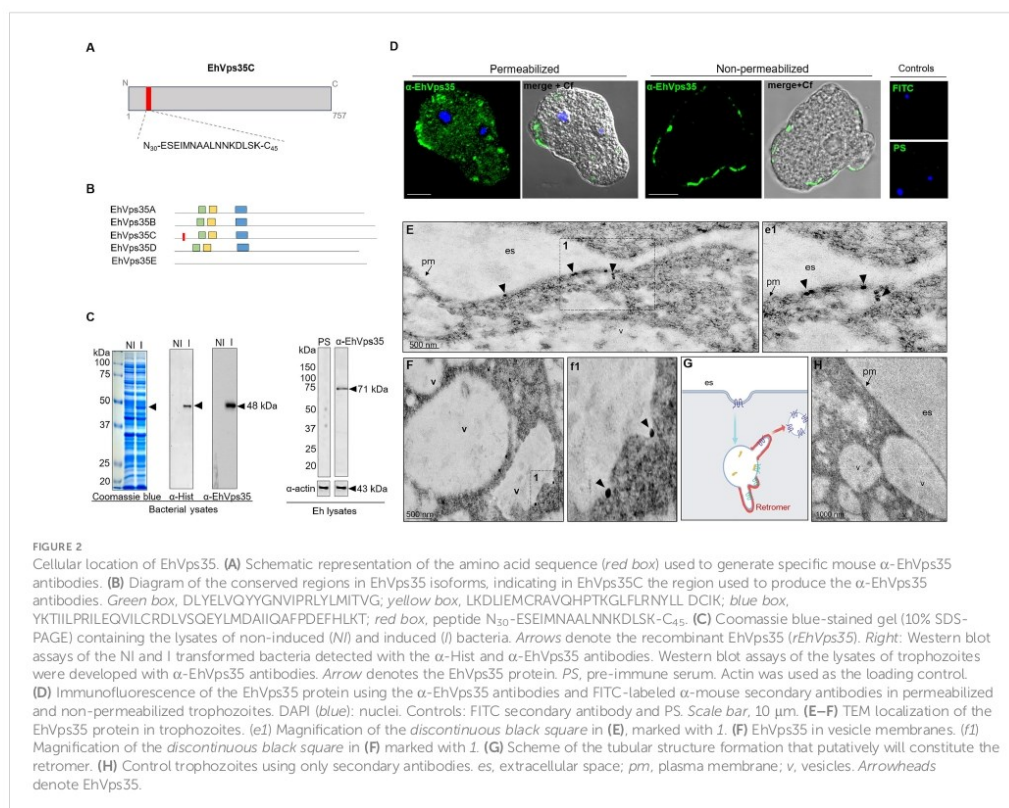


FIGURE 1 Comparative representation of the *Entamoeba histolytica* retromer with the human and yeast canonical structures. (A) Upper section shows the difference between the sorting nexin (SNX) proteins in *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *E. histolytica*. Below: scheme illustrating the retromeric protein structure in these organisms. (B) Diagram of the Vps35 protein showing the Vps35 domain (red box) covering most of the protein and the PRLYL motif (green box in the sequences below) at the N-terminus. Below: amino acid sequence alignment of the fragment surrounding the PRLYL motif of Vps35 proteins from *H. sapiens* (Hs), *S. cerevisiae* (Sc), *Arabidopsis thaliana* (At), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Toxoplasma gondii* (Tg), *Trypanosoma brucei* (Tb), *Giardia lamblia* (Gl), and *E. histolytica* (Eh). Dashed lines show the PRLYL motif marked in green square in all sequences. Shadow amino acids in these sequences indicate the identity and homology among the species according to intensity. The numbers to the left and right correspond to the regions of the alignment for each protein.



sequence, was 87.2 kDa. However, the aberrant migration of EhVps35 was not surprising as this has been widely reported for the Vps35 protein in humans (Haft et al., 2000; Damen et al., 2006; Zhao et al., 2007; Fjorback et al., 2012) and for other EhVps in *E. histolytica* (Avalos-Padilla et al., 2015). The aberrant migration behavior could be explained by the protein structure and charge.

With a confocal microscope, in permeabilized trophozoites, the antibodies were shown to detect the EhVps35 protein in clusters, some of them located in vesicles scattered in the cytoplasm and near the plasma membrane (Figure 2D). Intriguingly, in non-permeabilized trophozoites, the EhVps35 protein appeared in the plasma membrane (Figure 2D), and TEM assays confirmed that it was located on the outer face of the plasma membrane and in vesicle membranes (Figure 2E, e1). Interestingly, EhVps35 was observed in elongated structures, suggesting that membrane remodeling possibly occurred at these points, an event necessary for protein recycling (Figure 2F, f1). The scheme in Figure 2G shows a diagram of the vesicle projections that could be forming the tubular retromer structures described in other systems (Bonifacino and Hurley, 2008; van Weering et al., 2010), and Figure 2H corresponds to the control treated with secondary antibody.

3.3 EhVps35 is involved in phagocytosis

Phagocytosis is one of the landmarks of trophozoite virulence. This function requires high activity in membrane remodeling to form the phagocytic cups and channels, the endosomes, the multivesicular bodies (MVBs), and other vesicles. At the same time, protein recycling is needed in the cell to reuse certain molecules and save energy. Thus, being a complex involved in the selection and recycling of proteins, the retromer may also be involved in phagocytosis.

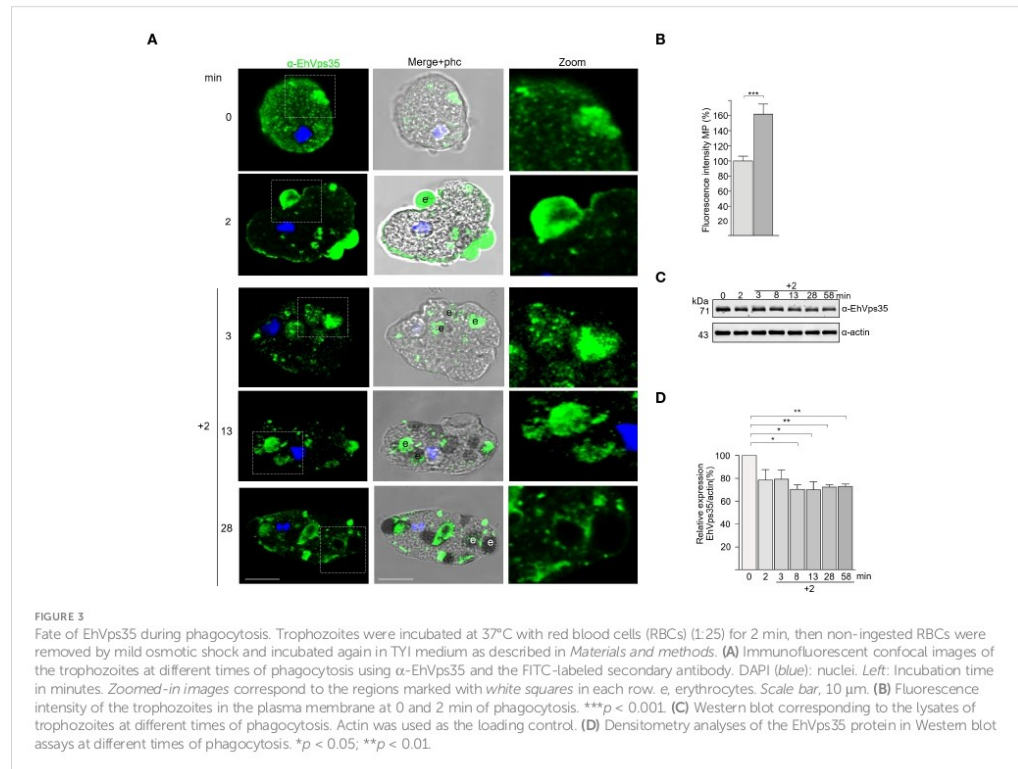
We explored the fate of the EhVps35 protein under the RBC stimulus, tracking the protein with the α -EhVps35 antibodies and the FITC-labeled α -mouse secondary antibodies. Confocal images revealed that after 2 min contact of the trophozoites with RBCs, the EhVps35 protein was translocated at the contact site of both cells and was visualized decorating the adhered RBCs, as has been previously reported for the EhSNX1 and EhVps26 retromeric proteins (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020). EhVps35 was also found in the ingested RBCs, which confirms the high mobility of this protein from the vesicle membranes to the plasma membrane and *vice versa*, suggesting that the retromer acts in concert with other molecules during phagocytosis.

In some experiments, after 2 min of phagocytosis, the adhered and non-ingested RBCs were removed by mild osmotic shock and then incubated again in TYI medium. These pulse-chase experiments were carried out to follow the fate of the already ingested cells, without the noise of other RBCs recently adhered and ingested. In these experiments, at 5 (2 + 3) and 15 (2 + 13) min, the antibodies again detected the EhVps35 protein in cytoplasmic vesicles, as well as on and in ingested erythrocytes. At 30 (2 + 28) min, the protein was located on and around the ingested erythrocytes and in phagosomes (Figure 3A). Our experiments showed that EhVps35, as are other retromeric proteins (Figure 3B) (Nakada-Tsukui et al., 2005, 2009; Watanabe et al., 2020), is located in the vesicle membranes that surround the ingested erythrocytes. Our results also evidenced that EhVps35, as are other proteins involved in phagocytosis (Avalos-Padilla et al., 2015; Galindo et al., 2021), follows the path of the ingested target cell.

Intriguingly, the Western blot assays of the lysates obtained from the trophozoite-RBC mixture revealed that the amount of EhVps35 protein apparently decreased during phagocytosis (Figure 3C). Densitometry analysis confirmed that, after 10 min of phagocytosis, the EhVps35 protein significantly decreased between 20% and 40% with respect to the 0 time (Figure 3D). This condition could be due to

the partial degradation of the cellular amount of this protein during phagocytosis. Actin was used as a control to normalize the data for quantification (Figures 3C, D).

The TEM images, using gold-labeled secondary antibodies, confirmed that, after 5 min of phagocytosis, the EhVps35 protein was located at the contact sites of the trophozoites with RBCs, as observed in confocal images (Figure 4A, a1). Subsequently, EhVps35 was observed in the RBC-containing phagosomes. The gold label appeared mainly in the endosome and phagosomal membranes, where it could have undergone an eventual membrane remodeling, which is necessary for protein recycling (Figures 4B–D, b1–d1, respectively). In TEM assays, the RBC-containing phagosomes presented white intricate arrangements (WIAs) that have been reported in other studies on proteins involved in phagocytosis (Avalos-Padilla et al., 2015; Galindo et al., 2021). These WIAs could partially correspond to the digested hemoglobin that is inside these vesicular structures, which have not been thoroughly described. However, the location of the EhVps35 protein in the WIAs could also suggest that the retromer carried out its function of selecting proteins to recycle them to different cellular compartments (Figure 4E, e1). More experimental evidence is necessary to confirm this hypothesis.



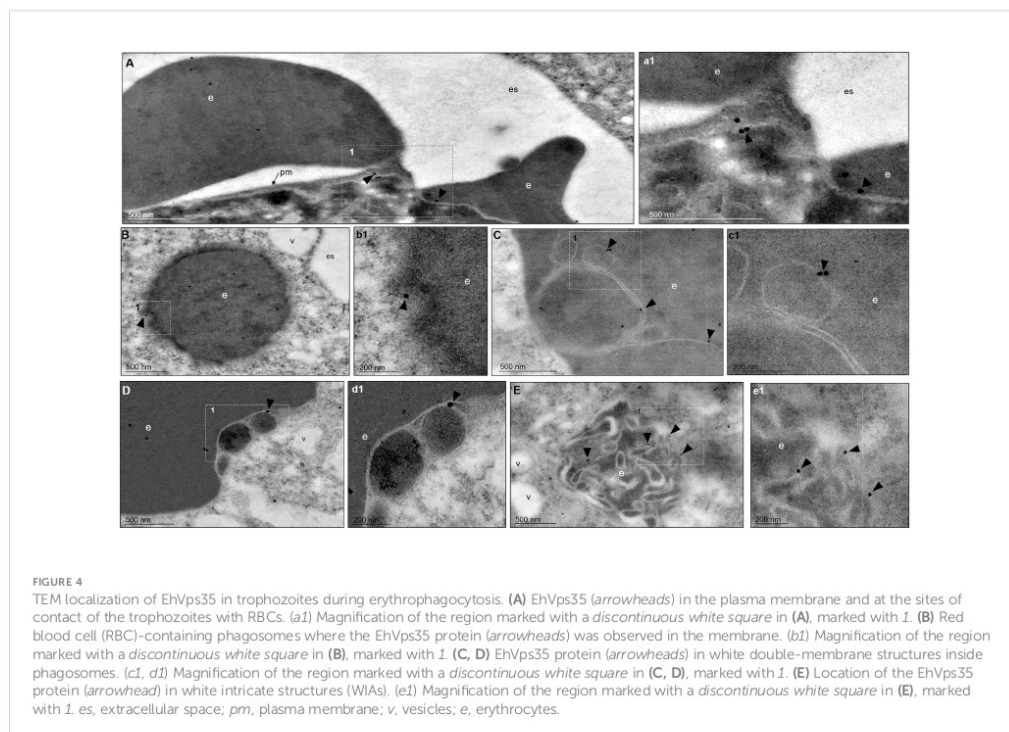


FIGURE 4

TEM localization of EhVps35 in trophozoites during erythrophagocytosis. (A) EhVps35 (arrowheads) in the plasma membrane and at the sites of contact of the trophozoites with RBCs. (a1) Magnification of the region marked with a discontinuous white square in (A), marked with 1. (B) Red blood cell (RBC)-containing phagosomes where the EhVps35 protein (arrowheads) was observed in the membrane. (b1) Magnification of the region marked with a discontinuous white square in (B), marked with 1. (C, D) EhVps35 protein (arrowheads) in white double-membrane structures inside phagosomes. (c1, d1) Magnification of the region marked with a discontinuous white square in (C, D), marked with 1. (E) Location of the EhVps35 protein (arrowhead) in white intricate structures (WIAs). (e1) Magnification of the region marked with a discontinuous white square in (E), marked with 1. es, extracellular space; pm, plasma membrane; v, vesicles; e, erythrocytes.

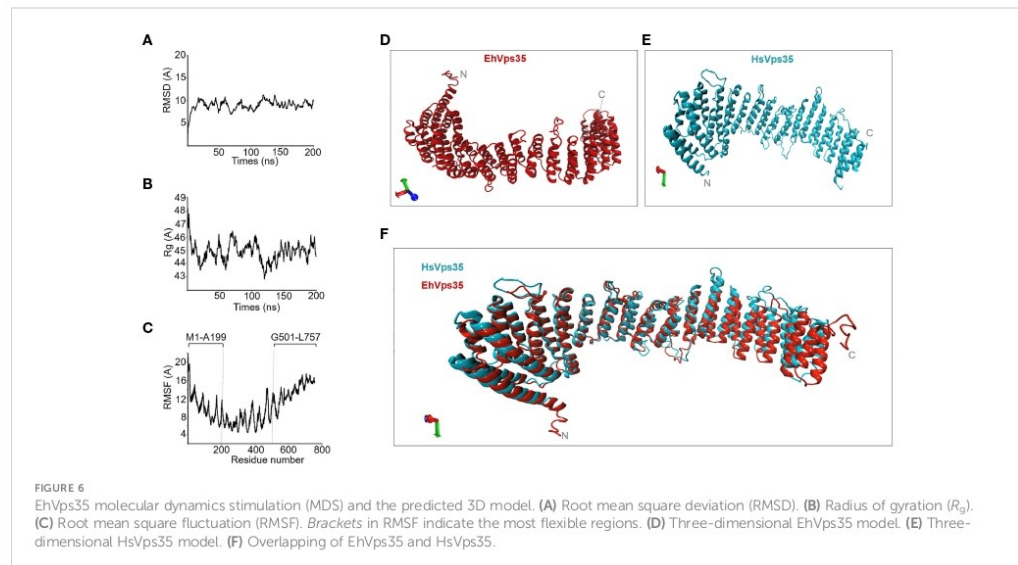
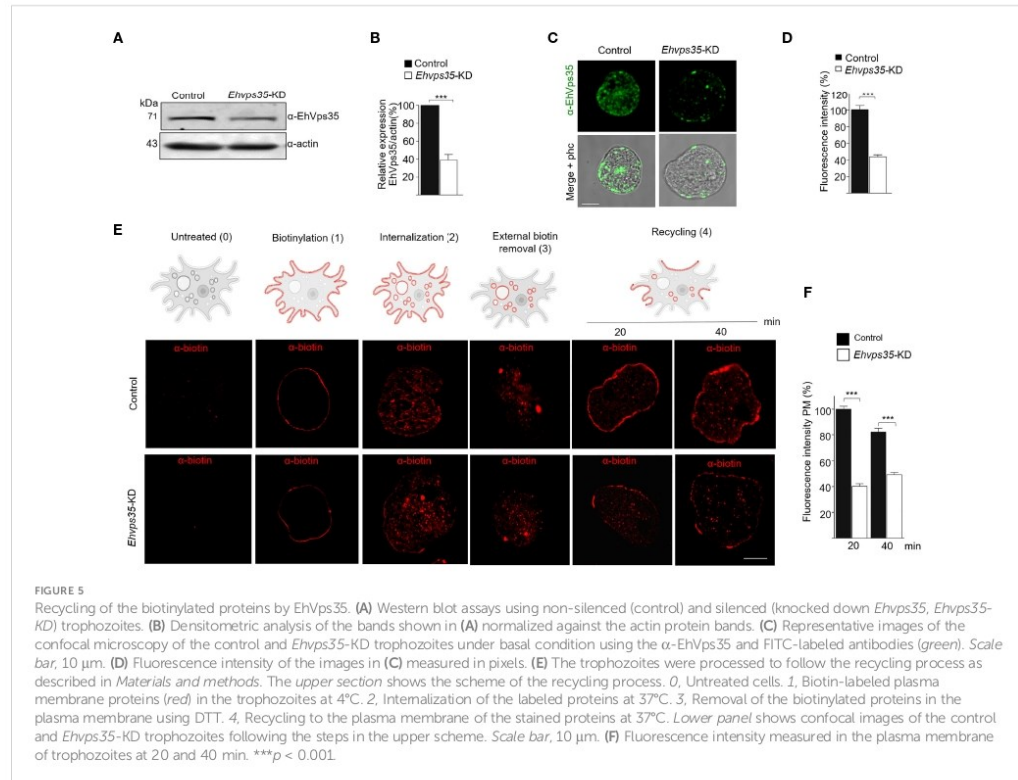
3.4 EhVps35 participates in plasma membrane protein recycling

To experimentally demonstrate that recycling occurred in the trophozoites in this study and that the EhVps35 protein is involved in this function, we knocked down the *EhVps35* gene using dsRNA (Solis et al., 2009). Western blot assays using silenced trophozoites (*EhVps35*-KD) evidenced that they expressed approximately 60% less EhVps35 than the control (Figures 5A, B). The results of the immunofluorescence assays corroborated these findings (Figures 5C, D). Subsequently, we used biotin (S-NHS-SS-Biotin) to label the plasma membrane proteins (Biller et al., 2014). Under a confocal microscope, the biotinylated trophozoites, maintained at 4°C, displayed the plasma membrane proteins uniformly labeled in both the control and *EhVps35*-KD trophozoites (Figure 5E, 1). Thereafter, the trophozoites were incubated for 15 min at 37°C and the label internalized in both cell types (Figure 5E, 2). Interestingly, after 20 min incubation at 37°C, the labeled proteins returned to the plasma membrane in the control trophozoites, but not in the *EhVps35*-KD trophozoites (Figure 5E, 4). The incubation time at 37°C was augmented to 40 min; however, recycling in the *EhVps35*-KD trophozoites remained poor (Figure 5E, 4). After quantification of the fluorescence intensity in the plasma membrane, these assays confirmed that significant recycling reductions of 50% and 60% occurred in the *EhVps35*-KD

trophozoites compared to the control (Figure 5F). These results strongly suggest that the EhVps35 protein, even when located in the plasma membrane, does not participate in the introduction of the target cell, but has a vital role in protein recycling.

3.5 Three-dimensional model of EhVps35

To analyze the interaction of EhVps35 with the other membrane proteins involved in phagocytosis, the complete EhVps35 3D model was used. A previous report showed the 3D design of the EhVps35 carboxy terminus (Srivastava et al., 2017), but not the complete protein. Here, we obtained the full 3D protein structure from the I-TASSER server (Figure 6D). The structural alignment of this model exhibited a root mean square deviation (RMSD) of 1.07 Å with the HsVps35 (PDB:7BLN:C) crystal ortholog (Figure 6F). Analysis of the MDS trajectory measured using RMSD indicated that EhVps35 has an unstable trajectory oscillating ± 3 Å, and it is independent of the simulation time (Figure 6A). The radius of gyration (R_g) data confirmed that EhVps35 is an extended protein that is compacted during the MDS in the first 25 ns, after which is compacted again at 100 ns and expanded after 100–150 ns, remaining unchanged until the end of the simulation (Figure 6B). However, the root mean square fluctuation (RMSF) values showed a high movement of the protein



in the N-terminus region from 1 to 199 amino acids and at the C-terminus from 501 to 757 amino acids (Figure 6C). This analysis showed that EhVps35 has the 3D model described for its orthologs as an α -solenoid protein (Figure 6E) (Hiero et al., 2007; Lucas et al., 2016) containing 33 α -helices (Figure 6D), confirming that EhVps35 is indeed an ortholog of the HsVps35 protein in humans.

3.6 *In silico* EhVps35 binding to EhADH

Once the EhVps35 model was obtained, docking analysis was carried out between EhVps35 and EhADH using the 3D EhADH model already reported (Montaño et al., 2017). The docking results predicted that EhVps35 interacts with EhADH with a global free energy of $\Delta G = -920.6$, given by two salt bridges and 19 hydrogen bonds (Figure 7A). The EhVps35 residues that interacted with EhADH were H271, E312, L315, D316, Q320, R321, N323, S329, and Y233. On the other hand, in EhADH, these were K98, K100, Y445, Y457, R663, Q673, Q674, P675, Y676, G679, T680, and N681. The binding of EhADH to EhVps35 did not interfere with the Bro1 or adhesion domains in the EhADH protein as, except for the K98, K100, and Y457 amino acids that appeared located in these domains, most of the EhADH residues appeared situated at the C-terminus after the adhesion domain.

3.7 Experimental binding of EhVps35 to EhADH, Gal/GalNac lectin, and actin

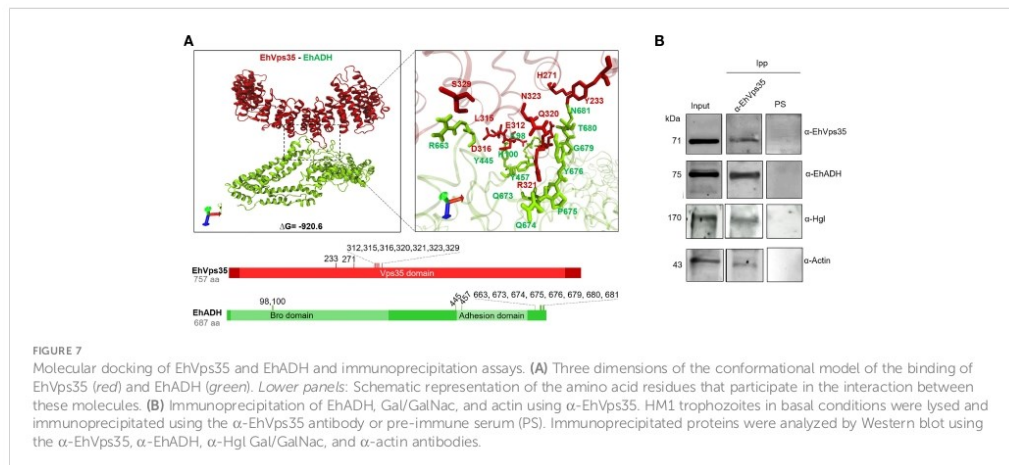
Subsequently, we experimentally examined the EhVps35–EhADH binding with immunoprecipitation assays using the α -EhVps35 antibodies for precipitation and the total trophozoite extracts. The Western blot assays revealed that the α -EhADH antibodies recognized a 75-kDa protein in the immunoprecipitates, corresponding to the EhADH protein migration (Figure 7B). These results strongly suggest the association of EhVps35 with EhADH, a

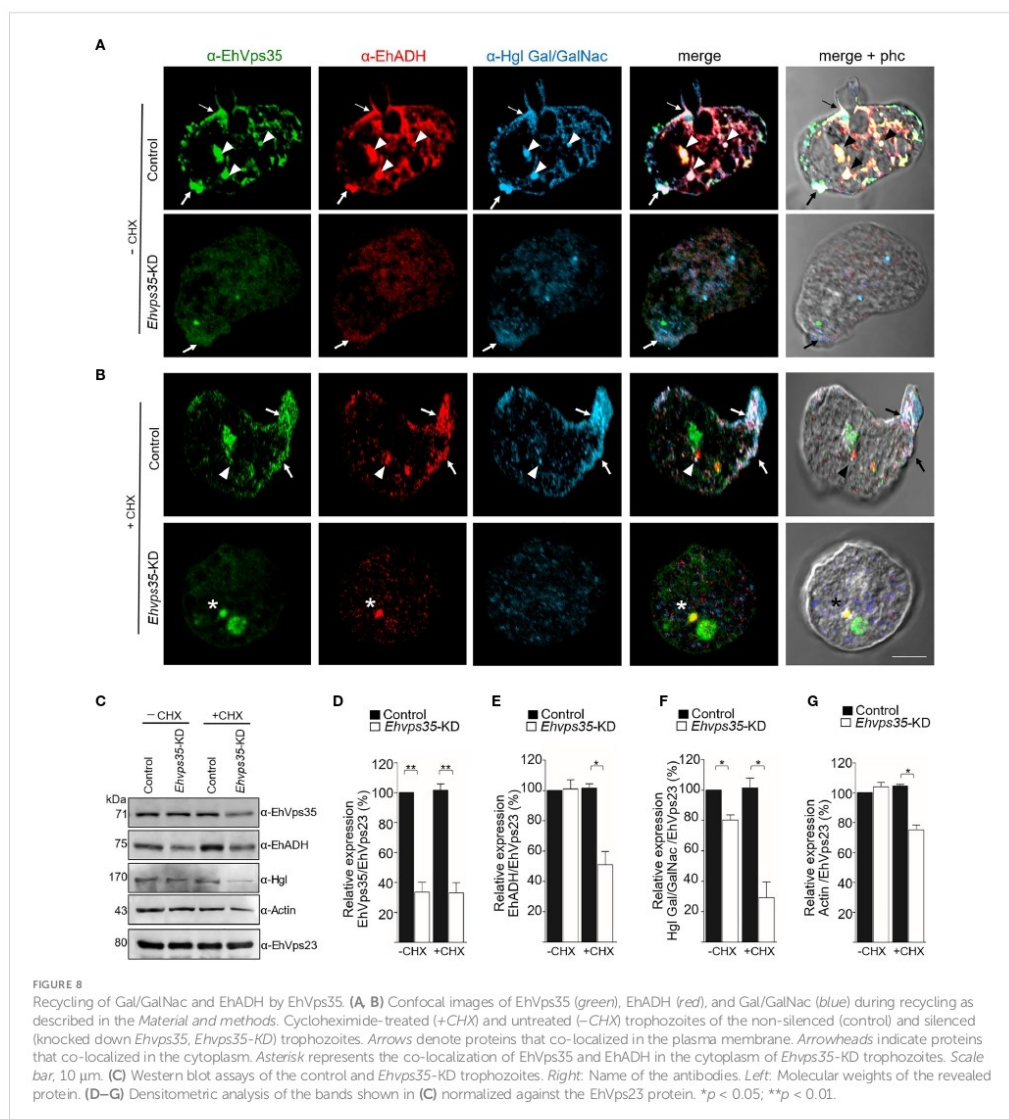
molecule that is actively mobilized during phagocytosis (Arroyo and Orozco, 1987; Garcia-Rivera et al., 1999). Considering the docking analysis, the binding of EhVps35 and EhADH could occur by direct interaction; however, we cannot rule out that an indirect link can also happen.

In these experiments, we searched for the Gal/GalNac lectin, another membrane protein mobilized during virulence events (Petri et al., 2002; Frederick and Petri, 2005), and for actin as, during the retromer function, it binds to EhSNX-1 and EhSNX-1 interacts with the EhVps35 protein (Watanabe et al., 2020). In addition, Gal/GalNac lectin binds to actin and to other cytoskeletal proteins (McCoy and Mann, 2005). The EhVps35, EhADH, Gal/GalNac, and actin proteins appeared in the immunoprecipitates obtained with the α -EhVps35 antibody, strongly suggesting that they bind to each other. The pre-immune serum did not recognize any band (Figure 7B).

3.8 EhVps35 participates in the recycling of the EhADH and Gal/GalNac proteins

Once the association of EhVps35 with EhADH and Gal/GalNac was confirmed, we proceeded to investigate whether the retromer recycles these proteins using the *EhVps35*-KD trophozoites and the respective antibodies against the two proteins. Firstly, under a confocal microscope, the α -EhVps35, α -EhADH, and α -Hgl Gal/GalNac antibodies in the control trophozoites were detected to colocalize in the plasma membrane and in some cytoplasmic regions (Figure 8A), suggesting the formation of EhADH and Gal/GalNac protein complexes associated with EhVps35. In contrast, in the *EhVps35*-KD trophozoites, the fluorescent signals of the three antibodies were poor (Figure 8A). Weak labeling was also observed in dots scattered in the cytoplasm, without visible labels in the plasma membrane. The three antibodies also exhibited very poor co-localization in *EhVps35*-KD trophozoites (Figure 8). These experiments demonstrated that, when the EhVps35 protein is





poorly expressed, the recycling of EhADH and Gal/GalNac lectin is affected, strongly supporting the participation of EhVps35 in this event.

Subsequently, to avoid interference of the proteins that were *de novo* synthesized and then transported to the plasma membrane, we used CHX to stop the protein synthesis and followed only those proteins present in the cell at the beginning of the recycling experiments. In the confocal images of control

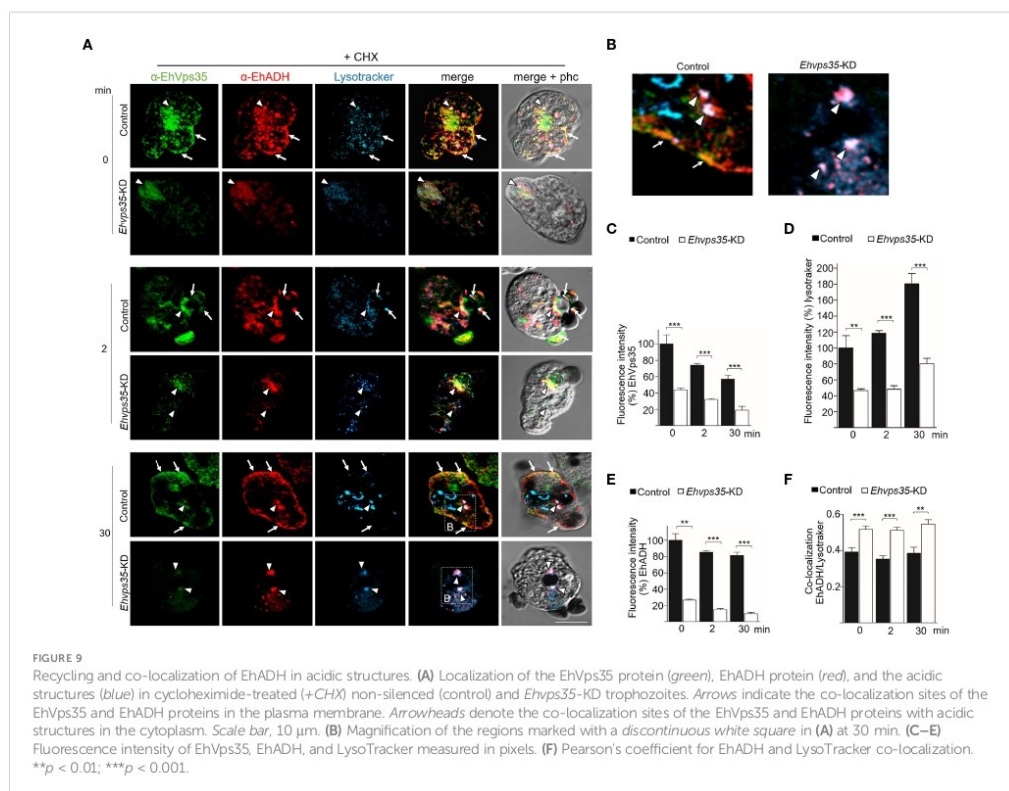
cells, the α -EhVps35, α -Hgl Gal/GalNac, and α -EhADH antibodies were again detected in the plasma membrane (Figure 8B, arrow) and in some dots in the cytoplasm (Figure 8B, arrowhead). The three proteins appeared to mainly co-localize in clusters in the plasma membrane, suggesting that CHX did not affect their interaction, nor the morphology of the trophozoites, as can be observed in the phase-contrast images (Figures 8A, B). Cell viability was neither affected, which was

measured using trypan blue exclusion. In contrast, the *EhVps35*-KD cells showed poor fluorescence labels, and their cellular location was also disturbed due to the proteins remaining scattered in the cytoplasm, but not in the plasma membrane (Figure 8B). Several *EhVps35*-KD trophozoites presented a large cytoplasmic vesicle labeled by antibodies against the remnant EhVps35 and EhADH, and protein co-localization appeared poor and in small cytoplasmic vesicles (Figure 8B). These results confirmed that the recycling of EhADH and Gal/GalNac proteins was affected by the knockdown of the *EhVps35* gene.

To further explore the decrease of the EhADH and Gal/GalNac proteins observed in *EhVps35* knockdown, Western blot assays were performed using the lysates from untreated and CHX-treated trophozoites. In untreated *EhVps35*-KD trophozoites, the Gal/GalNac protein significantly decreased (Figures 8C, D, F), but the EhADH and actin proteins did not show apparent changes (Figures 8C, E, G). In contrast, in CHX-treated *EhVps35*-KD trophozoites, the EhADH, Gal/GalNac, and actin proteins significantly decreased between 20% and 60% with respect to the control trophozoites (Figures 8C–G). The α -EhVps23 antibody was used to normalize the data. These results suggest a possible degradation of EhADH, Gal/GalNac, and actin in the absence of the EhVps35 protein and the treatment with CHX.

3.9 In *EhVps35*-KD trophozoites, the EhADH protein is localized mainly in acidic vesicles

Previous studies have shown that EhADH can be located in acidic vesicles during phagocytosis (Castellanos-Castro et al., 2016), suggesting that a portion of this protein is conducted to degradation and another portion is recycled, as shown here (Figures 8A, B). Thus, LysoTracker was used to investigate whether EhADH appeared in acidic vesicles in the control and the CHX-treated *EhVps35*-KD trophozoites. In basal conditions, the control trophozoites showed that the EhVps35 and EhADH proteins co-localized, but their co-localization with LysoTracker was low. Interestingly, the CHX-treated *EhVps35*-KD trophozoites showed higher co-localization of both proteins with LysoTracker (Figures 9A–F). These results suggest that a greater degradation of both proteins could have occurred in *EhVps35*-KD trophozoites compared to the control. After phagocytosis (2 min), in the control trophozoites, the EhVps35 and EhADH proteins moved to the contact site with RBCs. In contrast, the *EhVps35*-KD trophozoites appeared poorly labeled and the protein co-localization with LysoTracker was also poor (Figures 9A–F). In the control cells, after 30 min of phagocytosis, the EhVps35 and EhADH proteins re-



localized to the plasma membrane and co-localized with LysoTracker in some RBC-containing phagosomes, suggesting that, during phagocytosis, a portion of them were conducted to degradation. In contrast, the CHX-treated *EhVps35*-KD trophozoites presented fewer acidic vesicles, the EhADH protein did not return to the plasma membrane, and EhVps35 and EhADH remained in small points in the cytoplasm, with some of them co-localizing with LysoTracker (Figures 9A, F). Quantitative data of the fluorescence intensity of the EhVps35 and EhADH proteins and the acidic vesicle marker showed a significant reduction (60%–80%) in *EhVps35*-KD trophozoites compared to the control cells (Figures 9B–D). These results strengthened the assumption that EhADH is degraded in the absence of the EhVps35 protein, and these remark the importance of the retromer in phagocytosis, recycling and preserving the proteins participating in these events.

3.10 Actin disruption in *EhVps35*-KD trophozoites

The Western blot assays revealed a decrease of actin in *EhVps35*-KD trophozoites (Figures 8C, D). To explore whether the actin cytoskeleton was affected by the *EhVps35* gene silencing, confocal microscopy assays were performed using CHX-treated trophozoites. In basal conditions, in the control trophozoites, EhVps35 and F-actin again co-localized mainly near the plasma membrane and in cytoplasmic structures, as described (Manich et al., 2018a). In contrast, *EhVps35*-KD trophozoites presented the diminished fluorescence intensity of F-actin and disorganization of the actin cytoskeleton (Figures 10A–C). After 2 min of phagocytosis, the control trophozoites displayed the EhVps35 and

F-actin proteins relocated to the contact site with the RBCs, decorating the phagocytic cups and channels (Figure 10A). However, these structures were not observed in the *EhVps35*-KD trophozoites, suggesting that the silencing of the *EhVps35* gene affected the structuring of the actin cytoskeleton, which is necessary in the formation of phagocytic cups and channels (Figures 10A, B). Quantitative data of the fluorescence intensity of the EhVps35 and F-actin proteins showed a reduction of 40%–70% in *EhVps35*-KD trophozoites compared to the control cells (Figures 10B, C). Co-localization analysis between EhVps35 and F-actin showed an increase in the control trophozoites after 2 min of phagocytosis, while the *EhVps35*-KD trophozoites remained constant. Furthermore, in *EhVps35*-KD trophozoites, the co-localization between EhVps35 and F-actin was significantly lower compared to that in the control trophozoites (Figure 10D). These results suggest that CHX treatment did not affect the structure of the actin cytoskeleton. To obtain more insights on the relationship between the EhVps35 protein and actin cytoskeleton structuring, the immunoprecipitates with α -EhVps35 antibodies were analyzed using mass spectrometry. EhVps35-bound proteins were selected after comparison to previous proteomic analyses of the actin cytoskeleton in *E. histolytica* (Manich et al., 2018; Rath and Gourinath, 2020). The results revealed 33 cytoskeleton-associated proteins, including actin and cytoskeleton modulator proteins (Table 1).

Finally, to examine the importance of the EhVps35 in phagocytosis, for its role in surface protein recycling and the actin cytoskeleton structure required for this event, the adhesion efficiency and the rate of phagocytosis were evaluated using the silenced trophozoites. The results showed a decrease of 50%–63% in the adhesion efficiency and 53%–61% in the rate of phagocytosis in

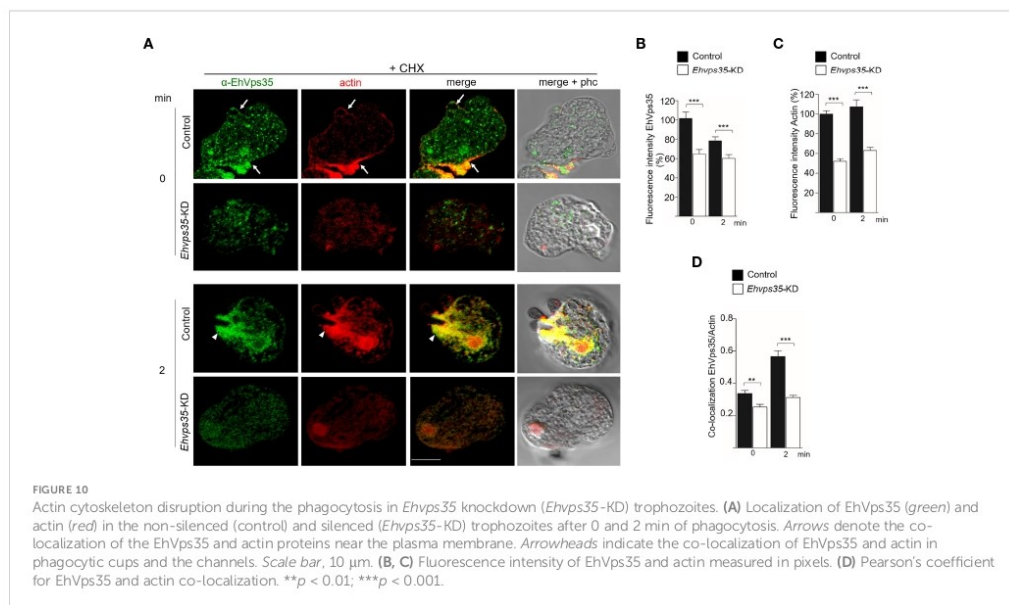


TABLE 1 Proteins associated with EhVps35 and related to the actin cytoskeleton.

Protein	Accession number
Actin	EHL_140120/EHL_126190/ EHL_161200/EHL_182900
Profilin 1	EHL_176140
CAP	EHL_136150/EHL_081430
ARPC2	EHL_199690
ARP2	EHL_111050
ARPC1	EHL_045000
ARP3	EHL_198930
Myosin-II	EHL_110180
Bin1/Endophilin	EHL_187770
Cortaxillin	EHL_083140
Cortaxillin	EHL_104560
Coronin 1/CRN12a	EHL_083590
Coronin 2/CRN12b	EHL_105330
α -actinin1	EHL_146140/EHL_164430
Filopodin	EHL_080740
LimD	EHL_194520
EhLIM-A	EHL_096420
LimC	EHL_110280
Actin-binding Rho-activating protein	EHL_187110
F-actin bundling C-domain	EHL_189930/EHL_103860/EHL_004550/ EHL_086690/EHL_010570
TolA	EHL_159620
TolA-like	EHL_052780
Rab2C	EHL_067850
RabC3	EHL_143650
Rab1A	EHL_108610
RabX11	EHL_177520
RabC1	EHL_153690
Rab GDP dissociation inhibitor	EHL_167060
Rho GTPase	EHL_129750
Ras GTPase	EHL_058090
α -Tubulin	EHL_010530

Trophozoite proteins were immunoprecipitated with α -EhVps35 antibodies. The EhVps35-bound proteins were identified by mass spectrometry. Comparative analysis with previous proteomic analyses of the actin cytoskeleton was performed (Manich et al., 2018; Rath and Gourmath, 2020).

EhVps35-KD trophozoites at 5 and 30 min, respectively, with respect to the results of the control trophozoites, which were taken as 100% (Figures 11A, B). These results strengthened the assumption that the EhVps35 protein is involved in the phagocytosis of trophozoites,

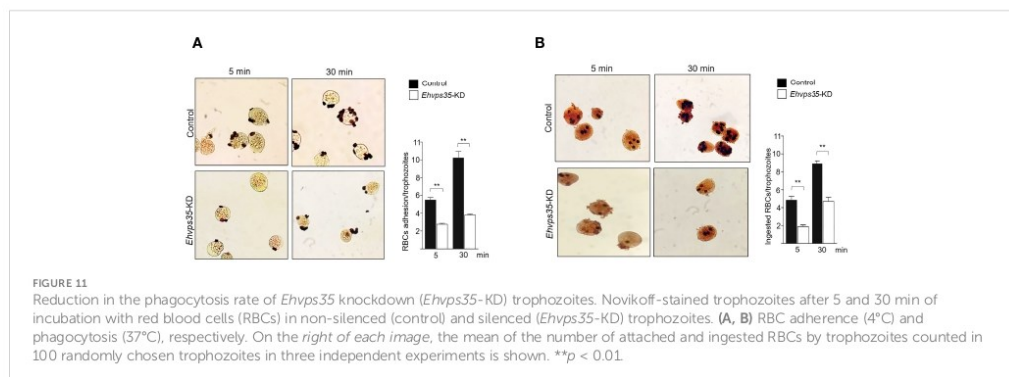
probably due to its active participation in protein recycling and in the structuring of the actin cytoskeleton.

4 Discussion

The retromer has been widely studied in humans due to its involvement in neurodegenerative diseases (Zhang et al., 2018). However, in parasitic protozoan, further research has yet to be conducted to determine whether this protein complex participates in virulence events and, therefore, whether it is a target to defeat parasites. In *T. gondii*, the retromer is crucial for the biogenesis of secretory organelles and to maintain the morphology of parasites; thus, several authors agree in the fact that the retromer indeed participates in *T. gondii* virulence (Sangaré et al., 2016; Gras et al., 2019). In the case of *E. histolytica*, there are reports suggesting that the retromer is involved in phagocytosis, an important virulence mechanism in this parasite (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020). The retromer in these protozoa differs from the canonical one, described in yeast and mammals. The main differences are that, in both protozoa, the SNX-BAR is absent, which suggests that the membrane remodeling mechanisms in these parasites could differ from those of the classical pathway (Figure 1A) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Koumandou et al., 2011; Sangaré et al., 2016; Watanabe et al., 2020). More knowledge is needed on the characteristics and function of each of the elements that construct the protozoan retromer to reveal their participation in cellular functions, particularly in virulence. This knowledge will also help in understanding the evolutionary process that this conserved complex has gone through.

In this paper, we have studied the structure and function of the EhVps35 protein, the core of the CSC complex, as it binds EhVps29 and EhVps26, maintaining the complex and allowing the retromer function. Our work is relevant to the advance of the knowledge of the *E. histolytica* retromer as:

- i. It presented data on the EhVps35 3D model;
- ii. It provided evidence on the interaction of the retromer with the EhADH and Gal/GalNac lectin and actin proteins;
- iii. It provided experimental evidence that the *E. histolytica* retromer carries out surface protein recycling and that EhVps35 is necessary to carry out this function;
- iv. It showed that EhVps35 recycles two highly involved proteins in the host-parasite relationship: the EhADH adhesin (Arroyo and Orozco, 1987; Garcia-Rivera et al., 1999; Bañuelos et al., 2012) and the Gal/GalNac lectin (Frederick and Petri, 2005);
- v. It provided data on the influence of EhVps35 on the structuring of the actin cytoskeleton during phagocytosis, providing further experimental data on phagocytosis being carried out by a concatenated chain of events in which several molecules participate, including EhADH, an accessory protein of the ESCRT machinery; and
- vi. The data presented here strongly support the retromeric proteins also participating in phagocytosis. The knockdown



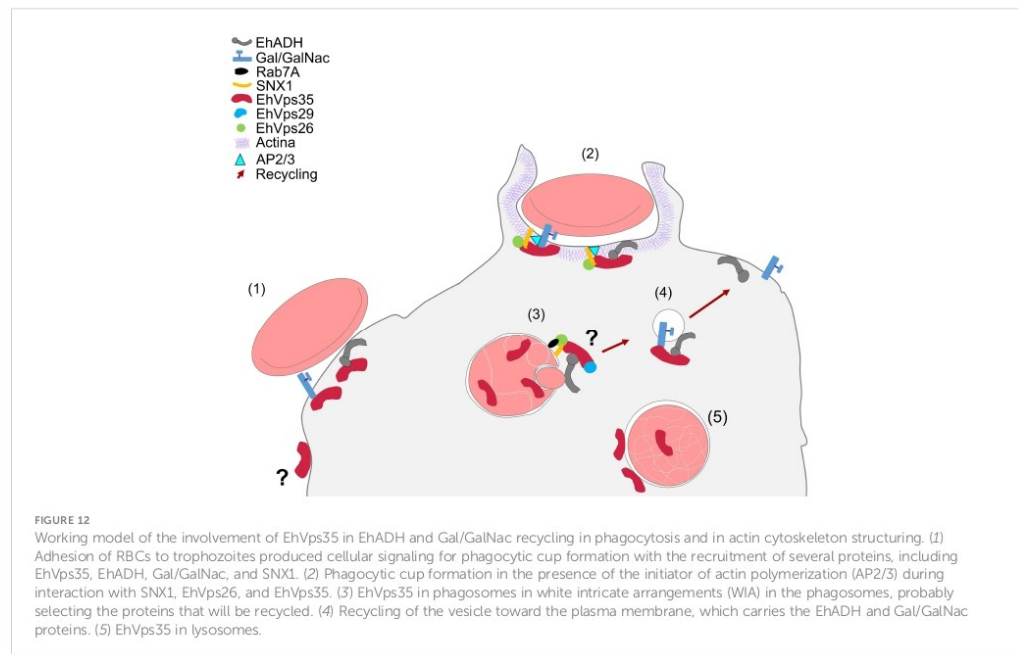
of the *Ehvps35* gene revealed that, when one of the elements of phagocytosis is altered, the whole event is disrupted.

The main function of the retromer is the protein recycling from the endosomes to the *trans*-Golgi apparatus and the plasma membrane after selection of the internalized proteins. Thus, although its presence in the plasma membrane was not surprising, as it occurs with other retromeric proteins in mammals (Kerr et al., 2005), the presence of EhVps35 in the outer plasma membrane is intriguing because there is no information on its function in this location. More experimental data are needed to investigate whether the retromer acts together with other molecules from the first contact of the trophozoite with the target cell.

The knockdown of the *Ehvps35* gene (*Ehvps35*-KD) in trophozoites presented interesting results on the role of this protein, not only in protein recycling but also during the process of phagocytosis. The adhesion efficiency and the rate of phagocytosis were reduced in *Ehvps35*-KD trophozoites, possibly due to the absence of the EhVps35 protein, which caused a decrease in the EhADH and Gal/GalNac recycling. However, we cannot discard gene expression coordination of the chain links involved in phagocytosis. This is an assumption based on the work of Ocádiz-Ruiz et al. (2016), where it was found that silencing of the EhADH gene affects the expression of EhCP112 and *vice versa*. Moreover, EhADH is a scaffold protein; therefore, impairment in its localization could affect the recruitment of other proteins necessary for phagocytosis (Arroyo and Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Frederick and Petri, 2005; Bañuelos et al., 2012; Avalos-Padilla et al., 2015; Galindo et al., 2021). In addition, our results showed that EhVps35 co-localized with EhADH and F-actin in the early and late stages of phagocytosis. As a consequence, *Ehvps35*-KD trophozoites showed less ability to

form phagocytic cups and channels. This event may be related to the decrease in actin exhibited by the CHX-treated trophozoites. This could be due to: i) the ligand attachment to the Gal/GalNac lectin in the plasma membrane, triggering a series of events including cytoskeletal reorganization and signal transduction, hence producing, in *Ehvps35*-KD trophozoites with less Gal/GalNac lectin, an actin disruption (Marion et al., 2004; McCoy and Mann, 2005; Meza et al., 2006; Emmanuel et al., 2015); ii) the CHX treatment in these trophozoites could quickly activate signaling mediated by proteins of the Rho family, which regulates the structuring and degradation of actin (Guild et al., 2002; Darvishi and Woldemichael, 2016); or iii) the poor interaction between EhVps35 and EhSNX1, which could have caused the EhSNX1 protein to not bind to the initiator of actin polymerization (AP2/3) (Watanabe et al., 2020), strongly suggesting that the *E. histolytica* retromer is essential for the organization of the actin cytoskeleton. In fact, this has been suggested for other organisms (Harbour et al., 2010; McGough et al., 2014; Zavadzky et al., 2014). Furthermore, 33 actin cytoskeletal proteins directly or indirectly bound to EhVps35 were identified by mass spectrometry (Table 1).

The decrease of EhVps35 caused poor acidification of the endosomes (Figure 9), which could lead to a decreased rate of phagocytosis. In *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and *Dictyostelium discoideum*, the retromer is vital for the lysosomal pathway as this complex recycles the V-ATPase subunit, a complex responsible for regulating cell acidification (Carnell et al., 2011; Finnigan et al., 2011; Maruzs et al., 2015; Ye et al., 2020). Gilmartin et al. (2017) demonstrated that, when ATPase activity was inhibited, the rate of phagocytosis in *E. histolytica* decreased. Furthermore, it has also been reported that EhVps26 and EhVps29 mutant trophozoites showed a decrease in CP activity, proteins that require acidic structures to be functional (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017).



In conclusion, our work provides an overview on the complex interactions between EhVps35, EhADH, Gal/GalNac, and actin during protein transport to different compartments in the phagocytosis of *E. histolytica* (Figure 12). This primitive protozoan is an excellent model for studying vesicular transport to further explore the retromer functions in phagocytosis and other virulence mechanisms. In addition, the roles of EhVps35 in protein recycling and in *E. histolytica* phagocytosis will reveal new targets for anti-amoebiasis drug design.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.uniprot.org/>, Q96QK1; <https://www.uniprot.org/>, P34110; <https://www.uniprot.org/>, C4M8Z4; <https://www.uniprot.org/>, C4M4G0; <https://www.uniprot.org/>, A0A8U0WP17; <https://www.uniprot.org/>, C4LWG4; <https://www.uniprot.org/>, C4M3E8; <https://www.uniprot.org/>,

Q7X659; <https://www.uniprot.org/>, F4I0P8; <https://www.uniprot.org/>, A8R7K9; <https://www.uniprot.org/>, Q8IIQ6; <https://www.uniprot.org/>, S7USD8; <https://www.uniprot.org/>, Q38C17; <https://www.uniprot.org/>, Q6Y0Y2.

Ethics statement

The human samples used in this study were acquired from primarily isolated as part of your previous study for which ethical approval was obtained. Written informed consent for participation was not required from the participants or the participants' legal guardians/next of kin in accordance with the national legislation and institutional requirements.

Author contributions

JD: Conceptualization, Writing – original draft, Investigation, Methodology. RJ: Supervision, Writing – original draft,

Methodology. SM: Writing – original draft, Methodology, Software. DT: Writing – original draft, Methodology. EO: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

(Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales) at CINVESTAV for his support technical in mass spectrometry analysis.

Funding

The author(s) declare that no financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to Zootechnical Veterinary Doctor Benjamin Emmanuel Chávez Alvarez for his support in the inoculation techniques in laboratory animals. Additionally, we thank Emmanuel Rios Castro from the Proteomics Unit of LaNSE

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 151–158. doi: 10.1016/0166-6851(87)90150-2
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., et al. (2015). EhVps32 is a vacuole-associated protein involved in pinocytosis and phagocytosis of Entamoeba histolytica. *PLoS Pathog.* 11, e1005079. doi: 10.1371/journal.ppat.1005079
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, L., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., et al. (2012). EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the Entamoeba histolytica multivesicular bodies pathway. *J. BioMed. Biotechnol.* 2012, 1–15. doi: 10.1155/2012/657942
- Biller, L., Matthiesen, J., Kühne, V., Lotter, H., Handal, G., Nozaki, T., et al. (2014). The cell surface proteome of Entamoeba histolytica. *Mol. Cell Proteomics* 13, 132. doi: 10.1074/mcp.M113.031393
- Bonifacio, J. S., and Hurley, J. H. (2008). Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 427–436. doi: 10.1016/j.cob.2008.03.009
- Carnell, M., Zech, T., Calaminus, S. D., Ura, S., Hagedorn, M., Johnston, S. A., et al. (2011). Actin polymerization driven by WASH causes V-ATPase retrieval and vesicle neutralization before exocytosis. *J. Cell Biol.* 193, 831–839. doi: 10.1083/jcb.201009119
- Castellanos-Castro, S., Cerda-García-Rojas, C. M., Javier-Reyna, R., Pais-Morales, J., Chávez-Munguía, B., and Orozco, E. (2016). Identification of the phospholipid lysobisphosphatidic acid in the protozoan Entamoeba histolytica: An active molecule in endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Rep.* 5, 224–236. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.12.010
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* 20, 45–50. doi: 10.1093/bioinformatics/btg371
- Cui, Y., Carosi, J. M., Yang, Z., Ariotti, N., Kerr, M. C., Parton, R. G., et al. (2019). Retromer has a selective function in cargo sorting via endosome transport carriers. *J. Cell Biol.* 218, 615–631. doi: 10.1083/jcb.201806153
- Damen, E., Krieger, E., Nielsen, J. E., Eygensteyn, J., and Van Leeuwen, J. E. M. (2006). The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide. *Biochem. J.* 398, 399–409. doi: 10.1042/BJ20060033
- Darvishi, E., and Woldemichael, G. M. (2016). Cycloheximide inhibits actin cytoskeletal dynamics by suppressing signaling via RhoA. *J. Cell Biochem.* 117, 2886–2898. doi: 10.1002/jcb.25601
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431–432. doi: 10.1016/0035-9203(78)90144-X
- Emmanuel, M., Nakano, Y. S., Nozaki, T., and Datta, S. (2015). Small GTPase Rab21 mediates fibronectin induced actin reorganization in Entamoeba histolytica: implications in pathogen invasion. *PLoS Pathog.* 11, e1004666. doi: 10.1371/journal.ppat.1004666
- Finnigan, G. C., Hanson-Smith, V., Houser, B. D., Park, H. J., and Stevens, T. H. (2011). The reconstructed ancestral subunit functions as both V-ATPase isoforms (Vph1p and Stv1p) in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Biol. Cell* 22, 3176–3191. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0244/ASSET/IMAGES/LARGE/3176FIG10.JPEG
- Fjorback, A. W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C., et al. (2012). Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J. Neurosci.* 32, 1467–1480. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2272-11.2012
- Frederick, J. R., and Petri, W. A. (2005). Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology* 15, 53R–59R. doi: 10.1093/glycob/cwj007
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., et al. (2022). EhVps23, an ESCRT-I member, is a key factor in secretion, motility, phagocytosis and tissue invasion by Entamoeba histolytica. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.835654
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Montaña, S., Ortega-Lopez, J., et al. (2021). EhVps23: A component of ESCRT-I that participates in vesicular trafficking and phagocytosis of Entamoeba histolytica. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.770759
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., et al. (1999). Entamoeba histolytica: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* 33, 556–568. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x
- García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E., and Guameros, G. (1982). Isolation of clones of E. histolytica deficient in adhesion to human erythrocytes. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 13, 129–136.
- Gilmartin, A. A., Ralston, K. S., and Petri, W. A., Jr. (2017). Inhibition of Amebic Lysosomal Acidification Blocks Amebic Trophocytosis and Cell Killing. *mBio*, 8 (4), e01187–e011817. doi: 10.1128/mBio.01187-17
- Gras, S., Jimenez-Ruiz, E., Klingler, C. M., Schneider, K., Klingl, A., Lemgruber, L., et al. (2019). An endocytic-secretory cycle participates in Toxoplasma gondii in motility. *PLoS Biol.* 17, e3000060. doi: 10.1371/journal.pbio.3000060
- Guild, G. M., Connelly, P. S., Vranich, K. A., Shaw, M. K., and Tilney, L. G. (2002). Actin filament turnover removes bundles from Drosophila bristle cells. *J. Cell Sci.* 115, 641–653. doi: 10.1242/jcs.115.3.641
- Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Bafford, R., Lesniak, M. A., Barr, V. A., and Taylor, S. I. (2000). Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into multimeric complexes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4105–4116. doi: 10.1091/mbc.11.12.4105
- Harbour, M. E., Breusegem, S. Y. A., Antrobus, R., Freeman, C., Reid, E., and Seaman, M. N. J. (2010). The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J. Cell Sci.* 123, 3703–3717. doi: 10.1242/jcs.071472
- Hashiguchi, Y., Nihama, M., Takahashi, T., Saito, C., Nakano, A., Tasaka, M., et al. (2012). Loss-of-function mutations of retromer large subunit genes suppress the phenotype of an Arabidopsis zig mutant that lacks Qb-SNARE VTI11. *Plant Cell* 22, 159–172. doi: 10.1105/tpc.109.069294

- Hierro, A., Rojas, A. L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A. V., et al. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449, 1063–1067. doi: 10.1038/nature06216
- Huang, J., and Mackerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 34, 2135–2145. doi: 10.1002/jcc.23354
- Huang, Y., Huang, H., Zhou, L., Li, J., Chen, X., Thomas, J., et al. (2022). Mutant VPS35-D620N induces motor dysfunction and impairs DAT-mediated dopamine recycling pathway. *Hum. Mol. Genet.* 31, 3886–3896. doi: 10.1093/hmg/ddac142
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Ivaska, J., Whelan, R. D. H., Watson, R., and Parker, P. J. (2002). PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J.* 21, 3608–3619. doi: 10.1093/emboj/cdb371
- Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miège, C., and Gaude, T. (2007). The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* 130, 1057–1070. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.040
- Kerr, M. C., Bennetts, J. S., Simpson, F., Thomas, E. C., Flegg, C., Gleeson, P. A., et al. (2005). A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic* 6, 991–1001. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00328.x
- Koukos, P. I., and Glykos, N. M. (2013). Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories. *J. Comput. Chem.* 34, 2310–2312. doi: 10.1002/jcc.23381
- Koumandou, V. L., Klute, M. J., Herman, E. K., Nunez-Miguel, R., Dacks, J. B., and Field, M. C. (2011). Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 124, 1496–1509. doi: 10.1242/jcs.081596
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., et al. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 81, 2159–2166. doi: 10.1002/prot.24403
- Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G., Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M. L., and Thornton, J. M. (1997). PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.* 22, 488–490. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01140-7
- Li, G. Z., Vissers, J. P. C., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V., and Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* 9, 1696–1719. doi: 10.1002/psmic.200800564
- Liu, T. T., Gomez, T. S., Sackey, B. K., Billadeau, D. D., and Burd, C. G. (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol. Biol. Cell* 23, 2505–2515. doi: 10.1091/mbc.e11-11-0915
- Lucas, M., Gershlick, D. C., Vidaurazaga, A., Rojas, A. L., Bonifacio, J. S., and Hierro, A. (2016). Structural mechanism for cargo recognition by the retromer complex. *Cell* 167, 1623. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.056
- Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., et al. (2018). Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 8, doi: 10.3389/fcimb.2018.00179
- Marion, S., Laurent, C., and Guillén, N. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol.* 7, 1504–1518. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00573.x
- Marion, S., Tavares, P., Arhets, P., and Guillén, N. (2004). Signal transduction through the Gal-GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135, 31–38. doi: 10.1016/j.molbiopara.2003.12.012
- Maruz, T., Lorincz, P., Szatmári, Z., Széplaki, S., Sándor, Z., Lakatos, Z., et al. (2015). Retromer ensures the degradation of autophagic cargo by maintaining lysosome function in *Drosophila*. *Traffic* 16, 1088–1107. doi: 10.1111/tra.12309
- McCoy, J. J., and Mann, B. J. (2005). Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 110, 220–225. doi: 10.1016/j.exppara.2005.02.013
- McGough, J. J., Steinberg, F., Jia, D., Barbuti, P. A., McMillan, K. J., Heesom, K. J., et al. (2014). Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35(D620N) mutation. *Curr. Biol.* 24, 1670–1676. doi: 10.1016/j.cub.2014.06.024
- McNally, K. E., Faulkner, R., Steinberg, F., Gallon, M., Ghai, R., Pim, D., et al. (2017). Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nat. Cell Biol.* 10, 1214–1225. doi: 10.1038/ncb3610
- Meza, I., Talamás-Rohana, P., and Vargas, M. A. (2006). The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch. Med. Res.* 37, 234–243. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.09.008
- 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35, 486–503. doi: 10.1080/07391102.2016.1151831
- Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. (2009). Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 11, 1471–1491. doi: 10.1111/cmi.2009.11.issue-10
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell* 16, 5294. doi: 10.1091/mbc.e05-04-0283
- Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Davis, C., and Quintana, N. (1972). Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 1006–1023. doi: 10.1177/20.12.1006
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Linford, A. S., Yoshino, T. P., Orozco, E., and Rodriguez, M. A. (2016). 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, 50–59. doi: 10.1017/S003118201500147X
- Perdomo, D., Ait-Ammar, N., Syan, S., Sachs, M., Jhingan, G. D., and Guillén, N. (2015). Cellular and proteomic analysis of the endomembrane system from the unicellular *Entamoeba histolytica*. *J. Proteomics* 112, 125–140. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.034
- Petri, W. A., Haque, R., and Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 39–64. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160959
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., et al. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* 153, 1–53. doi: 10.1063/5.0014475/16709547/044130_1_ACCEPTED_MANUSCRIPT.PDF
- Purushothaman, L. K., Arlt, H., Kuhlee, A., Raunser, S., and Ungermann, C. (2017). Retromer-driven membrane tubulation separates endosomal recycling from Rab7/Ypt7-dependent fusion. *Mol. Biol. Cell* 28, 783–791. doi: 10.1091/mbc.e16-08-0582
- Ramírez-Flores, C. J., Cruz-Mirón, R., Arroyo, R., Mondragón-Castelan, M. E., Nopal-Guerrero, T., González-Pozos, S., et al. (2019). Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitol. Res.* 118, 289–306. doi: 10.1007/s00436-018-6163-5
- Rath, P. P., and Gourinath, S. (2020). The actin cytoskeleton orchestra in *Entamoeba histolytica*. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 88, 1361–1375. doi: 10.1002/prot.25955
- Roberts, M., Barry, S., Woods, A., van der Suijs, P., and Norman, J. (2001). PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. *Curr. Biol.* 11, 1392–1402. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00442-0
- Sangaré, L. O., Alayi, T. D., Westermann, B., Hovasse, A., Sindikubwabo, F., Callebaut, I., et al. (2016). Unconventional endosome-like compartment and retromer complex in *Toxoplasma gondii* govern parasite integrity and host infection. *Nat. Commun.* 7, 1–14. doi: 10.1038/ncomms11191
- Seaman, M. N. J., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E., and Bright, N. (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J. Cell Sci.* 122, 2371–2382. doi: 10.1242/jcs.048686
- Solis, C. F., Santi-Rocca, J., Perdomo, D., Weber, C., and Guillén, N. (2009). Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One* 4, 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0008424
- Srivastava, V. K., Yadav, R., Watanabe, N., Tomar, P., Mukherjee, M., Gourinath, S., et al. (2017). Structural and thermodynamic characterization of metal binding in Vps29 from *Entamoeba histolytica*: implication in retromer function. *Mol. Microbiol.* 106, 562–581. doi: 10.1111/mmi.13836
- Takiff, H. E., Chen, S.-M., Court, D. L., Morri-Son, P. T., Lovett, S. T., Gilson, L., et al. (1989). Genetic analysis of the rnc operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 2581–2590. doi: 10.1128/jb.171.5.2581-2590.1989
- Talamás-Lara, D., Acosta-Virgen, K., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., Salazar-Villatoro, L., Espinosa-Cantellano, M., et al. (2021). Golgi apparatus components in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* after menensin treatment. *Microsc. Res. Tech.* 84, 1887–1896. doi: 10.1002/jemt.23745
- Tomavo, S., Slomianny, C., Meissner, M., and Carruthers, V. B. (2013). Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. *PLoS Pathog.* 9, e1003629. doi: 10.1371/journal.ppat.1003629
- van Weering, J. R. T., Verkade, P., and Cullen, P. J. (2010). SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 371. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.11.009

- Wang, S., and Bellen, H. J. (2015). The retromer complex in development and disease. *Development* 142, 2392–2396. doi: 10.1242/dev.123737
- Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2020). Two isoforms of phosphatidylinositol 3-phosphate-binding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 22, 1–16. doi: 10.1111/cmi.13144
- Ye, H., Ojeda, S. A., Li-Kroeger, D., Zuo, Z., Wang, L., Li, Y., et al. (2020). Retromer subunit, vps29, regulates synaptic transmission and is required for endolysosomal function in the aging brain. *Elife* 9, 1–33. doi: 10.7554/eLife.51977.sa2
- Zavodszky, E., Seaman, M. N. J., Moreau, K., Jimenez-Sanchez, M., Breusegem, S. Y., Harbour, M. E., et al. (2014). Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat. Commun.* 1, 1–16. doi: 10.1038/ncomms4828
- Zelazny, E., Santambrogio, M., and Gaude, T. (2013). Retromer association with membranes: Plants have their own rules! *Plant Signal Behav.* 8, 1–4. doi: 10.4161/PSB.25312
- Zhang, H., Huang, T., Hong, Y., Yang, W., Zhang, X., Luo, H., et al. (2018). The retromer complex and sorting nexins in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.* 10. doi: 10.3389/fnagi.2018.00079
- Zhao, X., Nothwehr, S., Lara-Lemus, R., Zhang, B. Y., Peter, H., and Arvan, P. (2007). Dominant-negative behavior of mammalian Vps35 in yeast requires a conserved PRLYL motif involved in retromer assembly. *Traffic* 8, 1829–1840. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00658.x
- Zhou, M., Wiener, H., Su, W., Zhou, Y., Liot, C., Ahearn, I., et al. (2016). VPS35 binds farnesylated N-Ras in the cytosol to regulate N-Ras trafficking. *J. Cell Biol.* 214, 445. doi: 10.1083/jcb.201604061



OPEN ACCESS

EDITED BY
Patricia Sampaio Tavares Veras,
Gonçalo Moniz Institute (IGM), Brazil

REVIEWED BY
Lesly Temesvari,
Clemson University, United States
Julia Romano,
Johns Hopkins University, United States

*CORRESPONDENCE
Esther Orozco
✉ esther@cinvestav.mx

RECEIVED 19 July 2024
ACCEPTED 30 August 2024
PUBLISHED 27 September 2024

CITATION
Díaz-Valdez J, Javier-Reyna R, Galindo A,
Salazar-Villatoro L, Montaña S and Orozco E
(2024) EhVps35, a retromer component, is a
key factor in secretion, motility, and tissue
invasion by *Entamoeba histolytica*.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 14:1467440.
doi: 10.3389/fcimb.2024.1467440

COPYRIGHT
© 2024 Díaz-Valdez, Javier-Reyna, Galindo,
Salazar-Villatoro, Montaña and Orozco. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or reproduction
is permitted which does not comply with
these terms.

EhVps35, a retromer component, is a key factor in secretion, motility, and tissue invasion by *Entamoeba histolytica*

Joselin Díaz-Valdez¹, Rosario Javier-Reyna¹, Ausencio Galindo¹,
Lizbeth Salazar-Villatoro¹, Sarita Montaña² and Esther Orozco^{1*}

¹Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México, ²Laboratorio de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, México

In humans and *Drosophila melanogaster*, the functional convergence of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery that is in charge of selecting ubiquitinated proteins for sorting into multivesicular bodies, and the retromer, that is the complex responsible for protein recycling to the plasma membrane and Golgi apparatus. ESCRT and retromer complexes are codependent for protein sorting recycling, degradation, and secretion. In this article, we studied the EhVps35 C isoform (referred to as EhVps35), that is the central member of the *Entamoeba histolytica* retromer, and its relation with the ESCRT machinery during sorting and protein recycling events and their involvement virulence. Our findings revealed that EhVps35 interacts with at least 300 proteins that participate in multiple cellular processes. Laser confocal and transmission electronic microscopy images, as well as secretion assays, revealed that EhVps35 is secreted in vesicles together with EhVps23 and EhADH (both ESCRT machinery proteins). In addition, immunoprecipitation, immunofluorescence, and molecular docking assays revealed the relationship among EhVps35 and other ESCRT machinery proteins. Red blood cell stimulus increased EhVps35 secretion, and the knockdown of the *EhVps35* gene in trophozoites reduced their capacity to migrate and invade tissues. This also impacts the cellular localization of ubiquitin, EhVps23 (ESCRT-I), and EhVps32 (ESCRT-III) proteins, strongly suggesting their functional relationship. Our results, taken together, give evidence that EhVps35 is a key factor in *E. histolytica* virulence mechanisms and that it, together with the ESCRT machinery components and other regulatory proteins, is involved in vesicle trafficking, secretion, migration, and cell proliferation.

KEYWORDS

vesicular trafficking, ESCRT machinery, retromer, *Entamoeba histolytica*, virulence mechanisms, EhVps35

1 Introduction

Two evolutionarily conserved cellular machineries, the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) and the retromer complex, mediate cargo sorting into the degradative and recycling pathways, respectively (Cullen and Steinberg, 2018). The ESCRT machinery is formed by the ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, and ESCRT-III complexes, and accessory proteins (Leung et al., 2008), while the retromer is in general composed of five proteins that form two subcomplexes: the cargo selective complex shaped by the Vps26, Vps29, and Vps35 proteins and the SNX-BAR dimer (Vps5 and Vps17 in yeast) (Seaman, 2021). The retromer and ESCRT machinery participate together in cell division, endocytosis, secretion, migration, and regulated cell death, among many other cellular processes, and, in humans, alterations of these machineries produce diseases (Tomavo et al., 2013; Wang and Bellen, 2015; Gras et al., 2019; Vietri et al., 2019; Seaman, 2021; Tan et al., 2022; Yang et al., 2022). Recently, it has been reported that the functions of the ESCRT machinery and the retromer complex are mutually codependent, since the silencing of the TSG101 and CHMP3 proteins (Vps23 and Vps32, respectively in yeast), both components of the ESCRT machinery, inhibits the recycling of cargoes by the retromer (Dukes et al., 2011; Pannen et al., 2020); while, *vps35* gene silencing causes a negative regulation of degradation pathways, augments protein ubiquitination, and alters the exosome secretion (Williams et al., 2018; Liu et al., 2020; Filippone et al., 2021b, 2021a; Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022) produced through the release of multivesicular bodies (MVBs) intraluminal vesicles, formed by the ESCRT machinery (Anand et al., 2019).

Entamoeba histolytica, the protozoan responsible for human amoebiasis, presents very active vesicular trafficking and membrane movement in the basal state, and they increase during phagocytosis and tissue invasion. The constant membrane remodeling in this parasite is crucial for cellular functions, and the ESCRT and the retromer complexes actively participate in these events (Arroyo and Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Nakada-Tsukui et al., 2005; Bañuelos et al., 2012; Avalos-Padilla et al., 2015, 2018; Ocadiz-Ruiz et al., 2016; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020; Galindo et al., 2021, 2022; Díaz-Hernández et al., 2023; Díaz-Valdez et al., 2024). Our group has studied the participation of the ESCRT components in phagocytosis and other virulence processes in trophozoites. In addition, others have investigated the retromer components in *E. histolytica*, identifying the proteins EhVps35 (corresponding to the EhVps35C isoform reported in Díaz-Valdez et al., 2024), EhVps26, and EhVps29 (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020). Using two-hybrid screening, they demonstrated a direct interaction between these proteins. Furthermore, the EhVps26, EhVps29, and SNX1 proteins participate in phagocytosis (Nakada-Tsukui et al., 2005; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020). We have recently published a study on the function of EhVps35 (EhVps35C isoform) in phagocytosis and EhADH and Gal/GalNac in lectin recycling (Díaz-Valdez et al., 2024), two virulence-involved proteins (Arroyo and Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Petri et al., 2002; Frederick and Petri, 2005; Bañuelos et al., 2012). Our findings also showed that EhVps35 is

involved in cytoskeleton structuration because the knockdown of the *EhVps35C* gene (*EhVps35-KD*) caused cytoskeleton disruption and decreased phagocytosis (Díaz-Valdez et al., 2024). In addition, experimental evidence on the interaction of EhVps23 with EhVps35 (Galindo et al., 2022) and of EhADH with EhVps35 (Díaz-Valdez et al., 2024) strengthened the evidence of the relationship between the ESCRT and the retromer.

Here, we furthered the study of the ESCRT-retromer interaction using trophozoites in a basal state and after cellular stimulus with red blood cells (RBCs). Docking analysis and immunoprecipitation, using α -EhVps35 antibodies (specifically recognizes EhVps35C), substantiated that the EhTom1 (ESCRT-0), EhVps23 (ESCRT-I), and EhVps32 (ESCRT-III) proteins, and EhADH (an ESCRT accessory protein, belonging to the ALIX family, characterized by the Bro-1 domain) interact with EhVps35. Experiments using *EhVps35-KD* trophozoites evidenced the codependence between the ESCRT and the retromer complexes because the gene silencing altered EhVps23 and EhVps32 cellular locations, affecting the formation and motility of MVBs and the capacity of trophozoites to produce hepatic abscesses. These functions revealed that EhVps35 may be a new target for anti-amoebiasis drug design.

2 Materials and methods

2.1 *E. histolytica* culture

E. histolytica trophozoites, strain HM1: IMSS, were axenically grown at 37°C in TYI-S-33 medium (Diamond et al., 1978) and harvested at the logarithmic growth phase. The culture flasks were then chilled at 4°C, and trophozoites were collected by centrifugation. All experiments reported here were performed at least three times in independent experiments, with two technical replicates per experiment.

2.2 Antibodies

The amino acid sequence of EhTom1 (access numbers: C4LXU1), described by Bañuelos et al. (2022) as a component of ESCRT, was used to design a specific peptide to generate mouse polyclonal antibodies against a specific EhTom1 peptide (N₂₄₄-EQIKTTLERHKKLTTEK-C₂₅₉). Male BALB/c mice (from an already-existing collection in the Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (UPEAL-CINVESTAV) were immunized with 80 μ g of the peptide resuspended in TiterMax Gold adjuvant (1:1) (Sigma Aldrich). Three more immunizations were then performed at 15-day intervals, followed by bleeding to obtain the α -EhTom1 antibody. Pre-immune serum was obtained before the immunizations.

The other primary antibodies used in this study were mouse α -EhVps35, which specifically recognizes the EhVps35C isoform (onwards the EhVps35 protein) (Díaz-Valdez et al., 2024), mouse monoclonal α -Ubiquitin (α -Ub) (Santacruz), rabbit α -EhADH (Galindo et al., 2022), mouse monoclonal α -human actin (kindly

given by Dr. Manuel Hernandez, CINESTAV IPN), rabbit α -EhCP112 (García-Rivera et al., 1999), rat α -EhVps23 (Galindo et al., 2021), mouse α -EhVps32 (Avalos-Padilla et al., 2015), and rabbit α -EhVps36 (Díaz-Hernández et al., 2023). As secondary antibodies, we used HRP-labeled α -mouse IgG, α -rabbit IgG, and α -rat IgG (Zymed) for the Western blot assays; and Pacific Blue-labeled or Alexa Fluor 647-labeled α -mouse IgG and Cy5-labeled α -rat IgG (Life Technologies) for the immunofluorescence assays. For the immunoelectron microscopy experiments, we used α -mouse IgG conjugated with 20 nm or 30 nm gold particles, α -rat IgG conjugated with 10 nm gold particles, and α -rabbit IgG conjugated with 30 nm gold particles (TED Pella Inc).

2.3 Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation was carried out with 200 μ l of protein-G-agarose (rProtein-G; Invitrogen) previously incubated for 2 h at 4°C with the α -EhVps35 antibody or preimmune serum (Díaz-Valdez et al., 2024). Trophozoite lysates were prepared in the presence of 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, and a protease inhibitors cocktail during freeze-thawing in liquid nitrogen and vortexing cycles. The lysates were then pre-cleared with 200 μ l of rProtein-G (previously blocked with 2% BSA) and incubated for 2 h at 4°C under gentle stirring (Avalos-Padilla et al., 2015; Galindo et al., 2021). The previously cleared cell lysates were incubated overnight (ON) at 4°C with rProtein-G bound to α -EhVps35 antibody, and then the complex: rProtein-G/ α -EhVps35/EhVps35-associated proteins were recovered by centrifugation. After washing with PBS, 60 μ l of 4 x sample buffer (40% glycerol, 240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromophenol blue, and 5% of β -mercaptoethanol). Samples were boiled for 3 min and centrifuged again at 11,600 g for 2 min at 4°C. The supernatant (30 μ l) was loaded into 10% SDS-PAGE and subjected to Western blot assays using the α -EhVps35, α -EhTom1, α -EhVps23, α -EhVps36, α -EhVps32, and α -EhADH antibodies. In addition, replicas of the same experiment were analyzed in the Proteomics Units of the LaNSE (National Laboratory of Experimental Services) of CINVESTAV to massively identify the proteins that bind to EhVps35.

2.4 Mass spectrometry analysis

In total, 30 μ g of the immunoprecipitated proteins with the α -EhVps35 antibody were enzymatically digested according to the protocol reported by Ramírez-Flores et al. (2019). Afterward, the peptides were loaded into a Symmetry C18 Trap V/M precolumn (Waters); 180 μ m \times 20 mm, 100 Å pore size, 5 μ m particle size, and desalted using mobile phase A (0.1% formic acid in H₂O) and mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) under the following isocratic gradient: 99.9% mobile phase A and 0.1% of mobile phase B at a flow of 5 μ l/min for 3 min. Then, the peptides were loaded and separated on an HSS T3 C18 column (Waters); 75 μ m \times 150 mm, 100 Å pore size, 1.8 μ m particle size, using an UPLC ACQUITY M-Class (Waters) with the same mobile phases under the following gradient: 0 min 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 to 126.46 min 85% B, and 129 to

130 min 7% B, at a flow of 400 nL/min and at 45°C. The spectra data were acquired in a mass spectrometer, Synapt G2-Si (Waters), with electrospray ionization and ion mobility separation using a data-independent acquisition approach through the HDMSE mode (Waters). The generated raw files containing MS and MS/MS spectra were deconvoluted and compared using ProteinLynx Global Server (PLGS) v3.0.3 software (Li et al., 2009) against a reversed *E. histolytica* database (downloaded from Uniprot). Only the proteins with $\geq 95\%$ reliability (Protein AutoCurate green) were reported here, according to the methodology described by Ramírez-Flores et al. (2019). Additionally, the identified proteins were classified according to their function, as described in the literature, and analyzed using the PANTHER server and the GeneOntology (GO) database (<http://geneontology.org/>). GO analysis was conducted using the top 10 enriched GO terms in the biological processes, molecular functions, and cellular component branches. All the adjusted and statistically significant P values of the terms were log-normalized negative 10 bases.

2.5 Phagocytosis assays

For the phagocytosis assays, trophozoites were incubated with RBCs (1:25) from an already-existing collection for 2 min at 37°C. The cell mixture was then washed with TYI-water (2:1) at 37°C to remove the adhered and non-ingested RBCs. Subsequently, the cells were incubated at 37°C for 28 min and the samples were processed for the immunofluorescence assays (García-Rivera et al., 1982).

2.6 Laser confocal microscopy assays

Trophozoites were grown on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde at 37°C for 1 h, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and blocked with 10% fetal bovine serum in PBS. Preparations were incubated at 4°C ON with primary antibodies (1:50); and were incubated with the corresponding secondary antibodies for 30 min at 37°C: Pacific Blue-labeled α -mouse IgG for α -Ub, Cy5-labeled α -rat IgG for α -EhVps23 or Alexa Fluor 647-labeled α -mouse IgG for α -EhVps32 (1:100). We directly labeled the α -EhVps35 antibody with the FITC labeling fluorochrome kit (Molecular Probes-Thermo Fisher). All preparations were preserved using the Vectashield antifade reagent (Vector) and 0.5 μ m laser sections were obtained and examined through the Carl Zeiss LMS 700 confocal microscope and processed with ZEN 2009 Light Edition Software (Zeiss). To evaluate the co-localization between molecules, Pearson's coefficients were obtained from at least 30 confocal images using the ImageJ 1.45v software and the JACoP plugin.

2.7 Secretion assays

Trophozoites (3×10^6) in basal conditions or after being incubated with RBCs for 2 min as previously described (Galindo et al., 2021), were washed three times in PBS and incubated with 200

μ l of PBS supplemented with 1 mg/ml of E64 (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (Roche) for 2 h at 37°C. The samples were centrifuged at 13,000 x g for 10 min to obtain the secretion products (SP) in the supernatant fraction. The trophozoites in the pellet were lysed in the presence of protease inhibitors as previously reported (Bolaños et al., 2016; Galindo et al., 2022) to obtain the trophozoite extracts (TE). Samples were submitted to Western blot assays using α -EhVps35, α -EhVps23, α -EhCP112 or α -actin antibodies as described above. For further experiments, secretion products were processed to purify the extracellular vesicles (EVs), as described below.

2.8 Western blot experiments

Trophozoites lysates were obtained in the presence of protease inhibitors (PHMB 10 mM, E-64 10 μ g/ml, and a protease inhibitor cocktail). Samples were electrophoresed in 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with α -EhVps35 (1:500), α -actin (1:3000), α -CP112 (1:3000), α -EhVps23 (1:500), α -EhTom1 (1:500), α -EhVps36 (1:500), α -EhADH (1:500), or α -EhVps32 (1:500) antibodies. Membranes were washed, incubated with the respective HRP-labeled secondary antibodies (Sigma, 1:1 000) according to the species, and revealed with the ECL Prime detection reagent (GE-Healthcare, Chicago, IL, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.9 Purification of extracellular vesicles by differential centrifugation

The secretion products of trophozoites were processed to purify the extracellular vesicles (Théry et al., 2006; Galindo et al., 2022). Briefly, the secretion products were centrifuged at 10,000 x g for 30 min to remove cell debris. The final supernatant was then ultracentrifuged at 100,000 x g for 70 min to pellet the small vesicles. The pellet was washed in one volume of PBS to remove contaminating proteins and centrifuged at the same high speed. The purified samples were analyzed by transmission electron microscopy (TEM).

2.10 Transmission electron microscopy

EVs purified from trophozoites in basal conditions were prepared for TEM as previously described (Mancilla-Olea et al., 2018). Briefly, the preparations were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at room temperature, washed with PBS, and dehydrated with increasing concentrations of ethanol. After infiltration, samples were embedded in LR White resin (London Resin Co) and polymerized at 56°C ON to obtain thin sections (60 nm) that were mounted on Formvar-covered nickel grids followed by ON incubation at 4°C with the α -EhVps35, α -EhVps23, or α -EhADH antibodies (1:50). The samples were then incubated ON with the corresponding gold-labeled secondary antibodies (1:50) according to the specific species: α -mouse IgG was conjugated with 20 nm or 30 nm gold particles, α -rat IgG was conjugated with 10 nm

gold particles, and α -rabbit IgG was conjugated with 30 nm gold particles (TED Pella Inc). The samples were then contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed through a Joel JEM-1011 transmission electron microscope.

2.11 Protein-protein docking analysis

The predicted and refined 3D structures of the EhVps32 and EhVps23 (Montaño et al., 2017; Galindo et al., 2021) proteins were used for docking analysis as was the 3D structure of the EhVps35 protein (Díaz-Valdez et al., 2024). EhTom1, a 3D model, was obtained from the I-TASSER server using the VHS domain of the Tom1 protein (PDB: ELK1) from *Homo sapiens* as the template. The 3D structure was refined through 200 ns of MDS by NAMD2.8 (Phillips et al., 2020) with the force field CHARMM36 to create the topologies of the protein (Huang and Mackerell, 2013). The TIP3 model was applied for the water molecules. The system was solvated using the psfgen software in the VMD program (Humphrey et al., 1996). Next, 17,229 water molecules and 6 chlorine ions were added to neutralize the system which was minimized for 10,000 steps, followed by equilibration under constant temperature and pressure (NPT) conditions for 1 ns with the protein and lipid atoms restrained. Afterward, MDS was run for 200 ns, considering EhTom1 a soluble protein, without position restraints under periodic boundary conditions (PBC), and using an NPT ensemble at 310 K and 200 ns of MD simulation. The structures were visualized using the UCSF Chimera software.

The snapshots were obtained using the clustering analysis of 200 ns MDS with the Carma software (Koukos and Glykos, 2013). The protein-protein docking was done employing different conformers with the Cluspro server (Comeau et al., 2004; Kozakov et al., 2013). The conformers with the highest cluster members and the lowest energy were analyzed on the PDBSum server (Laskowski et al., 1997) and the 3D structures visualization was performed by VMD (Humphrey et al., 1996).

2.12 dsRNA-based *Ehvps35* gene silencing

The *Ehvps35*-KD gene silencing was performed using the bacteria-expressed double-stranded RNA (dsRNA) that was soaked with the trophozoites as previously described (Solis et al., 2009). Briefly, HT115 bacteria were transformed with *pL4440/Ehvps35* (Díaz-Valdez et al., 2024) and grown at 37°C in LB broth in the presence of ampicillin (100 mg/ml) and tetracycline (10 mg/ml) (Takiff et al., 1989). *Ehvps35*-dsRNA expression was induced by 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ON at 37°C. dsRNA was then isolated from the bacteria using Trizol Reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. DNase I (Invitrogen) and RNase A (Ambion) were added to remove ssRNA and dsDNA molecules; *Ehvps35*-dsRNA was washed with isopropanol and ethanol, analyzed by agarose gel electrophoresis, and its concentration was determined by spectrophotometry. Finally, trophozoites (3×10^4) in TYI-S-33 medium were incubated with purified *Ehvps35*-dsRNA molecules to a final concentration of 5 μ g/ml, and the cultures were left for 48 h at

37°C, the time at which we previously determined the silencing effect. Cells growing under standard conditions (without dsRNA) were used as controls.

2.13 Migration assays

Serum-starved (3 h) trophozoites (7.5×10^4) were placed in the upper chamber of Transwell inserts (5 μ m pore size, 24 well, Costar) and 500 μ l of bovine serum was added to the lower chamber. Trophozoites were incubated for 3 h at 37°C and trophozoite migration was determined by counting the number of cells in the lower chamber of the Transwell (Bolaños et al., 2016).

2.14 *In vivo* virulence experiments

Four-week-old male hamsters (*Mesocricetus auratus*) weighing 40 ± 5 g were fasted for 24 h prior to surgery (Galindo et al., 2022). Subsequently, they were anesthetized with 3% isoflurane and anesthetized again with 1.5% of the same anesthetic during the surgical procedure. The abdominal surfaces of the hamsters were shaved, and a longitudinal incision of the abdominal wall was made, to expose the port vein and livers. Subsequently, 1.5×10^6 trophozoites in 200 μ l TYI-S-33 without bovine serum were intraperitoneally inoculated into the animals. The hamsters were sacrificed with an overdose of anesthetic 7 days after the challenge; the whole liver was weighed, and the liver lesion was dissected and weighed to calculate the percentage of damaged tissue in relation to the total liver weight (Pais-Morales et al., 2016; Galindo et al., 2022).

2.15 Statistical analysis

Values for all experiments were expressed as the mean and standard error of at least three independent assays carried out by duplicate. Statistical analyses were done with the GraphPad Prism v5.01 software by a paired Student's t test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

2.16 Ethics statement

CINVESTAV fulfills the standard of the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) "Technical Specifications for the Care and Use of Laboratory Animals", based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ("The Guide," 2011, NRC, USA with the Federal Register Number BOO.02.03.02.01.908), awarded by the National Service for Agrifood Health, Safety and Quality (SENASICA). This organization verifies the state of compliance of such NOM in Mexico and belongs to the Ministry of Agriculture and Rural Development. The Institutional Committee for Animal Care and Use (IACUC/Ethics committee) from CINVESTAV, the regulatory office for research protocols approval involving the use of laboratory animals, reviewed and approved all animal experiments (Protocol Number 0505-12, CICUAL 001).

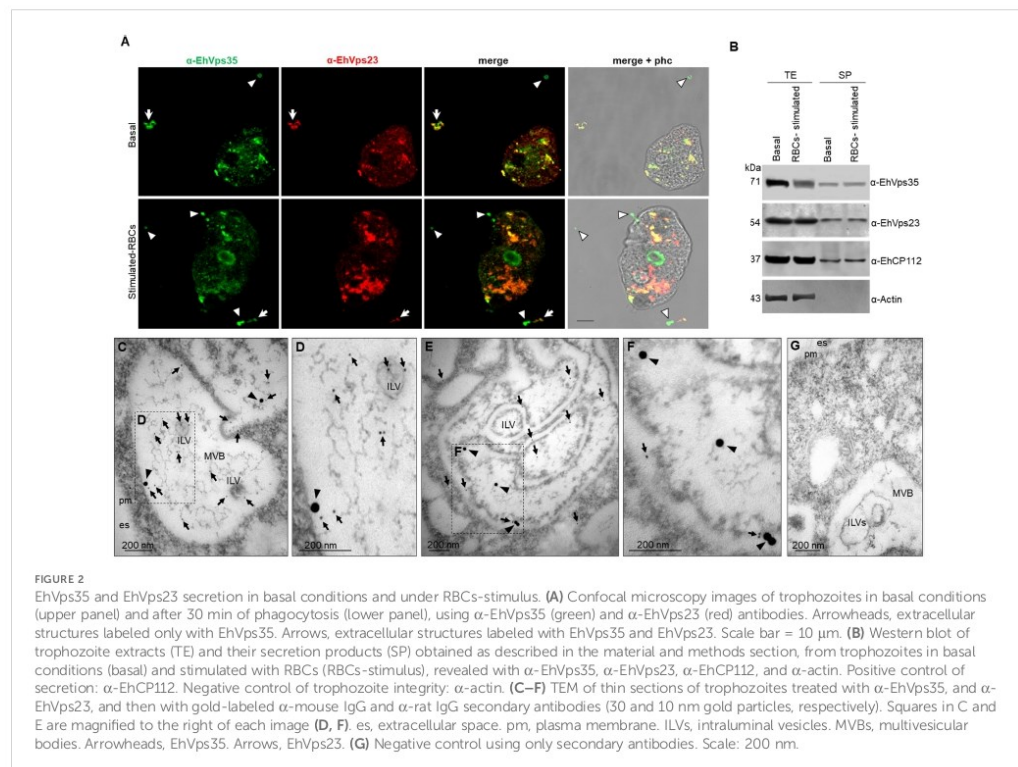
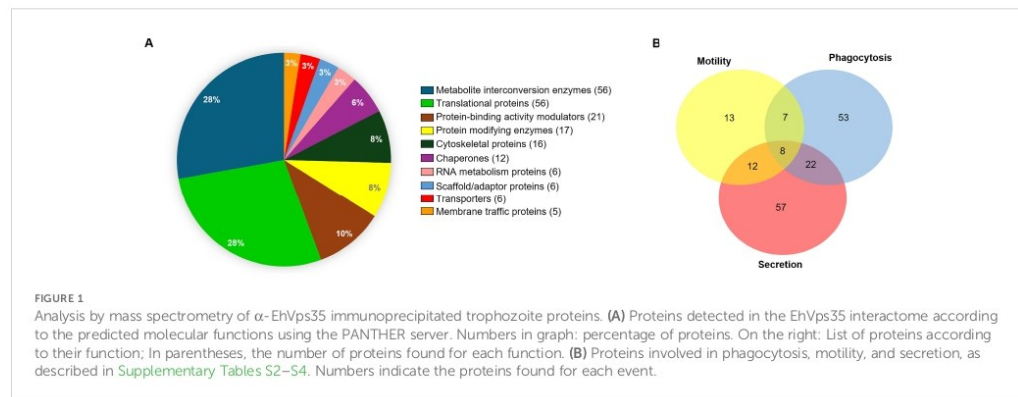
3 Results

3.1 Interaction of EhVps35 with secretion-, motility-, and phagocytosis-related proteins

We continued with the characterization of the C isoform of the EhVps35 protein (hereinafter EhVps35) in virulence mechanisms. We investigated by immunoprecipitation experiments and mass spectrometry analyses the proteins that interact with EhVps35, using α -EhVps35 antibodies (Díaz-Valdez et al., 2024). After immunoprecipitation, the proteins were separated by SDS-PAGE, examined by mass spectrometry, and classified according to their function, as described in the literature. The results of the analysis revealed the presence of 300 proteins, from which we selected those related to vesicular trafficking (13 proteins) (Supplementary Table S1), motility (40 proteins) (Supplementary Table S2), phagocytosis (90 proteins) (Supplementary Table S3), and secretion (99 proteins) (Supplementary Table S4) (Figures 1A, B and Supplementary Figure S1). Some of these proteins participate in more than one function (Figure 1B), the majority of them (33%) were related to the secretion process in *E. histolytica* trophozoites.

3.2 EhVps35 is secreted in extracellular vesicles

Next, we explored the mechanism used by the trophozoites to secrete EhVps35, the effect of RBCs-stimulus in the protein secretion, and its relationship with ESCRT machinery proteins. Confocal images of trophozoites in basal and phagocytic conditions evidenced that EhVps35 appeared together with EhVps23 in cytoplasmic and extracellular vesicles. EhVps23 has been reported as an EVs marker in *E. histolytica* (Galindo et al., 2022) (Figure 2A). We then analyzed by SDS-PAGE the supernatants with the secreted proteins that were transferred to nitrocellulose membranes and probed with α -EhVps35, α -EhVps23, α -EhCP112, and α -actin, and with the corresponding secondary antibodies (Figure 2B). As we previously reported, the amount of EhVps35 protein decreased between 20% and 40% after the RBCs-stimulus to the trophozoites (Díaz-Valdez et al., 2024). Our results confirmed that this reduction remained after 2 h, the time required for the secretion assays. The decrease of EhVp35 in total extracts is possibly due to an increase in secretion (Figure 2B). However, we cannot rule out partial degradation of EhVps35 during the assays. In these experiments, the α -EhVps23 antibody served as an internal control (Galindo et al., 2022), the α -EhCP112 as a positive control for secretion (Bolaños et al., 2016), while the α -actin antibody, used as an internal negative control, indicates the integrity of the trophozoites during the experiments (Figure 2B) (Bolaños et al., 2016; Galindo et al., 2022). TEM confirmed EhVps35 and EhVp23 localization in MVBs, formed through the ESCRT machinery (Figures 2C–G). These structures contain intraluminal vesicles, which are released to generate exosomes.



We proceeded to purify the EVs from the supernatant as described in the materials and methods section to analyze them by TEM. As previously reported (Galindo et al., 2022), the EVs presented in sizes from 32 to 297 nm (Figure 3). Thin sections of the EVs were then labeled with α -EhVps23, α -EhVps35, and α -EhADH antibodies

and the corresponding secondary antibodies conjugated to gold particles, namely, EhVps35 (20 nm), EhVps23 (10 nm), and EhADH (30 nm), and the samples were then examined by TEM. The EhVps35 protein was located near vesicle membranes and inside EVs (Figures 3A, C, E). Recently, Galindo et al. (2022) reported that

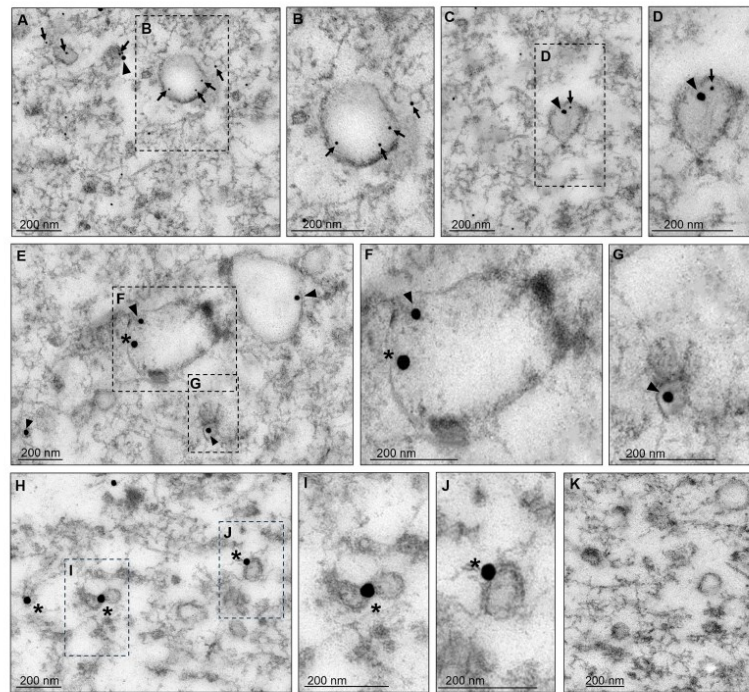
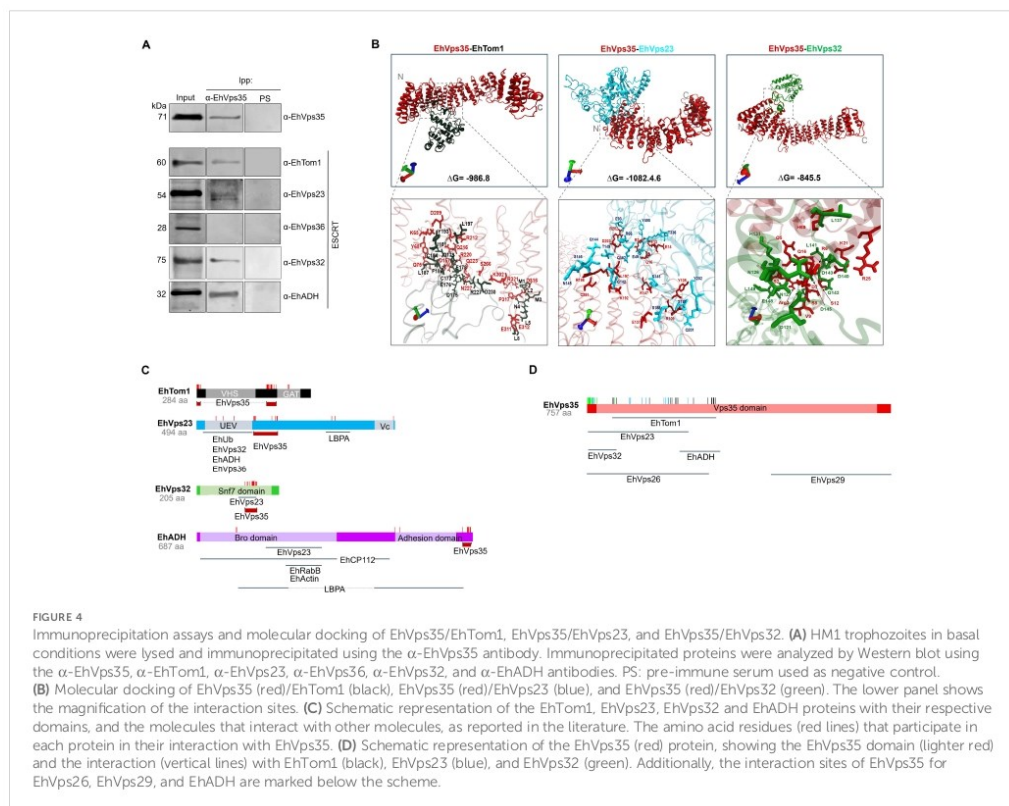


FIGURE 3
Transmission electron microscopy of EVs found in secretion products. After 2 hours of incubation at 37°C, the supernatants of trophozoites were collected and ultracentrifuged as described in the material and methods section. The pellets were processed for TEM. (A–J) Preparations were labeled with α -EhVps35, α -EhVps23, or α -EhADH, and then with gold-labeled α -mouse IgG, α -rat IgG, and α -rabbit IgG secondary antibodies (20, 10, and 30 nm gold particles, respectively). Squares in (A, C, E, H) are magnified to the right of each image (B, D, F, G, I, J). Arrowheads, EhVps35. Arrows: EhVps23. Asterisks, EhADH. (K) Negative control using only secondary antibodies. Scale: 200 nm.

EhVps23 was also found in EVs, determining that this protein is a key factor in *E. histolytica* secretion, as has also been reported for human cells (Anand et al., 2019). In addition, PDCD61P, an ALIX family member, has been considered an exosome marker in humans (Anand et al., 2019). Thus, we also looked for EhADH in EVs. The images showed that the three proteins appeared in the vesicular membranes and inside them (Figures 3A–J). In some vesicles, EhVps35 and EhVps23 (Figures 3A–D) or EhVps35 and EhADH (Figures 3E–G) were observed together. EhADH was also localized alone in certain vesicles (Figures 3H–J), however, it being found alone in vesicles or their solitude may be due to the thin section observed. Interestingly, this is the first time that EhADH has been found in EVs, as has been reported for other ALIX family members. Therefore, our results highlight the importance of secretion for cellular communication and virulence processes (van Niel et al., 2022), suggesting that the EhVps35, EhVps23, and EhADH proteins in EVs might have a role in the *E. histolytica* attack on the host cell. Due to EhVps23 and EhVps35 co-localization in EVs and in the cytoplasm of trophozoites (Figure 2A), we proceeded to analyze the interaction between EhVps35 with different proteins of the ESCRT machinery.

3.3 EhVps35 and ESCRT protein interactions

To further investigate the interaction between the retromer and the ESCRT machinery components, we performed immunoprecipitation assays using α -EhVps35, and we searched for components of the different ESCRT machinery subcomplexes using α -EhTom1 (ESCRT-0), α -EhVps23 (ESCRT-I), α -EhVps36 (ESCRT-II), α -EhVps32 (ESCRT-III), and α -EhADH (an ESCRT accessory protein). Western blot assays of immunoprecipitates evidenced that α -EhTom1, α -EhVps23, α -EhVps32, and α -EhADH specific antibodies recognized 60, 54, 32, and 75 kDa bands, respectively, in concordance with previous reports on the migration of each protein (Arroyo and Orozco, 1987; Avalos-Padilla et al., 2015; Galindo et al., 2021; Galindo-Olea, 2022). However, the 28 kDa band that corresponds to EhVps36 did not appear in the immunoprecipitates (Figure 4A). This is probably because EhVps36 is an atypical protein, lacking the ubiquitin-binding domain necessary in many systems for the recruitment of other ESCRT machinery proteins (Díaz-Hernández et al., 2023). However, we cannot rule out a very fast dynamic interaction



between EhVps35 and EhVps36, since the ESCRT machinery proteins participate in highly dynamic cellular processes with very fast direct or indirect interactions (Avalos-Padilla et al., 2018). Furthermore, as an interaction between EhVps36 and EhVps23 has been previously reported (Díaz-Hernández et al., 2023), an indirect interaction between EhVps35-EhVps36 could be mediated by EhVps23, a highly labile protein that is frequently degraded during experimental procedures (Galindo et al., 2022), making it difficult to study its interactions.

To strengthen the evidence of the association among the ESCRT machinery components and the retromer, we performed docking analysis using 3D models of the proteins already reported (Galindo et al., 2021; Díaz-Valdez et al., 2024) and the EhTom1 3D model was obtained using the I-TASSER server. The global free energy of the EhVps35-EhTom1 interaction was calculated as $\Delta G = -986.8$ (Figure 4B). The EhVps35 predicted residues that interacted with EhTom1 were K65, Y68, Q75, D157, D209, R212, Q216, R220, Q223, N227, S266, K302, E311, E312, D316, P317, and R321. Meanwhile, in EhTom1, there were M1, L2, M3, N4, L5, L8, D175, E176, C177, E178, Q179, I181, C184, Q185, F186, L187, Y193, L197, R227, and D230. R227 and D230 were located in the EhTom1GAT domain (Figures 4B, C), a ubiquitin-binding domain

(Bañuelos et al., 2022). The majority of the EhTom1 residues that interacted with EhVps35 were located between the VHS and GAT domains (Figure 4C), suggesting that the binding of EhVps35-EhTom1 does not interfere with EhTom1 binding to other proteins.

The docking analysis also predicted that EhVps35 interacts with EhVps23 with an overall free energy of $\Delta G = -1082.46$ (Figure 4B). The EhVps35 predicted residues that interact with EhVps23 were R3, E13, E14, Q16, Y105, R109, E137, K147, K192, L197, R196, R202, D203, and C251; while in EhVps23 they were E49, R66, E93, Q142, Q144, N145, S146, T149, Q152, S188, S197, Q201, Y202, T336, S345, and Y490. Only three residues appeared in the EhVps23 UEV domain (E49, R66, and E94), and one residue (Y490) in the Vps23 core domain. The majority of the EhVps23 predicted residues were located between the UEV and Vps23 core domains, suggesting that EhVps23-EhVps35 binding does not interfere with EhVps23 binding to other ESCRT proteins and other molecules such as EhUbiquitin (EhUb) and LBPA (Galindo et al., 2021) (Figure 4C). The EhVps23 UEV domain participates in the binding to EhUb, EhVps36, EhVps32, and EhADH (Galindo et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2023); meanwhile, in other organisms, the Vps23 core domain is responsible for congregating other ESCRT proteins (Kostelansky et al., 2007).

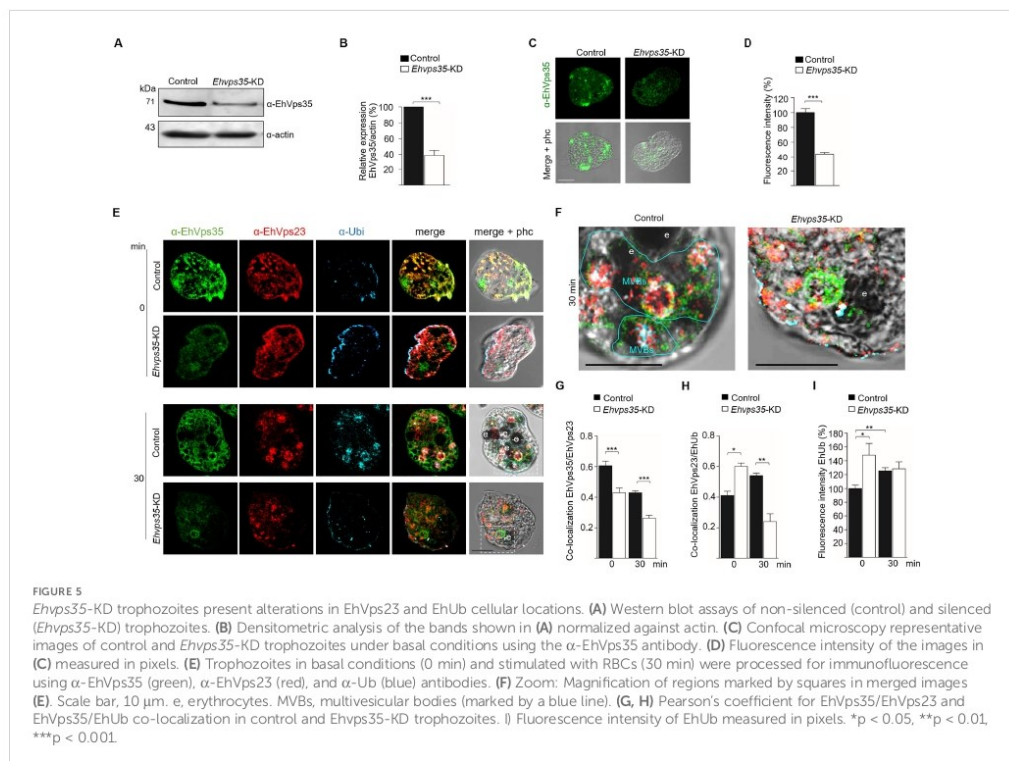
The EhVps35-EhVps32 interaction showed a global free energy of $\Delta G = -845.5$ (Figure 4B). The predicted residues of EhVps35 interacting with EhVps32 were S2, R3, Q5, R6, D7, S8, V9, S12, Q16, K21, R25, and H69; while in EhVps32, they were D121, N126, N127, H131, L137, E139, D140, L141, Q142, D143, D145, E148, and L149, located in the EhVps32 Snf7 domain (Figure 4C). The majority of the EhVps32 residues (D121, N127, H131, L137, E139, D140, L141, Q142, D145, and E148) are in the same site as those that interact with EhVps23 (Galindo et al., 2021), suggesting that the EhVps35-EhVps32 interaction prevents the EhVps23-EhVps32 union, or that a fast connection of these pair proteins occurs at a certain time. The amino acid location of the selected ESCRT proteins to predict their binding to EhVps35 are depicted in the scheme in Figures 4C, D. Some data were obtained from our docking analysis and other data from reports in the literature (Nakada-Tsukui et al., 2005; Castellanos-Castro et al., 2016; Montañó et al., 2017; Srivastava et al., 2017; Galindo et al., 2021; Díaz-Hernández et al., 2023; Díaz-Valdez et al., 2024).

These results strongly suggest an association of the retromer proteins with the ESCRT machinery as shown in the scheme depicted in Figures 4C, D. It has already been reported that several of these proteins are involved in phagocytosis (Arroyo and Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Avalos-Padilla et al., 2015,

2018; Galindo et al., 2021) and in other virulence events of *E. histolytica* (Galindo et al., 2022).

3.4 *EhVps35* gene knockdown (*EhVps35*-KD) alters the cellular location of some ESCRT machinery components

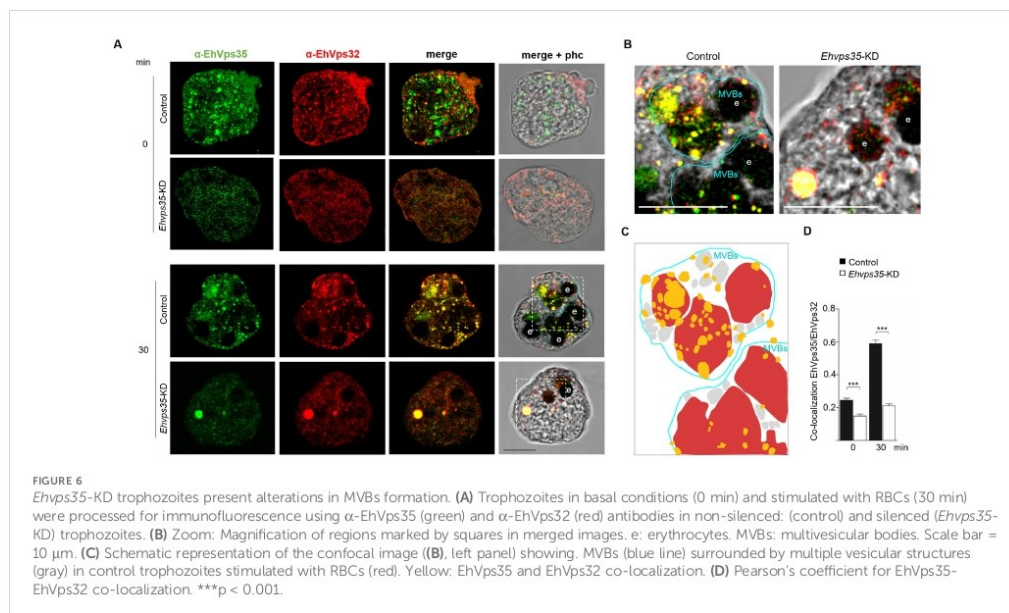
We have recently reported that the *EhVps35*-KD gene alters the trophozoite localization of EhADH (Díaz-Valdez et al., 2024). To study the effect of *EhVps35*-KD trophozoites on EhVps23 and EhVps32, we obtained *EhVps35*-KD trophozoites as previously described (Díaz-Valdez et al., 2024). In concordance with previous experiments (Díaz-Valdez et al., 2024), the Western blot and confocal immunofluorescence assays evidenced a 60% reduction in the EhVps35 protein expression in the newly obtained *EhVps35*-KD trophozoites (Figures 5A–D). To explore the impact of *EhVps35*-KD on the localization and function of the EhVps23 and EhVps32 proteins, we performed pulse-chase erythrophagocytosis assays as described in the materials and methods section. After 30 min of phagocytosis, we searched, by confocal microscopy, for the EhVps35 and EhVps23 proteins, using the α -EhVps35 and α -EhVps23 antibodies. We also analyzed the EhUb localization because



EhVps23 frequently binds to ubiquitinated proteins for the recruitment of other ESCRT machinery components (Galindo et al., 2021). The results obtained using non-silenced (control) trophozoites in basal conditions showed a poor signal for α -Ub, whereas α -EhVps35 and α -EhVps23 recognized small spots in the plasma membrane and cytoplasmic vesicular structures. The antibodies co-localized the EhVps35, EhVps23, and EhUb proteins at discrete points in the plasma membrane, but poor co-localization was detected in the cytoplasm. However, EhVps35 and EhVps23 were co-localized in dots and in circular structures (Figure 5E) while EhVps23 and EhUb appeared as small points near the plasma membrane, as described (Galindo et al., 2021). In contrast, in *EhVps35*-KD trophozoites, EhVps35 exhibited a low signal, while the localization of EhVps23 increased in the plasma membrane where it mostly co-localized with EhUb (Figure 5E). After 30 min of phagocytosis, the cellular location of these proteins changed. EhVps35, EhVps23, and EhUb appeared in the cytoplasm in non-silenced trophozoites, co-localizing around the phagosomes. In addition, the α -Ub signal was augmented, possibly due to the ubiquitination of several proteins involved in different steps of phagocytosis. We also observed the co-localization of the three proteins in structures that could correspond to MVBs (Figures 5E, F). In contrast, in *EhVps35*-KD trophozoites, the EhVps35, EhVps23, and EhUb proteins were poorly co-localized and only appeared in small vesicular structures (Figures 5E–H). It is worth mentioning that EhUb recognition by EhVps23 initiates the ESCRT machinery component recruitment for MVBs formation (Galindo et al., 2021). Our data evidenced that *EhVps35* gene silencing affects the EhUb location and fluorescence intensity (Figures 5E, I) and it alters both the localization

and recruitment of other members of the ESCRT machinery components and the subsequent MVBs formation.

The effect of *EhVps35*-KD on the location of EhVps23 and EhUb could also impact EhVps32 cellular localization, an ESCRT-III component that regulates the intraluminal vesicles (ILVs) (Avalos-Padilla et al., 2018). We proceeded to analyze, by confocal microscopy, whether the cellular location of EhVps32 was also affected in *EhVps35*-KD trophozoites. Our results showed no co-localization of EhVps35 and EhVps32 in basal conditions. Both proteins appeared in vesicular structures in the cytoplasm, and, in some cells, EhVps32 presented polarization to a membrane pole. In *EhVps35*-KD trophozoites, fluorescence staining was poorly observed with the α -EhVps35 antibody, and the EhVps32 protein appeared dispersed in the cytoplasm (Figure 6A). Interestingly, after 30 min of erythrophagocytosis in the control trophozoites, EhVps35 and EhVps32 appeared together in MVBs (Figures 6A–D). In contrast, in *EhVps35*-KD trophozoites, EhVps35 and EhVps32 were co-localized only in cytoplasmic vacuoles, and no MVBs were visualized (Figures 6A, D). Previous studies in human cells have reported that *Hsvps35* gene silencing causes an alteration in the ESCRT machinery functions (Filippone et al., 2021a; Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022). Our results suggest that in *E. histolytica*, EhVps35 also indirectly participates in the recruitment of the ESCRT machinery, because in *EhVps35*-KD trophozoites, EhUb (a key initiator molecule for this process) had an aberrant cellular location. In addition, from our results, it was logical to assume that these alterations affect virulence processes in the parasite.



3.5 Migration is affected in *EhVps35*-KD trophozoites

EhVps23 is key for trophozoite migration (Galindo et al., 2022) and the experiments performed in this study have shown that the *EhVps35*-KD gene affects EhVps23 cellular location and MVBs formation. In addition, we have reported that *EhVps35*-KD causes an alteration in the cytoskeleton, a key element in movement (Diaz-Valdez et al., 2024). Furthermore, there are reports that indicate that, in cancer human cells, *Hsvps35* gene silencing reduces the ability of the cells to migrate (Liu et al., 2012; Tan et al., 2022). We proceeded to investigate whether the *EhVps35*-KD trophozoites presented with decreased motility, using a chemoattractant in Transwell filters (Bolaños et al., 2016). Trophozoites were placed in the upper chamber of the filters, and the lower chamber was charged with 500 μ l of bovine serum. Migration was measured by the ability of the trophozoites to move to the chemoattractant. After 3 h incubation at 37°C, the *EhVps35*-KD trophozoites showed an 80% decrease in their capacity to migrate toward the chemoattractant compared to the migration of the control trophozoites (Figures 7A, B). These results strongly suggest that EhVps35 is strongly involved in the motility signaling pathways involved in migration. This could explain the high number of motility- and cytoskeleton-involved proteins detected in the mass spectrometry analysis presented in Figure 1.

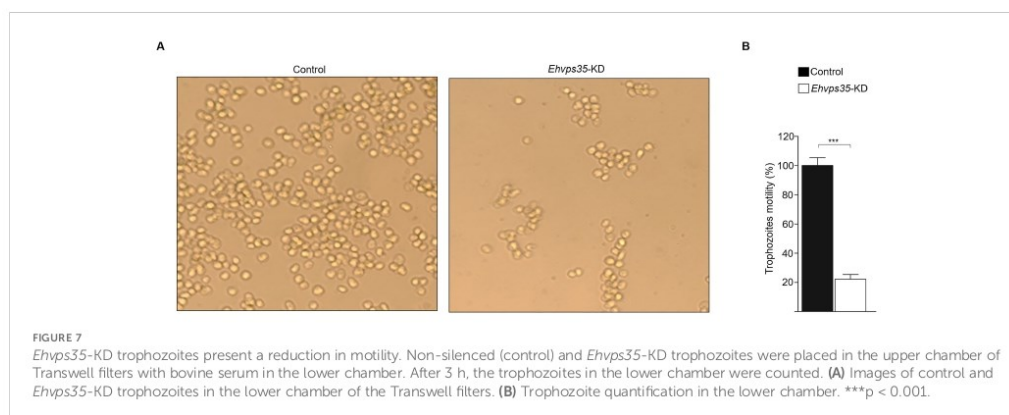
3.6 *EhVps35*-KD trophozoites showed decreased *in vivo* virulence

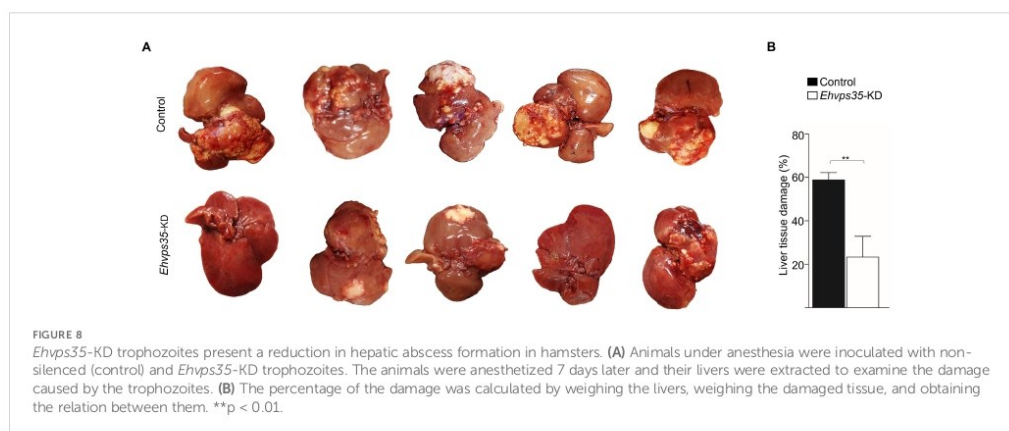
E. histolytica movement is a key element for trophozoites to invade and reach different organs such as the liver where they cause hepatic abscesses. We investigated the ability of *EhVps35*-KD trophozoites to produce hepatic abscesses in hamsters. The animals were anesthetized and intraperitoneally inoculated with either control or *EhVps35*-KD trophozoites. After 7 days of inoculation, the control animals presented with bristly hair and abdominal inflammation, and appeared depressed, while the animals

inoculated with *EhVps35*-KD trophozoites appeared healthy. Thus, under deep anesthesia, we examined their livers. The results showed that the control trophozoites produced a huge number of abscesses, whereas the *EhVps35*-KD trophozoites caused only a few small ones (Figure 8A). Quantification of the healthy and damaged tissue showed that the control trophozoites damaged approximately 58.8% of the liver tissue, while the hamsters inoculated with the same number of *EhVps35*-KD trophozoites presented with only approximately 23.3% of the tissue damaged (Figure 8B). The decrease in liver damage presented by the *EhVps35*-KD trophozoites could be related to their motility impairment and to the alteration of the cellular location of EhVps23. It has been reported that when the *EhVps23* gene is overexpressed, the hepatic abscesses are exacerbated (Galindo et al., 2022). Our results suggest that EhVps35 is a key protein for the correct localization and function of the ESCRT machinery components, and they strengthened the assumption that the relationship between both complexes is crucial for virulence mechanism expression in *E. histolytica*. In addition, they influence other vital functions of trophozoites.

4 Discussion

Herein, we studied the relationship of the EhVps35 protein, the central member of the retromer (Nakada-Tsukui et al., 2005; Watanabe et al., 2020), with the ESCRT machinery. We selected EhVps35 for our study because experimental evidence suggests that Vps35 participates in multiple key cellular events involved in pathogenesis in different systems: i) in humans, HsVps35 is a malignant cancer marker since it induces cell growth, motility, and the invasion capacity of cancer cells (Liu et al., 2020; Tan et al., 2022); ii) HsVps35 is also related to EVs formation and secretion (Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022); iii) in *E. histolytica*, EhVps35 actively participates in vesicular trafficking, specifically in the recycling of plasma membrane-associated proteins (Diaz-Valdez et al., 2024). Therefore, this protein might be involved in several trophozoite virulence functions (Diaz-Valdez et al., 2024). Knowledge of





EhVps35 functions in virulence mechanisms provides an excellent tool for discovering interconnections among proteins and cellular events. Hence, the molecular characterization of this protein could help in the development of strategies for the detection of amoebiasis and treatment designs to combat it.

Our work provides evidence on: i) the involvement of ESCRT machinery and retromer proteins in vesicular trafficking, phagocytosis, secretion, and motility, clue events in virulence mechanisms (Supplementary Tables S1–S4); ii) the effect of RBCs-stimulus on *EhVps35* secretion (Figure 2); iii) the presence of *EhVps35* together with *EhVps23* and *EhADH* in EVs (Figure 3); iv) the interaction of *EhVps35* with the *Tom1* (ESCRT-0), *EhVp23* (ESCRT-I), and *EhVps32* (ESCRT-III) proteins (Figure 4); v) the low expression of *EhVps35* caused changes in the cellular localization of *EhVps23* and *EhVps32*, which negatively impacts MVBs formation (Figures 5, 6); and, interestingly, vi) the reduction in trophozoite motility and hepatic abscess formation in cells poorly expressing *EhVps35*, suggesting that the retromer is an important player in tissue invasion (Figures 7, 8). In total, 57.3% of the 300 proteins that were detected by mass spectrometry to interact with the *EhVps35* protein are related to secretion, motility, and phagocytosis, highlighting the importance of the retromer in these events. All of the events require the main retromer functions: selection, sorting, and recycling.

In humans, TSG101 (*Vps23* in other organisms) has been considered an exosome marker (Anand et al., 2019) and *Vps35* secretion in EVs has been used a malignant marker in cancer cells and in neurodegenerative diseases, where the EVs secretion is of great importance for intercellular communication and the prognosis of these diseases (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2018; Ferraiuolo et al., 2020; Filippone et al., 2021b, 2021a; Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022). In fact, there are reports suggesting that *HsVps35* impacts EV formation in humans (Gross et al., 2012; Tan et al., 2022). During infection, the *E. histolytica* trophozoites can migrate from the intestine to the liver and other organs in a similar process to the metastasis of cancer cells (Orozco et al., 1994; Leroy et al., 1995). Our results from the immunoprecipitation assays using α -*EhVps35* antibody and mass spectrometry, showed that 33% of the identified

proteins corresponded to proteins detected by (Sharma et al., 2020) in *E. histolytica* EVs, including *EhVps35* (Figure 1). *EhADH*, *EhVps23*, and *EhVps35* were detected in vesicles and could correspond to the exosomes generated as a result of the release of MVBs intraluminal vesicles, formed through the ESCRT machinery. These findings also suggest the participation of the retromer and ESCRT components in intercellular communication in *E. histolytica* trophozoites using EVs as a transportation medium, an event that has been poorly studied in this parasite. Furthermore, a low expression of *EhVps35* caused a decrease in the phagocytic capacity of the trophozoites (Díaz-Valdez et al., 2024). At the same time, there was an increase in *EhVps35* secretion in the RBCs-stimulus trophozoites, evidencing retromer participation in phagocytosis (Figures 2, 3). Multiple proteins of the ESCRT machinery and the retromer exhibit re-localization to different cellular structures during phagocytosis in trophozoites (Arroyo and Orozco, 1987; Garcia-Rivera et al., 1999; Nakada-Tsukui et al., 2005; Avalos-Padilla et al., 2015, 2018; Ocádiz-Ruiz et al., 2016; Srivastava et al., 2017; Watanabe et al., 2020; Galindo et al., 2021, 2022; Díaz-Hernández et al., 2023; Díaz-Valdez et al., 2024).

We have further analyzed the interaction of *EhVps35* with the ESCRT machinery proteins, performing immunoprecipitation assays using the α -*EhVps35* antibody, Western blot, and molecular docking analysis. The results showed that *EhVps35* interacts with ESCRT-0 (*EhTom1*), ESCRT-I (*EhVps23*), ESCRT-III (*EhVps32*), and ESCRT accessory proteins (*EhADH*) (Figure 4). This assumption is supported by Galindo et al. (2021) results on the interaction between *EhVps23*-*EhVps32* and *EhVps23*-*EhADH*. In addition, *EhTom1* and *EhVps23* have domains that allow interaction with ubiquitinated proteins, an event that initiates the recruitment of other ESCRT machinery components. However, we do not know if these are direct or indirect interactions and we assume that these interactions are highly dynamic and fast as a part of the chain of events presented during phagocytosis.

Furthermore, *Ehvps35*-KD in trophozoites produced an impairment in *EhVps23* and *EhVps32* cellular localization and a decrease in MVBs formation (Figures 5, 6). These results strongly support that the function of both complexes is codependent, as has

been reported for humans and *D. melanogaster* (Dukes et al., 2011; Pannen et al., 2020; Walsh et al., 2021; Tan et al., 2022). Interestingly, low expression of EhVps35 led to the aberrant localization of EhUb and augmentation of fluorescence intensity in basal conditions, which is related to the altered localization of EhVps23 and EhVps32. This agrees with reports in human neuronal cells, where a reduction in HsVps35 expression causes an alteration in the degradation pathways, provoking an accumulation of the ubiquitin mark (Filippone et al., 2021b, 2021a). Our results suggest that in *E. histolytica*, EhVps35 has a role in protein degradation mediated by the ESCRT machinery (Díaz-Valdez et al., 2024).

The HsVps35, TSG101, and CHMP6 (orthologous of EhVps35, EhVps23, and EhVps32) proteins have been widely studied in multiple cellular processes, such as cell migration, secretion, and cell proliferation in cancer (Zhang et al., 2018; Liu et al., 2020; Tan et al., 2022). In addition, several of the *E. histolytica* ESCRT proteins have been related to virulence mechanisms (cell proliferation, secretion, phagocytosis, motility, and hepatic abscess formation) (Arroyo and Orozco, 1987; García-Rivera et al., 1999; Bañuelos et al., 2012; Avalos-Padilla et al., 2015, 2018; Ocadiz-Ruiz et al., 2016; Galindo et al., 2021, 2022; Díaz-Hernández et al., 2023). This is supported by the results obtained using *Ehvps35*-KD trophozoites, where we observed a reduction in their motility and in their ability to cause hepatic abscesses, strengthening the presumption that this protein plays a key role in the virulence of *E. histolytica* (Figures 7, 8).

In conclusion, our work provides an overview and presents experimental evidence of the complex interactions between EhVps35 and the ESCRT machinery proteins during phagocytosis and protein transport to different cellular compartments in *E. histolytica*, impacting their virulence. This primitive protozoan is an excellent model in which to study vesicular transport to further explore retromer functions and other cellular mechanisms. Furthermore, the impact of EhVps35 on hepatic abscess formation and migration of *E. histolytica* will reveal new targets for anti-amoebiasis drug design.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by CINVESTAV fulfills the standard of the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) "Technical Specifications for the Care and Use of Laboratory Animals", based on the Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals ("The Guide," 2011, NRC, USA with the Federal Register Number BOO.02.03.02.01.908), awarded by the National Service for Agrifood Health, Safety and Quality (SENASICA). This organization verifies the state of compliance of such NOM in Mexico and belongs to the Ministry of Agriculture and Rural Development. The Institutional Committee for Animal Care and Use (IACUC/Ethics committee) from CINVESTAV, the regulatory office for research protocols approval involving the use of laboratory animals, reviewed, and approved all animal experiments (Protocol Number 0505-12, CICUAL 001). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The human samples used in this study were acquired from primarily isolated as part of your previous study for which ethical approval was obtained. Written informed consent for participation was not required from the participants or the participants' legal guardians/next of kin in accordance with the national legislation and institutional requirements. The animal studies were approved by CINVESTAV fulfills the standard of the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) "Technical Specifications for the Care and Use of Laboratory Animals", based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ("The Guide," 2011, NRC, USA with the Federal Register Number BOO.02.03.02.01.908), awarded by the National Service for Agrifood Health, Safety and Quality (SENASICA). This organization verifies the state of compliance of such NOM in Mexico and belongs to the Ministry of Agriculture and Rural Development. The Institutional Committee for Animal Care and Use (IACUC/Ethics committee) from CINVESTAV, the regulatory office for research protocols approval involving the use of laboratory animals, reviewed, and approved all animal experiments (Protocol Number 0505-12, CICUAL 001). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Author contributions

JD-V: Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing, Data curation, Methodology, Writing – original draft. RJ-R: Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. AG: Data curation, Methodology, Writing – review & editing. LS-V: Investigation, Methodology, Writing – review & editing. SM: Data curation, Methodology, Writing – review & editing. EO: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare that no financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Acknowledgments

We are grateful to Zootechnical Veterinary Doctor Benjamin Emmanuel Chávez Alvarez for his support in the inoculation techniques in laboratory animals. Additionally, we thank Emmanuel Rios Castro from the Proteomics Unit of LaNSE (Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales) at CINVESTAV for his technical support in the mass spectrometry analysis.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Anand, S., Samuel, M., Kumar, S., and Mathivanan, S. (2019). Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom* 1867, 1–10. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.02.005
- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 151–158. doi: 10.1016/0166-6851(87)90150-2
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., et al. (2015). EhVps32 is a vacuole-associated protein involved in pinocytosis and phagocytosis of Entamoeba histolytica. *PLoS Pathog.* 11, e1005079. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005079
- Avalos-Padilla, Y., Knorr, R. L., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Lipowsky, R., Dimova, R., et al. (2018). The conserved ESCRT-III machinery participates in the phagocytosis of Entamoeba histolytica. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 8. doi: 10.3389/fcimb.2018.00053/FULL
- Bañuelos, C., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Galindo, A., and Orozco, E. (2022). Molecular interplays of the Entamoeba histolytica endosomal sorting complexes required for transport during phagocytosis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 12, 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2022.855797/FULL
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., et al. (2012). EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the Entamoeba histolytica multivesicular bodies pathway. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–15. doi: 10.1155/2012/657942
- Bolaños, J., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Huerta, M., Pais-Morales, J., et al. (2016). EhNPC1 and ehNPC2 proteins participate in trafficking of exogenous cholesterol in Entamoeba histolytica trophozoites: relevance for phagocytosis. *PLoS Pathog.* 12, e1006089. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1006089
- Castellanos-Castro, S., Montaña, S., and Orozco, E. (2016). Data on docking and dynamics simulation of Entamoeba histolytica EhADH (an ALIX protein) and lysobisphosphatidic acid. *Data Brief* 7, 457–459. doi: 10.1016/j.dib.2016.02.067
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* 20, 45–50. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTG371
- Cullen, P. J., and Steinberg, F. (2018). To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 679–696. doi: 10.1038/s41580-018-0053-7
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431–432. doi: 10.1016/0035-9203(78)90144-X
- Díaz-Hernández, M., Javier-Reyna, R., Martínez-Valencia, D., Montaña, S., and Orozco, E. (2023). Dynamic Association of ESCRT-II Proteins with ESCRT-I and ESCRT-III Complexes during Phagocytosis of Entamoeba histolytica. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 1–22. doi: 10.3390/IJMS24065267/S1
- Díaz-Valdez, J., Javier-Reyna, R., Montaña, S., Talamás-Lara, D., and Orozco, E. (2024). EhVps35, a retromer component, is involved in the recycling of the EhADH and Gal/GalNAc virulent proteins of Entamoeba histolytica. *Front. Parasitol.* 3, 1–22. doi: 10.3389/fpara.2024.1356601
- Dukes, J. D., Fish, L., Richardson, J. D., Blaikley, E., Burns, S., Caunt, C. J., et al. (2011). Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 22, 3192. doi: 10.1091/mbc.E11-04-0343

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2024.1467440/full#supplementary-material>

- Ferraiuolo, R. M., Manthey, K. C., Stanton, M. J., Triplett, A. A., and Wagner, K. U. (2020). The multifaceted roles of the tumor susceptibility gene 101 (TSG101) in normal development and disease. *Cancers (Basel)* 12, 1–16. doi: 10.3390/CANCERS12020450
- Filippone, A., Li, J. G., Praticò, D., and Mecocci, P. (2021a). VPS35 down regulation alters degradation pathways in neuronal cells. *J. Alzheimers Dis.* 84, 1079. doi: 10.3233/JAD-210701
- Filippone, A., Smith, T., and Praticò, D. (2021b). Dysregulation of the retromer complex in brain endothelial cells results in accumulation of phosphorylated tau. *J. Inflamm. Res.* 14, 7455. doi: 10.2147/JIR.S342096
- Frederick, J. R., and Petri, W. A. (2005). Roles for the galactose-N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology* 15, 53R–59R. doi: 10.1093/GLYCOB/CWJ007
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., et al. (2022). EhVps23, an ESCRT-I member, is a key factor in secretion, motility, phagocytosis and tissue invasion by Entamoeba histolytica. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.835654/BIBTEX
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Montaña, S., Ortega-Lopez, J., et al. (2021). EhVps23: A component of ESCRT-I that participates in vesicular trafficking and phagocytosis of Entamoeba histolytica. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.770759/BIBTEX
- Galindo-Olea, A. (2022). *Los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I en Entamoeba histolytica y su papel en la virulencia* (Ciudad de México: CINVESTAV-IPN). Available online at: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4102> (Accessed February 21, 2024).
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., et al. (1999). Entamoeba histolytica: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* 33, 556–568. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x
- García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E., and Guameros, G. (1982). Isolation of clones of E. histolytica deficient in adhesion to human erythrocytes. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 13, 129–136.
- Gras, S., Jimenez-Ruiz, E., Klinger, C. M., Schneider, K., Klingl, A., Lemgruber, L., et al. (2019). An endocytic-secretory cycle participates in Toxoplasma gondii in motility. *PLoS Biol.* 17, e3000060. doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000060
- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 1036–1045. doi: 10.1038/ncb2574
- Huang, J., and Mackerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 34, 2135–2145. doi: 10.1002/JCC.23354
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph* 14, 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Kostelansky, M. S., Schluter, C., Tam, Y. Y. C., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., et al. (2007). Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129, 485. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.016
- Koukos, P. I., and Glykos, N. M. (2013). Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories. *J. Comput. Chem.* 34, 2310–2312. doi: 10.1002/JCC.23381
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., et al. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Structure Function Bioinf.* 81, 2159–2166. doi: 10.1002/PROT.24403

- Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G., Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M. L., and Thornton, J. M. (1997). PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.* 22, 488–490. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01140-7
- Leroy, A., Mareel, M., De Bruyne, G., Bailey, G., and Nelis, H. (1995). Metastasis of *Entamoeba histolytica* compared to colon cancer: one more step in invasion. *Invasion Metastasis* 14, 177–191.
- Leung, K. F., Dacks, J. B., and Field, M. C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery: retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 9, 1698–1716. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x
- Li, G. Z., Vissers, J. P. C., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V., and Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* 9, 1696–1719. doi: 10.1002/PMIC.200800564
- Liu, Y., Deng, H., Liang, L., Zhang, G., Xia, J., Ding, K., et al. (2020). Depletion of VPS35 attenuates metastasis of hepatocellular carcinoma by restraining the Wnt/PCP signaling pathway. *Genes Dis.* 8, 232–240. doi: 10.1016/j.gendis.2020.07.009
- Liu, T. T., Gomez, T. S., Sackey, B. K., Billadeau, D. D., and Burd, C. G. (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol. Biol. Cell* 23, 2505–2515. doi: 10.1091/mbc.E11-11-0915/ASSET/IMAGES/LARGE/2505FIG8.JPEG
- Mancilla-Olea, M. I., Ortega-López, J., Figueroa-Angulo, E. E., Avila-González, L., Cárdenas-Guerra, R. E., Miranda-Ozuna, J. F. T., et al. (2018). *Trichomonas vaginalis* cathepsin D-like aspartic proteinase (Tv-CatD) is positively regulated by glucose and degrades human hemoglobin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 97, 1–15. doi: 10.1016/j.bioce.2018.01.015
- 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. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35, 486–503. doi: 10.1080/07391102.2016.1151831
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell* 16, 5294–5303. doi: 10.1091/mbc.E05-04-0283
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Linford, A. S., Yoshino, T. P., Orozco, E., and Rodríguez, M. A. (2016). 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, 50–59. doi: 10.1017/S003118201500147X
- Orozco, E., Benitez-Bibriesca, L., and Hernandez, R. (1994). Invasion and metastasis mechanisms in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mutat. Research/Fundamental Mol. Mech. Mutagenesis* 305, 229–239. doi: 10.1016/0027-5107(94)90243-7
- Pais-Morales, J., Betanzos, A., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Shibayama, M., and Orozco, E. (2016). Resveratrol induces apoptosis-like death and prevents *in vitro* and *in vivo* virulence of *entamoeba histolytica*. *PLoS One* 11, 1–23. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0146287
- Pannen, H., Rapp, T., and Klein, T. (2020). The ESCRT machinery regulates retromer-dependent transcytosis of septate junction components in *Drosophila*. *Elife* 9, 1–66. doi: 10.7554/ELIFE.61866
- Petri, W. A., Haque, R., and Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 39–64. doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160959
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., et al. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* 153, 1–33. doi: 10.1063/1.50014475
- Ramírez-Flores, C. J., Cruz-Mirón, R., Arroyo, R., Mondragón-Castelán, M. E., Nopal-Guerrero, T., González-Pozos, S., et al. (2019). Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitol. Res.* 118, 289–306. doi: 10.1007/S00436-018-6163-5/METRICS
- Seaman, M. N. J. (2021). The retromer complex: from genesis to revelations. *Trends Biochem. Sci.* 46, 608–620. doi: 10.1016/j.tibs.2020.12.009
- Sharma, M., Morgado, P., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Manna, D., and Singh, U. (2020). Characterization of extracellular vesicles from *entamoeba histolytica* identifies roles in intercellular communication that regulates parasite growth and development. *Infect. Immun.* 88, 1–20. doi: 10.1128/IAI.00349-20
- Solis, C. F., Santi-Rocca, J., Perdomo, D., Weber, C., and Guillén, N. (2009). Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One* 4, 1–11. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008424
- Srivastava, V. K., Yadav, R., Watanabe, N., Tomar, P., Mukherjee, M., Gourinath, S., et al. (2017). Structural and thermodynamic characterization of metal binding in Vps29 from *Entamoeba histolytica*: implication in retromer function. *Mol. Microbiol.* 106, 562–581. doi: 10.1111/MML.13836
- Takiff, H. E., Chen, R. S.-M., Courtt, D. L., Morri-Son, P. T., Lovett, S. T., Gilson, L., et al. (1989). Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 2581–2590. doi: 10.1128/jb.171.5.2581-2590.1989
- Tan, W., Zhang, J., Liu, L., Liang, M., Li, J., Deng, Z., et al. (2022). Hsp90 Inhibitor STA9090 induced VPS35 related extracellular vesicle release and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Transl. Oncol.* 26, 1–17. doi: 10.1016/j.tranon.2022.101502
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 30, 3.22.1–3.22.29. doi: 10.1002/0471143030.CB0322S30
- Tomavo, S., Slomianny, C., Meissner, M., and Carruthers, V. B. (2013). Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. *PLoS Pathog.* 9, e1003629. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1003629
- van Niel, G., Carter, D. R. F., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., and Vader, P. (2022). Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 369–382. doi: 10.1038/s41580-022-00460-3
- Vietri, M., Radulovic, M., and Stenmark, H. (2019). The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 25–42. doi: 10.1038/s41580-019-0177-4
- Walsh, R. B., Dresselhaus, E. C., Becalska, A. N., Zunitz, M. J., Blanchette, C. R., Scialera, A. L., et al. (2021). Opposing functions for retromer and Rab11 in extracellular vesicle traffic at presynaptic terminals. *J. Cell Biol.* 220, 1–20. doi: 10.1083/jcb.202012034
- Wang, S., and Bellen, H. J. (2015). The retromer complex in development and disease. *Development* 142, 2392–2396. doi: 10.1242/DEV.123737
- Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2020). Two isoforms of phosphatidylinositol 3-phosphate-binding sorting nexins play distinct roles in trophocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 22, 1–16. doi: 10.1111/CMI.13144
- Williams, E. T., Glauser, L., Tsika, E., Jiang, H., Islam, S., and Moore, D. J. (2018). Parkin mediates the ubiquitination of VPS35 and modulates retromer-dependent endosomal sorting. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3189. doi: 10.1093/HMG/DDY224
- Yang, Y., Wang, M., Zhang, Y. Y., Zhao, S. Z., and Gu, S. (2022). The endosomal sorting complex required for transport repairs the membrane to delay cell death. *Front. Oncol.* 12. doi: 10.3389/FONC.2022.1007446/BIBTEX
- Zhang, H., Huang, T., Hong, Y., Yang, W., Zhang, X., Luo, H., et al. (2018). The retromer complex and sorting nexins in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.* 10. doi: 10.3389/FNAGI.2018.00079/BIBTEX

13. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., et al. (2016). *Biología Molecular De La Célula.*, 6th Edn. Barcelona: Omega.
- Aley, S. B., Cohn, Z. A., and Scott, W. A. (1984). Endocytosis in *Entamoeba histolytica*. Evidence for a unique non-acidified compartment. *Journal of Experimental Medicine* 160, 724–737. doi: 10.1084/JEM.160.3.724
- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23, 151–158. doi: 10.1016/0166-6851(87)90150-2
- Avalos-Padilla, Y., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., et al. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 11, e1005079. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005079
- Avalos-Padilla, Y., Knorr, R. L., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Lipowsky, R., Dimova, R., et al. (2018). The conserved ESCRT-III machinery participates in the phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 53. doi: 10.3389/FCIMB.2018.00053/FULL
- Babuta, M., Mansuri, M. S., Bhattacharya, S., and Bhattacharya, A. (2015). The *Entamoeba histolytica*, Arp2/3 Complex Is Recruited to Phagocytic Cups through an Atypical Kinase EhAK1. *PLoS Pathog* 11, e1005310. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1005310
- Balderhaar, H. J. K., Arlt, H., Ostrowicz, C., Bröcker, C., Sündermann, F., Brandt, R., et al. (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J Cell Sci* 123, 4085–4094. doi: 10.1242/JCS.071977
- Bañuelos, C., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., Galindo, A., and Orozco, E. (2022). Molecular interplays of the *Entamoeba histolytica* endosomal sorting complexes required for transport during phagocytosis. *Front Cell Infect Microbiol* 12. doi: 10.3389/FCIMB.2022.855797/FULL
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., et al. (2012). EhADH112 Is a Bro1 domain-containing protein involved in the *entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed Biotechnol* 2012, 1–15. doi: 10.1155/2012/657942
- Bartuzi, P., Billadeau, D. D., Favier, R., Rong, S., Dekker, D., Fedoseienko, A., et al. (2016). CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nature Communications* 2016 7:1 7, 1–11. doi: 10.1038/ncomms10961
- Bian, W., Jiang, H., Yao, L., Hao, W., Wu, L., and Li, X. (2023). A spatially defined human Notch receptor interaction network reveals Notch intracellular storage and Ataxin-2-mediated fast recycling. *Cell Rep* 42, 112819. doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112819
- Biller, L., Matthiesen, J., Kühne, V., Lotter, H., Handal, G., Nozaki, T., et al. (2014). The Cell Surface Proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics* 13, 132. doi: 10.1074/MCP.M113.031393

- Bilodeau, P. S., Urbanowski, J. L., Winistorfer, S. C., and Piper, R. C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 4, 534–539. doi: 10.1038/NCB815
- Bolaños, J., Betanzos, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Huerta, M., Pais-Morales, J., et al. (2016). EhNPC1 and EhNPC2 Proteins Participate in Trafficking of Exogenous Cholesterol in *Entamoeba histolytica* Trophozoites: Relevance for Phagocytosis. *PLoS Pathog* 12, e1006089. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1006089
- Bonifacino, J. S., and Hurley, J. H. (2008). Retromer. *Curr Opin Cell Biol* 20, 427–436. doi: 10.1016/J.CEB.2008.03.009
- Brandizzi, F., and Barlowe, C. (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 382–392. doi: 10.1038/NRM3588
- Brodin, L., and Shupliakov, O. (2018). Retromer in Synaptic Function and Pathology. *Front Synaptic Neurosci* 10, 419761. doi: 10.3389/FNSYN.2018.00037/BIBTEX
- Canuel, M., Lefrancois, S., Zeng, J., and Morales, C. R. (2008). AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 724–730. doi: 10.1016/J.BBRC.2007.12.015
- Carnell, M., Zech, T., Calaminus, S. D., Ura, S., Hagedorn, M., Johnston, S. A., et al. (2011). Actin polymerization driven by WASH causes V-ATPase retrieval and vesicle neutralization before exocytosis. *Journal of Cell Biology* 193, 831–839. doi: 10.1083/JCB.201009119/VIDEO-4
- Castellanos-Castro, S., Cerda-García-Rojas, C. M., Javier-Reyna, R., Pais-Morales, J., Chávez-Munguía, B., and Orozco, E. (2016a). Identification of the phospholipid lysobisphosphatidic acid in the protozoan *Entamoeba histolytica*: An active molecule in endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 5, 224–236. doi: 10.1016/J.BBREP.2015.12.010
- Castellanos-Castro, S., Montaña, S., and Orozco, E. (2016b). Data on docking and dynamics simulation of *Entamoeba histolytica* EhADH (an ALIX protein) and lysobisphosphatidic acid. *Data Brief* 7, 457–459. doi: 10.1016/J.DIB.2016.02.067
- Cereghino, J. L., Marcusson, E. G., and Emr, S. D. (1995). The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol Biol Cell* 6, 1089. doi: 10.1091/MBC.6.9.1089
- Chávez-Munguía, B., Espinosa-Cantellano, M., Castañón, G., and Martínez-Palomo, A. (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 31, S165–S167. doi: 10.1016/S0188-4409(00)00158-2
- Chen, D., Xiao, H., Zhang, K., Wang, B., Gao, L., Jian, Y., et al. (2010). Retromer is required for apoptotic cell clearance by phagocytic receptor recycling. *Science* 327, 1261–1264. doi: 10.1126/SCIENCE.1184840
- Chierogatti, E., and Meldolesi, J. (2005). Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 181–187. doi: 10.1038/NRM1572

- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2017). Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem Sci* 42, 42–56. doi: 10.1016/J.TIBS.2016.08.016
- Collins, B. M., Skinner, C. F., Watson, P. J., Seaman, M. N. J., and Owen, D. J. (2005). Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* 2005 12:7 12, 594–602. doi: 10.1038/nsmb954
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* 20, 45–50. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTG371
- Constantino-Jonapa, L. A., Hernández-Ramírez, V. I., Osorio-Trujillo, C., and Talamás-Rohana, P. (2018). EhRab21 mobilization during erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Microsc Res Tech* 81, 1024–1035. doi: 10.1002/JEMT.23069
- Cuartero, Y., Mellado, M., Capell, A., Álvarez-Dolado, M., and Verges, M. (2012). Retromer regulates postendocytic sorting of β -secretase in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic* 13, 1393–1410. doi: 10.1111/J.1600-0854.2012.01392.X
- Cullen, P. J. (2008). Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008 9:7 9, 574–582. doi: 10.1038/nrm2427
- Damen, E., Krieger, E., Nielsen, J. E., Eygensteyn, J., and Van Leeuwen, J. E. M. (2006). The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide. *Biochem J* 398, 399–409. doi: 10.1042/BJ20060033
- Derivery, E., Helfer, E., Henriot, V., and Gautreau, A. (2012). Actin polymerization controls the organization of WASH domains at the surface of endosomes. *PLoS One* 7. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0039774
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J. J., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell* 17, 712–723. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2009.09.010
- Díaz-Hernández, M., Javier-Reyna, R., Martínez-Valencia, D., Montaña, S., and Orozco, E. (2023). Dynamic Association of ESCRT-II Proteins with ESCRT-I and ESCRT-III Complexes during Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Int J Mol Sci* 24, 1–22. doi: 10.3390/IJMS24065267/S1
- Díaz-Valdez, J. (2018). La proteína EhVps35 durante la eritrofagocitosis en *Entamoeba histolytica*. Ciudad de México: CINVESTAV-IPN. Available at: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1059> (Accessed July 22, 2024).
- Doyette, A., Russel, M. R. G., Hopkins, C. R., and Woodman, P. G. (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian ‘Class E’ compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* 118, 3003–3017. doi: 10.1242/JCS.02421
- Dukes, J. D., Fish, L., Richardson, J. D., Blaikley, E., Burns, S., Caunt, C. J., et al. (2011). Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling

- of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22, 3192. doi: 10.1091/MBC.E11-04-0343
- Eddidin, M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003 4:5 4, 414–418. doi: 10.1038/nrm1102
- Emmanuel, M., Nakano, Y. S., Nozaki, T., and Datta, S. (2015). Small GTPase Rab21 Mediates Fibronectin Induced Actin Reorganization in *Entamoeba histolytica*: Implications in Pathogen Invasion. *PLoS Pathog* 11, e1004666. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1004666
- Farmer, T., O'Neill, K. L., Naslavsky, N., Luo, X., and Caplan, S. (2019). Retromer facilitates the localization of Bcl-xL to the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 30, 1138–1146. doi: 10.1091/MBC.E19-01-0044
- Faust, D. M., and Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect* 14, 1428–1441. doi: 10.1016/J.MICINF.2012.05.013
- Filippone, A., Li, J. G., Praticò, D., and Mecocci, P. (2021a). VPS35 down regulation alters degradation pathways in neuronal cells. *J Alzheimers Dis* 84, 1079. doi: 10.3233/JAD-210701
- Filippone, A., Smith, T., and Pratico, D. (2021b). Dysregulation of the Retromer Complex in Brain Endothelial Cells Results in Accumulation of Phosphorylated Tau. *J Inflamm Res* 14, 7455. doi: 10.2147/JIR.S342096
- Finnigan, G. C., Hanson-Smith, V., Houser, B. D., Park, H. J., and Stevens, T. H. (2011). The reconstructed ancestral subunit a functions as both V-ATPase isoforms Vph1p and Stv1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 22, 3176–3191. doi: 10.1091/MBC.E11-03-0244/ASSET/IMAGES/LARGE/3176FIG10.JPEG
- Fjorback, A. W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C., et al. (2012). Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci* 32, 1467–1480. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2272-11.2012
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7, 61–98. doi: 10.1146/ANNUREV-PATHOL-011811-132445
- Franch-Marro, X., Wendler, F., Guidato, S., Griffith, J., Baena-Lopez, A., Itasaki, N., et al. (2008). Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/Sprinter by the retromer complex. *Nat Cell Biol* 10, 170–177. doi: 10.1038/NCB1678
- Frederick, J. R., and Petri, W. A. (2005). Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology* 15, 53R-59R. doi: 10.1093/GLYCOB/CWJ007
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2012). Novel Transmembrane Receptor Involved in Phagosome Transport of Lysozymes and β -Hexosaminidase in the Enteric Protozoan *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog* 8, e1002539. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002539
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2013a). Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 81, 1820–1829. doi: 10.1128/IAI.00915-12

- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2013b). Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 81, 1820–1829. doi: 10.1128/IAI.00915-12
- Fuse, A., Furuya, N., Kakuta, S., Inose, A., Sato, M., Koike, M., et al. (2015). VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process. *FEBS Lett* 589, 1430–1436. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2015.04.040
- Galindo A. (2016). Identificación de las proteínas Tom1 y Vps23 en *Entamoeba histolytica*. Ciudad de Mexico: CINVESTAV-IPN. Available at: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1062> (Accessed October 3, 2024).
- Galindo A. (2022). Los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I en *Entamoeba histolytica* y su papel en la virulencia. Ciudad de México: CINVESTA-IPN. Available at: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4102> (Accessed June 19, 2024).
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., et al. (2022). EhVps23, an ESCRT-I Member, Is a Key Factor in Secretion, Motility, Phagocytosis and Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 835654. doi: 10.3389/FCIMB.2022.835654/BIBTEX
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Montaña, S., Ortega-Lopez, J., et al. (2021). EhVps23: A Component of ESCRT-I That Participates in Vesicular Trafficking and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 770759. doi: 10.3389/FCIMB.2021.770759/BIBTEX
- Galindo-Olea, A. (2022). Los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I en *Entamoeba histolytica* y su papel en la virulencia. Ciudad de México: CINVESTAV-IPN. Available at: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4102> (Accessed February 21, 2024).
- Gallon, M., Clairfeuille, T., Steinberg, F., Mas, C., Ghai, R., Sessions, R. B., et al. (2014). A unique PDZ domain and arrestin-like fold interaction reveals mechanistic details of endocytic recycling by SNX27-retromer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111. doi: 10.1073/PNAS.1410552111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201410552SI.PDF
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocadiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles, A., et al. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* 33, 556–568. doi: 10.1046/J.1365-2958.1999.01500.X
- García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E., and Guarneros, G. (1982). Isolation of clones of *E. histolytica* deficient in adhesion to human erythrocytes. *Arch Invest Med (Mex)* 13, 129–136. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6295303/> (Accessed October 19, 2023).
- Ghosh, S. K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R., et al. (1999). Chitinase Secretion by Encysting *Entamoeba invadens* and Transfected *Entamoeba histolytica* Trophozoites: Localization of Secretory Vesicles, Endoplasmic Reticulum, and Golgi Apparatus. *Infect Immun* 67, 3073. doi: 10.1128/IAI.67.6.3073-3081.1999

- Gilmartin, A. A., Ralston, K. S., and Petri, W. A. (2017). Inhibition of Amebic lysosomal acidification blocks amebic trophocytosis and cell killing. *mBio* 8. doi: 10.1128/MBIO.01187-17/ASSET/2BB44F2C-45D6-4E64-9186-572DD4070E85/ASSETS/GRAPHIC/MBO0041734570003.JPEG
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2016.02.026
- Gras, S., Jimenez-Ruiz, E., Klinger, C. M., Schneider, K., Klingl, A., Lemgruber, L., et al. (2019). An endocytic-secretory cycle participates in *Toxoplasma gondii* in motility. *PLoS Biol* 17, e3000060. doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000060
- Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M., and Qualmann, B. (2003). Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003 4:2 4, 127–139. doi: 10.1038/nrm1016
- Haft, C. R., De la Luz Sierra, M., Bafford, R., Lesniak, M. A., Barr, V. A., and Taylor, S. I. (2000). Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell* 11, 4105–4116. doi: 10.1091/MBC.11.12.4105
- Harbour, M. E., Breusegem, S. Y. A., Antrobus, R., Freeman, C., Reid, E., and Seaman, M. N. J. (2010). The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci* 123, 3703–3717. doi: 10.1242/JCS.071472
- Harrison, M. S., Hung, C. S., Liu, T. T., Christiano, R., Walther, T. C., and Burd, C. G. (2014). A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 267–272. doi: 10.1073/PNAS.1316482111
- Harterink, M., Port, F., Lorenowicz, M. J., McGough, I. J., Silhankova, M., Betist, M. C., et al. (2011). A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nature Cell Biology* 2011 13:8 13, 914–923. doi: 10.1038/ncb2281
- Hendrick, H. M., Welter, B. H., Hapstack, M. A., Sykes, S. E., Sullivan, W. J., and Temesvari, L. A. (2016). Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor-2 α during Stress and Encystation in *Entamoeba* Species. *PLoS Pathog* 12, e1006085. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1006085
- Hertz, R., Tovy, A., Kirschenbaum, M., Geffen, M., Nozaki, T., Adir, N., et al. (2014). The *Entamoeba histolytica* Dnmt2 homolog (Ehmet) confers resistance to nitrosative stress. *Eukaryot Cell* 13, 494–503. doi: 10.1128/EC.00031-14/SUPPL_FILE/ZEK999094256SO1.PDF
- Hierro, A., Rojas, A. L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A. V., et al. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449, 1063–1067. doi: 10.1038/NATURE06216
- Hong, Z., Yang, Y., Zhang, C., Niu, Y., Li, K., Zhao, X., et al. (2009). The retromer component SNX6 interacts with dynactin p150Glued and mediates endosome-to-TGN transport. *Cell Research* 2009 19:12 19, 1334–1349. doi: 10.1038/cr.2009.130
- Huang, J., and Mackerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34, 2135–2145. doi: 10.1002/JCC.23354

- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Huston, C. D., and Sateriale, A. (2011). A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol Res* 2011, 926706. doi: 10.1155/2011/926706
- Iqbal, M. S., Siddiqui, A. A., Banerjee, C., Nag, S., Mazumder, S., De, R., et al. (2018). Detection of retromer assembly in *Plasmodium falciparum* by immunosensing coupled to Surface Plasmon Resonance. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1866, 722–730. doi: 10.1016/J.BBAPAP.2018.04.005
- Itoh, T., and Takenawa, T. (2009). Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains. *Prog Lipid Res* 48, 298–305. doi: 10.1016/J.PLIPRES.2009.05.002
- Ivaska, J., Whelan, R. D. H., Watson, R., and Parker, P. J. (2002). PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J* 21, 3608–3619. doi: 10.1093/EMBOJ/CDF371
- Jackson-Akers, J. Y., Prakash, V., and Oliver, T. I. (2023). Amebic Liver Abscess. *Treatment and Management of Tropical Liver Disease*, 128–132. doi: 10.1016/B978-0-323-87031-3.00025-1
- Javier-Reyna, R., Montaña, S., García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., González-Robles, A., and Orozco, E. (2019a). EhRabB mobilises the EhCPADH complex through the actin cytoskeleton during phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 21. doi: 10.1111/CMI.13071
- Javier-Reyna, R., Montaña, S., García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., González-Robles, A., and Orozco, E. (2019b). EhRabB mobilises the EhCPADH complex through the actin cytoskeleton during phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 21, e13071. doi: 10.1111/CMI.13071
- Jia, D., Gomez, T. S., Billadeau, D. D., and Rosen, M. K. (2012). Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol Biol Cell* 23, 2352–2361. doi: 10.1091/MBC.E11-12-1059
- Jia, D., Zhang, J. S., Li, F., Wang, J., Deng, Z., White, M. A., et al. (2016). Structural and mechanistic insights into regulation of the retromer coat by TBC1d5. *Nature Communications* 2016 7:1 7, 1–11. doi: 10.1038/ncomms13305
- Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145–155. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00434-2
- Kerr, M. C., Bennetts, J. S., Simpson, F., Thomas, E. C., Flegg, C., Gleeson, P. A., et al. (2005). A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic* 6, 991–1001. doi: 10.1111/J.1600-0854.2005.00328.X
- Kostelansky, M. S., Schluter, C., Tam, Y. Y. C., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., et al. (2007). Molecular Architecture and Functional Model of the Complete Yeast ESCRT-I Heterotetramer. *Cell* 129, 485. doi: 10.1016/J.CELL.2007.03.016
- Koumandou, V. L., Klute, M. J., Herman, E. K., Nunez-Miguel, R., Dacks, J. B., and Field, M. C. (2011). Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 124, 1496–1509. doi: 10.1242/JCS.081596

- Kovtun, O., Leneva, N., Bykov, Y. S., Ariotti, N., Teasdale, R. D., Schaffer, M., et al. (2018). Structure of the membrane-assembled retromer coat determined by cryo-electron tomography. *Nature* 2018 561:7724 561, 561–564. doi: 10.1038/s41586-018-0526-z
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., et al. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 81, 2159–2166. doi: 10.1002/PROT.24403
- Krai, P., Dalal, S., and Klemba, M. (2014). Evidence for a Golgi-to-Endosome Protein Sorting Pathway in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 9, e89771. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0089771
- Kvainickas, A., Jimenez-Orgaz, A., Nägele, H., Hu, Z., Dengjel, J., and Steinberg, F. (2017a). Cargo-selective SNX-BAR proteins mediate retromer trimer independent retrograde transport. *J Cell Biol* 216, 3677–3693. doi: 10.1083/JCB.201702137
- Kvainickas, A., Orgaz, A. J., Nägele, H., Diedrich, B., Heesom, K. J., Dengjel, J., et al. (2017b). Retromer- and WASH-dependent sorting of nutrient transporters requires a multivalent interaction network with ANKRD50. *J Cell Sci* 130, 382–395. doi: 10.1242/JCS.196758
- Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G., Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M. L., and Thornton, J. M. (1997). PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem Sci* 22, 488–490. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01140-7
- Lauffer, B. E. L., Melero, C., Temkin, P., Lei, C., Hong, W., Kortemme, T., et al. (2010). SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol* 190, 565–574. doi: 10.1083/JCB.201004060
- Leroy, A., Mareel, M., De Bruyne, G., Bailey, G., and Nelis, H. (1995). Metastasis of *Entamoeba histolytica* compared to colon cancer: one more step in invasion. *Invasion Metastasis* 14, 177–191. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7657511/> (Accessed June 19, 2024).
- Liu, J. J. (2016). Retromer-Mediated Protein Sorting and Vesicular Trafficking. *J Genet Genomics* 43, 165–177. doi: 10.1016/J.JGG.2016.02.006
- Liu, T. T., Gomez, T. S., Sackey, B. K., Billadeau, D. D., and Burd, C. G. (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell* 23, 2505–2515. doi: 10.1091/MBC.E11-11-0915
- Liu, Y., Deng, H., Liang, L., Zhang, G., Xia, J., Ding, K., et al. (2020). Depletion of VPS35 attenuates metastasis of hepatocellular carcinoma by restraining the Wnt/PCP signaling pathway. *Genes Dis* 8, 232–240. doi: 10.1016/J.GENDIS.2020.07.009
- Lucas, M., Gershlick, D. C., Vidaurrazaga, A., Rojas, A. L., Bonifacino, J. S., and Hierro, A. (2016). Structural Mechanism for Cargo Recognition by the Retromer Complex. *Cell* 167, 1623. doi: 10.1016/J.CELL.2016.10.056
- Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., et al. (2018). Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* 8. doi: 10.3389/FCIMB.2018.00179/FULL
- Marie, C., and Petri, W. A. (2014). Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 68, 493. doi: 10.1146/ANNUREV-MICRO-091313-103550

- Marion, S., Laurent, C., and Guillén, N. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol* 7, 1504–1518. doi: 10.1111/J.1462-5822.2005.00573.X
- Markiewicz, J. M., Syan, S., Hon, C. C., Weber, C., Faust, D., and Guillen, N. (2011). A Proteomic and Cellular Analysis of Uropods in the Pathogen *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* 5. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0001002
- Martinez-Higuera, A., Salas-Casas, A., Calixto-Gálvez, M., Chávez-Munguía, B., Pérez-Ishiwara, D. G., Ximénez, C., et al. (2013). Identification of calcium-transporting ATPases of *Entamoeba histolytica* and cellular localization of the putative SERCA. *Exp Parasitol* 135, 79–86. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2013.06.004
- Maruzs, T., Lorincz, P., Szatmári, Z., Széplaki, S., Sándor, Z., Lakatos, Z., et al. (2015). Retromer Ensures the Degradation of Autophagic Cargo by Maintaining Lysosome Function in *Drosophila*. *Traffic* 16, 1088–1107. doi: 10.1111/TRA.12309
- Mazzuco, A., Benchimol, M., and De Souza, W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron* 28, 241–247. doi: 10.1016/S0968-4328(97)00024-3
- McCoy, J. J., and Mann, B. J. (2005). Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 110, 220–225. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2005.02.013
- McGarvey, J. C., Xiao, K., Bowman, S. L., Mamonova, T., Zhan, Q., Bisello, A., et al. (2016). Actin-Sorting Nexin 27 (SNX27)-Retromer Complex Mediates Rapid Parathyroid Hormone Receptor Recycling. *J Biol Chem* 291, 10986–11002. doi: 10.1074/JBC.M115.697045
- McGough, I. J., de Groot, R. E. A., Jellett, A. P., Betist, M. C., Varandas, K. C., Danson, C. M., et al. (2018). SNX3-retromer requires an evolutionary conserved MON2:DOPEY2:ATP9A complex to mediate Wntless sorting and Wnt secretion. *Nature Communications* 2018 9:1 9, 1–13. doi: 10.1038/s41467-018-06114-3
- McGough, I. J., Steinberg, F., Jia, D., Barbuti, P. A., McMillan, K. J., Heesom, K. J., et al. (2014). Retromer Binding to FAM21 and the WASH Complex Is Perturbed by the Parkinson Disease-Linked VPS35(D620N) Mutation. *Current Biology* 24, 1670–1676. doi: 10.1016/J.CUB.2014.06.024
- McNally, K. E., Faulkner, R., Steinberg, F., Gallon, M., Ghai, R., Pim, D., et al. (2017). Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nature Cell Biology* 2017 19:10 19, 1214–1225. doi: 10.1038/ncb3610
- Meza, I., Talamás-Rohana, P., and Vargas, M. A. (2006). The Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, Function, and Regulation by Signaling Pathways. *Arch Med Res* 37, 234–243. doi: 10.1016/J.ARCMED.2005.09.008
- Miras, S. L., Merino, M. C., Gottig, N., Rópolo, A. S., and Touz, M. C. (2013). The giardial VPS35 retromer subunit is necessary for multimeric complex assembly and interaction with the vacuolar protein sorting receptor.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 2628–2638. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2013.06.015
- 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. *J Biomol Struct Dyn* 35, 486–503. doi: 10.1080/07391102.2016.1151831
- Nagata, N., Shimbo, T., Akiyama, J., Nakashima, R., Nishimura, S., Yada, T., et al. (2012). Risk factors for intestinal invasive amebiasis in Japan, 2003–2009. *Emerg Infect Dis* 18, 717–724. doi: 10.3201/EID1805.111275
- Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2016). Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by Entamoeba histolytica. *Front Immunol* 7, 1. doi: 10.3389/FIMMU.2016.00175
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005). A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Mol Biol Cell* 16, 5294–5303. doi: 10.1091/MBC.E05-04-0283
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in Entamoeba: annotation of E. invadens Rab and its use for the understanding of Entamoeba biology. *Exp Parasitol* 126, 337–347. doi: 10.1016/J.EXPPARA.2010.04.014
- Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. (2012). A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. *Cell Microbiol* 14, 1299–1317. doi: 10.1111/J.1462-5822.2012.01800.X
- Nickel, W., and Rabouille, C. (2008). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:2 10, 148–155. doi: 10.1038/nrm2617
- Nothwehr, S. F., Ha, S. A., and Bruinsma, P. (2000). Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol* 151, 297–309. doi: 10.1083/JCB.151.2.297
- Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Davis, C., and Quintana, N. (1972). Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 20, 1006–1023. doi: 10.1177/20.12.1006
- Nozaki, T., and Nakada-Tsukui, K. (2006). Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Parasitol Res* 98, 179–183. doi: 10.1007/S00436-005-0079-6
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Linford, A. S., Yoshino, T. P., Orozco, E., and Rodríguez, M. A. (2016). 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, 50–59. doi: 10.1017/S003118201500147X
- Okada, M., and Nozaki, T. (2006). New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in Entamoeba histolytica by proteomic analysis. *Arch Med Res* 37, 244–251. doi: 10.1016/J.ARCMED.2005.10.003

- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y. C., Jiang, L., et al. (2006). Plant Retromer, Localized to the Prevacuolar Compartment and Microvesicles in Arabidopsis, May Interact with Vacuolar Sorting Receptors. *Plant Cell* 18, 1239–1252. doi: 10.1105/TPC.105.035907
- Orozco, E., Benitez-Bibriesca, L., and Hernandez, R. (1994). Invasion and metastasis mechanisms in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 305, 229–239. doi: 10.1016/0027-5107(94)90243-7
- Pacheco-Sánchez, M., Martínez-Hernández, S. L., Muñoz-Ortega, M. H., Reyes-Martínez, J. A., Ávila-Blanco, M. E., and Ventura-Juárez, J. (2023). The Gal/GalNac lectin as a possible acetylcholine receptor in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol* 13, 1110600. doi: 10.3389/FCIMB.2023.1110600/BIBTEX
- Pais-Morales, J., Betanzos, A., Garcia-Rivera, G., Chavez-Munguia, B., Shibayama, M., and Orozco, E. (2016). Resveratrol Induces Apoptosis-Like Death and Prevents In Vitro and In Vivo Virulence of *Entamoeba histolytica*. *PLoS One* 11, 1–23. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0146287
- Pan, X., Zaarur, N., Singh, M., Morin, P., and Kandror, K. V. (2017). Sortilin and retromer mediate retrograde transport of Glut4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Biol Cell* 28, 1667–1675. doi: 10.1091/MBC.E16-11-0777
- Pannen, H., Rapp, T., and Klein, T. (2020). The ESCRT machinery regulates retromer-dependent transcytosis of septate junction components in *Drosophila*. *Elife* 9, 1–66. doi: 10.7554/ELIFE.61866
- Paravicini, G., Horazdovsky, B. F., and Emr, S. D. (1992). Alternative pathways for the sorting of soluble vacuolar proteins in yeast: a vps35 null mutant missorts and secretes only a subset of vacuolar hydrolases. *Mol Biol Cell* 3, 415. doi: 10.1091/MBC.3.4.415
- Petri, W. A., Haque, R., and Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56, 39–64. doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160959
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., et al. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics* 153, 1–33. doi: 10.1063/5.0014475
- Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B., and Knust, E. (2011). Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr Biol* 21, 1111–1117. doi: 10.1016/J.CUB.2011.05.007
- Priya, A., Kalaidzidis, I. V., Kalaidzidis, Y., Lambright, D., and Datta, S. (2015). Molecular Insights into Rab7-Mediated Endosomal Recruitment of Core Retromer: Deciphering the Role of Vps26 and Vps35. *Traffic* 16, 68–84. doi: 10.1111/TRA.12237
- Puthenveedu, M. A., Lauffer, B., Temkin, P., Vistein, R., Carlton, P., Thorn, K., et al. (2010). Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell* 143, 761. doi: 10.1016/J.CELL.2010.10.003

- Qi, X., Sun, Y., and Xiong, S. (2015). A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form. *Microb Cell Fact* 14, 1–12. doi: 10.1186/S12934-015-0208-6/FIGURES/9
- Que, X., and Reed, S. L. (2000). Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13, 196. doi: 10.1128/CMR.13.2.196-206.2000
- Rabouille, C. (2017). Retriever fetches integrins from endosomes. *Nature Cell Biology* 2017 19:10 19, 1144–1146. doi: 10.1038/ncb3612
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 2009 458:7237 458, 445–452. doi: 10.1038/nature07961
- 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* 2014 508:7497 508, 526–530. doi: 10.1038/nature13242
- Ramírez-Flores, C. J., Cruz-Mirón, R., Arroyo, R., Mondragón-Castelán, M. E., Nopal-Guerrero, T., González-Pozos, S., et al. (2019). Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitol Res* 118, 289–306. doi: 10.1007/S00436-018-6163-5/METRICS
- Rath, P. P., and Gourinath, S. (2020). The actin cytoskeleton orchestra in *Entamoeba histolytica*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 88, 1361–1375. doi: 10.1002/PROT.25955
- Rivero, M. R., Miras, S. L., Feliziani, C., Zamponi, N., Quiroga, R., Hayes, S. F., et al. (2012). Vacuolar Protein Sorting Receptor in *Giardia lamblia*. *PLoS One* 7, e43712. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0043712
- Roberts, M., Barry, S., Woods, A., Van der Sluijs, P., and Norman, J. (2001). PDGF-regulated rab4-dependent recycling of α v β 3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. *Curr Biol* 11, 1392–1402. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00442-0
- Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C. R., and Bonifacino, J. S. (2007). Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol* 27, 1112–1124. doi: 10.1128/MCB.00156-06
- Rojas, R., Van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., et al. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 183, 513. doi: 10.1083/JCB.200804048
- Roquemore, E. P., and Banting, G. (1998). Efficient Trafficking of TGN38 from the Endosome to the trans-Golgi Network Requires a Free Hydroxyl Group at Position 331 in the Cytosolic Domain. *Mol Biol Cell* 9, 2125. doi: 10.1091/MBC.9.8.2125
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:9 10, 623–635. doi: 10.1038/nrm2745
- Saito-Nakano, Y., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2007). Two Rab7 isotypes, EhRab7A and EhRab7B, play distinct roles in

- biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 9, 1796–1808. doi: 10.1111/J.1462-5822.2007.00915.X
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., and Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 279, 49497–49507. doi: 10.1074/JBC.M403987200
- Sangaré, L. O., Alayi, T. D., Westermann, B., Hovasse, A., Sindikubwabo, F., Callebaut, I., et al. (2016). Unconventional endosome-like compartment and retromer complex in *Toxoplasma gondii* govern parasite integrity and host infection. *Nature Communications* 2016 7:1 7, 1–14. doi: 10.1038/ncomms11191
- Seaman, M. N. J. (2007). Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J Cell Sci* 120, 2378–2389. doi: 10.1242/JCS.009654
- Seaman, M. N. J. (2021). The Retromer Complex: From Genesis to Revelations. *Trends Biochem Sci* 46, 608–620. doi: 10.1016/J.TIBS.2020.12.009
- Seaman, M. N. J., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E., and Bright, N. (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* 122, 2371–2382. doi: 10.1242/JCS.048686
- Seaman, M. N. J., Marcusson, E. G., Cereghino, J. L., and Emr, S. D. (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J Cell Biol* 137, 79–92. doi: 10.1083/JCB.137.1.79
- Seaman, M. N. J., McCaffery, J. M., and Emr, S. D. (1998). A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast. *J Cell Biol* 142, 665. doi: 10.1083/JCB.142.3.665
- 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. *J Trop Med* 2013. doi: 10.1155/2013/890603
- Sharma, M., Morgado, P., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Manna, D., and Singh, U. (2020). Characterization of Extracellular Vesicles from *Entamoeba histolytica* Identifies Roles in Intercellular Communication That Regulates Parasite Growth and Development. *Infect Immun* 88, 1–20. doi: 10.1128/IAI.00349-20
- Sharma, M., Zhang, H., Ehrenkauf, G., and Singh, U. (2023). Stress Response in *Entamoeba histolytica* Is Associated with Robust Processing of tRNA to tRNA Halves. *mBio* 14. doi: 10.1128/MBIO.03450-22/ASSET/DC72B48A-CDD9-44C7-B1CF-1F0BAFB35575/ASSETS/IMAGES/MEDIUM/MBIO.03450-22-F007.GIF
- Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D., and Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 4, 389–393. doi: 10.1038/NCB790
- Simonetti, B., Danson, C. M., Heesom, K. J., and Cullen, P. J. (2017). Sequence-dependent cargo recognition by SNX-BARs mediates retromer-independent

- transport of CI-MPR. *J Cell Biol* 216, 3695–3712. doi: 10.1083/JCB.201703015
- Sloves, P. J., Delhayé, S., Mouveaux, T., Werkmeister, E., Slomianny, C., Hovasse, A., et al. (2012). Toxoplasma sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe* 11, 515–527. doi: 10.1016/J.CHOM.2012.03.006
- Smith, S. S., and Guillén, N. (2010). “Organelles and Trafficking in *Entamoeba histolytica*,” in *Structures and Organelles in Pathogenic Protists*, (Springer, Berlin, Heidelberg), 149–173. doi: 10.1007/978-3-642-12863-9_7
- Solis, C. F., Santi-Rocca, J., Perdomo, D., Weber, C., and Guillén, N. (2009). Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One* 4, 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0008424
- Sorkin, A., and Von Zastrow, M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 600–614. doi: 10.1038/NRM883
- Srivastava, V. K., Yadav, R., Watanabe, N., Tomar, P., Mukherjee, M., Gourinath, S., et al. (2017). Structural and thermodynamic characterization of metal binding in Vps29 from *Entamoeba histolytica*: implication in retromer function. *Mol Microbiol* 106, 562–581. doi: 10.1111/MMI.13836
- Stanley, S. L. (2003). Amoebiasis. *Lancet* 361, 1025–1034. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9
- Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E. C., Bell, A. J., Heesom, K. J., et al. (2013). A global analysis of SNX27–retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nature Cell Biology* 2013 15:5 15, 461–471. doi: 10.1038/ncb2721
- Strochlic, T. I., Setty, T. G., Sitaram, A., and Burd, C. G. (2007). Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol* 177, 115–125. doi: 10.1083/JCB.200609161
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207–234. doi: 10.1016/J.PEP.2005.01.016
- Swarbrick, J. D., Shaw, D. J., Chhabra, S., Ghai, R., Valkov, E., Norwood, S. J., et al. (2011). VPS29 Is Not an Active Metallo-Phosphatase but Is a Rigid Scaffold Required for Retromer Interaction with Accessory Proteins. *PLoS One* 6, e20420. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0020420
- Tabuchi, M., Yanatori, I., Kawai, Y., and Kishi, F. (2010). Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1. *J Cell Sci* 123, 756–766. doi: 10.1242/JCS.060574
- Talamás-Lara, D., Acosta-Virgen, K., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., Salazar-Villatoro, L., Espinosa-Cantellano, M., et al. (2021). Golgi apparatus components in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* after monensin treatment. *Microsc Res Tech* 84, 1887–1896. doi: 10.1002/JEMT.23745
- Tan, W., Zhang, J., Liu, L., Liang, M., Li, J., Deng, Z., et al. (2022). Hsp90 Inhibitor STA9090 induced VPS35 related extracellular vesicle release and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Transl Oncol* 26, 1–17. doi: 10.1016/J.TRANON.2022.101502
- Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimermanic, P., Krogan, N. J., and Von Zastrow, M. (2011). SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-

- to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature Cell Biology* 2011 13:6 13, 715–721. doi: 10.1038/ncb2252
- Tenter, A. M., Heckerth, A. R., and Weiss, L. M. (2000). Toxoplasma gondii: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 1217. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00124-7
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 30, 3.22.1-3.22.29. doi: 10.1002/0471143030.CB0322S30
- Trousdale, C., and Kim, K. (2015). Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur J Cell Biol* 94, 513–521. doi: 10.1016/J.EJCB.2015.07.002
- Vassilieva, E. V., and Nusrat, A. (2008). Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods Mol Biol* 440, 3–14. doi: 10.1007/978-1-59745-178-9_1
- Walsh, R. B., Dresselhaus, E. C., Becalska, A. N., Zunitch, M. J., Blanchette, C. R., Scalera, A. L., et al. (2021). Opposing functions for retromer and Rab11 in extracellular vesicle traffic at presynaptic terminals. *J Cell Biol* 220, 1–20. doi: 10.1083/JCB.202012034
- Wang, W., Ma, X., Zhou, L., Liu, J., and Zhu, X. (2017). A conserved retromer sorting motif is essential for mitochondrial DLP1 recycling by VPS35 in Parkinson's disease model. *Hum Mol Genet* 26, 781–789. doi: 10.1093/HMG/DDW430
- Wassmer, T., Attar, N., Harterink, M., van Weering, J. R. T., Traer, C. J., Oakley, J., et al. (2009). The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell* 17, 110–122. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2009.04.016
- Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2020). Two isoforms of phosphatidylinositol 3-phosphate-binding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 22, 1–16. doi: 10.1111/CMI.13144
- Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2023). Molecular Dissection of Phagocytosis by Proteomic Analysis in *Entamoeba histolytica*. *Genes (Basel)* 14, 379. doi: 10.3390/GENES14020379/S1
- Williams, E. T., Glauser, L., Tsika, E., Jiang, H., Islam, S., and Moore, D. J. (2018). Parkin mediates the ubiquitination of VPS35 and modulates retromer-dependent endosomal sorting. *Hum Mol Genet* 27, 3189. doi: 10.1093/HMG/DDY224
- Willnow, T. E., Petersen, C. M., and Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors — regulators of neuronal viability and function. *Nature Reviews Neuroscience* 2008 9:12 9, 899–909. doi: 10.1038/nrn2516
- Wu, S., Fagan, R. R., Uttamapinant, C., Lifshitz, L. M., Fogarty, K. E., Ting, A. Y., et al. (2017). The Dopamine Transporter Recycles via a Retromer-Dependent Postendocytic Mechanism: Tracking Studies Using a Novel Fluorophore-Coupling Approach. *J Neurosci* 37, 9438–9452. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3885-16.2017
- Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., and Ramiro, M. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México* 23, 398–407.

Available at: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx (Accessed July 23, 2024).

- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., and Gómez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol* 9, 1023–1032. doi: 10.1016/J.MEEGID.2009.06.008
- Ye, H., Ojelade, S. A., Li-Kroeger, D., Zuo, Z., Wang, L., Li, Y., et al. (2020). Retromer subunit, vps29, regulates synaptic transmission and is required for endolysosomal function in the aging brain. *Elife* 9. doi: 10.7554/ELIFE.51977
- Yong, X., Zhao, L., Deng, W., Sun, H., Zhou, X., Mao, L., et al. (2020). Mechanism of cargo recognition by retromer-linked SNX-BAR proteins. *PLoS Biol* 18, e3000631. doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000631
- Yu, J., Feng, H., Sang, Q., Li, F., Chen, M., Yu, B., et al. (2023). VPS35 promotes cell proliferation via EGFR recycling and enhances EGFR inhibitors response in gastric cancer. *EBioMedicine* 89. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104451
- Zavodszky, E., Seaman, M. N. J., Moreau, K., Jimenez-Sanchez, M., Breusegem, S. Y., Harbour, M. E., et al. (2014). Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nature Communications* 2014 5:1 5, 1–16. doi: 10.1038/ncomms4828
- Zelazny, E., Santambrogio, M., Pourcher, M., Chambrier, P., Berne-Dedieu, A., Fobis-Loisy, I., et al. (2013). Mechanisms governing the endosomal membrane recruitment of the core retromer in Arabidopsis. *J Biol Chem* 288, 8815–8825. doi: 10.1074/JBC.M112.440503
- Zhang, G., Tang, X., Liang, L., Zhang, W., Li, D., Li, X., et al. (2020). DNA and RNA sequencing identified a novel oncogene VPS35 in liver hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2020 39:16 39, 3229–3244. doi: 10.1038/s41388-020-1215-6
- Zhang, H., Huang, T., Hong, Y., Yang, W., Zhang, X., Luo, H., et al. (2018). The retromer complex and sorting nexins in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 10, 349534. doi: 10.3389/FNAGI.2018.00079/BIBTEX
- Zhao, X., Nothwehr, S., Lara-Lemus, R., Zhang, B. Y., Peter, H., and Arvan, P. (2007). Dominant-negative behavior of mammalian Vps35 in yeast requires a conserved PRLYL motif involved in retromer assembly. *Traffic* 8, 1829–1840. doi: 10.1111/J.1600-0854.2007.00658.X
- Zhou, M., Wiener, H., Su, W., Zhou, Y., Liot, C., Ahearn, I., et al. (2016). VPS35 binds farnesylated N-Ras in the cytosol to regulate N-Ras trafficking. *J Cell Biol* 214, 445. doi: 10.1083/JCB.201604061