



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

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Funciones del complejo ESCRT-II de *Entamoeba histolytica*: implicaciones en la virulencia y su rol en el ensamble de la maquinaria ESCRT

Proyecto de Doctorado

M. en C. Mitzi Carolina Díaz Hernández

Directora de Tesis

Dra. María Esther Orozco Orozco

Asesores de tesis

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Dr. José Luis Rosales Encina

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Dr. Israel López Reyes

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

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de una beca para realizar los estudios de Doctorado. CVU 708564 y matrícula 151220018.

Agradecimientos

A la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sobre todo la dirección de este proyecto que resultó en dos publicaciones de primer autor y otro par de exitosas colaboraciones.

A las Dras. Rosario Javier, Guillermina García por su apoyo con los experimentos y el seguimiento para que se publicaran los artículos científicos.

A Alejandrina y a Gabi que son parte fundamental de este trabajo, por brindarme los materiales de laboratorio siempre listos para trabajar. Gracias por recibirme siempre con una sonrisa y la mejor de las actitudes.

A mis asesores, los doctores Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, José Luis Rosales Encina, José Manuel Hernández e Israel López Reyes. Gracias por sus aportes, consejos, correcciones a mi proyecto y su disposición y motivación, ante todo.

A las Dras. Abigail Betanzos, Cecilia Bañuelos y Ana Lorena Gutiérrez por sus palabras de aliento, su fuerza y el apoyo brindado.

A mis amiguitas, Anais, Diana, Melisa, Dxine y Fabiana que siempre me motivaron a salir adelante y a no claudicar. Las quiero con todo mi corazón y les agradezco tantos buenos momentos.

A mi familia, que sin ellos no sé cómo lo hubiese logrado. Gracias a mis padres, a mi hermana, a mi pareja y a mis tías por sus palabras de aliento y el apoyo incondicional. Los cómo no se imaginan, este logro es todo suyo.

A MI MADRE

MI MEJOR EJEMPLO DE FUERZA, MADUREZ Y SUPERACIÓN.

TE AMO CON TODO MI CORAZÓN, MAMÁ

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Biología de <i>Entamoeba histolytica</i>	10
Ciclo de vida.....	10
1.2 Patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	16
Adhesión	16
Citotoxicidad	17
Fagocitosis.....	19
1.3 Tráfico vesicular en <i>E. histolytica</i>	20
1.4 Cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT.....	21
1.4.1 Complejo ESCRT-0	26
1.4.2 Complejo ESCRT-I.....	26
1.4.3 Complejo ESCRT-II.....	27
1.4.4 Complejo ESCRT-III.....	29
1.5 La maquinaria ESCRT en <i>E. histolytica</i>	32
1.6 ESCRT-0 y I en <i>Entamoeba histolytica</i>	35
1.7 ESCRT-III en <i>Entamoeba histolytica</i>	40
1.8 Proteínas accesorias de la maquinaria ESCRT en <i>Entamoeba histolytica</i>	43
1.9 ESCRT-II en <i>Entamoeba histolytica</i>	46
1.10 SUMOilación en <i>Entamoeba histolytica</i>	63
1.11 SUMOilación en la maquinaria ESCRT	64
2 JUSTIFICACIÓN	68
3 HIPÓTESIS.....	68
4 OBJETIVOS	68
5 MATERIALES Y MÉTODOS	69
6 RESULTADOS	76
7 DISCUSIÓN.....	104
8 CONCLUSIONES.....	108
9 REFERENCIAS	111

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	12
Figura 2.- Estadios biológicos de <i>E. histolytica</i>	14
Figura 3.- Interacciones moleculares y composición general de la maquinaria ESCRT	24
Figura 4.- Sistema ESCRT en diferentes organismos	30
Figura 5.- Perfil de expresión de genes correspondientes a proteínas que conforman la maquinaria ESCRT en <i>E. histolytica</i>	33
Figura 6.- EhTom1 y EhVps23 de <i>E. histolytica</i> durante la eritrofagocitosis	36
Figura 7.- EhVps2 se asocia a componentes del complejo ESCRT-III, ubiquitina y fosfolípidos durante el evento de fagocitosis	38
Figura 8.- Detección y localización de las proteínas del complejo ESCRT-III en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	41
Figura 9.- Localización de las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH durante la eritrofagocitosis y su asociación con EhVps32	44
Figura 10.- Identificación y caracterización <i>in silico</i> de EhVps22	48
Figura 11.- Interacciones <i>in silico</i> de EhVps22 y niveles de RNAm durante la fagocitosis	50
Figura 12.- Identificación y caracterización <i>in silico</i> de EhVps25	53
Figura 13.- Análisis de EhVps25 durante la fagocitosis en <i>Entamoeba histolytica</i>	55
Figura 14.- Identificación y caracterización <i>in silico</i> de EhVps36	59
Figura 15.- Análisis de EhVps36 durante la fagocitosis en <i>Entamoeba histolytica</i> .	61
Figura 16. Resultados de predicción de modelos MDS de EhVp22, EhVps25 y EhVps36	78
Figura 17.- Estructuras 3D de EhVps22, EhVps25 y EhVps36 y simulación MD	80
Figura 18.- Acoplamiento molecular entre las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36	83

Figura 19.- Localización celular de proteínas ESCRT-II en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	86
Figura 20.- Localización celular de las proteínas ESCRT-II durante la fagocitosis	89
Figura 21.- Colocalización celular de EhVps36 (ESCRT-II) y EhVps23 (ESCRT-I) durante la fagocitosis	92
Figura 22.- Colocalización de EhVps25 (ESCRT-II) y EhVps20 (ESCRT-III) durante la fagocitosis	94
Figura 23.- Eficiencia fagocítica y de adherencia en trofozoítos silenciados en el gen <i>Ehvps25</i>	102
Figura 24.- Modelo de trabajo que propone la participación de ESCRT-II en la fagocitosis	109

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I.- Sitios de SUMOilación en la maquinaria ESCRT de <i>Entamoeba histolytica</i>	66
Tabla II. rEhVps25 y rEhVps36 con proteínas implicadas en la fagocitosis y el citoesqueleto	98

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ARN	Ácido ribonucleico
CP	Cisteína proteasa
DAPI	Diclorohidrato de 4', 6-diamidino-fenilindol
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
ESCRT	Del inglés <i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Hora
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliamperes
min	Minutos
ml	Mililitros

mM	Milimolar
MVB	Cuerpos multivesiculares, del inglés <i>Multivesicular Bodies</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHMB	Para-hidroxi-meruribenzoato
RT	Retrotranscriptasa
S	Segundo
SDS	Duodecilsulfato sódico
Tm	Temperatura de alineamiento
Vps	Del inglés <i>Vacuolar protein sorting</i>
Xg	Gravedades
μl	Microlitros

RESUMEN

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario con una tasa alta de fagocitosis, uno de sus principales mecanismos de virulencia. En la fagocitosis participan los mecanismos y las moléculas relacionadas con el tráfico vesicular, incluyendo a la maquinaria ESCRT (del inglés *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). La maquinaria ESCRT comprende los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III (formados por las proteínas *Vps*, del inglés *Vacuolar Protein Sorting*) y proteínas accesorias. En *E. histolytica* se han estudiado algunas *Vps*'s de los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III así como la adhesina EhADH y la ATPasa EhVps4, proteínas accesorias de la maquinaria ESCRT. Los estudios realizados durante mi maestría indicaron que las proteínas del complejo ESCRT-II: EhVps22, EhVps25 y EhVps36, participan en la fagocitosis en *E. histolytica*. Sin embargo, sus funciones aún no han sido caracterizadas. Es por ello que en este proyecto nos propusimos investigar las interacciones del complejo ESCRT-II así como las funciones de sus componentes. En primer lugar, investigamos con cuales proteínas interactúan EhVps22, EhVps25 y EhVps36. Para ello realizamos ensayos de *pull down* y analizamos las proteínas candidato mediante espectrometría de masas y ensayos tipo *Western blot*. Adicional a esto, trabajamos con ensayos inmunofluorescencia y análisis por *docking* molecular para profundizar en las características de estas interacciones. Finalmente, realizamos ensayos de silenciamiento y evaluamos su efecto sobre los eventos de fagocitosis y adhesión. Con estos resultados, concluimos que el ESCRT-II interactúa con otras moléculas durante el contacto con la presa, la conducción a través de bocas fagocíticas y el sistema membranoso de los trofozoítos. Por lo anterior, las proteínas ESCRT-II son miembros de la cadena proteica durante el tráfico de vesículas y son fundamentales para la continuidad y eficacia de la fagocitosis.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a protozoan parasite with a high rate of phagocytosis, one of its main virulence mechanisms. Mechanisms and molecules related to vesicular trafficking participate in phagocytosis, including the ESCRT machinery (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). The ESCRT machinery comprises the ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III complexes (formed by the Vps, Vacuolar Protein Sorting proteins) and accessory proteins. In *E. histolytica*, some Vps's of the ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III complexes have been studied, as well as the EhADH adhesin and the EhVps4 ATPase, accessory proteins of the ESCRT machinery. Studies carried out during my master's degree indicated that the ESCRT-II complex proteins: EhVps22, EhVps25 and EhVps36, participate in phagocytosis in *E. histolytica*. However, its functions have not yet been characterized. That is why in this project we set out to investigate the interactions of the ESCRT-II complex as well as the functions of its components. First, we investigated which proteins EhVps22, EhVps25 and EhVps36 interact with. To do this, we performed pull down assays and analyzed the candidate proteins using mass spectrometry and Western blot assays. In addition to this, we work with immunofluorescence assays and molecular docking analysis to delve into the characteristics of these interactions. Finally, we performed silencing assays and evaluated its effect on phagocytosis and adhesion events. With these results, we conclude that ESCRT-II interacts with other molecules during contact with prey, conduction through phagocytic mouths, and the membrane system of trophozoites. Therefore, ESCRT-II proteins are members of the protein chain during vesicle trafficking and are essential for the continuity and efficiency of phagocytosis.

1 INTRODUCCIÓN

La disentería amibiana es causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*, el cual infecta aproximadamente al 3.55% de la población mundial y provoca entre 50,000 y 75,000 muertes al año (Lozano y col., 2012). A pesar de que se conocen datos estadísticos del número de personas infectadas con *E. histolytica*, hay un sesgo en esta información debido a que los métodos de diagnóstico son poco sensibles para identificar al parásito y este suele confundirse con ciertas especies no patogénicas como *E. dispar* y *E. moshkovskii* (Ali y col, 2003; Diamond and Clark, 1993). Además, entre el 80-90% de los individuos que se encuentran infectados son asintomáticos, lo que representa un foco de infección y un gran problema para la salud pública a nivel mundial (Ali y col., 2008; Ximenez y col ,2009).

En México, la amibiasis ocupa el décimo lugar entre las patologías con mayor prevalencia (). A pesar de que la tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años, gracias al empleo de fármacos como el metronidazol y sus derivados, existen estudios serológicos que reportan que un 8.4% de la población mexicana tiene anticuerpos contra *E. histolytica*, indicando una alta exposición al parásito (Caballero-Salcedo y col.,1994). En 2007, Ximénez y col. encontraron que entre 1995 y 2006 la tasa de morbilidad por amibiasis intestinal fue de 1,000 a 5,000 casos por cada 100,000 habitantes. Esto, junto con los datos de pacientes asintomáticos hacen que el panorama sea preocupante (Ximenez y col., 2009). Es por ello que realizar investigaciones y análisis sobre los signos, los síntomas, los mecanismos de patogénesis y la búsqueda de moléculas blanco en el parásito es importante para mejorar el diagnóstico y el tratamiento contra esta enfermedad (Gil christ and Petri, 1999)

Cómo se dijo anteriormente, la infección por *E. histolytica* puede ser asintomática o invadir la mucosa intestinal y causar diarrea, colitis amibiana o disentería; y también puede producir infección extraintestinal. En el primer caso, no hay molestias para el paciente, pero es importante que sea diagnosticado por que contamina el ambiente y puede infectar a otros individuos. En la infección intestinal amibiana se presenta

dolor abdominal, pérdida de peso, diarrea acuosa y sanguinolenta (sangre macroscópica en heces) y fiebre en la mayoría de los casos (Adams and MacLeod, 1977; Aristizabal y col., 1991) . Los trofozoítos pueden, además del intestino, invadir el hígado y producir absceso hepático que ocurre cuando las amibas llegan al hígado por vía portal (Adams and MacLeod, 1977; Haque y col., 1998; Katzenstein y col., 1982) y ésta es una de las complicaciones extraintestinales más frecuentes. También se han reportado casos de absceso en pulmón, cerebro y piel, debido a difusión hematogena del parásito (Haque y col., 2003).

1.1 Biología de *Entamoeba histolytica*

Ciclo de vida

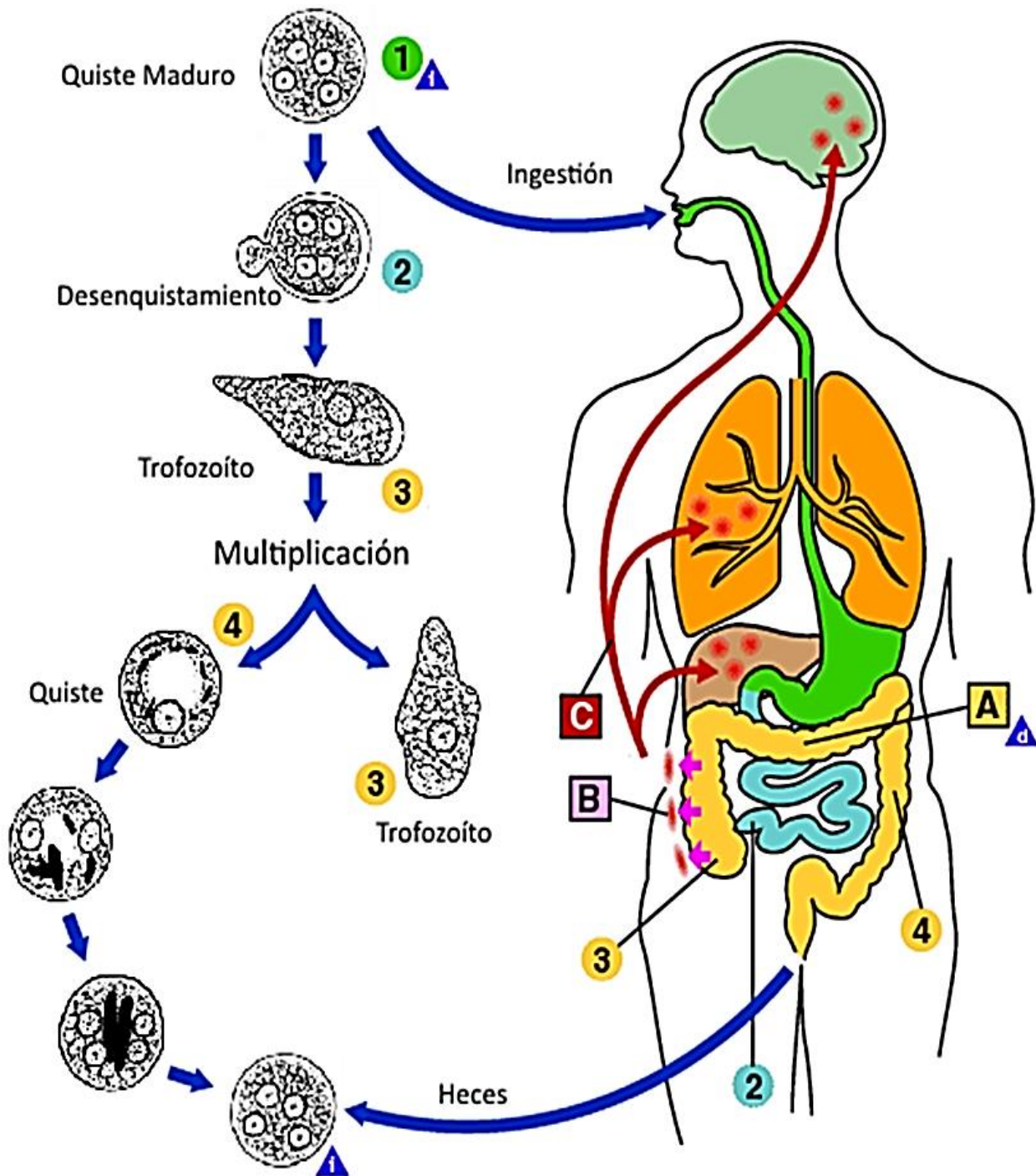
E. histolytica es un protozoario que presenta dos formas en su ciclo vital: quiste y trofozoíto. Los quistes, la forma infectiva de este parásito, son estructuras redondas de 10-16 μm que tienen de 1 a 4 núcleos, poseen una pared gruesa rica en quitina, N-acetil glucosamina ligada a β -1-4 (GlcNAc), así como lectinas de unión a quitina como la lectina Jacob2. Los quistes pueden permanecer en el medio ambiente externo durante días, debido a la protección que les brinda la composición de su pared (Figura 2) (Samuelson and Robbins, 2011, Frisardi y col., 2000; Spadafora y col., 2016; Van Dellen y col., 2006).

El trofozoíto, la fase móvil e invasiva, tiene un diámetro de 20-40 μm (Figura 2B), posee movimiento gracias a su ectoplasma, al citoesqueleto y otros factores y funciones que le permiten formar pseudópodos. Su citoesqueleto participa activamente en el movimiento. Su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización (Haque y col., 20023; Petri, 2002; Tanyksel and Petri, 2003).

La infección por *E. histolytica* (Figura 1) ocurre por la ingestión de quistes maduros que se encuentran en alimentos y en agua contaminados con quistes del parásito. Al ser ingeridos, es probable que no sobrevivan ya que la cubierta externa del quiste

es reblandecida por los jugos gástricos y pancreáticos, sin embargo, cuando algunos de ellos llegan al intestino delgado sufren un proceso de desenquistamiento y surgen ocho trofozoítos que pueden volver a enquistarse o migrar hacia el intestino grueso, donde se multiplican por fisión binaria. En muchos casos, los trofozoítos se mantienen confinados al lumen intestinal (infección no invasiva) de portadores asintomáticos, los cuales liberan los quistes en sus heces. Los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad amibiana intestinal) y a través de la corriente sanguínea llegan a sitios extraintestinales como el hígado, el cerebro y el pulmón (enfermedad amibiana extraintestinal), donde producen daños severos(consultado en: <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>).

Figura 1.- Ciclo de vida de *E. histolytica*. Existen dos fases de este parásito, la fase móvil e invasiva: el trofozoíto, y la fase estacionaria o infectiva: el quiste. Este tipo de parásito es capaz de infectar al ser humano vía fecal-oral, a través de alimentos y/o bebidas contaminadas con quistes, así como la exposición directa con las heces contaminadas durante el contacto sexual (CDC, 2015a; CDC, 2015b)(<http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>).



1 = Forma infectante

- A** = Colonización no invasiva
- B** = Enfermedad intestinal
- C** = Enfermedad extra-intestinal

Figura 2.- Estadios biológicos de *E. histolytica*. A) Quiste de *E. histolytica*. B) Trofozoíto de *E. histolytica*. Flechas negras: núcleos (Haque y col., 2003).

A



QUISTE

B



TROFOZOÍTO

1.2 Patogenicidad de *E. histolytica*

La patogénesis de *E. histolytica* se evidencia en el daño que el parásito produce a los tejidos, afectando principalmente al epitelio intestinal grueso y en menor grado al hígado, al pulmón, al cerebro y la piel (Olivos-García y col., 2011). Las lesiones se caracterizan por una zona central de necrosis, con parásitos conservados en la periferia y rodeados por un infiltrado inflamatorio principalmente de tipo linfocitario y mononuclear, (Faust y col., 2011). Los mecanismos moleculares involucrados en el daño a estos tejidos son la adhesión al epitelio, la citotoxicidad hacia células hospederas y la fagocitosis de éstas (Christy and Petri, 2011; Esther Orozco y col., 1983; García-Rivera y col., 1999) A continuación, se describen cada uno de estos eventos del proceso de producción de daño:

Adhesión

La adherencia al epitelio intestinal es un prerrequisito para la infección del trofozoíto en el medio ambiente del colon, principalmente en sitios que involucran el desarrollo de úlceras amebianas (Anaya-Velazquez y col., 1985). La importancia de este mecanismo fue demostrada *in vitro* a partir de la selección de clones deficientes en adhesión partiendo de una cepa virulenta. Se demostró que estas clones tenían un bajo efecto citopático sobre las monocapas de células epiteliales, la fagocitosis de eritrocitos y la virulencia *in vivo* (Rodríguez y Orozco, 1986). Por otro lado, se ha demostrado que al inhibir la adherencia del parásito a su célula blanco también se inhibe la patogénesis sobre ésta, lo que sugiere que existen interacciones específicas que median el contacto con la célula del hospedero y que la adhesión es necesaria para que la fagocitosis y la citólisis se lleven a cabo (Cano-Mancera y López-Revilla, 1987; Hughes y col., 2003; Arroyo & Orozco, 1987). Existen diferentes moléculas que han sido estudiadas por su participación en este mecanismo, entre ellas se encuentran las lectinas, las cuales participan en la adhesión del trofozoíto a la mucosa intestinal, al epitelio y a las células inflamatorias

del huésped. Una de las lectinas más estudiadas es la Gal/GalNac un receptor transmembranal formado por tres subunidades: una subunidad pesada de 170 kDa (Hg), una subunidad ligera de 35 kDa (Lgl) y una subunidad intermedia de 150 kDa (Igl) que se une a residuos de galactosa/N-acetil-galatosamina de la capa de mucina (Allen y col., 1998; Petri y col., 2002; Ravdin y Guerrant, 1981; Ravdin y col., 1985). Además, hay evidencia de que esta lectina sirve como un receptor durante la ingestión de eritrocitos (Katz y col., 2002; Petri y col., 1987). También, se ha estudiado una segunda lectina de 220 kDa que es inhibida por oligómeros de N-acetil-glucosamina y se localiza en la superficie de los trofozoítos (Rosales-Encina y col., 1987; Mezay col., 1987).

El complejo EhCPADH112 (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera y col., 1999), formado por una cisteína proteasa de 49 kDa (EhCP) y una adhesina de 75 kDa (EhADH112), se encuentra en la superficie de los trofozoítos y al ser bloqueado por anticuerpos monoclonales disminuye la adhesión, la fagocitosis y los efectos citopáticos y citotóxicos (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera y col., 1999; Rodríguez y Orozco, 1986). El complejo EhCPADH112 se localiza en vacuolas y en la membrana plasmática de trofozoítos y durante la eritrofagocitosis, se encuentra en los sitios de contacto focal entre el trofozoíto y el eritrocito, en los fagosomas y rodeando a los eritrocitos (García-Rivera y col., 1997).

Citotoxicidad

La infección por *E. histolytica* tiene resultados variables, pero cuando ocurre la enfermedad invasiva la actividad citotóxica del parásito es probablemente el mecanismo más implicado en el extenso daño al tejido. El efecto citopático producido por *E. histolytica* ha sido comprobado al poner en contacto trofozoítos con monocapas de células epiteliales MDCK (del inglés *Madin-Darby Canine Kidney*) (Esther Orozco y col., 1985) y CHO (del inglés *Chinesse Hamster Ovary*) (Ravdin y col., 1980). Los efectos citotóxicos sobre la célula del huésped son la producción de especies reactivas de oxígeno, la pérdida de integridad de

membrana, la fragmentación de ADN, el incremento de calcio, la exposición de fosfatidilserina y la activación de caspasa-3 (Ralston y Petri, 2011).

Dentro de este mecanismo de virulencia participan moléculas citotóxicas como los amebaporos A, B y C (Leippe y col., 1994), las cuales son proteínas formadoras de poros, que tienen una secuencia similar a las proteínas permeabilizadoras de membrana NK-lisina y granulisina en mamíferos. Los amebaporos de *E. histolytica* presentan actividad sobre la membrana plasmática de linfocitos y macrófagos (Young y col., 1982); además, hay evidencia de que la inhibición de la expresión del amebaporo A disminuye la virulencia del parásito (Bracha y col., 1999). La actividad de estas proteínas se ve aumentada en parásitos más patogénicos (Lynch y col., 1982) y contribuye a la formación del absceso hepático amibiano (Andra y col., 2003; Zhang y col., 2004).

Otro mecanismo de citotoxicidad se basa en la secreción de cisteína proteasas (EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5, EhCP-A7 y EhCP112) que sirven no sólo para romper la matriz del epitelio intestinal y lisar las células blanco (García-Rivera y col., 1999; Irmer y col., 2009; Lushbaugh y col., 1985), sino también como inmunomoduladores del parásito, ya que pueden degradar IgA, quimiocinas y miembros del complemento (García-Nieto y col., 2008; Hou y col., 2010; Pertuz Belloso y col., 2004; Reed y col., 1995; Reed y col., 1989). Los niveles de secreción de estas cisteína proteasas están relacionados directamente con la virulencia del parásito (Reed y col., 1989). La EhCP112, posee un dominio RGD de posible interacción con integrinas celulares, cuenta con una secuencia transmembranal para anclarse a la membrana, puede unirse a eritrocitos y degradar hemoglobina y componentes de la matriz extracelular (García-Rivera y col., 1999; Ocadiz y col., 2005).

Los trofozoítos de *E. histolytica* inducen cambios en el flujo de calcio en la célula blanco, de modo dependiente de Gal/GalNac (Ravdin y col., 1988; Ravdin y col., 1985), lo cual modifica la vía de señalización de MAPK induciendo la apoptosis (Ragland y col., 1994; Rawal y col., 2005) dependiente de caspasa 3 (Huston y col.,

2000; Seydel y Stanley, 1998; Yan y Stanley, 2001) degradando moléculas del citoesqueleto como paxilina y cinasas de adhesión focal por modulación de calpaína, así como reguladores de la muerte celular, tales como NOX1 (Jang y col., 2011; Kim y col., 2011; Kim y col., 2007; Sim y col., 2005).

Fagocitosis

La fagocitosis se define como la propiedad de los trofozoítos de ingerir microorganismos en el intestino grueso y células del hospedero entre las que se incluyen células del sistema inmune y no inmune, lo cual ocurre durante la invasión al tejido (Marion y col., 2005). Por medio de la fagocitosis la amiba adquiere nutrientes, evade al sistema inmune y causa patogenicidad (Christy y Petri, 2011). Se ha demostrado que amibas deficientes en fagocitosis reducen la adhesión a eritrocitos, el efecto citopático y el efecto citotóxico (Rodríguez & Orozco, 1986) y la generación de absceso hepático amibiano en el modelo de hámster (Orozco y col., 1983); además, este proceso está ligado a la exocitosis de cisteína proteasas (Hirata y col., 2007). Huston y col. (2003) demostraron que los trofozoítos ingieren preferencialmente células apoptóticas, reconociendo ligandos únicos sobre la superficie de éstas.

El análisis del genoma de *E. histolytica* ha revelado la presencia de genes *rab* (Saito-Nakano y col., 2001; Temesvari y col., 1999), los cuales son regulados positivamente durante la fagocitosis (Debnath y col., 2007). EhRab5, una GTPasa homóloga a Rab5 de mamíferos, es necesaria durante la ingestión de eritrocitos y junto con EhRab7A se encuentran en vacuolas prefagosomales durante la maduración fagosomal (Saito-Nakano y col., 2004). Otra proteína involucrada es EhRabB, la cual se transloca hacia la membrana plasmática y a las bocas fagocíticas, asimismo disminuye sus niveles a los 10 min de la fagocitosis, lo que sugiere su participación en la regulación de este evento (Rodríguez y Orozco, 2000; Saito-Nakanoy col., 2004; Welter y col., 2002).

La miosina IB, un componente del citoesqueleto, participa en la fagocitosis de eritrocitos y es reclutada a los sitios de formación de copas fagocíticas y en la periferia del fagosoma (Voigt y col., 1999). En este evento, participan proteínas como las GTPasas Rho y RacG y cinasas como EhPAK, que regulan la remodelación del citoesqueleto y controlan la motilidad y fagocitosis en la amiba (Godbold y Mann, 1998; Guillen y col., 1998; Labruyere y col., 2003).

1.3 Tráfico vesicular en *E. histolytica*

Aunque en los trofozoítos de *E. histolytica* no se han observado organelos clásicos de peroxisomas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, ensayos ultraestructurales han revelado la presencia de estructuras similares al retículo endoplásmico liso y el aparato de Golgi (Chavez-Mungía y col., 2000). Asimismo, mediante el uso de anticuerpos dirigidos a marcadores de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, se identificaron estructuras similares a estos organelos en *E. histolytica* (Ghosh col., 1999).

El tráfico vesicular se encuentra implicado en muchos aspectos de la virulencia de *E. histolytica*, por ejemplo, el movimiento característico de los trofozoítos depende del movimiento interno de las vesículas hacia la membrana plasmática, un proceso que participa en la formación de los pseudópodos, proporcionando una fuente de membrana de superficie celular, o bien, una fuente de moléculas que participan en la adhesión celular, necesarias para la unión a las células blanco (Bretscher y Aguado-Velasco, 1998; Welter y Temesvari, 2004). Por otro lado, la secreción de cisteína proteasas en lisosomas se relaciona con el evento de tráfico vesicular (Okada y col., 2006), el cual, a su vez tiene un papel importante en la fagocitosis (Orozco y col., 1985) y durante la movilización de moléculas hacia los lisosomas y fagosomas para desintegrar sustancias endocitadas por el parásito, lo que finalmente repercute en la virulencia de la amiba (Okada y col., 2006).

1.4 Cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT

La función de los endosomas es separar a las proteínas que serán recicladas a otros lugares en la célula de aquellas que serán degradadas en lisosomas. Además, intervienen en el transporte y liberación de las moléculas que requieran ser secretadas al medio extracelular. También regulan la composición de la superficie celular y juegan un papel importante en una gran variedad de funciones biológicas. La maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos implica el recambio de lípidos y proteínas a través de elementos túbulo-vesiculares que clasifican a estos componentes de vuelta a la red trans-Golgi y a la membrana plasmática. Las proteínas de membrana y las proteínas cargo que no han sido recicladas, así como materiales lumbinales solubles son transportados a los endosomas tardíos y a los lisosomas (Gruenberg y Maxfield, 1995) para su degradación, por lo que son incorporadas dentro de vesículas intraluminales (VILs) contenidas en cuerpos multivesiculares (CMVs) mediante un proceso dependiente de ubiquitinación. Posteriormente, la fusión de los CMVs con lisosomas inicia la degradación de las VILs y de su contenido, por medio de las hidrolasas lisosomales que poseen (Bishop y col., 2002; Lemmon y Traub, 2000).

Los CMVs fueron observados por primera vez en células eucarióticas a través de microscopía electrónica de transmisión como estructuras delimitadas por membrana y con VILs en su interior, las cuales son generadas por invaginación de brotes de membrana hacia el interior de la vesícula (Palade y col., 1955; Sotelo y Porter, 1959; Williams y Urbe, 2007). El seguimiento de las proteínas internalizadas definió a los CMVs como parte de la vía endocítica y a las VILs como una ruta de degradación de proteínas tales como el factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Felder y col., 1990; Gorden y col., 1978; Haigler y col., 1979; Van Deurs y col., 1993). Estas estructuras tienen una apariencia característica ya que contienen en su interior VILs y realizan una variedad de funciones en la vía endocítica, por lo que, pueden tener diferentes composiciones y morfologías. Además, estas estructuras contienen marcadores tales como Rabs, LAMPs y marcadores de endocitosis, los cuales los

distinguen de otros organelos o estructuras con membranas internas como cuerpos autofágicos o lisosomas multilamelares.

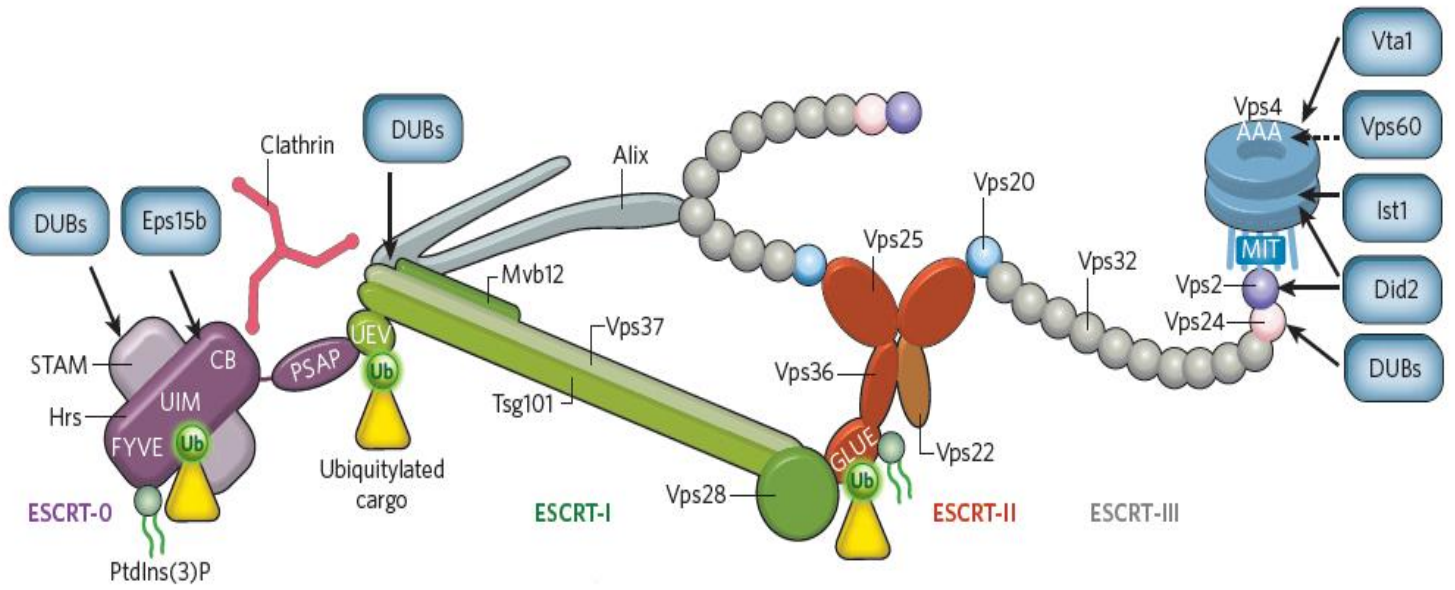
Durante la formación de los CMVs interviene un complejo de proteínas conocido como maquinaria ESCRT (del inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Este complejo participa en el transporte de moléculas desde la membrana plasmática hacia el interior de la célula y del interior de la célula hacia la membrana, en la degradación de proteínas plasmáticas innecesarias o peligrosas, en la biogénesis de lisosomas o vacuolas en levadura, en la liberación de la mayoría de los virus envueltos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Raiborg y Stenmark, 2009), en la abscisión de la membrana durante la citocinesis, la macroautofagia, entre otros (Hurley, 2010).

La manera en que la maquinaria ESCRT genera estos CMVs es primero por el reconocimiento de la proteína cargo ubiquitinada, esto desencadena el reclutamiento ordenado del ESCRT a la membrana de los endosomas junto con la proteína cargo (Babst, 2011; Henne y col., 2011; Henne y col., 2013; Hurley, 2010). Después, se forma un anillo/ espiral en la superficie de la membrana y a esto le sigue la desubiquitinación del cargo. Luego, se lleva a cabo la deformación de la membrana, y con ello, la constricción y escisión un cuello de botella. Finalmente, el ESCRT se separa, dejando las proteínas cargo en los CMVs para que estos sean clasificados hacia los lisosomas (Ali y col. 2013).

La maquinaria ESCRT está formada por los subcomplejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y las proteínas accesorias, llamados así por el orden de ensamblaje durante la formación de los CMVs (Figura 3) (Williams y Urbé, 2007; Camilla Raiborg y Harald Stenmark, 2009). Cada uno de los complejos están constituidos a su vez por proteínas, que, en su mayoría son llamadas Vps (del inglés *class E Vacuolar protein sorting*). Se ha visto que su eliminación en levadura resulta en la alteración de la morfología del endosoma (formas aberrantes) y cancela la entrega de las proteínas cargo (Raymond y col. 1992). Otro estudio en levadura mostró la mutación de los genes *vps* inhibía el transporte de hidrolasas vacuolares, produciendo una morfología endosomal aberrante (Coonrod y col., 2010).

A su vez, cada una de las proteínas Vps que conforman el complejo ESCRT cuentan con diferentes dominios o regiones específicas que les permiten el anclaje a la membrana por la asociación con lípidos, la interacción con ubiquitina, la activación de proteínas aledañas y por supuesto el contacto con otras Vps del complejo, trabajando, así como un engranaje. En el siguiente apartado se explica a detalle la composición de cada subcomplejo ESCRT, sus funciones y los hallazgos hasta el momento.

Figura 3.- Interacciones moleculares y composición general de la maquinaria ESCRT. La imagen representa el ensamble de moléculas de cada complejo ESCRT (en diferentes colores) y los nombres de las proteínas. La información que se aprecia en la figura intenta englobar los resultados y estudios obtenidos de mamíferos y de levadura con respecto a esta maquinaria (tomado de Raiborg y Stenmark, 2009).



1.4.1 Complejo ESCRT-0

Es un heterodímero formado por las subunidades Vps27 y Hse1 en una proporción 1:1. Los nombres adjudicados a las proteínas fueron denominadas primero en levadura (Figura 4). Ambos componentes del complejo ESCRT-0 tienen dominios de unión a ubiquitina conocidos como UIM (del inglés *Ubiquitin Interaction Motifs*) (Bilodeau y col., 2002). El complejo ESCRT-0 puede unirse a cadenas de poliubiquitina con alta avidéz (Ren y Hurley, 2010) para agrupar a las proteínas cargo ubiquitinadas hacia los sitios de formación de los CMVs, además, recluta clatrina, ligasas de ubiquitina y enzimas desubiquitinantes (Wollert y Hurley, 2010). A través de la proteína Vps27 este complejo puede interactuar con la proteína Vps23 del complejo ESCRT-I (Raiborg y col., 2001).

1.4.2 Complejo ESCRT-I

Este complejo ESCRT-I es un heterotetrámero formado por las proteínas Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12 (Katzmann col., 2001; Audhya col., 2007; Chu col., 2006; Curtiss col., 2007; Kostelansky col., 2007; Morita y col., 2007; Oestreich col., 2007) (Figura 4). Se co-ensambla con el complejo ESCRT-II sobre las membranas (Kostelansk col.,2007) iniciando la formación de la membrana limitante del CMV dentro de su lumen (Wollert y Hurley, 2010). Vps23 contiene un dominio llamado UEV (del inglés *Ubiquitin E2 Variant*) que le permite interactuar con proteínas cargo ubiquitinadas (Katzmann col., 2001; Sundquist col., 2004; Teo y col., 2004) y con el complejo ESCRT-0 (Bilodeau col., 2003; Katzmann col., 2003; Lu y col., 2003; Pornillos col., 2003). La proteína Vps28 contiene un dominio CDT (del inglés *C-terminal four helix bundle domain*) que interactúa con la proteína Vps36 del complejo ESCRT-II (Gill y col., 2007; Kostelansky col., 2006).

1.4.3 Complejo ESCRT-II

Este complejo ha sido caracterizado principalmente en humano y en levadura. Está formado por las proteínas Vps22, Vps25 y Vps36, en una proporción 1:2:1, respectivamente (Hierro y col., 2004; Im y Hurley, 2008; Teo y col., 2004) (Figura 4). A pesar de que carecen de homología en secuencia entre ellas, cada una contiene dos dominios WH (del inglés *Winged Helix*). Estos dominios han sido bien caracterizados como dominios de unión a ácidos nucleicos, tanto ARN como ADN, pero se encuentran principalmente en proteínas de unión a ADN y además están involucrados en las interacciones proteína-proteína (Emmerman y col., 2018), sin embargo, hasta el momento no hay evidencia directa de que el ESCRT-II pueda interactuar con este ácido nucleico (Teo y col., 2006) . Por otro lado, los dominios WH también se han reportado en factores de transcripción como E2F4 y DP2. (Gajiwala y Burley, 2000 ; Zheng y col., 1999).

Además de compartir los dominios WH, las proteínas del ESCRT-II también cuentan con regiones características para cada una de ellas. Vps22 contiene en la región N-terminal un motivo CC (del inglés *Coiled coil*) que se une a Vps36, y sus dominios WH le permiten la interacción con Vps25 (Winter y Hauser 2006; Hierro y col. 2014).

Vps25 contiene dos motivos PPXY que contactan a Vps22 y Vps36, y los dominios WH le permiten asociarse con Vps20 del complejo ESCRT-III. Ensayos *in vitro* e *in vivo* en levadura han demostrado que Vps25 induce la liberación de la auto-inhibición de Vps20 por el desplazamiento de la región auto-inhibitoria de ésta proteína. Este evento resulta en la activación de Vps20, la cual una vez activada puede desencadenar la nucleación por Vps32 durante la formación de los CMVs (Teis y col., 2010).

Vps36 puede interactuar con Vps25 y Vps22 a través de sus dominios WH y en el extremo N-terminal contiene un dominio llamado GLUE (del inglés *GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45*) que se asocia a proteínas cargo ubiquitinadas, a fosfatidilinositol-3-fosfato (Slagsvold y col., 2005) y a Vps28 del complejo ESCRT-I, todo esto en humano (Hurley y Scott, 2006; Im y Hurley, 2008). En el caso de *S. cerevisiae*, el dominio GLUE está formado por dos motivos de dedos de zinc: NZF1

y NZF2 (del inglés *Npl4-type zinc finger*), el primero se une a Vps28 ESCRT-I y el segundo interacciona con la ubiquitina (Teo col., 2006). En otros organismos como *Fusarium graminearum* se ha descubierto que Vps36 además de interactuar con Vps28 también puede asociarse a otros componentes del complejo ESCRT-I, como la proteína Vps23, reforzando así la unión entre el complejo ESCRT-I y ESCRT-II durante el evento de endocitosis (Xie y col., 2019).

El complejo ESCRT-II trabaja en conjunto con los complejos ESCRT-I y ESCRT-III en la biogénesis de los CMVs (Babst col., 2002) y funciona como un puente entre los complejos río arriba ESCRT-0 y ESCRT-I y el complejo río abajo ESCRT-III, involucrado en la escisión de la membrana. Existe evidencia de que la sobreexpresión del ESCRT-II puede rescatar las deleciones en los genes del ESCRT-I en levadura, pero no viceversa (Babst col., 2002).

Al igual que los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I, el complejo ESCRT-II puede unirse a proteínas cargo ubiquitinadas, a través de la proteína Vps36 (Alam col., 2004). Además, este complejo puede conectar a los CMVs hacia microtúbulos mediante las proteínas RILP, Rab7 y dineina (Progida col., 2007; Wang y Hong, 2006).

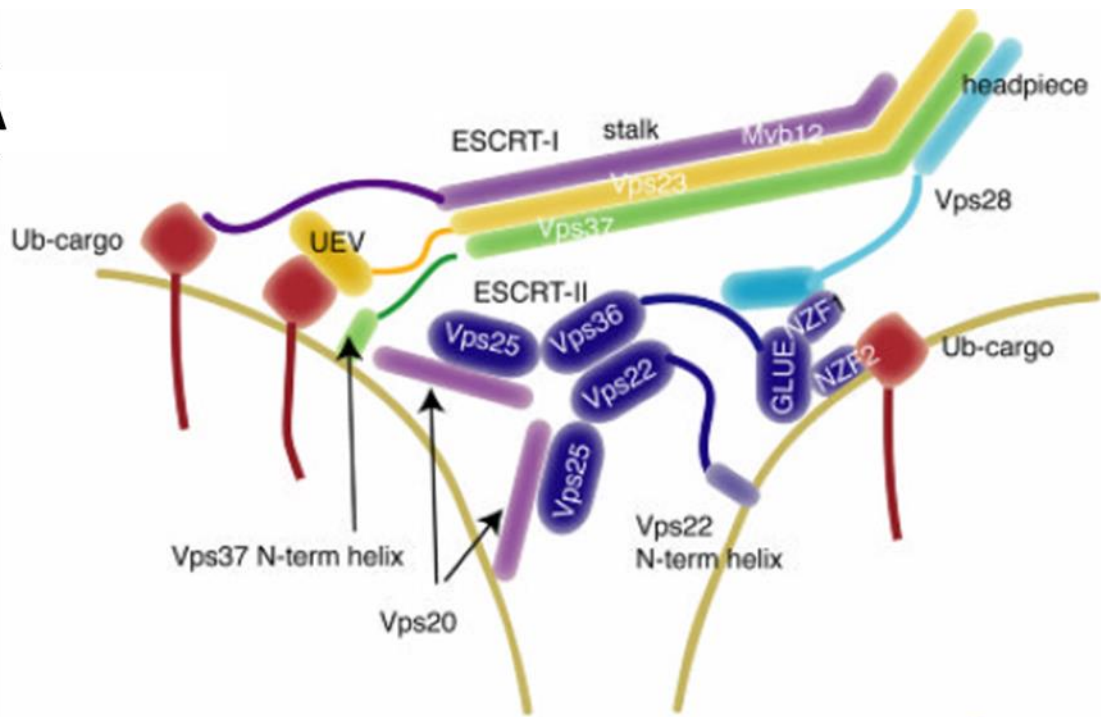
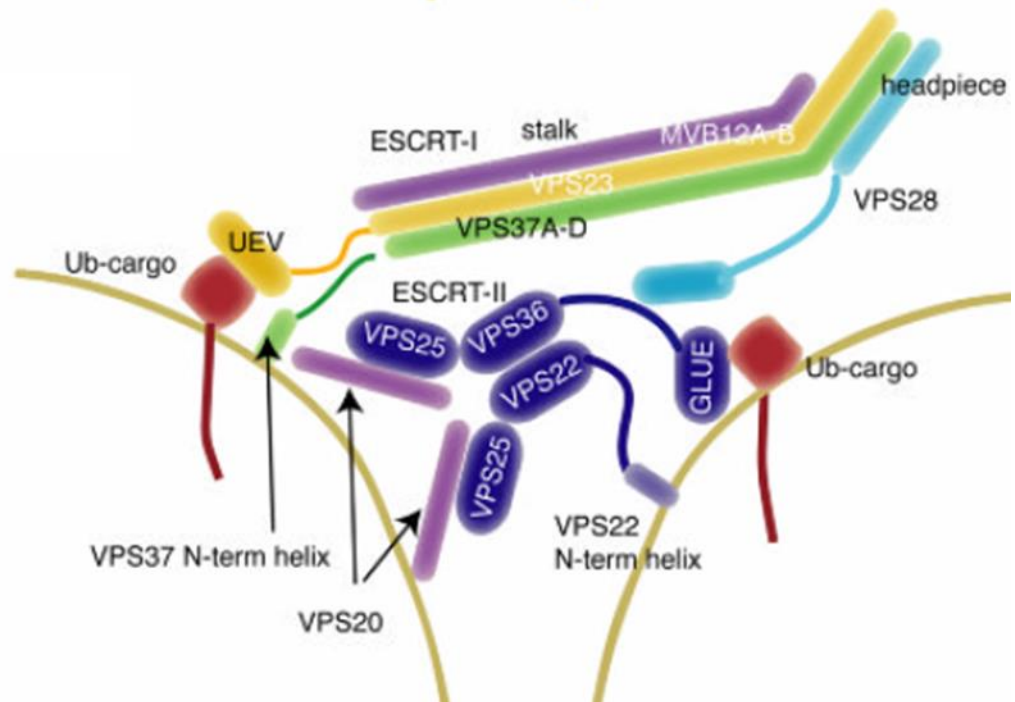
A algunos de los componentes de este complejo ESCRT-II se les atribuye un rol en otros eventos celulares, por ejemplo, durante la abscisión citocinética, en donde Vps25 se asocia con Vps20 del complejo ESCRT-III para participar en una cascada de reclutamiento de los demás componentes de la maquinaria ESCRT al sitio donde se llevará el proceso de citocinesis (Christ y col., 2016). Por otro lado, se ha observado que el silenciamiento del gen *vps22* en *Oryza sativa* (arroz) es causante de letalidad en las plántulas y reduce de manera significativa el crecimiento de brotes y raíces (Zhang y col., 2012), lo que sugiere su participación durante el crecimiento y desarrollo de este organismo.

En especies como *Arabidopsis thaliana* también se ha comprobado la existencia de las proteínas Vps22, Vps25 y Vps36. Y se ha observado la asociación de este complejo con ubiquitina, su participación en la biogénesis de CMVs y el rol en la clasificación endosomal de las proteínas cargo en la membrana de vacuolas para su degradación (Wang y col., 2017).

1.4.4 Complejo ESCRT-III

El ESCRT-III consiste en cuatro subunidades: Vps2, Vps20, Vps24 y Vps32 (Babst col., 2002) (Figura 4). Los monómeros de ESCRT-III no se localizan en el endosoma, sino que existen en un estado autoinhibido en el citoplasma. El complejo ESCRT-III inicia su ensamblaje cuando la proteína Vps25 del complejo ESCRT-II se une a Vps20. Vps20 recluta a Vps32, que al polimerizarse atrae a Vps24. Vps32 también acerca a la proteína Bro1/Alix (del inglés *BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1/apoptosis-linked gene-2 interacting-protein X*) que estabiliza los filamentos de Vps32 y recluta a la enzima deubiquitinasa Doa4 (Luhtala y Odorizzi, 2004), en seguida, Vps2 es atraída al endosoma gracias a Vps24 (Teis col., 2008). Finalmente, la proteína accesoria Vps4, una ATPasa, lleva a cabo el desensamblaje de la maquinaria. Ésta se une a subunidades del complejo ESCRT-III a través de su dominio MIT (del inglés *microtubule-interacting and trafficking*) localizado en el N-terminal (Babst col., 1997; Babst col., 1998).

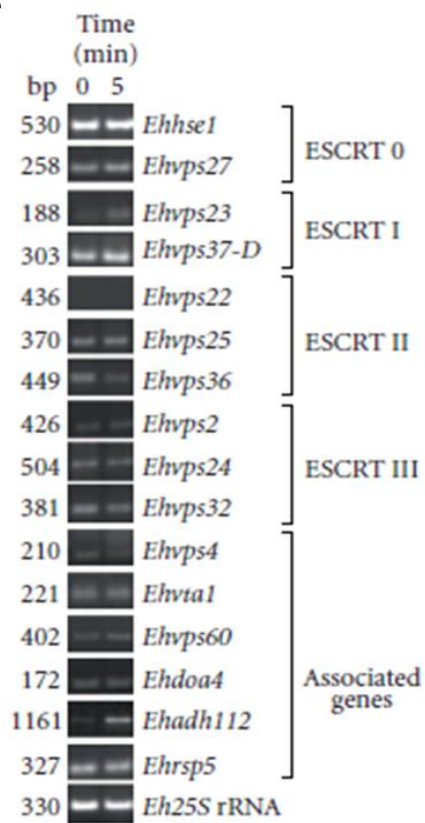
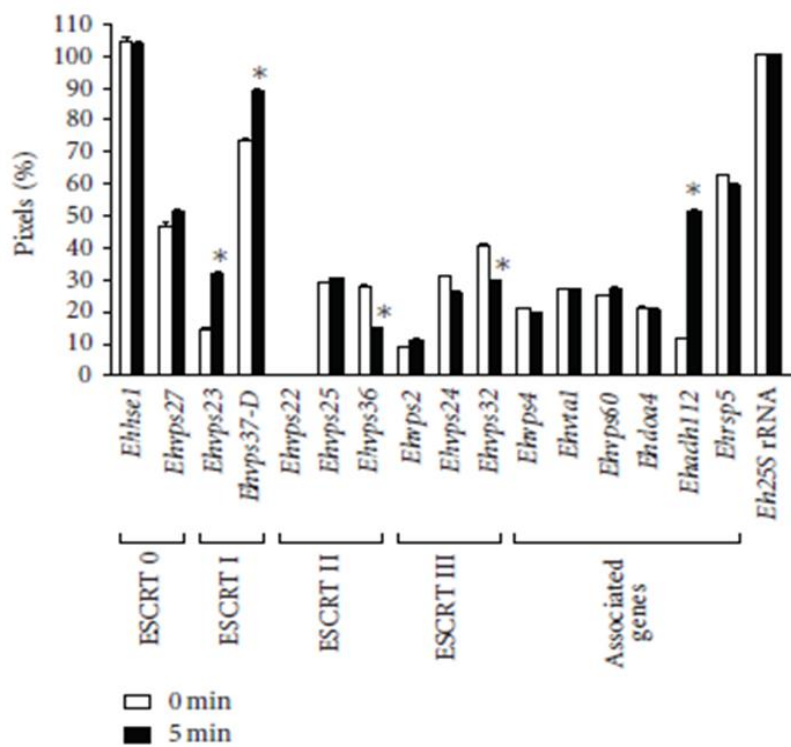
Figura 4.- Sistema ESCRT en diferentes organismos. A) Maquinaria ESCRT en *Saccharomyces cerevisiae*. B) Representación de la maquinaria ESCRT en *Homo sapiens* (Hurley, 2010). La mayoría de las proteínas que conforman esta maquinaria se conservan en los organismos antes mencionados y cuentan con dominios similares.

A**B**

1.5 La maquinaria ESCRT en *E. histolytica*

En *E. histolytica*, la fagocitosis y tráfico vesicular juegan un papel muy importante en la ingestión y degradación de las células del hospedero y de otros microorganismos que la amiba ingiere. Algunas de las proteínas Vps's, así como las proteínas accesorias que se encuentran involucradas en procesos de transporte de vesículas en eucariontes han sido detectadas en este parásito. De acuerdo al análisis *in silico* en las bases de datos del genoma de la amiba se identificaron 22 genes correspondientes a proteínas ESCRT con similitud a las de levadura y humano y se probó que la mayoría de ellos se transcriben en trofozoítos en condiciones basales y a los 5 min de la eritrofagocitosis (Figura 5) (Lopez-Reyes y col., 2010).

Figura 5.- Perfil de expresión de genes correspondientes a proteínas que conforman la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*. A) En la imagen se muestran los productos de los ensayos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos de trofozoítos en condiciones basales y a los 5 minutos después de eritrofagocitosis. B) Análisis densitométrico de los productos amplificados por RT-PCR. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones basales y de eritrofagocitosis para algunos de los genes del complejo ESCRT (López-Reyes y col., 2010).

A**B**

1.6 ESCRT-0 y I en *Entamoeba histolytica*

Aunque en *E. histolytica* no se ha detectado el complejo ESCRT-0 tal y como está descrito en levadura o en humano, *E. histolytica* expresa la proteína EhTom1, la cual podría llevar a cabo funciones del ESCRT-0 como sucede en *Dictyostelium discoideum* (Blanc y col., 2009) y también expresa la proteína EhVps23 del complejo ESCRT-I. Ensayos de transcripción de los genes *ehtom1* y *ehvps23* del parásito durante la fagocitosis, indicaron que existe un aumento diferencial en los niveles de ARN mensajero para los dos genes a tiempos tempranos de eritrofagocitosis (figura 6) (Galindo-Olea, 2016, Tesis de maestría). Por otro lado, se determinó que la proteína EhVps23 cuenta con un dominio de interacción con ubiquitina y un dominio “Vps23 core” (Galindo-Olea y col., 2021). Además, mediante ensayos de inmunofluorescencia se evaluó la localización de EhVps23 en condiciones de fagocitosis y en condición basal. Los resultados obtenidos arrojaron que esta proteína se situaba en membrana plasmática, vesículas citoplásmicas y cuerpos multivesiculares durante el estado basal, a diferencia de la condición de fagocitosis en donde se observó a esta proteína asociada a ubiquitina en fagosomas y vesículas aledañas (Galindo-Olea y col., 2021). Además, a través de análisis de docking molecular y ensayos de inmunoprecipitación se determinó que EhVps23 interactúa con ubiquitina, componentes del complejo ESCRT-III como EhVps32 y otras moléculas como el ácido lisobifosfatídico (Galindo-Olea y col., 2021). Por otro lado, el silenciamiento del gen *EhVps23* también resultó en la disminución de la tasa de fagocitosis (Galindo-Olea y col., 2021). EhVps23 ha mostrado ser un factor clave en otros procesos como secreción, motilidad e invasión de tejido (Galindo-Olea et al., 2022).

Figura 6.- EhTom1 y EhVps23 de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis. A) Niveles de expresión de los genes *ehtom1* y *ehvps23* en condiciones basales y durante eritrofagocitosis, obtenidos mediante RT-qPCR. B). Localización subcelular de EhTom1 y EhVps23 en trofozoítos de *E. histolytica* incubados con eritrocitos durante 0, 2, 5 y 10 minutos; se utilizaron anticuerpos específicos primarios anti-EhTom1 y anti-EhVps23 (dil. 1:50) y anticuerpos secundarios (dil. 1:100) marcados fluorescentemente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (dil. 1:200) (modificada de Galindo Olea, 2016).

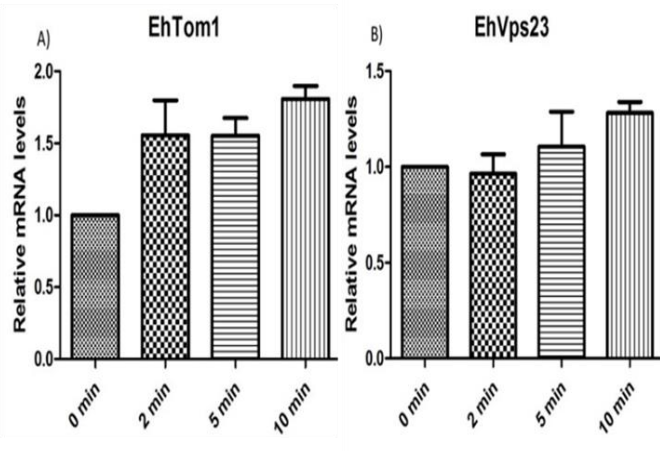
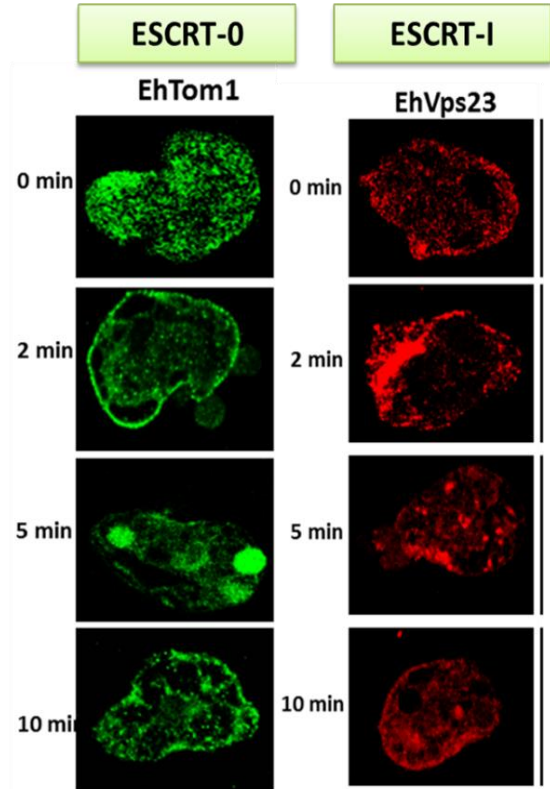
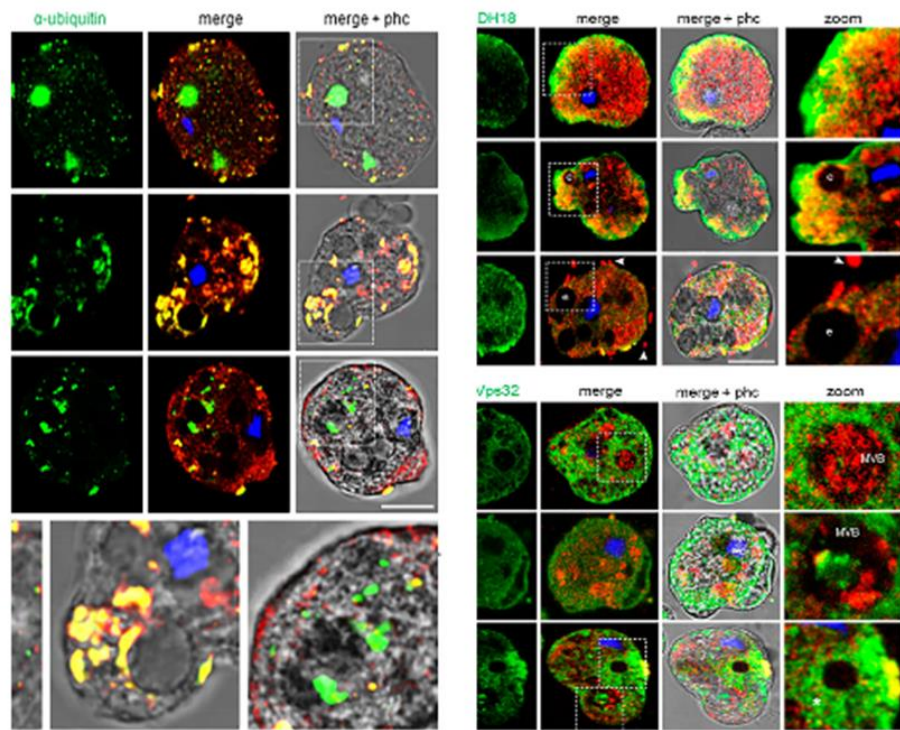
A**Niveles de ARN mensajero****B**

Figura 7.- EhVps2 se asocia a componentes del complejo ESCRT-III, ubiquitina y fosfolípidos durante el evento de fagocitosis. La proteína EhVps2, parte del complejo ESCRT-III tiene la capacidad de asociarse con EhVps20 y EhVps32 del mismo complejo (modificada de Ávalos-Padilla y col., 2018).

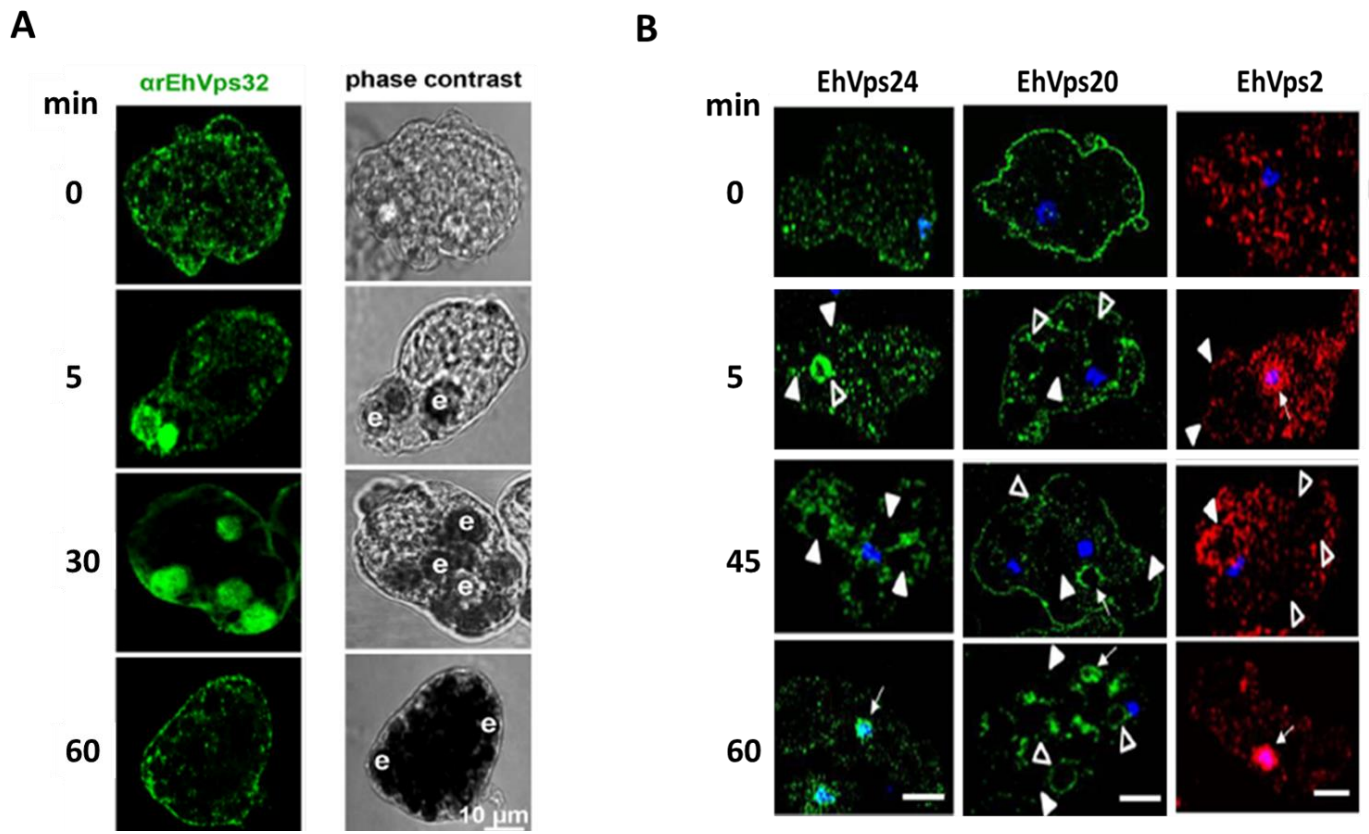


1.7 ESCRT-III en *Entamoeba histolytica*

En 2016, Ávalos Padilla caracterizó a los miembros del ESCRT-III en amiba: EhVps32, EhVps24, EhVps20 y EhVps2. Estas proteínas están dispersas e inactivas en el citoplasma cuando la amiba está en estado basal. Durante la fagocitosis, EhVps32 se encuentra en vesículas citoplasmáticas adyacentes a la membrana plasmática y en algunos fagosomas con eritrocitos (Figura 7) formando oligómeros sobre estos. EhVps32 se co-localizó con proteínas que participan en la endocitosis como la actina, la EhADH y la lectina Gal/GalNAc en las bocas fagocíticas y en algunos fagosomas que contienen eritrocitos, lo que sugiere su participación directa durante la fagocitosis (Figura 8) (Ávalos-Padilla y col., 2015).

Mediante ensayos con vesículas gigantes unilamelares (GUVs) se estudió la función de las proteínas del complejo ESCRT-III. Por medio de estos experimentos se determinó que EhVps20 es la primera proteína que se une a las membranas cargadas negativamente e inicia el reclutamiento del resto de la maquinaria. Posteriormente EhVps32 forma invaginaciones en la membrana y después de esto EhVps24 escinde la vesícula naciente durante la formación de CMVs, originando las VILs. A pesar de que EhVps2 parece no ser necesaria para la formación de estas vesículas se observaron cambios en su localización celular durante la eritrofagocitosis al igual que las demás Vps del complejo ESCRT-III (Figura 8) (Ávalos-Padilla, 2016). Por otra parte, resultados recientes han mostrado que EhVps2 podría tener un papel regulador del tamaño de las VILs en los CMVs (Henne, 2012; Ávalos-Padilla, 2016).

Figura 8.-Detección y localización de las proteínas del complejo ESCRT-III en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis en trofozoítos de *E. histolytica*. A) Localización EhVps32 durante la fagocitosis. Microscopia confocal usando anticuerpos específicos anti-EhVps32r seguido del uso de anticuerpos secundarios marcados con FITC. Flechas: membrana plasmática. Puntas de flecha: vesículas cercanas a la membrana plasmática. B) Trofozoítos incubados con eritrocitos humanos a 37°C, en relación 1:25, a diferentes tiempos. Las preparaciones se incubaron con los anticuerpos específicos α -EhVps24, α -EhVps20 y α -EhVps2 seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde) en el caso de EhVps24 y EhVps20 y TRITC (rojo) para EhVps2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), para su posterior análisis en microscopia confocal. Cabezas de flecha rellenas: fagosomas marcados el respectivo anticuerpo. Cabezas de flecha vacías: fagosomas sin marca modificado de (Ávalos-Padilla, 2016).



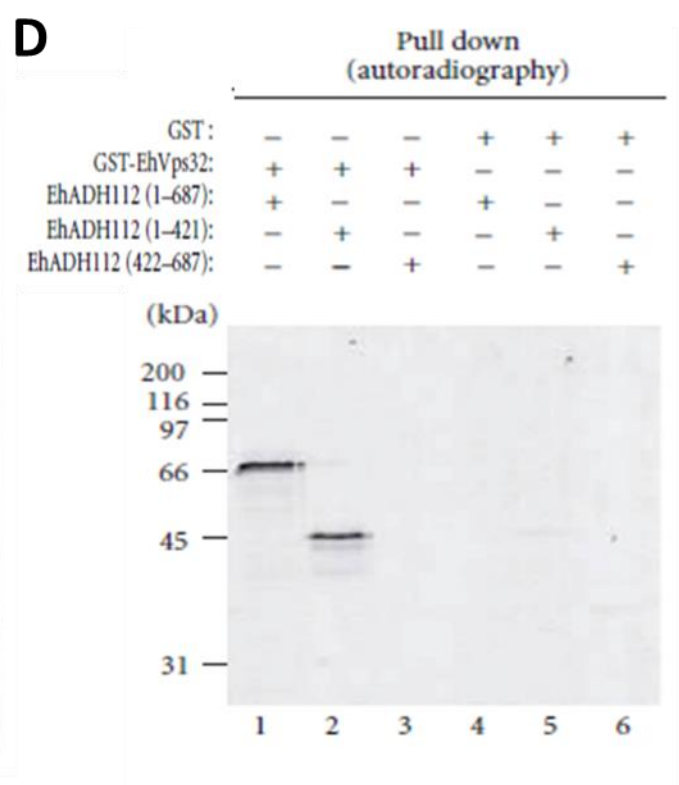
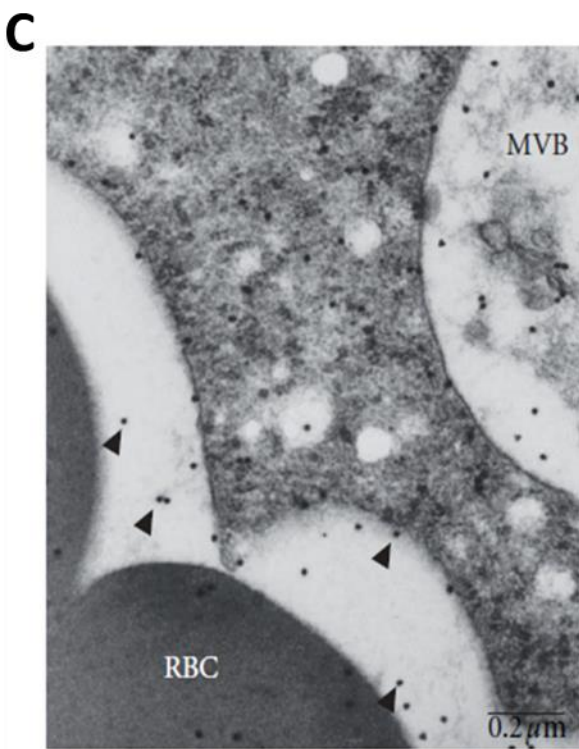
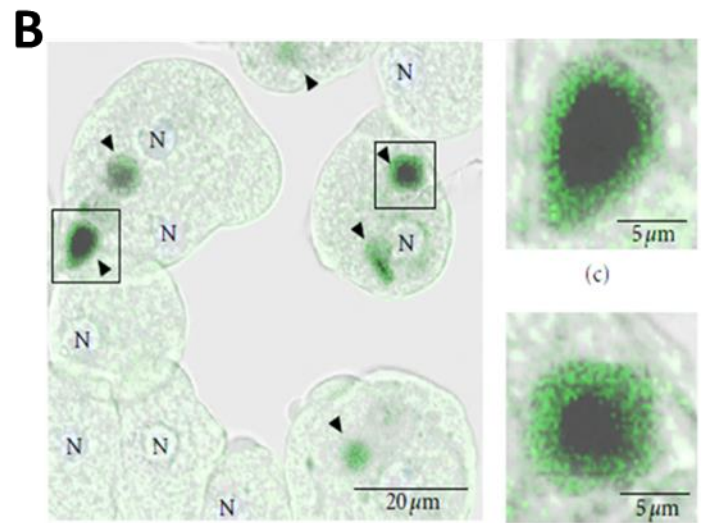
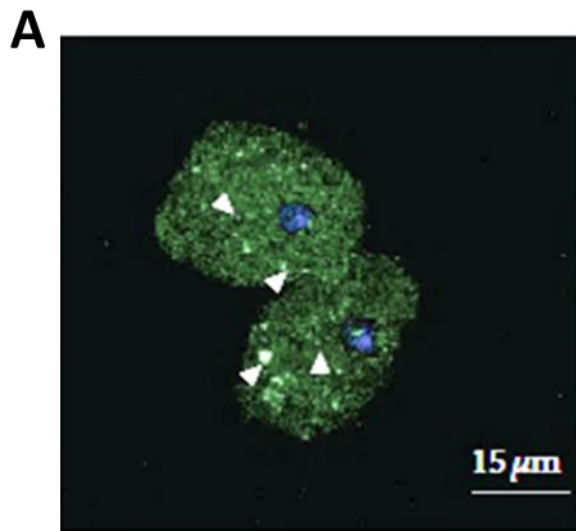
1.8 Proteínas accesorias de la maquinaria ESCRT en *Entamoeba histolytica*

Para su eficiente funcionamiento, la maquinaria ESCRT requiere de la coadyuvancia de otras proteínas que no forman parte de los complejos ESCRT, pero que participan en los procesos que esta maquinaria lleva a cabo. A estas proteínas se les conoce como proteínas accesorias y entre ellas se encuentran EhVps4 y EhADH (Figura 9).

En *E. histolytica* se demostró la presencia de EhVps4, que conserva la arquitectura típica de sus homólogos y posee actividad de ATPasa, importante para desensamblar la maquinaria ESCRT. En ensayos de eritrofagocitosis usando una mutante dominante negativa, se demostró que la EhVps4 participa en los procesos de virulencia *in vitro* e *in vivo* y cambia su localización desde el citoplasma en condiciones basales hacia alrededor de los fagosomas que contienen eritrocitos durante la fagocitosis (Figura 9) (Lopez-Reyes y col., 2010).

Análisis *in silico* demostraron que la proteína EhADH contiene en la región N-terminal un dominio Bro1 de alta homología con el dominio Bro1 de las proteínas de la familia ALIX de mamífero. Alix participa en el direccionamiento de proteínas endosomales y en la captura de la molécula cargo (Sun y col. 2015). La sobreexpresión en trofozoítos del dominio Bro1 de EhADH disminuyó la tasa de fagocitosis del parásito y llevó a la acumulación de esta proteína en compartimentos aberrantes, sugiriendo que el dominio Bro1 recluta proteínas que participan en la fagocitosis. EhADH se localizó en membrana plasmática, en CMVs y en fagosomas durante la eritrofagocitosis y se asoció con EhVps32 a través del dominio Bro1, lo cual sugiere su participación en la vía de la formación de CMVs (Banuelos y col., 2012; Banuelos y col., 2005).

Figura 9.- Localización de las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH112 durante la eritrofagocitosis y su asociación con EhVps32. A) Trofozoítos de la clona A se incubaron con anticuerpos primarios anti-EhVps4 y anticuerpos secundarios marcados con FITC. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Las puntas de flecha indican la señal de EhVps4 en pequeños puntos dentro del citoplasma. B) Localización celular de EhVps4 durante la eritrofagocitosis. Las puntas de flecha negras muestran que EhVps4 rodea a los eritrocitos fagocitados (modificada de (López-Reyes y col., 2010). C) EhADH112 en fagosomas y CMVs después de 15 min de interacción con eritrocitos, utilizando microscopía electrónica de transmisión y anticuerpos acoplados a partículas de oro. D) Interacción *in vitro* de EhADH112 a EhVps32 a través del dominio Bro1, utilizando proteínas GST-EhVps32 y EhADH112 marcada radiactivamente con [S^{35}].



1.9 ESCRT-II en *Entamoeba histolytica*

El primer estudio de los genes ESCRT-II en *E. histolytica* fue realizado por López-Reyes y col. en 2011. En este trabajo, usando las bases de datos de amiba (amoebaDB) se identificaron los genes *Ehvps22*, *Ehvps25* y *Ehvps36* que conforman este complejo. Se obtuvieron los números de acceso EHI_131120 para EhVps22, EHI_137860 para EhVps25 y EHI_045320 para EhVps36. Además, mediante ensayos de PCR se evaluaron los niveles de expresión de estos genes en una condición de fagocitosis y la condición basal. Los resultados de este trabajo mostraron cambios en los niveles de expresión. En el caso de EhVps25 se describe un incremento y para EhVps36 una disminución en comparación con la condición basal. Esta información sugirió la participación del complejo ESCRT-II durante el evento de fagocitosis en amiba. Posteriormente, en 2017 (Díaz-Hernández, 2017. Tesis de maestría) se analizó *in silico* a estas tres proteínas para conocer su similitud con las proteínas de humano y levadura, cuáles eran sus dominios, su estructura terciaria y las interacciones que podrían llevar a cabo. Además, se evaluaron de manera experimental los niveles de proteína durante la condición de fagocitosis, esto mediante ensayos de western blot. En los siguientes apartados describimos cada uno de los hallazgos por proteína.

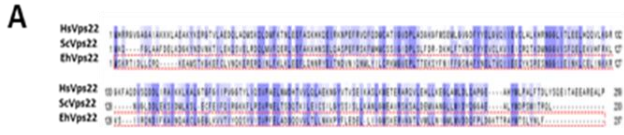
EhVps22

Mediante alineamientos *in silico* de la secuencia de aminoácidos se encontró que EhVps22 cuenta con un 33% y 28% de identidad con respecto a Vps22 de organismos en los que se ha estudiado ampliamente el complejo ESCRT como *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae* (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Mediante la obtención de la estructura tridimensional (Figura 10) y su comparación con la estructura de humano se determinó que EhVps22 presenta una identidad estructural del 87.5% con respecto a humano lo que indica un gran parecido y esto sugiere que EhVps22 pueda realizar las funciones que se le adjudicó en otros organismos. EhVps22 cuenta con los dos dominios WH

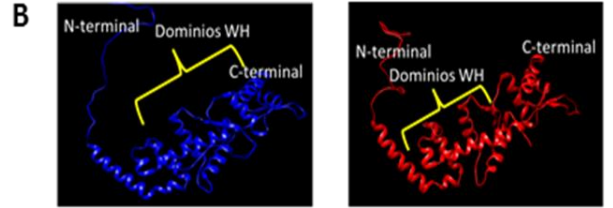
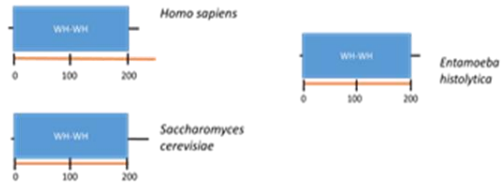
característicos de las Vps's del complejo ESCRT-II, los cuales le podrían permitir interactuar con EhVps25.

El interactoma *in silico* (Figura. 11) mostró que EhVps22 podría estar en contacto con componentes del complejo ESCRT-I, como Vps23, con EhVps25 y EhVps36 del complejo ESCRT-II y, además, con las proteínas accesorias EhVps4 y EhADH112 (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Otras proteínas con las que hay una probable interacción son las proteínas snRNP-F, que participan en el complejo del espliceosoma para la edición de pre-ARNm; EhCaBP, una proteína de unión a calcio que participa en la fagocitosis; y con Vps29, un probable componente del complejo del retrómero, el cual participa en el reciclaje de receptores transmembranales desde endosomas hacia la red *trans*-Golgi. Por otro lado, se evaluó la transcripción del gen *Ehvps22* durante el proceso de eritrofagocitosis, sin embargo, no se observaron cambios significativos a nivel transcripcional al menos hasta los 30 min de fagocitosis (Figura.11) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría).

Figura 10.- Identificación y caracterización *in silico* de EhVps22. A) Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de EhVps22 con Vps22 de *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae* y comparación de dominios funcionales. B) Obtención de la estructura tridimensional de EhVps22 y empalme con Vps22 de humano.



% Identidad	HsVps22	ScVps22
EhVps22	33%	28%



HsVps22
9 α -hélices
6 β -plegadas

EhVps22
9 α -hélices
6 β -plegadas

87.5% de identidad
estructural

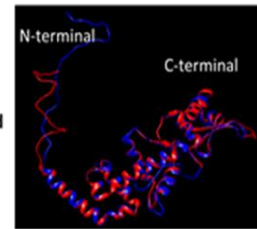
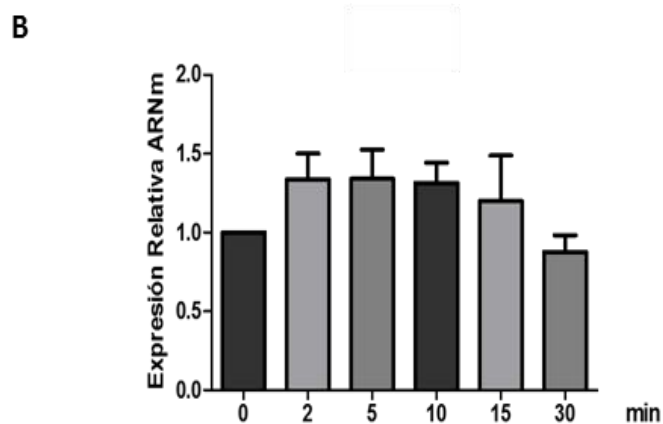
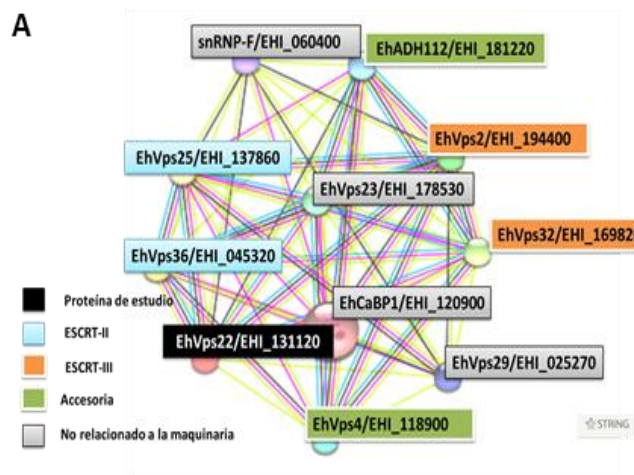


Figura 11.- Interacciones *in silico* de EhVps22 y niveles de RNAm durante la fagocitosis. A) Interactoma *in silico* de EhVps22. B) Niveles de transcripción del gen *Ehvps22* durante diferentes tiempos de eritrofagocitosis (0, 2, 5, 10, 15, 30 min).

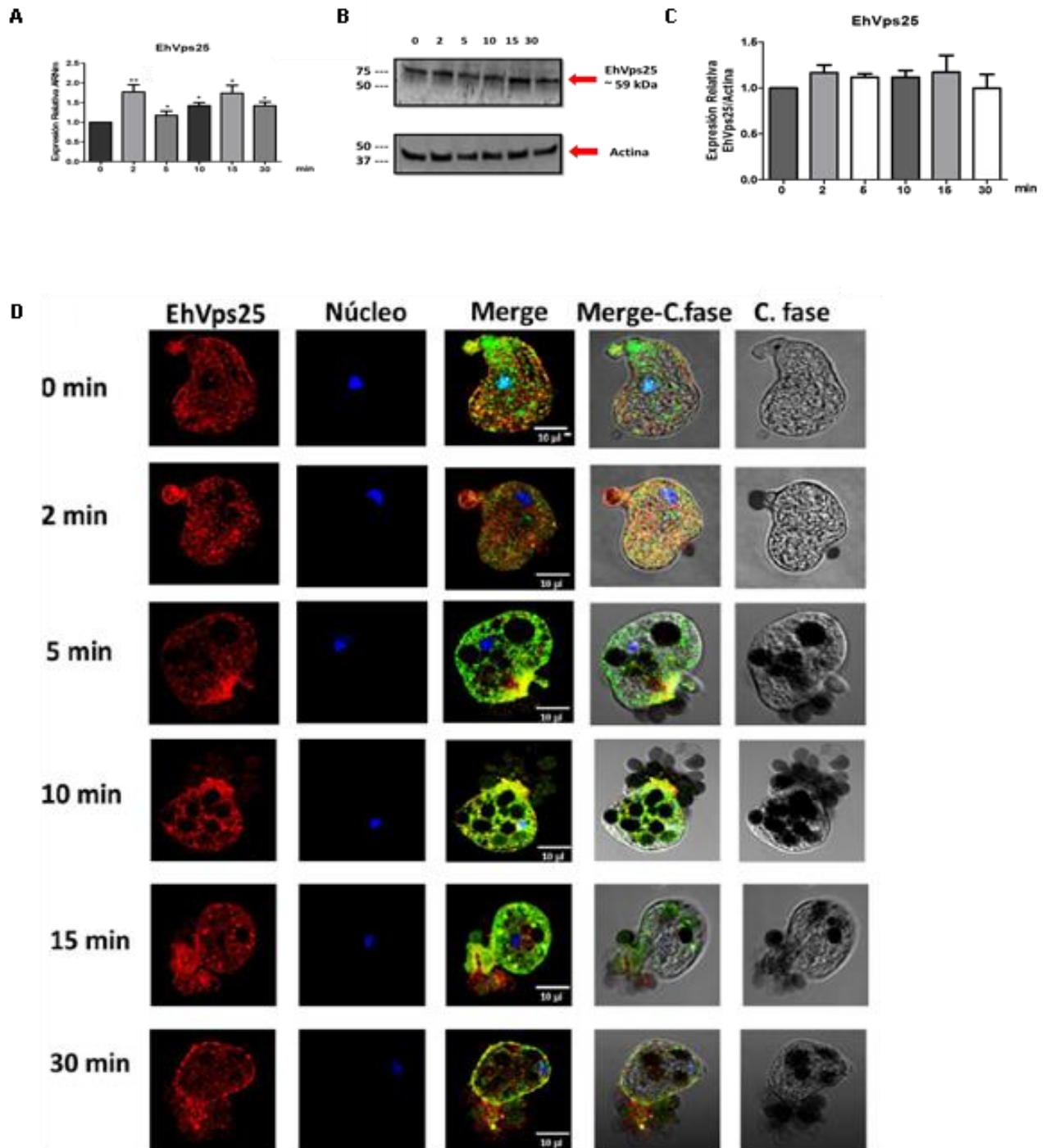


EhVps25

EhVps25 tiene un 29% y 20% de identidad en secuencia con *H. sapiens* y *S. cerevisiae*, respectivamente; y un 98.3% de identidad estructural con su contraparte humana (Figura 12) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Esta proteína cuenta en la región carboxilo terminal con dos dominios WH y un motivo PPXY importante para la asociación con otras proteínas Vps's, presentes también en humano y levadura. El análisis de predicción de interacciones *in silico* (Figura 12) mostró que esta proteína podría interactuar con Vps23 del ESCRT-I, con EhVps2 y EhVps32 del complejo ESCRT-III, con proteínas accesorias EhADH112 y EhVps4, y con las proteínas que conforman el complejo retrómero: Vps26, Vps29 y Vps35 (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Se observó también un aumento significativo de la transcripción del gen *Ehvps25* durante el evento de fagocitosis desde los 2 min hasta los 30 min. (Figura 13) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Interesantemente, durante la eritrofagocitosis no se detectó ningún cambio significativo en los niveles de proteína comparado con la condición basal, pero si un cambio en su localización, del citoplasma, en donde se localiza en condiciones basales, migró a las bocas fagocíticas, vesículas con eritrocitos fagocitados y núcleo (Figura.13) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría).

Figura 12.- Identificación y caracterización *in silico* de EhVps25. A) Alineamientos de secuencia de aminoácidos de EhVps25 con Vps25 de *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae* y comparación de dominios funcionales. B) Obtención de la estructura tridimensional de EhVps25 y empalme con Vps25 de humano. C) Interactoma *in silico* de EhVps25.

Figura 13.- Análisis de EhVps25 durante la fagocitosis en *Entamoeba histolytica*. A) Niveles de transcripción del gen *Ehvps25* durante diferentes tiempos de eritrofagocitosis (0, 2, 5, 10, 15, 30 min). B) Niveles de la proteína EhVps25 durante fagocitosis. C) Análisis densitométrico. D) Localización de EhVps25 durante la eritrofagocitosis.



EhVps36

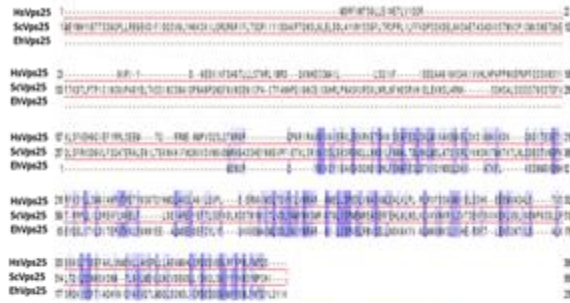
Vps36, es la tercera proteína que forma parte del complejo ESCRT-II. Se sabe que interactúa con otras Vps's de su mismo complejo, así como con las de complejos aledaños. Además, en otros organismos se ha visto que se asocia a ubiquitina que a su vez flanquea a la proteína cargo.

En *E. histolytica*, esta proteína tiene un 26% y 28% de identidad en secuencia con respecto a *H. sapiens* y *S. cerevisiae* (Figura 14) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Sin embargo, el análisis de la estructura terciaria de EhVps36 y su empalme con Vps36 de humano arrojó un 84.7% de identidad estructural (Figura14). Esta proteína cuenta con dos dominios WH en la región carboxilo terminal (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría), mediante los cuales podría interactuar con EhVps25; no contiene el dominio GLUE (Figura 14), el cual es importante para unirse a proteínas ubiquitinadas, anclarse a membrana endosomal y asociarse con proteínas del complejo ESCRT-I, sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que su asociación y la ejecución de éstas funciones se lleve a cabo de manera no conservada. El análisis *in silico* de probables interacciones sugiere la unión con las proteínas EhVps22 y EhVps25 (ESCRT-II), con EhVps23 (ESCRT-I), EhVps20 y EhVps32 (ESCRT-III), así como con la proteína EhVps35 del retrómero (Figura14). Por otro lado, mediante ensayos de RT-qPCR se evaluaron los niveles de ARNm también para el gen *Ehvps36* durante el evento de eritrofagocitosis. Los resultados indicaron que la cantidad de transcrito aumentó significativamente a los 2 min con respecto a la condición basal y descendieron a partir de los 5 min al mismo nivel que la condición basal (Figura15) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). La cantidad de la proteína EhVps36 disminuyó significativamente hasta los 15 y 30 min de la eritrofagocitosis (Figuras 15). En el estado basal EhVps36 se localizó en el citoplasma, en algunas regiones de la membrana y en el núcleo; durante la fagocitosis se encontró en los pseudópodos, el citoplasma y cerca de eritrocitos que aparentemente serán endocitados (Figura 15); además, se co-localizó con EhVps25 en bocas fagocíticas,

eritrocitos adheridos a la amiba y núcleo (Figura 15) (Díaz-Hernández M. C., 2017-
Tesis de maestría).

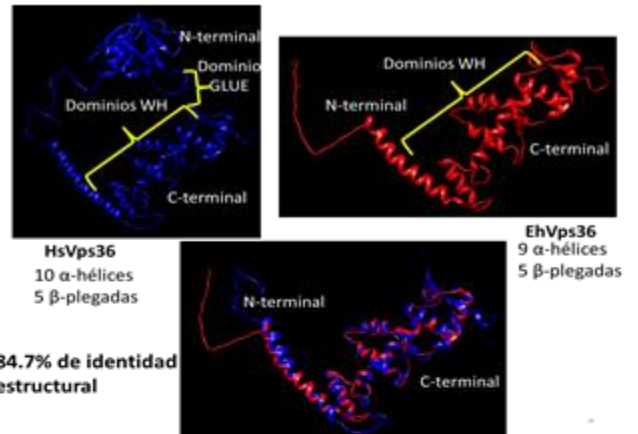
Figura 14.-Identificación y caracterización *in silico* de EhVps36. A) Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de EhVps36 con Vps36 de *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*. B) Obtención de la estructura tridimensional de EhVps36 y empalme con Vps36 de humano. C) Comparación de dominios funcionales de EhVps36 con los organismos de referencia. D) Interactoma *in silico* de EhVps36.

A

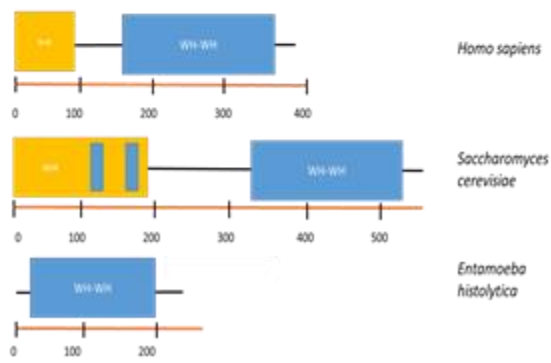


% Identidad	HsVps36	ScVps36
EhVps36	26%	28%

B



C



D

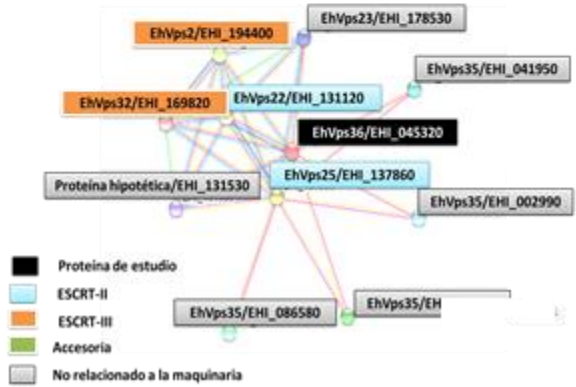
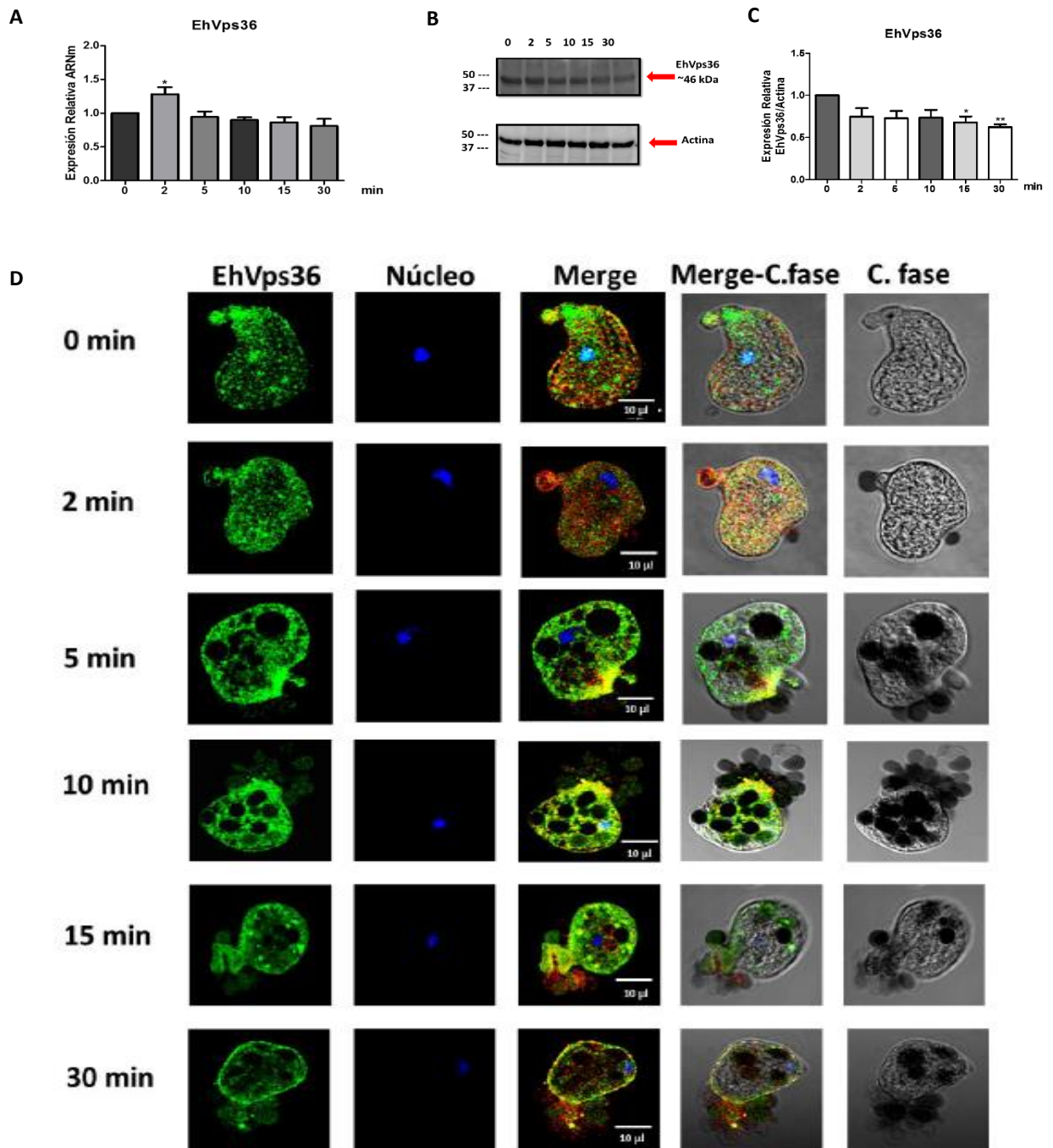


Figura 15.- Análisis de EhVps36 durante la fagocitosis en *Entamoeba histolytica*. A) Niveles de transcripción del gen *Ehvps36* durante diferentes tiempos de eritrofagocitosis (0, 2, 5, 10, 15, 30 min). B) Cuantificación de los niveles de proteína EhVps36 durante fagocitosis. C) Análisis densitométrico. D) Localización de EhVps36 durante fagocitosis de eritrocitos.



Dado que EhVps36 no contiene el dominio GLUE, el cual permite la unión a proteínas cargo ubiquitinadas, a fosfolípidos y a Vps28 del ESCRT-I, se propuso que mediante una modificación postraducciona como la sumoilación se pudiera suplir a la ubiquitinación. La adición de SUMO (del inglés *Small Ubiquitin like Modifiers*), es una proteína que podría compensar esta función. En otros sistemas, por ejemplo, en células de mamífero durante salida de la α -sinucleína al medio extracelular, los componentes de la maquinaria ESCRT son reclutados a través de la SUMOilación (Kunadt y col., 2015).

1.10 SUMOilación en *Entamoeba histolytica*

En tres especies de amibas: *Entamoeba invadens*, *Entamoeba dispar* y *Entamoeba histolytica*, a través de herramientas bioinformáticas, se identificaron genes modificadores de tipo ubiquitina conocidos como con sus respectivos genes para enzimas de activación, conjugación y ligación para que se lleve a cabo el proceso (Shweta Arya y col., 2012) por lo que no se descarta la posibilidad de que en *E. histolytica* exista una vía de señalización para la proteína SUMO, incluso, en otros organismos se sospecha que tal vez las vías de ubiquitinación y SUMOilación lleguen a converger en algún punto llevando a un resultado sinérgico o antagónico en su señalización (Shweta Arya y col., 2012).

En 2021, Díaz Hernández y colaboradores identificaron y caracterizaron por primera vez a la proteína SUMO en *E. histolytica* (EhSUMO). Esto mediante análisis *in silico* usando las bases de datos NCBI y AmoebaDB (Díaz-Hernández y col., 2021). Una vez obtenida la secuencia se realizaron comparaciones a nivel de aminoácidos y de estructura terciaria con organismos de referencia como humano, levadura y el parásito *Giardia lamblia*. Los resultados obtenidos muestran gran parecido de esta proteína con las ya estudiadas. Además, la proteína EhSUMO cuenta con el dominio *Ubiquitin-2 Rad60 SUMO-like* presente en humano, levadura y *giardia* que se sabe es importante para el reconocimiento de las proteínas blanco. Por otro lado, se evaluó la localización de esta proteína durante el evento de fagocitosis en amiba y los resultados evidencian el cambio en su localización desde el citoplasma en una condición basal, hasta regiones cercanas al contacto con los eritrocitos, bocas fagocíticas y fagosomas una vez

que se estimula la fagocitosis (Díaz- Hernández y col., 2021). Estos resultados sugieren fuertemente la intervención de la proteína EhSUMO durante la fagocitosis de *E. histolytica*.

1.11 SUMOilación en la maquinaria ESCRT

Como se explicó anteriormente, la SUMOilación está involucrada en la fagocitosis de *E. histolytica*. Por lo tanto, la función de las proteínas de la maquinaria ESCRT podría estar regulada o actuar en conjunto con la sumoilación. Para tratar de responder esta cuestión, en 2017, Díaz Hernández (tesis de maestría) realizó un análisis *in silico* de los posibles sitios de SUMOilación y de motivos de unión a SUMO (SIMs, del inglés *SUMO Interaction Motifs*) en las proteínas de la maquinaria ESCRT de *E. histolytica*. Este análisis mostró que la mayoría de las proteínas del complejo, hasta ahora estudiadas, pueden ser modificadas por SUMO y pueden contener motivos SIM (Figura16) (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría).

La ubiquitinación, también se lleva a cabo en residuos de lisina, por lo que se realizó el análisis *in silico* de posibles sitios de ubiquitinación en la maquinaria ESCRT para conocer si los mismos aminoácidos se modifican postraduccionalmente con ambas proteínas (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). Se encontró que las lisinas que pueden SUMOilarse no son las mismas que pueden ser marcadas por ubiquitina en la maquinaria ESCRT de amiba. También, se observó que EhVps22 contiene dos motivos SIMs y un sitio de SUMOilación, con los cuales podría interactuar con proteínas cargo o proteínas Vps SUMOiladas y con fosfolípidos de membrana. EhVps25 tiene un sitio de SUMOilación en la lisina del carboxilo terminal y además un sitio SIM en el aminoácido 98, el cual sugiere que esta proteína podría interactuar con la membrana endosomal y con proteínas cargo SUMOiladas. En Vps36 tiene un sitio de SUMOilación en la última lisina en carboxilo terminal, el cual le podría permitir el anclaje a membrana endosomal (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría). En otros organismos se ha reportado que Vps36 interacciona con Vps28 del ESCRT-I, pero ya que Vps28 no fue identificada en amiba, se analizó la existencia de algún sitio de SUMOilación o sitio SIM en EhVps23, una Vps que

pertenece al ESCRT-I y que ya ha sido estudiada en *E. histolytica* (Galindo-Olea, 2015; López-Reyes, 2010). EhVps23 tiene un sitio SIM en el carboxilo terminal, el cual podría interaccionar con SUMO en Vps36; lo anterior sugirió un vínculo entre ESCRT-I y ESCRT-II (Díaz-Hernández M. C., 2017-Tesis de maestría).

Además, en estudios recientes se ha comprobado de manera experimental que EhSUMO puede asociarse a componentes de la maquinaria ESCRT como EhVps32 y la proteína accesorio EhADH durante el evento de fagocitosis (Díaz-Hernández y col. 2021). Además, el silenciamiento del gen *Ehsumo* disminuye significativamente la tasa de fagocitosis y de adhesión, y en menor medida el efecto citopático (Díaz-Hernández y col. 2021).

Tabla I.- Sitios de SUMOilación en la maquinaria ESCRT de *Entamoeba histolytica*. Predicción *in silico* de posibles sitios de SUMOilación y sitios SIMs en las proteínas de la maquinaria ESCRT en amiba.

	Proteína	Posicion	Péptido/secuencia	Score	Sitio	Tamaño
ESCRT-0	EhTom1	99	SEGMEIVKKHPEVDE	37,628	SUMOilacion	494 aa
	EhVps23	91-95	TTIECPE LIDLY STSAWQD	61,875	SIM	284 aa
ESCRT-I	-	203	ILELEQLKEDMEIKE	44,401	SUMOilacion	-
	-	214	EIKEIIFKLEKAQPI	18,002	SUMOilación	-
	EhVps22	41	QINLFKCLKLEEFQDN	26,79	SUMOilacion	237 aa
		113-117	SRESNGGIIEINKLCELIN	63,03	SIM	-
		150-154	AKCLGEGLVVVTIYQQSY V	64,6	SIM	-
ESCRT-II	EhVps25	171	EYGIFWLK****	38,326	SUMOilacion	171 aa
		94-98	DLNKSSK LILLY KPLREWG	56,532	SIM	-
	EhVps36	235	TQYLQYIK***	41,096	SUMOilacion	235 aa
	EhVps2	117	RKVNEATKLPAMQKV	24,671	SUMOilacion	246 aa
	EhVps20	32-36	VTDLQK IVDLD RQIRQNI	65,754	SIM	206 aa
ESCRT-III	EhVps24	176	EGGIEAVKNEVIAES	43,439	SUMOilacion	205 aa
	EhVps32	133-137	NNEKSHE IGDLL GEDLQDI	64,005	SIM	204 aa
	EhVps4	78	MISGERVKSDDPDKE	45,994	SUMOilacion	419 aa
	-	128-132	EALQEAV ILPIK FPQLFTD	59,356	SIM	-
Accesory	-	231	TEASRRVKTEFLVQM	41,814	SUMOilacion	-
	EhADH112	154	QAAGAFQKAADCAQL	25,68	SUMOilacion	687 aa
	-	366-370	EYNSKAQ VILND SKKCES	58,036	SIM	-

2 JUSTIFICACIÓN

Los estudios realizados en *E. histolytica* sobre las proteínas de complejo ESCRT-II: EhVps22, EhVps25 y EhVps36 indican que participan durante la fagocitosis. Sin embargo, su rol en el ensamble de la maquinaria ESCRT y las interacciones con otras proteínas aún no han sido caracterizadas.

3 HIPÓTESIS

Las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36 del complejo ESCRT-II forman parte de la maquinaria ESCRT, la cual regula la fagocitosis en *Entamoeba histolytica*.

4 OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar las funciones e interacciones de las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36 del complejo ESCRT-II involucrado en la fagocitosis de *E. histolytica*.

Objetivos particulares

- 1.- Obtener las estructuras 3D del complejo ESCRT-II y determinar sus probables asociaciones mediante docking molecular (*in silico*).
- 2.- Comprobar experimentalmente las interacciones entre los componentes del complejo ESCRT-II (*in vitro*).
- 3.- Determinar interacción del complejo ESCRT-II con sus complejos aledaños: ESCRT-I y ESCRT-III (*in vitro*).
- 3.- Probar la función del complejo ESCRT-II de *E. histolytica in vivo*, mediante la disminución de la expresión del gen *Ehvps25*.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de trofozoítos

Trofozoítos de *E. histolytica*, clona A (cepa HM1: IMSS), se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 (Diamond y col., 1978) a 37 °C y se recolectaron en fase de crecimiento logarítmico para todos los experimentos.

Búsqueda ESCRT-II y análisis filogenético

Se identificó la secuencia completa de los genes EhVps22, EhVps25 y EhVps36 en el genoma de *E. histolytica* (EHI_131120, EHI_137860 y EHI_045320 respectivamente), utilizando el algoritmo BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la base de datos AmoebaDB (www.amoebadb.org). Además, también se exploraron las proteínas Vps22, Vps25 y Vps36 de *H. sapiens* (NP_009172, NP_115729 y NP_057159) y *S. cerevisiae* (YPL002C, YJR102C y YLR417W). Las secuencias de aminoácidos de EhVps22, EhVps25 y EhVps36, se alinearon con su ortólogo por ClustalW y los datos se sometieron a análisis filogenético por UPGMA, utilizando el software MEGA 5.05. El bootstrapping se realizó en 1000 repeticiones.

Estructura secundaria de EhVps22, EhVps25, EhVps36 y Vps20 y Simulaciones de Dinámica Molecular (MDS) para obtener la estructura terciaria.

Mediante análisis *in silico*, los dos dominios Winged-helix de las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36 se ubicaron y alinearon con la supuesta secuencia de aminoácidos y se compararon con EhVps22, EhVps25 y EhVps36 ortólogos, respectivamente, para diseñar la estructura secundaria de las proteínas. Los dominios funcionales se predijeron en la plataforma kegg (<https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) y la ilustración de los mismos se realizó en IBS Illustrator for Biological Sequences (<http://ibs.biocuckoo.org/en/linea.php>). La estructura 3D de EhVps22, EhVps25, EhVps36 y EhVps20 se obtuvo del servidor I-TASSER. Se seleccionó de acuerdo con su puntaje C y los

mejores valores de diagrama de Ramachandran después de MDS durante 100 ns en un ambiente soluble. El modelo 3D de EhVPS23 se obtuvo según lo informado previamente por Galindo-Olea y col., 2021.

Acoplamiento proteína-proteína

Las instantáneas de EhVps23 (Galindo-Olea y col., 2021), EhVps22, EhVps25, EhVps36 y EhVps20 para el análisis de acoplamiento se obtuvieron utilizando el análisis de agrupamiento en los últimos 50 ns de los MD con el software Carma (Koukos y Glykos, 2013). Los estudios de acoplamiento proteína-proteína se calcularon empleando diferentes conformeros con el servidor ClusPro (Comeau, Gatchell, Vajda y Camacho, 2004a; Comeau, Gatchell, Vajda y Camacho, 2004b; Kozakov y col., 2013); Los conformadores con los miembros de clúster más altos y la energía más baja calculada en FireDock (doi: 10.1093/nar/gkn186) se analizaron en el servidor PDBsum (DOI: 10.1016/s0968-0004(97)01140-7), la visualización de todas las estructuras 3D fue realizada por VMD (Humphrey y col., 1996).

Clonación de los Genes Vps22, Vps25 y Vps36 de E. histolytica (EhVps22, EhVps25 y EhVps36)

Para clonar los genes EhVps22, EhVps25 y EhVps36, se amplificaron por PCR las secuencias completas de ADN de 714, 516 y 708 pb respectivamente, utilizando los siguientes cebadores específicos: sense 5'CCGGTACCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATG

TCAAAAAGAACAATTGATTTGTTATGTAG-3' y antisentido 5'-GGGGATCCTTAAAACAAGTTATATAATGATGTCCAATATGCT-3' correspondiente a EhVps22, sentido 5'CCGGTACCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATG

ACATTTGGAATTCCTGAATTTGC-3' y antisentido 5'-GGGGATCCTTATTTCAA CCAAAAATTCCATATTCTCCT-3' correspondiente a EhVps25 y sentido 5'CCGGTACCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGTCTAATCAACCA CAATATGGAATTAATC-3' y antisentido 5'-GGGGATCCTTATTTGATGTATTGAAGGTATTGAGTATTA AAAAGA-3'

correspondiente a EhVps36, en una mezcla que contenía: 10 mM de dNTPs, molde asantómico y ADN histológico de E.D 100 ng, 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Gibco). El ensayo de PCR se llevó a cabo durante 35 ciclos (1 min a 94 °C, 30 s a 59 °C y 40 s a 72 °C). Los oligonucleótidos sentido contienen un sitio de restricción ScaI, mientras que el oligonucleótido antisentido alberga un sitio de restricción KpnI. . Los genes de longitud completa se clonaron en plásmido de ADN pCold II, que confirió una etiqueta de histidina.

Ensayos de PCR

El ARN total se aisló de los trofozoítos utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó usando cebadores oligo dT y la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad Q5® (Biolabs) con 20 ng de ADNc como moldes y cebadores específicos. Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Como controles para las amplificaciones por PCR, en lugar de ADN, se utilizó agua libre de nucleasas.

Expresión y purificación de proteína recombinante y generación de anticuerpos anti-EhVps22, EhVps25 y EhVps36

Las bacterias *Escherichia coli* BLI21 (pLysS) se transformaron por separado con pCold/EhVp22, pCold/EhVp25 y pCold/EhVp36, que contenían el marco de lectura abierto completo de los genes EhVps22, EhVps25 y EhVps36 para producir proteínas recombinantes EhVps22, EhVps25 y EhVps36 marcadas con His (rEhVps22, rEhVps25 y rEhVps36). Las proteínas His-rEhVps22, His-rEhVps25 y His-rEhVps36 se purificaron con perlas de cobalto en un gradiente de imidazol y se usaron para inocular por vía subcutánea e intramuscular ratones BALB/c (50 µg emulsionados en adyuvante Titer-Max Classic, 1:1) (Sigma), ratas Wistar (80 µg emulsionados en adyuvante Titer-Max Classic, 1:1) (Sigma), Conejo New Zeland (150 µg emulsionados en adyuvante Titer-Max Classic, 1:1)

(Sigma), respectivamente, para generar α -Anticuerpos policlonales EhVps22, EhVps25 y EhVps36. Se inyectaron dos dosis más con la misma concentración, en cada caso, a intervalos de 15 días, y se extrajo sangre de los animales para obtener el suero inmune. También se obtuvo suero preinmune, antes de la inmunización.

Ensayos de fagocitosis

Para los ensayos de fagocitosis, los trofozoítos se incubaron durante 0, 5, 15 y 30 min con glóbulos rojos (1:25) a 37 °C. En diferentes tiempos, los trofozoítos fueron preparados para inmunofluorescencia (García-Rivera y col., 1982) y observados a través del microscopio confocal. Otras preparaciones se tiñeron mediante la técnica de Novikoff (Novikoff y col., 1972), se contaron los eritrocitos adheridos e ingeridos en 100 trofozoítos a través del microscopio óptico (Axiolab, Zeiss).

Ensayos de Western Blot

Se sometieron a electroforesis lisados de trofozoítos (40 μ g) o rEhVps22, rEhVps25 y rEhVps36 purificados en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 15 % (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se probaron con α -EhVps22 de ratón (1:1000), α de rata -EhVps25 (1:2000), conejo α -EhVps36 (1:1000), rata α -EhVps23 (1:500), conejo α -EhVps20 (1:500), conejo α -EhVps32 (1:500) y anticuerpo monoclonal anti-actina (1:3000) gentilmente donado por el Dr. José Manuel Hernández (Departamento de Biología Celular, CINVESTAV). Las membranas se lavaron, se incubaron con anticuerpo secundario marcado con HRP de α -ratón, α -rata y α -conejo (Sigma, 1: 10 000) y se revelaron con el reactivo de detección ECL Prime (GE-Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante.

Ensayos de microscopía confocal

Los trofozoítos se cultivaron en cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 4 % a 37 °C durante 1 h, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % y se bloquearon con suero fetal bovino al 10 % en PBS. Luego, las células se incubaron a 4 °C durante la noche (ON) con α -EhVps22 (1:100), α -EhVps22 (1:100), α -EhVps36 (1:100), rata α -EhVps23 (1: 50) o α -EhVps20 de conejo (1:50), anticuerpos. Después de un lavado extenso, las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C con anticuerpo secundario marcado con azul pacífico de ratón alfa, marcado con TRIC de rata alfa o con FITC de conejo alfa (1:100). La fluorescencia se conservó utilizando el reactivo antifade Vectashield (Vector), se examinó a través de un microscopio confocal Carl Zeiss LMS 700, en secciones láser de 0,5 μ m y se procesó con el software ZEN 2009 Light Edition (Zeiss). Para evaluar la colocación entre proteínas, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia a partir de al menos 25 imágenes confocales, utilizando el software ImageJ 1.45v y el complemento JACoP.

Ensayos de pull-down

Se usaron proteínas recombinantes EhVps22, EhVps25 y EhVps36 etiquetadas con histidina purificadas. Estos se fijaron a la resina de cobalto mediante incubación durante 3 horas a 37°C con agitación suave. Posteriormente se realizaron 2 lavados con gradiente de imidazol. Luego se administró un lavado con PBS. A continuación, las proteínas unidas a la resina se incubaron con lisados de trofozoítos totales durante 4 horas a 37°C con agitación suave. Posteriormente se realizaron tres lavados con tampón de elución. Las muestras se centrifugaron, se recuperó el sobrenadante, se añadió tampón de muestra 2X y se hirvieron durante 5 min a 100°C. Posteriormente, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida al 12%. Las muestras corren a 1 cm de los pozos de gel y luego se tiñen con azul de Coomassie. Finalmente, se cortó la parte del gel por donde corrieron las muestras y estas se analizaron por espectrometría de masas.

Ensayo de silenciamiento

Las eliminaciones (KD) de EhVps25 se realizaron utilizando la expresión bacteriana de ARN de doble cadena (dsRNA) y experimentos de remojo de parásitos como se describe. Brevemente, los primeros 400 pb del extremo 5' del gen EhVps25 se amplificaron por PCR utilizando los siguientes cebadores: sentido 5'-CCGAGCTCATGACATTTGGAATTCCTGAATTTGC -3'

y antisentido 5'-GGGGTACCTTTCAATTGAAAATGATAAAGAATCTG-3'. Luego, el amplicón se clonó en pJET1.2/plásmido romo y se subclonó en el plásmido pL4440, usando los sitios de restricción Kpn1 y BamHI. Se realizaron PCR, análisis de restricción y secuenciación de ADN para verificar el plásmido pL4440-EhVps25 resultante. La cepa HT115 de *E. coli* deficiente en ARNasa III competente se transformó con el plásmido pL4440-EhVps25. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en caldo LB para la construcción de plásmidos o caldo 2YT para la expresión de dsRNA, en presencia de ampicilina (100 mg/mL) y tetraciclina (10 mg/mL). La expresión de EhVps25 dsRNA se indujo con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido ON 2 mM a 37 °C. Luego, el sedimento bacteriano se mezcló con acetato de amonio 1 M y EDTA 10 mM, se incubó con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó. El sobrenadante se mezcló con isopropanol, se centrifugó y el sedimento de ácido nucleico se lavó con etanol al 70 %. Se agregaron DNase I (Invitrogen) y RNase A (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) para eliminar las moléculas de ssRNA y dsDNA. EhVps25-dsRNA se lavó de nuevo con isopropanol y etanol, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y se determinó la concentración mediante espectrofotometría. Por último, se añadieron moléculas purificadas de EhVps25-dsRNA (50 µg/mL) a trofozoítos ($3,0 \times 10^4$) en medio completo TYI-S-33, y los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h. A las 24 h fue el momento en que se visualizó y analizó el silenciamiento de la proteína EhVps25 mediante ensayos de transferencia Western y microscopía confocal. Todos los experimentos posteriores se realizaron en este momento. Los trofozoítos que crecían en condiciones estándar (sin dsRNA) se usaron como controles.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t-Student, utilizando el software GraphPad Prism 5.0. Las puntuaciones que muestran diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos en los gráficos. Los valores de p correspondientes se indican en las leyendas de las figuras.

6 RESULTADOS

Las estructuras tridimensionales de las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36 presentan una alta homología con sus ortólogos

Como se sabe, la estructura de las proteínas y su dinámica en el medio ayuda a predecir posibles asociaciones con otras moléculas. Por lo que, en este proyecto quisimos obtener evidencia de que EhVps22, EhVps25 y EhVps36 son ortólogos cercanos a sus respectivas familias. Y para ello, obtuvimos las estructuras tridimensionales (3D) de las proteínas ESCRT- II y las analizamos mediante la comparación con sus ortólogos humanos y de levadura. Luego, estos modelos 3D se sometieron a un análisis de simulación de dinámica molecular (MDS), para posteriormente calcular la desviación cuadrática media (RMSD) usada para medir la similitud entre coordenadas atómicas superpuestas durante un lapso de tiempo y determinar cuándo la proteína alcanza su estabilidad. Además, estimamos las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) para medir el desplazamiento del C α y el radio de giro (Rg) para obtener la contracción de estructura.

El resultado del análisis de predicción de la estructura 3D de EhVps22 reveló que contiene nueve hélices α y tres láminas β que forman los dos dominios WH, como se describe para los ortólogos de *S. cerevisiae* y *H. sapiens* (Teo y col., 2006). La alineación estructural de este modelo exhibió un RMSD de 1.35 y 2.88 Å respecto a los cristales de sus ortólogos en humano y levadura (Figura 16). En cuanto al valor de RMSD, EhVps22 alcanzó su estabilidad a los 60 ns (Figura 17D), mientras que el valor de RMSF exhibió tres áreas de mayor movimiento en la proteína, una en M1-F23 con una fluctuación de 20 Å, probablemente debido a la falta de estructura secundaria en el extremo N de la proteína (Figura 17E). La segunda área de mayor movimiento se encontró en W214-A228 con fluctuaciones de 10 Å y la tercera en el aminoácido F237 con fluctuaciones de 8 Å (Figura 17E), ambas ubicadas en el extremo C-terminal, el cual está compuesto por estructuras enrolladas. El Rg mostró una expansión de la proteína en los primeros 15 ns y se contrajo en el lapso de 16 a 60 ns de trayectoria, alcanzando estabilidad después de 80 ns de MDS (Figura 17F).

EhVps25 presenta seis hélices α y ocho hebras β ; mientras tanto, los dominios WH aparecían formados por cinco hélices alfa (Figura 17B) como en sus ortólogos (Teo y col., 2004). La alineación estructural de este modelo exhibió un RMSD de 0.88 y 2.76 Å con ortólogos de cristales humanos y de levadura, respectivamente (Figura 16A). EhVps25 alcanzó su estabilidad al comienzo de RMDS a 20 ns (Figura 17D), mientras que RMSF exhibió cinco áreas de mayor movimiento en N89-S91 con 3 Å, G115-G119, con fluctuaciones de 3,5 Å, N129-E132, y Q160-E164 y otro en los aminoácidos K171 con fluctuaciones de 3 Å, 4 Å y 3,5 Å, respectivamente (Figura 17E). El Rg indicó la expansión de la proteína en los primeros 10 ns del MDS, y luego, el sistema permaneció sin cambios después de 190 ns de trayectoria, lo que coincide con los valores de RMSD (Figura 17F).

El modelo EhVps36 se encuentra formado por ocho hélices α y cinco láminas β (Figura 17C). Los dominios WH, a excepción de la última hoja β , se encuentran en el extremo C. EhVps36 alcanzó la estabilidad después de 170 ns de la simulación (Figura 17D). El gráfico de RMSF exhibió tres regiones de fluctuación ubicadas en M1-S28, D45-E60 y T228-K235 con 18 Å, 12 Å y 18 Å, respectivamente (Figura 17E). Los cálculos de Rg indicaron que EhVps36 es una proteína altamente dinámica que se expande y compacta durante la trayectoria analizada (Figura 17F). La estructura EhVps36 presentó un valor RMSD de 1,69 y 2,7 Å, respectivamente, en comparación con los ortólogos humanos y de levadura (Figura 16). De acuerdo con los datos anteriormente mostrados, se sugiere fuertemente que EhVps22, EhVps25 y EhVps36 son miembros de la familia ESCRT-II.

Figura 16. Resultados de predicción de modelos MDS de EhVp22, EhVps25 y EhVps36

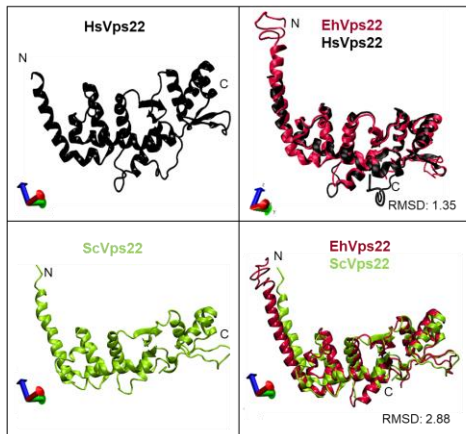
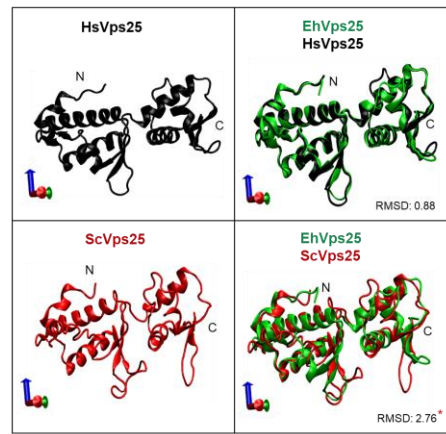
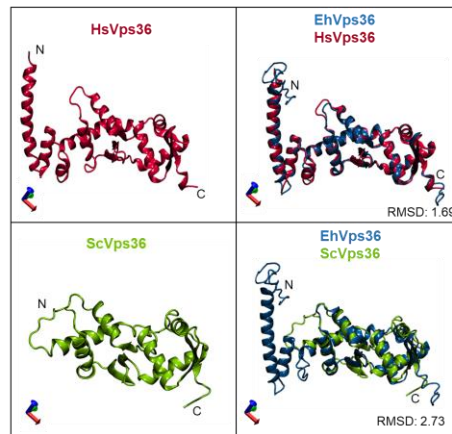
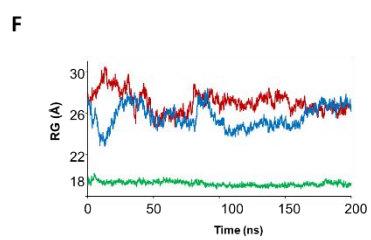
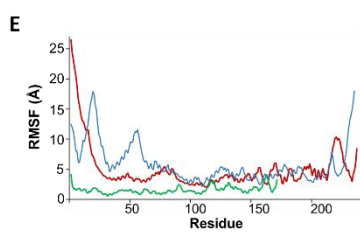
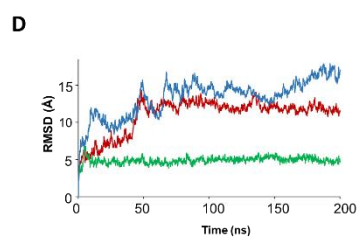
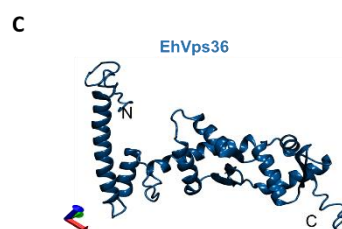
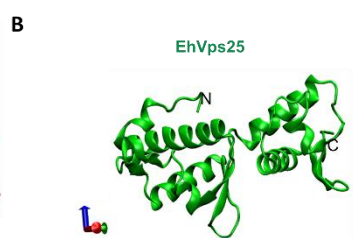
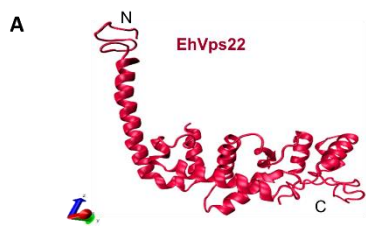
A**B****C**

Figura 17. Estructuras 3D de EhVps22, EhVps25 y EhVps36 y simulación MD. (A–C) Modelo 3D de EhVps22, EhVps25 y EhVps36. (D) SDRM. (E) RMSF. (F) Rg: Radio.

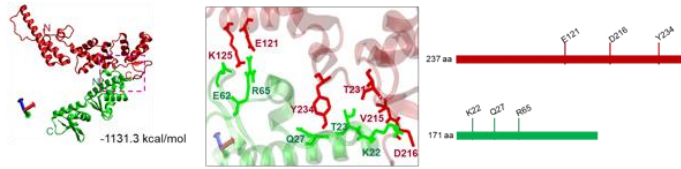


Regiones clave de los dominios WH-WH para la interacción entre EhVps22, EhVps25 y EhVps36 mediante análisis *In silico*

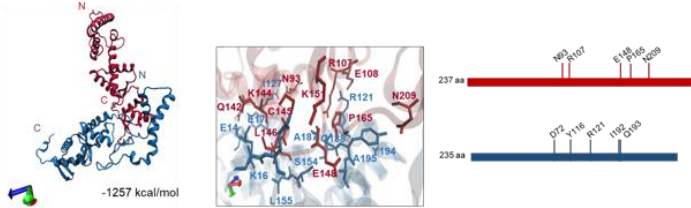
Luego de obtener los conformeros promedio de proteínas ya estables, exploramos mediante acoplamiento molecular el contacto entre EhVps22, EhVps25 y EhVps36, detectando que los aminoácidos involucrados pertenecen a regiones ubicadas en los dominios WH de cada proteína. EhVps22 se une a EhVps25 con -1131,3 kcal/mol de energía libre de unión (Figura 18A), a través de los residuos GLU121, LYS125, VAL215, ASP216, THR231 y TYR234; la mayoría de ellos están ubicados en el segundo pico de fluctuación, donde los aminoácidos carecen de estructura secundaria (Figura 18A, C). Por el contrario, los aminoácidos ARG65, GLU62, LYS22, THR23 y GLN27 participan en EhVps25 (Figura 18A). EhVps22 interactúa con EhVps36 con una energía de -1257 kcal/mol (Figura 18B) a través de los aminoácidos ASN36, LYS39, LYS79, TYR81, ASN83, ILE84, ASN93, GLU101, ARG107, GLU108, GLN142, LYS144, CYS145, LEU146, GLU148, LYS158, PRO165 y ASN209, mientras que los aminoácidos TYR40, LEU71, ASP72, ASN29, THR36, LYS10, TYR116, ILE127, ARG121, GLN188, GLN193, ALA187, ILE192, GLU14, GLU17, LYS16, LEU155, SERALA154, TYR194, participan en EhVps36 (Figura 18B). Por otro lado, el acoplamiento molecular entre EhVps36 y EhVps25 reveló que estas proteínas podrían interactuar con una energía libre de -1169,4 kcal/mol (Figura 18C). En el modelo, la interacción se realizó en EhVps25 a través de los aminoácidos ARG65, THR23, LYS10 y LYS24, mientras que en EhVps36 participaron los aminoácidos GLN179, CYS211, ASN224, GLN232 y ASP213 (Figura 18C). Además, realizamos el acoplamiento de las tres proteínas. El análisis indicó que la conformación esperada de la proteína cambia para adaptarse a las nuevas interacciones (Figura 18D). Estos análisis predijeron que las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36 podrían formar el complejo ESCRT-II al interactuar entre ellas.

Figura 18. Acoplamiento molecular entre las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36. (A) Acoplamiento de EhVps22 con EhVps25. (B) Acoplamiento de EhVps22 y EhVps36. (C) Acoplamiento entre EhVps36 con EhVps25. Paneles de la derecha: zoom de las regiones cuadradas en (A–C) involucradas en la unión. El siguiente panel es el zoom; representación lineal de la posición del aminoácido implicado en la asociación entre las proteínas. (D) Análisis *in silico* de las tres proteínas interactuadas como un solo complejo. Zoom de las regiones cuadradas en (D).

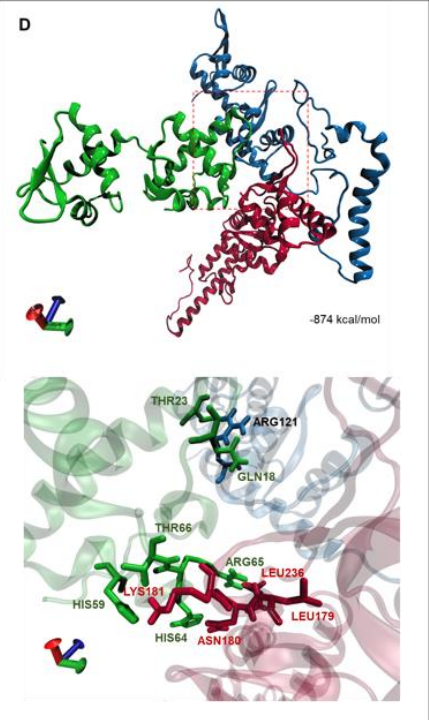
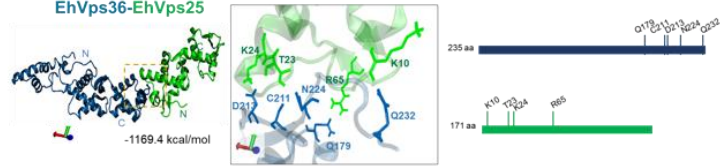
A EhVps22-EhVps25



B EhVps22-EhVps36



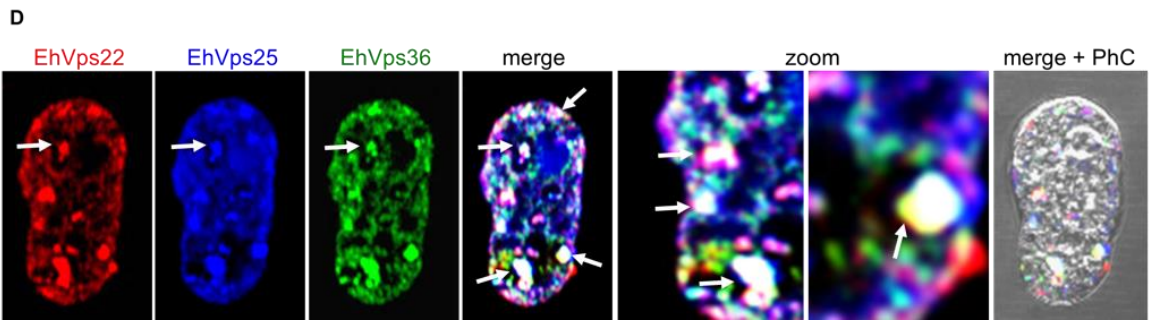
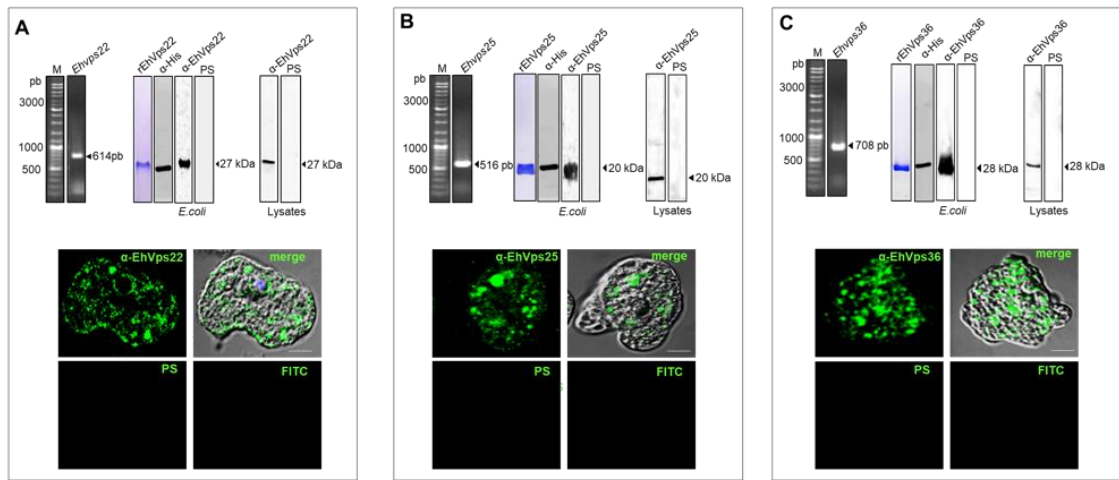
C EhVps36-EhVps25



Las proteínas ESCRT-II se ubican en el citoplasma de los trofozoítos y se observó su colocalización en vesículas y cerca de la membrana plasmática.

La localización celular de una proteína también da pistas sobre su función; por lo tanto, escudriñamos las proteínas dentro de la célula, buscando supuestas interacciones entre ellas y con otras moléculas. Clonamos los respectivos genes para obtener las proteínas recombinantes marcadas con un tag de histidina (Figura 19A-C) y generamos anticuerpos policlonales específicos para cada proteína en distintas especies animales. En los ensayos de *western blot*, los anticuerpos reconocieron bandas específicas de 27, 20 y 28 kDa, correspondientes a los pesos moleculares esperados de EhVps22, EhVps25 y EhVps36, respectivamente, calculados según su secuencia de aminoácidos (Figura 19A-C). En estado basal, las imágenes de microscopía láser confocal revelaron a las proteínas dispersas en el citoplasma de los trofozoítos, rodeando algunas vesículas, en pseudópodos y como agregados cercanos a la membrana plasmática interna (Figura 19A-C). También, observamos colocalización entre ellas en regiones como vesículas específicas y cerca de la membrana plasmática (Figura 19D).

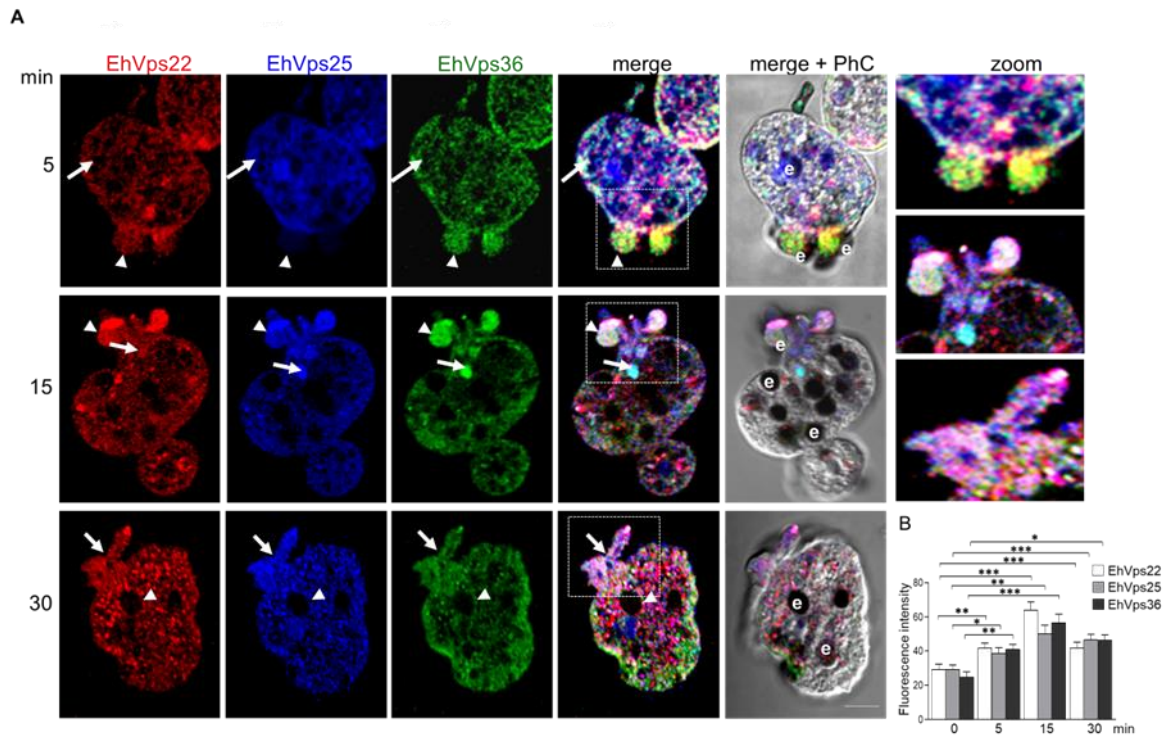
Figura 19. Localización celular de proteínas ESCRT-II en trofozoítos de *E. histolytica*. (C.A). Clonación, expresión y amplificación de los respectivos genes. (A) Detección de proteínas EhVps22, (B) EhVps25 y (C) EhVps36 en lisados bacterianos y amibianos. PS: suero preinmune. Las imágenes inferiores muestran la localización celular de las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps36 en los trofozoítos. Controles negativos: PS y anticuerpo secundario (FITC). (D) Imágenes de trofozoítos en condiciones basales que muestran los sitios de colocalización de las proteínas EhVps22 (rojo), EhVps25 (azul) y EhVps36 (verde). PhC: imágenes de contraste de fase. Las flechas y el zoom indican sitios de colocalización entre proteínas. Barra de escala = 10 μ m.



Las proteínas ESCRT-II cambian de ubicación durante la fagocitosis

Se ha visto en la literatura que proteínas de complejos aledaños al ESCRT-II como EhVps23 (ESCRT-I) y las cuatro proteínas del complejo ESCRT-III están involucradas en la fagocitosis (Avalos-Padilla y col., 2015; Galindo-Olea y col., 2021; Saha y col., 2018). Por ello, en este trabajo investigamos si el ESCRT-II también es parte clave dentro de este evento. Primero, realizamos cinéticas de fagocitosis de 0 a 30 min, y luego analizamos la localización de proteínas mediante microscopía confocal utilizando los anticuerpos específicos para cada proteína. A los 5 min, detectamos las proteínas alrededor de algunos glóbulos rojos adheridos a la membrana plasmática de los trofozoítos, aparentemente en proceso de ingestión (Figura 20). Las proteínas también se encontraron en los eritrocitos que contienen fagosomas, cerca de los endosomas y en las copas fagocíticas. Curiosamente, no todos los glóbulos rojos unidos estaban marcados por los anticuerpos. Nuestra hipótesis es que esto se debe a la adhesión a los trofozoítos en diferentes momentos del evento. A los 5 min de fagocitosis, observamos glóbulos rojos teñidos principalmente por EhVps36 y EhVps22 (Figura 20A), sin embargo, en otras imágenes las tres proteínas parecían estar co-localizadas (Figura 20A, 15 min). Después de los 30 min, las proteínas emergieron juntas o separadas, tal como las encontramos en condiciones basales. También se observaron diferencias en la intensidad de la fluorescencia en cada una de las imágenes (Figura 20B). Los resultados de estos experimentos sugieren que las proteínas ESCRT se reubican rápidamente en diferentes compartimentos celulares durante la fagocitosis.

Figura 20. Localización celular de las proteínas ESCRT-II durante la fagocitosis. (A) Trofozoítos en estado basal tratados con anticuerpos α -EhVps22 (rojo), α -EhVps25 (azul) y α -EhVps36 (verde). Las flechas indican los sitios de colocalización de las tres proteínas. Las puntas de flecha indican los sitios de colocalización sobre o alrededor de los eritrocitos. e: eritrocitos. Barra = 10 μ m. Zoom: ampliación de las regiones marcadas con cuadrados blancos en las áreas de zoom. PhC: imágenes de contraste de fase. (B) La intensidad de la fluorescencia se midió por píxeles en 30 células en condiciones basales y después de la fagocitosis. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$.



Las proteínas ESCRT-II se unen a los complejos ESCRT-I y ESCRT-III y su interacción aumenta durante la fagocitosis

En previos trabajos, se ha demostrado que varias proteínas del complejo ESCRT-III y ESCRT-I se unen y se separan entre ellas, lo cual ocurre de forma dinámica (Bañuelos y col., 2005; Ahmed y col., 2019; Bañuelos y col., 2022; Guiney y col., 2019); sin embargo, aún no se sabe si en un momento dado los complejos aparecen completamente ensamblados. Algunos autores sugieren que el ESCRT-II debe ser el nexo entre ESCRT-I y ESCRT-III (Gill y col., 2007; Teo y col., 2006; Odorizzi y col., 2003). Por lo tanto, analizamos la interacción entre el ESCRT-II y el ESCRT-I mediante microscopía confocal seguido de la identificación de ciertas proteínas mediante ensayos de *western blot* y análisis de espectrometría de masas. Para estos experimentos utilizamos los anticuerpos específicos α -EhVps36 (ESCRT-II) y α -EhVps23 (ESCRT-I), o α -EhVps25 (ESCRT-II) y α -EhVps20 (ESCRT-III) (Figuras 21 y 22). Las imágenes confocales mostraron que después de 2 min de fagocitosis, EhVps36 y EhVps23 colocalizaron en los eritrocitos adheridos a fagosomas y en vacuolas cercanas a ellos (Figura 21A). A los 5 min se sigue observando fluorescencia en el citoplasma, asociada a los eritrocitos ingeridos, y a los 30 min la fluorescencia se observa en los hematíes próximos a los trofozoítos y también se observó en el canal fagocítico. Aunque observamos la colocalización de las proteínas ESCRT-II en los glóbulos rojos y en las bocas fagocíticas, también detectamos a las proteínas por separado. Cabe destacar que, como en otros experimentos, la colocalización de ambos anticuerpos cambió según el momento de la fagocitosis, evidenciando la dinámica del evento. De manera similar, las imágenes obtenidas durante todo el proceso de fagocitosis usando los anticuerpos α -EhVps25 (ESCRT-II) y α -EhVps20 (ESCRT-III) respaldaron la colocalización de los dos complejos ESCRT en bocas fagocíticas, en fagosomas, en VIL dentro de CMV y vacuolas cerca de los eritrocitos (Figura 22A). Estos resultados demuestran que ESCRT-I se une, directa o indirectamente, a ESCRT-II a través de las proteínas EhVps36 (ESCRT-II) y EhVps23 (ESCRT-I) y a ESCRT-III por EhVps25 (ESCRT-II) y EhVps20 (ESCRT-III). Sin embargo, estos resultados no descartan la participación de otras proteínas en la interacción.

Figura 21. Colocalización celular de EhVps36 (ESCRT-II) y EhVps23 (ESCRT-I) durante la fagocitosis. (A) Imágenes confocales de trofozoitos tratados con anticuerpos α -EhVps36 (verde) y α -EhVps23 (rojo). El núcleo se tiñó con DAPI (azul). PhC: imágenes de contraste de fase. Flechas: colocalización de las proteínas. Zoom: ampliación de las regiones marcadas con cuadrados blancos. Barra = 10 μ m. (B) Coeficiente de colocalización de Pearson de EhVps36 y EhVps23 (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$. (C) Panel izquierdo: gel teñido con plata de las muestras obtenidas del ensayo desplegable y controles negativos. TE: extractos totales; PRN: proteína no recombinante. Panel derecho: ensayo de transferencia Western de ensayos desplegables utilizando α -EhVps36 para la precipitación y anticuerpos α -EhVps22, α -EhVps25 y α -EhVps23 para detectar las proteínas asociadas. rEhVps36-PD: muestra desplegable PS: suero preinmune. Números a la derecha: pesos moleculares. (D) Acoplamiento molecular entre EhVps36 y EhVps23. El recuadro muestra una ampliación de los aminoácidos predichos involucrados en la interacción proteína-proteína.

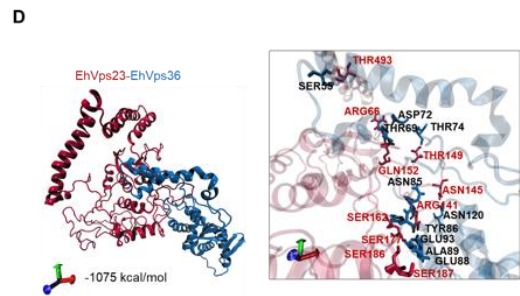
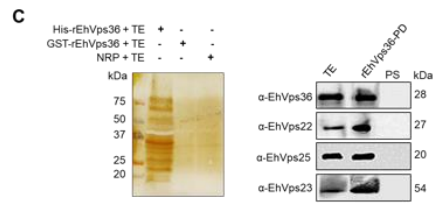
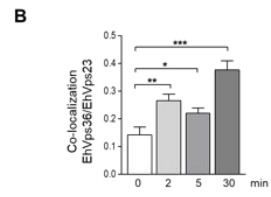
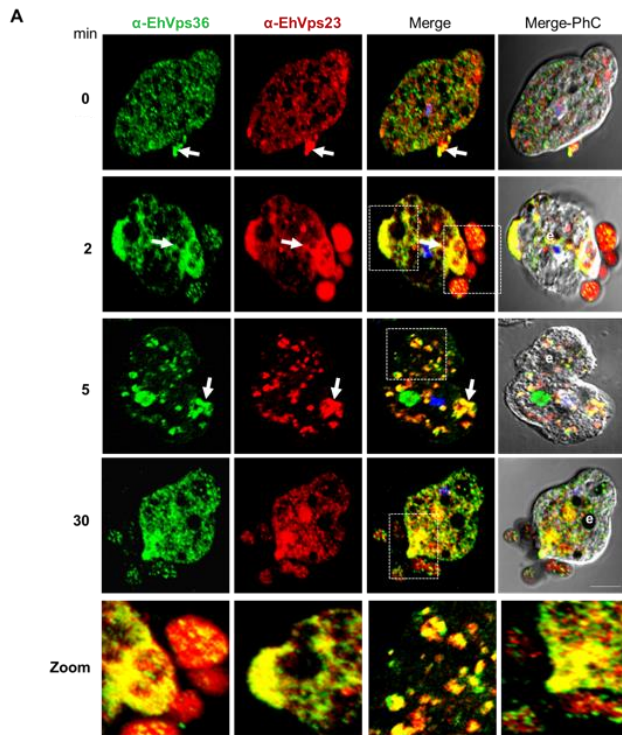
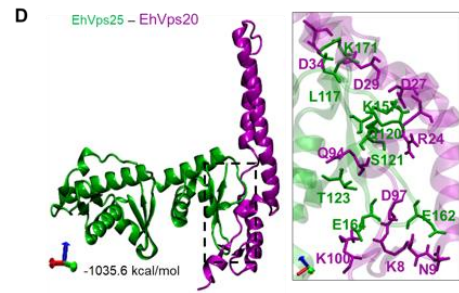
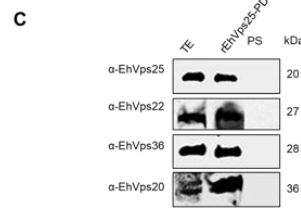
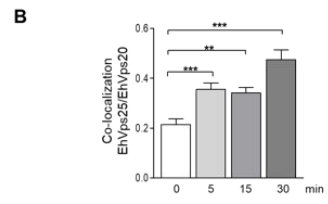
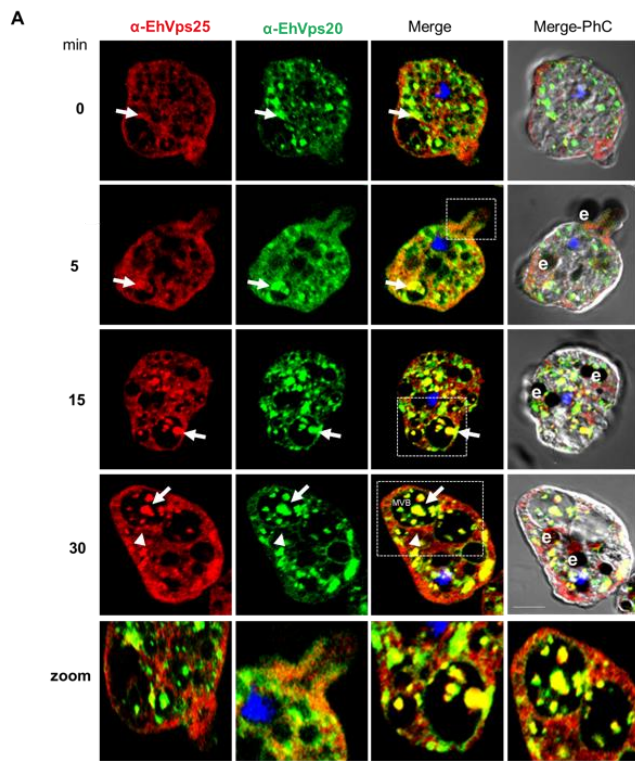


Figura 22. Colocalización de EhVps25 (ESCRT-II) y EhVps20 (ESCRT-III) durante la fagocitosis. (A) Imágenes confocales de trofozoitos tratados con anticuerpos α -EhVps25 (rojo) y α -EhVps20 (verde). El núcleo se tiñó con DAPI (azul). PhC: imágenes de contraste de fase. Flechas: colocalización de proteínas. Zoom: ampliación de la región marcada con cuadrados blancos. Barra = 10 μ m. (B) Coeficiente de Pearson de colocalización de EhVps25 y EhVps20 (** $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$). (C) Ensayo de transferencia Western de ensayos desplegables utilizando anticuerpos α -EhVps25, α -EhVps22, α -EhVps36 y α -EhVps20 y extractos de trofozoitos en condiciones basales. TE: extractos totales; rEhVps25-PD: muestra desplegable PS: suero preinmune. Números a la derecha: pesos moleculares. (D) Acoplamiento molecular entre EhVps25 y EhVps20. El recuadro muestra una ampliación de los supuestos aminoácidos que interactúan.



Para obtener más datos que respalden la naturaleza de las interacciones entre el complejo ESCRT, realizamos ensayos de *pull-down* utilizando las proteínas EhVps25 y EhVps36 recombinantes, incubadas de forma independiente con extractos amebianos. Posteriormente, las muestras obtenidas del *pull-down* se analizaron mediante *western blot*. Y Como era de esperarse, cuando usamos EhVps36 recombinante encontramos en la muestra final a las proteínas EhVps22, EhVps25 y EhVps23 (Figura 21C). Por otro lado, EhVps25 recombinante detectó proteínas EhVps22, EhVps36 y EhVp20 (Figura 22C). Estos resultados confirmaron los estudios de microscopía confocal láser, lo que sugiere fuertemente que todas estas proteínas están en movimiento permanente e interactúan directa o indirectamente, lo que es más evidente durante la fagocitosis.

Adicional, realizamos análisis de docking molecular para predecir los aminoácidos involucrados en estas asociaciones entre proteínas. La interacción entre EhVps36 y EhVps23 (Figura 21D) se llevó a cabo con una energía libre de unión de -1075 kcal/mol, lo que respalda aún más los resultados de la microscopía confocal. Este sitio de unión está formado por dos enlaces salinos y 11 puentes de hidrógeno (Figura 21D). Los residuos de EhVps23 involucrados fueron ARG66, ARG141, ASN145, THR149, GLN152, SER162, SER177, SER186, SER187 y THR493; para EhVps36, fueron ASP72, GLU93, GLY124, ASN120, THR74, THR69, TYR86, GLU93, ALA89, GLU88 y SER55. Mientras tanto, la energía libre de unión para la interacción entre EhVps25 y EhVps20 (Figura 22D) fue de -1035,6 kcal/mol, mediada por cinco puentes salinos y seis enlaces de hidrógeno (Figura 22D). Para la interacción EhVps25-EhVps20, los aminoácidos involucrados fueron GLU164, GLU162, THR123, SER121, GLN120, LYS157, LYS117 y LYS171 en EhVps25 y LYS8, ASP97, LYS100, ASN9, GLN94, ARG24, ASP27, ASP34 y ASP29 en EhVps20.

El análisis de espectrometría de masas revela la presencia de proteínas involucradas en la fagocitosis

Para saber que otras proteínas de amiba podían estar en contacto con el ESCRT-II, analizamos las muestras obtenidas de los ensayos de *pull-down* mediante espectrometría de masas, con ello identificamos proteínas que exhibieron más del 95 % de confiabilidad (Tabla II). Curiosamente, después de la depuración, la mayoría de las proteínas que aparecieron con el mayor porcentaje de confiabilidad están relacionados con procesos de fagocitosis y virulencia. Las muestras de *pull-down* obtenidas utilizando la proteína rEhVps22 revelaron que además de las proteínas ESCRT-II, se detectaron EhVps29, una proteína del complejo retrómero cuya función es el reciclaje de proteínas y está vinculada a la maquinaria ESCRT (Baños y col., 2019; Nakada y col.,2005; Srivastava y col.,2017), la proteína EhRabB (Guzmán y col., 2005; Javier-Reyna y col., 2019; Verma y col., 2020), ARP 2/3, tubulina, actina, reticulina, Gal/GalNac (Gilchrist y col.,1999), HSP70 y hexoquinasa 1 (Saucedo y col., 2014) (Tabla II).

Interesantemente, el análisis de espectrometría de masas realizado con las muestras de *pull-down* obtenidas de rEhVps25, detectó la presencia de EhVps22 y EhVps36 (ESCRT-II), y EhVps20 y EhVps32 (ESCRT-III), así como EhRabB (Verman y col.,2020), ARP 2/3 (Babuta y col., 2015) y grainina 1 (Nickel y col., 2000) (Tabla II). Por otro lado, la proteína EhVps36 se asocia, directa o indirectamente, con EhVps22 y EhVps25, EhVps23 de ESCRT-I y EhVps32 de ESCRT-III (Tabla II). Otras proteínas identificadas en este análisis fueron calmodulina (Rout y col.,2011), clatrina (Tovar y col., 2000) y EhCBP1 (Nickel y col., 2000). Estos resultados sugieren fuertemente que en *E. histolytica*, el ESCRT-II se une a los complejos ESCRT-I y ESCRT-III e interactúa directa o indirectamente con otras proteínas involucradas en la fagocitosis, apoyando la interacción de las moléculas que participan en el evento y el dinamismo de la unión temporal entre las proteínas del complejo ESCRT-II, y con las proteínas ESCRT-I y ESCRT-III para permitir la continuidad del proceso.

Tabla II. rEhVps25 y rEhVps36 con proteínas implicadas en la fagocitosis y el citoesqueleto. Los datos se obtuvieron mediante análisis de espectrometría de masas con un porcentaje de fiabilidad >95%. Se utilizó la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>, consultada en noviembre de 2022) para proporcionar el número de acceso de cada proteína.

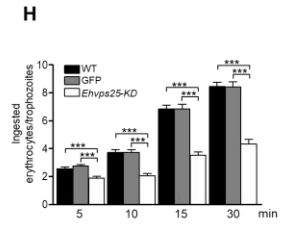
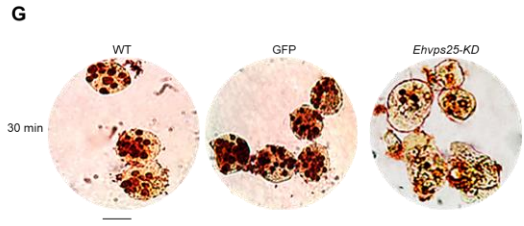
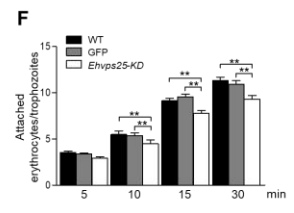
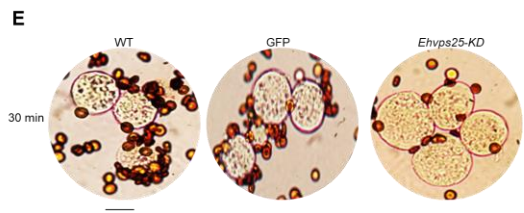
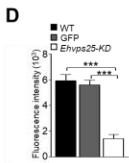
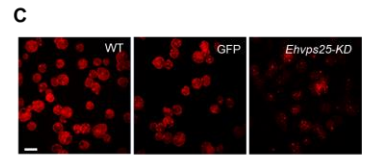
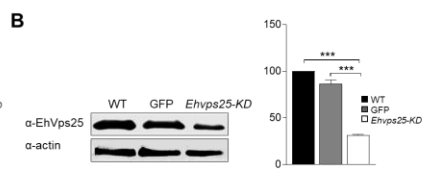
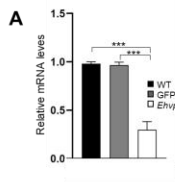
Proteína recombinante	Número de acceso	proteína	Función	Referencia
EhVps22	EHI_181240	Rab B GTPasa	Fagocitosis	Javier-Reyna y col., 2019
	EHI_137860	EhVps25	Fagocitosis (ESCRT-II)	López-Reyes y col., 2010
	EHI_045320	EhVps36	Fagocitosis (ESCRT-II)	López-Reyes y col., 2010
	EHI_025270	EhVps29	Fagocitosis (complejo retrómero)	-----
	EHI_030820	Complejo ARP2/3 subunidad de 20	Bocas fagocíticas y citoesqueleto	Mrigya-Babuta y col., 2015
	EHI_182900	Actina	Citoesqueleto	Parimita Rath y col., 2020
	EHI_049920	Tubulina	Citoesqueleto (nucleación de microtúbulos)	Gilchrist y col., 1999
	EHI_136160	Calreticulina putativa	Desarrollo de absceso hepático amibiano	Enrique-González y col. 2011
	EHI_012270	Gal/GalNAc lectina	Adherencia y citólisis	Gilchrist y col., 1999
	EHI_052860	Proteína de choque térmico 70	Patogenicidad amibiana por protección contra estrés oxidativo y nitrosativo	Gilchrist y col., 1999
	EHI_098290	Hexokinasa 1	Control de flujo de glicolisis	Saucedo-Mendiola y col. 2014
EhVps25	EHI_181240	Rab B GTPasa	Fagocitosis	Javier-Reyna y col., 2019
	EHI_131120	EhVps22	Fagocitosis (ESCRT-II)	López-Reyes y col., 2010
	EHI_045320	EhVps36	Fagocitosis (ESCRT-II)	López-Reyes y col., 2010
	EHI_066730	EhVps20	Fagocitosis (ESCRT-III)	Ávalos-Padilla y col., 2018
	EHI_169820	EhVps32	Fagocitosis (ESCRT-III)	Ávalos-Padilla y col., 2018
	EHI_030820	Complejo ARP2/3 subunidad 20 kDa	Bocas fagocíticas y citoesqueleto	Mrigya-Babuta y col., 2015
EHI_167300	Grainina 1	Maduración vesicular y exocitosis. Muerte celular programada.	Tovar y col., 2000	
EhVps36	EHI_181240	Rab B GTPasa	Fagocitosis	Javier-Reyna y col., 2019

	EHI_135460	EhVps23	Fagocitosis (ESCRT-I)	Galindo-Olea y col., 2021
	EHI_131120	EhVps22	Fagocitosis (ESCRT-II)	López-Reyes y col., 2010
	EHI_137860	EhVps25	Fagocitosis (ESCRT-II)	López-Reyes y col., 2010
	EHI_169820	EhVps32	Fagocitosis (ESCRT-III)	Ávalos-Padilla y col., 2018
	EHI_023500	Calmodulina putativa	Fagocitosis y dinámica de actina	Rout y col., 2011
	EHI_120360	Grainina	Asociado con la reducción de la virulencia	Tovar et.al., 2000
	EHI_201510	Cadena pesada de clatrina	Secreción	Rosalinda-Tovar y col., 2000
	EHI_120900	Proteína de unión a calcio 1 (EhCBP1)	Bocas fagocíticas y dinámica de actina	Nickel y col., 2000

El complejo ESCRT-II participa en la fagocitosis y la adherencia

Para estudiar el papel del complejo ESCRT-II en la fagocitosis, generamos trofozoítos con disminución en la expresión del gen *Ehvps25* utilizando el ARN de doble cadena (dsRNA) obtenido de bacterias transfectadas con un plásmido que contiene sólo los primeros 400 pb del gen (en orientación 5'-3') (Solís y col., 2008; Vayssié y col., 2004). Los trofozoítos en los que se afectó la expresión del gen *EhVps25* produjeron sólo alrededor del 55 % de la proteína EhVps25 (a estos trofozoítos los llamaremos *EhVps25-KD*, para fines prácticos) (Figura 23A, B), evaluados mediante ensayos de *western blot* y utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) como un control de gen interno no relacionado (Solís y col., 2008). Además, corroboramos este evento por microscopía confocal, en donde observamos que los trofozoítos mutantes exhibieron sólo el 30 % de la intensidad de fluorescencia comparada con los trofozoítos de tipo salvaje o *wild type* (WT) y el control interno (Figura 23C, D). En todos los tiempos probados, los trofozoítos *Ehvps25-KD* presentaron casi un 50 % menos de tasa de fagocitosis que los controles, y su eficiencia para adherirse a los glóbulos rojos también se vio afectada (Figura 23E, F).

Figura 23. Eficiencia fagocítica y de adherencia en trofozoítos silenciados en el gen *Ehvps25*. (A) Niveles relativos de ARNm obtenidos mediante el ensayo RT-qPCR de trofozoítos en condiciones basales: WT, trofozoítos de tipo salvaje; GFP, proteína fluorescente verde, utilizada como control para silenciar un gen no relacionado en la ameba; *Ehvps25-KD*, trofozoítos derribados. (B) Ensayos de transferencia Western. (B) Análisis de densitometría de bandas en (A) tomando actina como control de carga. (C) Imagen representativa de microscopía confocal de trofozoitos de tipo salvaje y *Ehvps25-KD* (D) Intensidad de fluorescencia medida por píxeles. Se analizaron 30 campos en cada muestra para obtener el gráfico. (E) Tinción de Novikoff de trofozoitos de tipo salvaje y *Ehvps25-KD*. (F) Cuantificación de eritrocitos ingeridos. (G) Tinción de Novikoff de trofozoitos de tipo salvaje y *Ehvps25-KD*. (H) Cuantificación de eritrocitos adheridos. Los datos representan la media y el error estándar del número de eritrocitos contados dentro de 100 trofozoítos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



7 DISCUSIÓN

Los complejos ESCRT forman una maquinaria molecular que, a través de interacciones proteicas posteriores y simultáneas, facilita el tráfico vesicular y el transporte de carga desde el exterior y el interior de la célula (Vietri y col., 2020). El efecto deformante de las proteínas ESCRT sobre las membranas celulares permite la fusión y fisión entre las vesículas (Crist y col., 2017). Además de la división celular, la gemación de virus y muchos otros eventos impulsados por ESCRT, en *E. histolytica*, esta maquinaria participa en funciones relacionadas con la capacidad del parásito para producir daño a las células huésped, como la adherencia de células diana, fagocitosis, motilidad y destrucción de la célula huésped (Bañuelos y col., 2005). Por lo tanto, el estudio de las proteínas ESCRT es relevante para comprender los eventos moleculares que ocurren en las funciones relacionadas con la virulencia de los trofozoítos. Además, *E. histolytica* presenta una alta divergencia en las proteínas que constituyen la maquinaria ESCRT conservada, produciendo características celulares y genómicas divergentes que son un enigma desafiante desde el punto de vista evolutivo. El conocimiento de las moléculas y sus motivos que interactúan para realizar estos eventos celulares dará pistas sobre el origen evolutivo de los antiguos protozoos, particularmente sobre los cambios sufridos por la maquinaria ESCRT.

Anteriormente, nuestro grupo publicó la caracterización de las proteínas que componen los complejos ESCRT-I, ESCRT-III y las proteínas accesorias EhADH (Bañuelos y col., 2005; García-Rivera y col., 1999) y EhVps4 (López-Reyes y col., 2010), todas ellas implicadas en la virulencia del parásito. Estos estudios nos han aportado elementos novedosos para entender su función y ayudarán a encontrar estrategias para derrotar la amebiasis, una infección que afecta al 3,55% de la población mundial y provoca la muerte de entre 50.000 y 75.000 personas cada año (Lozano y col., 2012).

Para construir un panorama completo de la maquinaria ESCRT en trofozoítos, presentamos la caracterización estructural y funcional de las proteínas ESCRT-II, enfatizando sus interacciones entre ellas y con otras proteínas ESCRT, y algunas otras involucradas en la fagocitosis. Para nuestro estudio, seguimos una estrategia basada en tres enfoques: (i) Mediante bioinformática, examinamos la

estructura y naturaleza de las proteínas ESCRT-II clonadas y expresadas en *E. coli*. Varias características estructurales predijeron que son ortólogos con humano y con levadura y que pueden interactuar con otras proteínas durante el tráfico vesicular en los trofozoítos. (ii) Mediante anticuerpos específicos, detectamos y seguimos el movimiento de las proteínas ESCRT-II y otras que participan en la fagocitosis. También exploramos la interacción de estas moléculas entre ellas y con proteínas de los complejos ESCRT-I y ESCRT-III. (iii) Finalmente, utilizamos el enfoque genético para disminuir la expresión de uno de los genes ESCRT-II (*Ehvps25*) y observamos que la fagocitosis se vio afectada cuando se alteró este complejo.

Nuestros resultados mostraron que *E. histolytica* posee un complejo ESCRT-II canónico completo, con diferencias entre sus ortólogos humanos y de levadura. Mientras que las tres proteínas ESCRT-II tienen los dominios WH-WH involucrados en la interacción con los ácidos nucleicos y las proteínas, EhVps36 carece del dominio GLUE involucrado en la estrecha interacción con Vps28 (ESCRT-I). En las interacciones simultáneas y de refuerzo del dominio GLUE con las membranas, ESCRT-I y la ubiquitina son fundamentales para la progresión de la carga ubiquitinada desde los endosomas tempranos hasta los tardíos (Curtiss y col.,2007). Sin embargo, a lo largo de la evolución, las proteínas han ganado y perdido diferentes secuencias que podrían modificar su función, por ello, no descartaríamos que estas proteínas hayan evolucionado juntas y posiblemente junto con otras proteínas de la maquinaria ESCRT para compensar las pérdidas que podrían afectar las funciones de todo el complejo. Esta hipótesis debe fortalecerse con más bioinformática y datos estadísticos. En el caso de *E. histolytica*, hemos encontrado que EhVps23 (ESCRT-I) se une a la ubiquitina (Galindo-Olea y col.,2021), probablemente supliendo o colaborando con la función de EhVps36. Esta interacción no se encuentra muy a menudo en la naturaleza, pero ya ha sido descrita para ciertos sistemas (Katzmann y col., 2001). Otras proteínas ESCRT o motivos en la misma proteína también podrían realizar esta tarea; por ejemplo, el N-terminal de la Vps36 humana se une a la ubiquitina a pesar de no tener un dominio NZF (Slagsvold y col., 2005), lo que demuestra que las proteínas tienen otros dominios con afinidad por la ubiquitina.

Los complejos ESCRT no han sido aislados; esto podría explicarse porque las interacciones entre sus proteínas son continuas y de corta duración, lo que dificulta el aislamiento y purificación de esta maquinaria. Como alternativa para el estudio del complejo ESCRT-III, otros trabajos refieren el uso de GUVs, un excelente sistema para probar y caracterizar *in vitro* las interacciones entre sus proteínas (Saha y col., 2018; Ávalos-Padilla y col., 2015; Dimova y col., 2019). Por lo anterior, las proteínas ESCRT-II se podrían estudiar más a fondo utilizando GUVs en un futuro cercano. Mientras tanto, mediante docking molecular hemos simulado la asociación entre las proteínas ESCRT-II y la predicción sugiere que EhVps23 y EhVps36 pueden unirse entre sí. Las imágenes de inmunofluorescencia confocal también revelaron la proximidad entre estas proteínas. Aunque no se ha informado ninguna asociación entre Vps23 y Vps36 en humanos y levaduras, hay informes en trigo que pueden asociarse entre sí (Qiurong y col., 2019). Por lo tanto, es posible que esta asociación también ocurra en *E. histolytica*.

Las imágenes de los trofozoítos capturadas en el confocal, también mostraron cambios en las interacciones y la ubicación de las proteínas ESCRT-II bajo el estímulo de los glóbulos rojos. En condiciones basales, la colocalización apareció en áreas pequeñas, incluso en vesículas que parecían estar saliendo de la célula. Curiosamente, después de 2 minutos de contacto con los glóbulos rojos, también aparecieron proteínas en las bocas fagocíticas, los fagosomas y los glóbulos rojos que estaban en proceso de ser ingeridos. La colocalización aumentó a los 5 y 30 min y, de nuevo, encontramos que ambas proteínas interactuaban en vacuolas cercanas a los glóbulos rojos ingeridos y cerca de los eritrocitos adheridos. Los mismos eventos ocurrieron entre EhVps25 y EhVps20; en las condiciones basales, observamos una colocalización deficiente, mientras que durante la fagocitosis, los fagosomas y muchas vacuolas internas, así como los MBV, aparecieron con vacuolas más pequeñas teñidas por ambos anticuerpos. El movimiento de las proteínas dentro de la célula plantea la posibilidad de que realicen tareas específicas para distintas funciones en diferentes regiones y momentos de la célula. Estas interacciones demuestran el dinamismo de la maquinaria ESCRT durante la fagocitosis, como se ha informado para otras proteínas involucradas en este fenómeno (Agarwal y col.,

2019; Bharadwi y col., 2018; Battacharya y col., 2011; Díaz-Hernández y col., 2021; Kumari y col., 2018; Mansuri y col., 2014; Sharma y col., 2020; Zhou y col., 2020), lo que refuerza la propuesta de que el ESCRT y otras moléculas trabajan en conjunto para realizar esta tarea de nutrición vital para la amiba

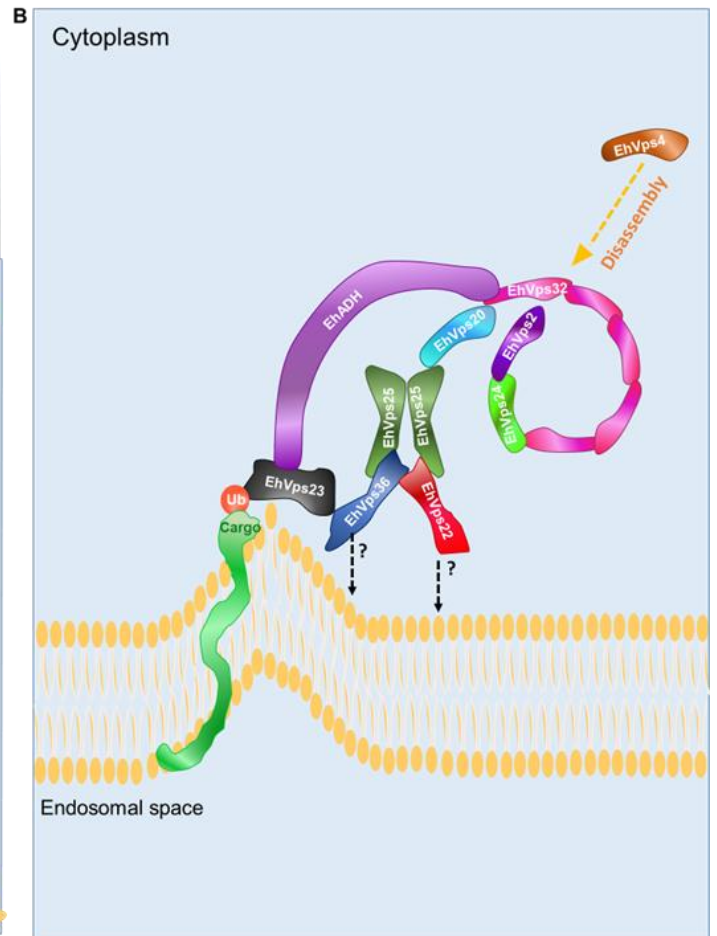
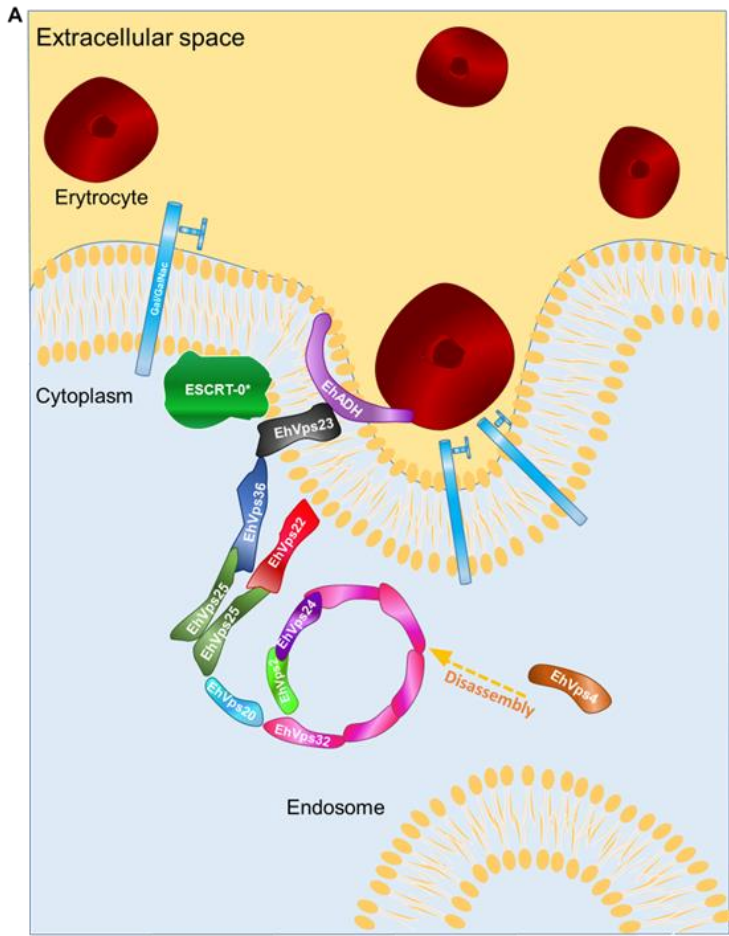
El análisis de espectrometría de masas corroboró la presencia de las tres proteínas ESCRT-II en las muestras de *pull-down*. Reveló la presencia de otras proteínas de la maquinaria ESCRT, probablemente trabajando juntas: RabB GTPase, calmodulina, clatrina y otras moléculas informadas como involucradas en la fagocitosis y la virulencia del parásito aparecieron en los resultados del análisis (Baños y col., 2019; Nakada y col., 2005; Srivastava y col., 2017; Guzmán y col., 2005; Javier-Reyna y col., 2019; Verma y col., 2020). Por las muchas proteínas encontradas en el análisis de espectrometría de masas, postulamos que el complejo ESCRT-II podría asociarse con otras proteínas para realizar otros procesos en los trofozoítos, como la citocinesis; sin embargo, esta especulación requiere que se prueben o descarten estrategias experimentales.

Finalmente, la evidencia de la participación del complejo ESCRT-II en la fagocitosis estuvo dada por los experimentos de silenciamiento. Los trofozoítos *Ehvps25-KD* exhibieron una afectación de alrededor del 50% en su tasa de fagocitosis después de 30 minutos en contacto con los glóbulos rojos. La adherencia de los eritrocitos a los trofozoítos también disminuyó significativamente, aunque la disminución no fue tan dramática como las tasas de fagocitosis. Hay resultados experimentales obtenidos de varias otras proteínas involucradas en la fagocitosis que muestran que cuando están mutadas, la fagocitosis se ve afectada (Galindo-Olea y col., 2021; Solis y col., 2008; Vayssié y col., 2004; Díaz-Hernández y col., 2021), lo que demuestra la complejidad del evento realizado en un modelo de cadena en el que varias proteínas están involucradas. Los eventos concatenados ocurren con varias proteínas actuando en conjunto para lograr la captura, transporte y digestión de la presa o cargo.

8 CONCLUSIONES

Todos estos resultados, demuestran el papel central del complejo ESCRT-II dentro de la maquinaria ESCRT en la fagocitosis y confirman que todas estas proteínas, junto con EhADH, están participando activamente desde el contacto hasta la introducción y conducción a través del complejo sistema membranoso de los trofozoítos para transportar las moléculas cargo o presas que pueden ser glóbulos rojos, bacterias y otros (Figura 24).

Figura 24. Modelo de trabajo que propone la participación de ESCRT-II en la fagocitosis. (A) El estímulo de los eritrocitos desencadena el reclutamiento a la membrana plasmática de la maquinaria ESCRT. La EhADH, la lectina Kerp Gal/–Gal–Nac y otras moléculas interactúan con la membrana del eritrocito. El asterisco indica que proteínas no identificadas que realizan funciones del complejo ESCRT-0 también podrían participar en esta unión. EhADH se asocia con EhVps23 (ESCRT-I) que interactúa con EhVps36 y otros miembros del complejo ESCRT-II. EhVps25 (ESCRT-II) recluta EhVps20 del complejo ESCRT-III. Luego, EhVps32 es reclutado por EhVps20 (ESCRT-III) y EhADH. Estos eventos promueven el cierre de la invaginación formada por la adherencia del eritrocito y la liberación de la vesícula naciente que produce el endosoma que contiene el eritrocito en el citoplasma de los trofozoítos. Según nuestros resultados, la maquinaria ESCRT está involucrada desde la adherencia hasta la formación de CMV y también participa en la secreción y motilidad. (B) Finalmente, EhVps32, EhVps20, EhVps24 y EhVps2 (ESCRT-III) polimerizan generando estructuras helicoidales que producen la formación y cierre de VIL dentro de los CMV. Al final del proceso, EhVps4–ATPasa desmonta el complejo para reiniciar el proceso.



9 REFERENCIAS

1. Adams EB, MacLeod IN. Invasive amebiasis. II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine (Baltimore)*. 1977 Jul;56(4):325-34. doi: 10.1097/00005792-197707000-00004. PMID: 875719.
2. Agarwal, S.; Anand, G.; Sharma, S.; Parimita Rath, P.; Gourinath, S.; Bhattacharya, A. EhP3, a homolog of 14-3-3 family of protein participates in actin reorganization and phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007789. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007789>.
3. Ahmed, I.; Akram, Z.; Iqbal, H.M.N.; Munn, A.L. The regulation of Endosomal Sorting Complex Required for Transport and accessory proteins in multivesicular body sorting and enveloped viral budding—An overview. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *127*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.015>.
4. Ali IK, Hossain MB, Roy S, Ayeh-Kumi PF, Petri WA Jr, Haque R, Clark CG. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* **2003** May;9(5):580-4. doi: 10.3201/eid0905.020548. PMID: 12737742; PMCID: PMC2972761.
5. Ali IK, Solaymani-Mohammadi S, Akhter J, Roy S, Gorrini C, Calderaro A, Parker SK, Haque R, Petri; Amos, B.; Aurrecoechea, C.; Barba, M.; Barreto, A.; Basenko, E.Y.; Bažant, W.; Belnap, R.; Blevins, A.S.; Böhme, U.; Brestelli, J.; y col. VEuPathDB: The eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D898–D911. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab929>.
6. Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, González-Robles A. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg.* 1985 Jul;34(4):723-30. doi: 10.4269/ajtmh.1985.34.723. PMID: 2862801.
7. Aristizábal H, Acevedo J, Botero M. Fulminant amebic colitis. *World J Surg.* 1991 Mar-Apr;15(2):216-21. doi: 10.1007/BF01659055. PMID: 2031357.
8. Arroyo, R.; Orozco, E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1987**, *23*, 151–158. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90150-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90150-2).
9. Ausencio, G.; Rosario, J.-R.; Guillermina, G.-R.; Cecilia, B.; Bibiana, C.-M.; Lizbeth, S.-V.; Esther, O. EhVps23, an ESCRT-I Member, Is a Key Factor in Secretion, Motility, Phagocytosis and Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 835654. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.835654>.
10. Ausencio, G.; Rosario, J.-R.; Guillermina, G.-R.; Cecilia, B.; Sarita, M.; Jaime, O.-L.; Bibiana, C.-M.; Lizbeth, S.-V.; Esther, O. EhVps23: A Component of ESCRT-I That Participates in Vesicular Trafficking and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 770759. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.770759>.
11. Avalos-Padilla, Y.; Betanzos, A.; Javier-Reyna, R.; García-Rivera, G.; Chávez-Munguía, B.; Lagunes-Guillén, A.; Ortega, J.; Orozco, E. EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005079. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005079>.
12. Babst, M.; Katzmann, D.J.; Estepa-Sabal, E.J.; Meerloo, T.; Emr, S.D. Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 271–282. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00220-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00220-4).

13. Babst, M.; Sato, T.K.; Banta, L.M.; Emr, S.D. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1820–1831. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1820>.
14. Babuta, M.; Mansuri, M.S.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A. The Entamoeba histolytica, Arp2/3 Complex Is Recruited to Phagocytic Cups through an Atypical Kinase EhAK1. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005310. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005310>.
15. Baños-Mateos, S.; Rojas, A.L.; Hierro, A. VPS29, a tweak tool of endosomal recycling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *59*, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.010>.
16. Bañuelos, C.; García-Rivera, G.; López-Reyes, I.; Orozco, E. Functional characterization of EhADH112: An Entamoeba histolytica Bro1 domain-containing protein. *Exp. Parasitol.* **2005**, *110*, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.005>.
17. Bharadwaj, R.; Sharma, S.; Arya, R.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A. EhRho1 regulates phagocytosis by modulating actin dynamics through EhFormin1 and EhProfilin1 in Entamoeba histolytica. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12851. <https://doi.org/10.1111/cmi.12851>.
18. Bhattacharya, A.; Somlata; Bhattacharya, S. A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 230. <https://doi.org/10.1038/ncomms1199>.
19. Blanc, C.; Charette, S.J.; Mattei, S.; Aubry, L.; Smith, E.W.; Cosson, P.; Letourneur, F. Dictyostelium Tom1 Participates to an Ancestral ESCRT-0 Complex. *Traffic* **2009**, *10*, 161–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00855.x>.
20. Bowers, K.; Lottridge, J.; Helliwell, S.B.; Goldthwaite, L.M.; Luzio, J.P.; Stevens, T.H. Protein–Protein Interactions of ESCRT Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **2004**, *5*, 194–210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00169.x>.
21. Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Apr;50(4):412-9. doi: 10.4269/ajtmh.1994.50.412. PMID: 8166347.
22. Cecilia, B.; Abigail, B.; Abigail, B.; Rosario, J.-R.; Ausencio, G.; Esther, O. Molecular interplays of the Entamoeba histolytica endosomal sorting complexes required for transport during phagocytosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.855797>.
23. Chen, V.B.; Arendall, W.B., III; Headd, J.J.; Keedy, D.A.; Immormino, R.M.; Kapral, G.J.; Murray, L.W.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
24. Christ, L.; Raiborg, C.; Wenzel, E.M.; Campsteijn, C.; Stenmark, H. Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.016>.
25. Christy NC, Petri WA Jr. Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of Entamoeba histolytica. *Future Microbiol.* **2011** Dec;6(12):1501-19. doi: 10.2217/fmb.11.120. PMID: 22122445.
26. Comeau, S.R.; Gatchell, D.W.; Vajda, S.; Camacho, C.J. ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein

- complexes. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 45–50. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371>.
27. Curtiss, M.; Jones, C.; Babst, M. Efficient Cargo Sorting by ESCRT-I and the Subsequent Release of ESCRT-I from Multivesicular Bodies Requires the Subunit Mvb12. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 636–645. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-07-0588>.
 28. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* 1993 May-Jun;40(3):340-4. doi: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04926.x. PMID: 8508172.
 29. Diamond, L.S.; Harlow, D.R.; Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1978**, *72*, 431–432. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90144-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90144-X).
 30. Díaz-Hernández, M.; Javier-Reyna, R.; Sotto-Ortega, I.; García-Rivera, G.; Montaña, S.; Betanzos, A.; Zanatta, D.; Orozco, E. Protein Sumoylation Is Crucial for Phagocytosis in *Entamoeba histolytica* Trophozoites. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5709. <https://doi.org/10.3390/ijms22115709>.
 31. Dimova, R. Giant Vesicles and Their Use in Assays for Assessing Membrane Phase State, Curvature, Mechanics, and Electrical Properties. *Annu. Rev. Biophys.* **2019**, *48*, 93–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115342>.
 32. Faust DM, Marquay Markiewicz J, Santi-Rocca J, Guillen N. New insights into host-pathogen interactions during *Entamoeba histolytica* liver infection. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2011 Mar;1(1):10-8. doi: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.4. PMID: 24466432; PMCID: PMC3894810.
 33. Feller, S.E.; Zhang, Y.; Pastor, R.W.; Brooks, B.R. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 4613–4621. <https://doi.org/10.1063/1.470648>.
 34. Frisardi M, Ghosh SK, Field J, Van Dellen K, Rogers R, Robbins P, Samuelson J. The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4217-24. doi: 10.1128/IAI.68.7.4217-4224.2000. PMID: 10858239; PMCID: PMC101730.
 35. García-Rivera, G.; Rodríguez, M.A.; Ocádiz, R.; Martínez-López, M.C.; Arroyo, R.; González-Robles, A.; Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: A novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* **1999**, *33*, 556–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01500.x>.
 36. Gilchrist CA, Petri WA. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Aug;2(4):433-7. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80076-9. PMID: 10458982.
 37. Gilchrist, C.A.; Petri, W.A. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 433–437. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80076-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80076-9).
 38. Gill, D.J.; Teo, H.; Sun, J.; Perisic, O.; Veprintsev, D.B.; Emr, S.D.; Williams, R.L. Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* **2007**, *26*, 600–612. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601501>.
 39. Guiney, E.L.; Zhu, L.; Sardana, R.; Emr, S.D.; Baile, M.G. Methods for studying the regulation of membrane traffic by ubiquitin and the ESCRT pathway. *Methods Enzymol.* **2019**, *619*, 269–291. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.12.041>.

40. Guzmán-Medrano, R.; Castillo-Juárez, B.A.; García-Pérez, R.M.; Salas-Casas, A.; Orozco, E.; Rodríguez, M.A. Entamoeba histolytica: Alterations in EhRabB protein in a phagocytosis deficient mutant correlate with the Entamoeba dispar RabB sequence. *Exp. Parasitol.* **2005**, *110*, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.002>.
41. Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of Entamoeba histolytica infection. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):449-52. doi: 10.1128/JCM.36.2.449-452.1998. PMID: 9466756; PMCID: PMC104557.
42. Henne, W.M.; Buchkovich, N.J.; Emr, S.D. The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>.
43. Hernández-Cuevas, N.A.; Weber, C.; Hon, C.-C.; Guillen, N. Gene expression profiling in Entamoeba histolytica identifies key components in iron uptake and metabolism. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107102>.
44. Huang, J.; MacKerell, A.D., Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
45. Huber, S.T.; Mostafavi, S.; Mortensen, S.A.; Sachse, C. Structure and assembly of ESCRT-III helical Vps24 filaments. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba4897. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba4897>.
46. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
47. Hurley, J.H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, *20*, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2007.12.002>.
48. Javier-Reyna, R.; Montaña, S.; García-Rivera, G.; Rodríguez, M.A.; González-Robles, A.; Orozco, E. EhRabB mobilises the EhCPADH complex through the actin cytoskeleton during phagocytosis of Entamoeba histolytica. *Cell. Microbiol.* **2019**, *21*, e13071. <https://doi.org/10.1111/cmi.13071>.
49. Kanehisa, M.; Araki, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Hirakawa, M.; Itoh, M.; Katayama, T.; Kawashima, S.; Okuda, S.; Tokimatsu, T.; y col. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D480–D484. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm882>.
50. Karimi, Z.; Falsafi-Zadeh, S.; Galehdari, H.; Jalali, A. Homology modeling and molecular dynamics simulation of odonthubuthus doriae (Od1) scorpion toxin in comparison to the BmK M1. *Bioinformatics* **2012**, *8*, 474–478. <https://doi.org/10.6026/97320630008474>.
51. Katzenstein D, Rickerson V, Braude A. New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. *Medicine (Baltimore)*. 1982 Jul;61(4):237-46. doi: 10.1097/00005792-198207000-00003. PMID: 6806561.
52. Katzmann, D.J.; Babst, M.; Emr, S.D. Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell* **2001**, *106*, 145–155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00434-2).
53. Koukos, P.I.; Glykos, N.M. Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 2310–2312. <https://doi.org/10.1002/jcc.23381>.
54. Kozakov, D.; Beglov, D.; Bohnuud, T.; Mottarella, S.E.; Xia, B.; Hall, D.R.; Vajda, S. How good is automated protein docking? *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2013**, *81*, 2159–2166. <https://doi.org/10.1002/prot.24403>.

55. Kumari, R.; Gupta, P.; Tiwari, S. Ubc7/Ube2g2 ortholog in *Entamoeba histolytica*: Connection with the plasma membrane and phagocytosis. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 1599–1611. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5842-6>.
56. Laskowski, R.A.; Hutchinson, E.G.; Michie, A.D.; Wallace, A.C.; Jones, M.L.; Thornton, J.M. PDBsum: A web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 488–490. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01140-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01140-7).
57. Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J.M.; Yeom, M.S.; Eastman, P.K.; Lemkul, J.A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J.C.; Qi, Y.; y col. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
58. López-Reyes, I.; García-Rivera, G.; Bañuelos, C.; Herranz, S.; Vincent, O.; López-Camarillo, C.; Marchat, L.A.; Orozco, E. Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*, 890674–890615. <https://doi.org/10.1155/2010/890674>.
59. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AIMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012 Dec 15;380(9859):2095-128. doi:

- 10.1016/S0140-6736(12)61728-0. Erratum in: *Lancet*. 2013 Feb 23;381(9867):628. AlMazroa, Mohammad A [added]; Memish, Ziad A [added]. PMID: 23245604.
60. Lozano, R.P.; Naghavi, M.P.; Lim, S.P.; Aboyans, V.P.; Abraham, J.M.P.H.; Adair, T.P.; Ahn, S.Y.M.P.H.; AlMazroa, M.A.M.D.; Anderson, H.R.P.; Anderson, L.M.P.; y col. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2012**, *380*, 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0).
 61. Mansuri, M.S.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A. A novel alpha kinase EhAK1 phosphorylates actin and regulates phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004411. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004411>.
 62. Martyna, G.J.; Klein, M.L.; Tuckerman, M. Nosé–Hoover chains: The canonical ensemble via continuous dynamics. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2635–2643. <https://doi.org/10.1063/1.463940>.
 63. Mashiach, E.; Schneidman-Duhovny, D.; Andrusier, N.; Nussinov, R.; Wolfson, H.J. FireDock: A web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W229–W232. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn186>.
 64. Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Le Blanc, I.; Ferguson, C.; Fauré, J.; Blanc, N.S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; y col. Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization. *Science* **2004**, *303*, 531–534. <https://doi.org/10.1126/science.1092425>.
 65. Nakada-Tsukui, K.; Saito-Nakano, Y.; Ali, V.; Nozaki, T. A Retromerlike Complex Is a Novel Rab7 Effector That Is Involved in the Transport of the Virulence Factor Cysteine Protease in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 5294–5303. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0283>.
 66. Nickel, R.; Jacobs, T.; Urban, B.; Scholze, H.; Bruhn, H.; Leippe, M. Two novel calcium-binding proteins from cytoplasmic granules of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 112–116. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02245-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02245-6).
 67. Novikoff, P.M.; Novikoff, A.B. Peroxisomes in Absorptive Cells of Mammalian Small Intestine. *J. Cell Biol.* **1972**, *53*, 532–560. <https://doi.org/10.1083/jcb.53.2.532>.
 68. Odorizzi, G.; Katzmann, D.J.; Babst, M.; Audhya, A.; Emr, S.D. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1893–1903. <https://doi.org/10.1242/jcs.00395>.
 69. Olivos-García Alfonso, Saavedra Emma, Nequiz Avendaño Mario, Pérez-Tamayo Ruy. Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Rev. Fac. Med. (Méx.)* [revista en la Internet]. 2011 Abr [citado 2023 Abr 14] ; 54(2): 10-20. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422011000200003&lng=es.
 70. Orozco, E.; Guarneros, G.; Martinez-Palomo, A.; Sanchez, T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* **1983**, *158*, 1511–1521. <https://doi.org/10.1084/jem.158.5.1511>.
 71. Petri WA Jr. Pathogenesis of amebiasis. *Curr Opin Microbiol.* **2002** Aug;5(4):443-7. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00335-1. PMID: 12160867.
 72. Phillips, J.C.; Hardy, D.J.; Maia, J.D.C.; Stone, J.E.; Ribeiro, J.V.; Bernardi, R.C.; Buch, R.; Fiorin, G.; Hénin, J.; Jiang, W.; y col. Scalable molecular

- dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153*, 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>.
73. Qiurong, X.; Qiurong, X.; Ahai, C.; Ahai, C.; Yunzhi, Z.; Yunzhi, Z.; Mingyue, Y.; Mingyue, Y.; Wei, X.; Wei, X.; y col. Component Interaction of ESCRT Complexes Is Essential for Endocytosis-Dependent Growth, Reproduction, DON Production and Full Virulence in *Fusarium graminearum*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00180>.
 74. Ren, X.; Hurley, J.H. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J.* **2010**, *29*, 1045–1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.6>.
 75. Rodríguez MA, Orozco E. Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* **1986** Jul;154(1):27-32. doi: 10.1093/infdis/154.1.27. PMID: 2872254.
 76. Rout, A.K.; Padhan, N.; Barnwal, R.P.; Bhattacharya, A.; Chary, K.V.R. Calmodulin-like Protein from *Entamoeba histolytica*: Solution Structure and Calcium-Binding Properties of a Partially Folded Protein. *Biochemistry* **2011**, *50*, 181–193. <https://doi.org/10.1021/bi101411q>.
 77. Saavedra E and Olivos A. Amibiasis.Ciencia.Academia Mexicana de ciencias. 2017. Mar; Vol.14. 14-17.
 78. Saha, N.; Dutta, S.; Datta, S.P.; Sarkar, S. The minimal ESCRT machinery of *Giardia lamblia* has altered inter-subunit interactions within the ESCRT-II and ESCRT-III complexes. *Eur. J. Cell Biol.* **2018**, *97*, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.11.004>.
 79. Samuelson J, Robbins P. A simple fibril and lectin model for cyst walls of *Entamoeba* and perhaps *Giardia*. *Trends Parasitol.* 2011 Jan;27(1):17-22. doi: 10.1016/j.pt.2010.09.002. PMID: 20934911; PMCID: PMC3014499.
 80. Saucedo-Mendiola, M.L.; Salas-Pacheco, J.M.; Nájera, H.; Rojo-Domínguez, A.; Yépez-Mulia, L.; Avitia-Domínguez, C.; Téllez-Valencia, A. Discovery of *Entamoeba histolytica* hexokinase 1 inhibitors through homology modeling and virtual screening. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2014**, *29*, 325–332. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.779265>.
 81. Schmidt, O.; Teis, D. The ESCRT machinery. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, R116–R120. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>.
 82. Sharma, M.; Morgado, P.; Zhang, H.; Ehrenkauf, G.; Manna, D.; Singh, U. Characterization of Extracellular Vesicles from *Entamoeba histolytica* Identifies Roles in Intercellular Communication That Regulates Parasite Growth and Development. *Infect. Immun.* **2020**, *88*, e00349-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00349-20>.
 83. Slagsvold, T.; Aasland, R.; Hirano, S.; Bache, K.G.; Raiborg, C.; Trambaiolo, D.; Wakatsuki, S.; Stenmark, H. Eap45 in Mammalian ESCRT-II Binds Ubiquitin via a Phosphoinositide-interacting GLUE Domain. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19600–19606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501510200>.
 84. Solis, C.F.; Guillén, N. Silencing Genes by RNA Interference in the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *442*, 113–128. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-191-8_9.
 85. Spadafora LJ, Kearney MR, Siddique A, Ali IK, Gilchrist CA, Arju T, Hoffstrom B, Nguyen FK, Petri WA Jr, Haque R, Cangelosi GA. Species-Specific Immunodetection of an *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 May 6;10(5):e0004697. doi: 10.1371/journal.pntd.0004697. PMID: 27152855; PMCID: PMC4859568.
 86. Srivastava, V.K.; Yadav, R.; Watanabe, N.; Tomar, P.; Mukherjee, M.; Gourinath, S.; Nakada-Tsukui, K.; Nozaki, T.; Datta, S. Structural and thermodynamic characterization of metal binding in Vps29 from *Entamoeba*

- histolytica: Implication in retromer function. *Mol. Microbiol.* **2017**, *106*, 562–581. <https://doi.org/10.1111/mmi.13836>.
87. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Oct;16(4):713-29. doi: 10.1128/CMR.16.4.713-729.2003. PMID: 14557296; PMCID: PMC207118.
 88. Teo, H.; Gill, D.J.; Sun, J.; Perisic, O.; Veprintsev, D.B.; Vallis, Y.; Emr, S.D.; Williams, R.L. ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell* **2006**, *125*, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.047>.
 89. Teo, H.; Perisic, O.; González, B.; Williams, R.L. ESCRT-II, an Endosome-Associated Complex Required for Protein Sorting: Crystal Structure and Interactions with ESCRT-III and Membranes. *Dev. Cell* **2004**, *7*, 559–569. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.003>.
 90. Tovar, R.; Murguía-López, M.L.; de Lourdes Muñoz, M.a. Immunolocalization of Clathrin During Electron-Dense Granule Secretion in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **2000**, *31*, S143–S144. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(00\)00206-X](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(00)00206-X).
 91. Van Dellen KL, Bulik DA, Specht CA, Robbins PW, Samuelson JC. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2006 Jan;5(1):203-6. doi: 10.1128/EC.5.1.203-206.2006. PMID: 16400183; PMCID: PMC1360259.
 92. Vayssié, L.; Vargas, M.; Weber, C.; Guillén, N. Double-stranded RNA mediates homology-dependant gene silencing of γ -tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2004**, *138*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.07.005>.
 93. Verma, K.; Srivastava, V.K.; Datta, S. Rab GTPases take centre stage in understanding *Entamoeba histolytica* biology. *Small GTPases* **2020**, *11*, 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>.
 94. Vietri, M.; Radulovic, M.; Stenmark, H. The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 25–42. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4>.
 95. WA Jr, Clark CG. Tissue invasion by *Entamoeba histolytica*: evidence of genetic selection and/or DNA reorganization events in organ tropism. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Apr 9;2(4):e219. doi: 10.1371/journal.pntd.0000219. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(6). doi: 10.1371/annotation/6fb9dd82-4678-48cb-a3b4-9856fdbe58e5. PMID: 18398490; PMCID: PMC2274956.
 96. Wei, Z.; Chengxin, Z.; Yang, L.; Robin, P.; Eric, W.B.; Yang, Z. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Rep. Methods* **2021**, *1*, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>.
 97. Williams, R.L.; Urbé, S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 355–368. <https://doi.org/10.1038/nrm2162>.
 98. Wunder, C.; Wollert, T.; Hurley, J.H.; Lippincott-Schwartz, J. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **2009**, *458*, 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature07836>.
 99. Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health.* 2010 Mar;7(3):1105-20. doi: 10.3390/ijerph7031105. Epub 2010 Mar 16. PMID: 20617021; PMCID: PMC2872301.
 100. Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol.* 2009

- Dec;9(6):1023-32. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.008. Epub 2009 Jun 18. PMID: 19540361.
101. Yang, J.; Zhang, Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2015**, *52*, 5.8.1–5.8.15. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>.
 102. Yunuen, A.-P.; Yunuen, A.-P.; Roland, L.K.; Rosario, J.-R.; Guillermina, G.-R.; Reinhard, L.; Rumiana, D.; Esther, O. The Conserved ESCRT-III Machinery Participates in the Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00053>.
 103. Zhou, H.; Guan, Y.; Feng, M.; Fu, Y.; Tachibana, H.; Cheng, X. Evaluation on Elongation Factor 1 Alpha of *Entamoeba histolytica* Interaction with the Intermediate Subunit of the Gal/GalNAc Lectin and Actin in Phagocytosis. *Pathogens* **2020**, *9*, 702. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090702>.
 104. Cano-Mancera R, López-Revilla R. Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. *Parasitol Res.* **1987**;74(1):18-22. doi: 10.1007/BF00534926. PMID: 2894024.
 105. Hughes MA, Lee CW, Holm CF, Ghosh S, Mills A, Lockhart LA, Reed SL, Mann BJ. Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein. *Mol Biochem Parasitol.* **2003** Apr 3;127(2):113-20. doi: 10.1016/s0166-6851(02)00326-2. PMID: 12672520.
 106. Allen A, Hutton DA, Pearson JP. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int J Biochem Cell Biol.* **1998** Jul;30(7):797-801. doi: 10.1016/s1357-2725(98)00028-4. PMID: 9722984.
 107. Ravdin JI, John JE, Johnston LI, Innes DJ, Guerrant RL. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect Immun.* **1985** May;48(2):292-7. doi: 10.1128/iai.48.2.292-297.1985. PMID: 2580787; PMCID: PMC261303.
 108. Katz U, Ankri S, Stolarsky T, Nuchamowitz Y, Mirelman D. *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gallectin are less virulent. *Mol Biol Cell.* **2002** Dec;13(12):4256-65. doi: 10.1091/mbc.e02-06-0344. PMID: 12475950; PMCID: PMC138631.
 109. Petri WA Jr, Joyce MP, Broman J, Smith RD, Murphy CF, Ravdin JI. Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect Immun.* **1987** Oct;55(10):2327-31. doi: 10.1128/iai.55.10.2327-2331.1987. PMID: 2888730; PMCID: PMC260708.
 110. Rosales-Encina JL, Meza I, López-De-León A, Talamás-Rohana P, Rojkind M. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* **1987** Nov;156(5):790-7. doi: 10.1093/infdis/156.5.790. PMID: 2888825.
 111. Meza I, Cázares F, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P, Rojkind M. Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* **1987** Nov;156(5):798-805. doi: 10.1093/infdis/156.5.798. PMID: 2888826.
 112. García-Rivera G, Arroyo R, Mena R, Luna J, Orozco E. Involvement of the 112 kDa adhesin in *Entamoeba histolytica* phagocytosis. *Arch Med Res.* **1997**;28 Spec No:166-7. PMID: 9033056.
 113. Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* **1980** Aug 1;152(2):377-90. doi: 10.1084/jem.152.2.377. PMID: 6249882; PMCID: PMC2185944.
 114. Ralston KS, Petri WA Jr. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 2011 Jun;27(6):254-63. doi:

- 10.1016/j.pt.2011.02.006. Epub **2011** Mar 26. PMID: 21440507; PMCID: PMC3104091.
115. Leippe M, Andrä J, Nickel R, Tannich E, Müller-Eberhard HJ. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol.* **1994** Dec;14(5):895-904. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01325.x. PMID: 7715451.
 116. Young JD, Young TM, Lu LP, Unkeless JC, Cohn ZA. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* **1982** Dec 1;156(6):1677-90. doi: 10.1084/jem.156.6.1677. PMID: 6294211; PMCID: PMC2186882.
 117. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol.* **1999** Nov;34(3):463-72. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01607.x. PMID: 10564488.
 118. Lynch EC, Rosenberg IM, Gitler C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **1982**;1(7):801-4. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01250.x. PMID: 6329705; PMCID: PMC553112.
 119. Andrä J, Herbst R, Leippe M. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev Comp Immunol.* **2003** Apr;27(4):291-304. doi: 10.1016/s0145-305x(02)00106-4. PMID: 12590963.
 120. Zhang X, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun.* **2004** Feb;72(2):678-83. doi: 10.1128/IAI.72.2.678-683.2004. PMID: 14742508; PMCID: PMC321641.
 121. Irmer H, Tillack M, Biller L, Handal G, Leippe M, Roeder T, Tannich E, Bruchhaus I. Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Mol Microbiol.* **2009** May;72(3):658-67. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06672.x. PMID: 19426210.
 122. Lushbaugh WB, Hofbauer AF, Pittman FE. *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol.* **1985** Jun;59(3):328-36. doi: 10.1016/0014-4894(85)90088-8. PMID: 2860002.
 123. Garcia-Nieto RM, Rico-Mata R, Arias-Negrete S, Avila EE. Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. *Parasitol Int.* **2008** Dec;57(4):417-23. doi: 10.1016/j.parint.2008.04.013. Epub 2008 May 15. PMID: 18571975.
 124. Hou Y, Mortimer L, Chadee K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *J Biol Chem.* **2010** Nov 12;285(46):35497-504. doi: 10.1074/jbc.M109.066035. Epub 2010 Sep 13. PMID: 20837477; PMCID: PMC2975174.
 125. Pertuz Belloso S, Ostoa Saloma P, Benitez I, Soldevila G, Olivos A, García-Zepeda E. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol.* **2004** May;26(5):237-41. doi: 10.1111/j.0141-9838.2004.00706.x. PMID: 15491473.
 126. Reed SL, Ember JA, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades

- anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* **1995** Jul 1;155(1):266-74. PMID: 7602103.
127. Reed SL, Keene WE, McKerrow JH, Gigli I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* **1989** Jul 1;143(1):189-95. PMID: 2543700.
 128. Ocadiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-López J, García-Pérez RM, Sánchez T, Castillo-Juárez BA, García-Rivera G, Rodríguez MA. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol.* **2005** Feb;7(2):221-32. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00453.x. PMID: 15659066.
 129. Ravdin JI, Murphy CF, Schlesinger PH. The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.* **1988** Feb;35(1):159-63. doi: 10.1111/j.1550-7408.1988.tb04096.x. PMID: 2452880.
 130. Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Exp Parasitol.* **1994** Nov;79(3):460-7. doi: 10.1006/expr.1994.1107. PMID: 7957763.
 131. Rawal S, Majumdar S, Vohra H. Activation of MAPK kinase pathway by Gal/GalNAc adherence lectin of *E. histolytica*: gateway to host response. *Mol Cell Biochem.* **2005** Jan;268(1-2):93-101. doi: 10.1007/s11010-005-3698-4. PMID: 15724442.
 132. Huston CD, Houtpt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA Jr. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* **2000** Dec;2(6):617-25. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00085.x. PMID: 11207613.
 133. Seydel KB, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun.* **1998** Jun;66(6):2980-3. doi: 10.1128/IAI.66.6.2980-2983.1998. PMID: 9596776; PMCID: PMC108298.
 134. Yan L, Stanley SL Jr. Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infect Immun.* **2001** Dec;69(12):7911-4. doi: 10.1128/IAI.69.12.7911-7914.2001. PMID: 11705976; PMCID: PMC98890.
 135. Jang YS, Song KJ, Kim JY, Lee YA, Kim KA, Lee SK, Shin MH. Calpains are involved in *Entamoeba histolytica*-induced death of HT-29 colonic epithelial cells. *Korean J Parasitol.* **2011** Jun;49(2):177-80. doi: 10.3347/kjp.2011.49.2.177. Epub 2011 Jun 14. PMID: 21738275; PMCID: PMC3121076.
 136. Kim KA, Lee YA, Shin MH. Calpain-dependent calpastatin cleavage regulates caspase-3 activation during apoptosis of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol.* **2007** Sep;37(11):1209-19. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.011. Epub 2007 Apr 6. PMID: 17498717.
 137. Kim KA, Kim JY, Lee YA, Song KJ, Min D, Shin MH. NOX1 participates in ROS-dependent cell death of colon epithelial Caco2 cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Microbes Infect.* **2011** Nov;13(12-13):1052-61. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.001. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21723410.
 138. Sim S, Yong TS, Park SJ, Im KI, Kong Y, Ryu JS, Min DY, Shin MH. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J Immunol.* **2005** Apr 1;174(7):4279-88. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4279. PMID: 15778391.

139. Marion S, Laurent C, Guillén N. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol.* **2005** Oct;7(10):1504-18. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00573.x. PMID: 16153248.
140. Hirata KK, Que X, Melendez-Lopez SG, Debnath A, Myers S, Herdman DS, Orozco E, Bhattacharya A, McKerrow JH, Reed SL. A phagocytosis mutant of *Entamoeba histolytica* is less virulent due to deficient proteinase expression and release. *Exp Parasitol.* **2007** Feb;115(2):192-9. doi: 10.1016/j.exppara.2006.08.004. Epub 2006 Sep 20. PMID: 16987516.
141. Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* **2003** Feb;71(2):964-72. doi: 10.1128/IAI.71.2.964-972.2003. PMID: 12540579; PMCID: PMC145391.
142. Saito-Nakano Y, Nakazawa M, Shigeta Y, Takeuchi T, Nozaki T. Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **2001** Sep 3;116(2):219-22. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00318-8. PMID: 11522354.
143. Temesvari LA, Harris EN, Stanley SL Jr, Cardelli JA. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol.* **1999** Oct 15;103(2):225-41. doi: 10.1016/s0166-6851(99)00133-4. PMID: 10551365.
144. Debnath A, Tashker JS, Sajid M, McKerrow JH. Transcriptional and secretory responses of *Entamoeba histolytica* to mucins, epithelial cells and bacteria. *Int J Parasitol.* **2007** Jul;37(8-9):897-906. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.01.016. Epub 2007 Feb 12. PMID: 17362964.
145. Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui K, Leippe M, Nozaki T. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* **2004** Nov 19;279(47):49497-507. doi: 10.1074/jbc.M403987200. Epub 2004 Sep 3. PMID: 15347665.
146. Rodríguez MA, Orozco E. Characterization of the EhRabB recombinant protein of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* **2000** Jul-Aug;31(4 Suppl):S171-2. doi: 10.1016/s0188-4409(00)00160-0. PMID: 11070270.
147. Welter BH, Laughlin RC, Temesvari LA. Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **2002** May;121(2):254-64. doi: 10.1016/s0166-6851(02)00047-6. PMID: 12034459.
148. Voigt H, Olivo JC, Sansonetti P, Guillén N. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J Cell Sci.* **1999** Apr;112 (Pt 8):1191-201. doi: 10.1242/jcs.112.8.1191. PMID: 10085254.
149. Godbold GD, Mann BJ. Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Braz J Med Biol Res.* **1998** Aug;31(8):1049-58. doi: 10.1590/s0100-879x1998000800004. PMID: 9777011.
150. Guillén N, Boquet P, Sansonetti P. The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Cell Sci.* **1998** Jun;111 (Pt 12):1729-39. doi: 10.1242/jcs.111.12.1729. PMID: 9601102.
151. Labruyère E, Zimmer C, Galy V, Olivo-Marin JC, Guillén N. EhPAK, a member of the p21-activated kinase family, is involved in the control of *Entamoeba histolytica* migration and phagocytosis. *J Cell Sci.* **2003** Jan 1;116(Pt 1):61-71. doi: 10.1242/jcs.00190. PMID: 12456716.

152. Chávez-Munguía B, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res*. **2000** Jul-Aug;31(4 Suppl):S165-7. doi: 10.1016/s0188-4409(00)00158-2. PMID: 11070268.
153. Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun*. **1999** Jun;67(6):3073-81. doi: 10.1128/IAI.67.6.3073-3081.1999. PMID: 10338523; PMCID: PMC96624.
154. Bretscher MS, Aguado-Velasco C. Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol*. **1998** Aug;10(4):537-41. doi: 10.1016/s0955-0674(98)80070-7. PMID: 9719876.
155. Welter BH, Temesvari LA. A unique Rab GTPase, EhRabA, of *Entamoeba histolytica*, localizes to the leading edge of motile cells. *Mol Biochem Parasitol*. **2004** Jun;135(2):185-95. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.02.002. PMID: 15110460.
156. Okada M, Nozaki T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res*. **2006** Feb;37(2):244-52. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.10.003. PMID: 16380325.
157. Orozco E, Suárez ME, Sánchez T. Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *Int J Parasitol*. **1985** Dec;15(6):655-60. doi: 10.1016/0020-7519(85)90012-8. PMID: 2869003.
158. Gruenberg J, Maxfield FR. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*. **1995** Aug;7(4):552-63. doi: 10.1016/0955-0674(95)80013-1. PMID: 7495576.
159. Bishop N, Horman A, Woodman P. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol*. **2002** Apr 1;157(1):91-101. doi: 10.1083/jcb.200112080. Epub 2002 Mar 26. PMID: 11916981; PMCID: PMC2173266.
160. Lemmon SK, Traub LM. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol*. **2000** Aug;12(4):457-66. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00117-4. PMID: 10873832.
161. PALADE GE. A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol*. **1955** Jan;1(1):59-68. doi: 10.1083/jcb.1.1.59. PMID: 14381428; PMCID: PMC2223592.
162. SOTELO JR, PORTER KR. An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol*. **1959** Mar 25;5(2):327-42. doi: 10.1083/jcb.5.2.327. PMID: 13654454; PMCID: PMC2224648.
163. Felder S, Miller K, Moehren G, Ullrich A, Schlessinger J, Hopkins CR. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*. **1990** May 18;61(4):623-34. doi: 10.1016/0092-8674(90)90474-s. PMID: 2344614.
164. Gorden P, Carpentier JL, Cohen S, Orci L. Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1978** Oct;75(10):5025-9. doi: 10.1073/pnas.75.10.5025. PMID: 311005; PMCID: PMC336255.

165. Haigler HT, McKanna JA, Cohen S. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol.* **1979** May;81(2):382-95. doi: 10.1083/jcb.81.2.382. PMID: 313931; PMCID: PMC2110321.
166. van Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K, Hansen SH. Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol.* **1993** Aug;61(2):208-24. PMID: 8223712.
167. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* **2009** Mar 26;458(7237):445-52. doi: 10.1038/nature07961. PMID: 19325624.
168. Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2010** Aug;11(8):556-66. doi: 10.1038/nrm2937. Epub 2010 Jun 30. PMID: 20588296; PMCID: PMC2922035.
169. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol.* **2011** Aug;23(4):452-7. doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.008. Epub 2011 May 11. PMID: 21570275; PMCID: PMC3148405.
170. Henne WM, Stenmark H, Emr SD. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2013** Sep 1;5(9):a016766. doi: 10.1101/cshperspect.a016766. PMID: 24003212; PMCID: PMC3753708.
171. Ali N, Zhang L, Taylor S, Mironov A, Urbé S, Woodman P. Recruitment of UBPY and ESCRT exchange drive HD-PTP-dependent sorting of EGFR to the MVB. *Curr Biol.* **2013** Mar 18;23(6):453-61. doi: 10.1016/j.cub.2013.02.033. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23477725.
172. Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA, Stevens TH. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell.* **1992** Dec;3(12):1389-402. doi: 10.1091/mbc.3.12.1389. PMID: 1493335; PMCID: PMC275707.
173. Coonrod EM, Stevens TH. The yeast vps class E mutants: the beginning of the molecular genetic analysis of multivesicular body biogenesis. *Mol Biol Cell.* **2010** Dec;21(23):4057-60. doi: 10.1091/mbc.E09-07-0603. PMID: 21115849; PMCID: PMC2993735.
174. Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol.* **2002** Jul;4(7):534-9. doi: 10.1038/ncb815. PMID: 12055639.
175. Ren X, Hurley JH. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J.* **2010** Mar 17;29(6):1045-54. doi: 10.1038/emboj.2010.6. Epub 2010 Feb 11. PMID: 20150893; PMCID: PMC2845278.
176. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature.* **2010** Apr 8;464(7290):864-9. doi: 10.1038/nature08849. Epub 2010 Mar 21. PMID: 20305637; PMCID: PMC2851844.
177. Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci.* **2001** Jun;114(Pt 12):2255-63. doi: 10.1242/jcs.114.12.2255. PMID: 11493665.
178. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal

- protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. **2001** Jul 27;106(2):145-55. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00434-2. PMID: 11511343.
179. Audhya A, McLeod IX, Yates JR, Oegema K. MVB-12, a fourth subunit of metazoan ESCRT-I, functions in receptor downregulation. *PLoS One*. **2007** Sep 26;2(9):e956. doi: 10.1371/journal.pone.0000956. PMID: 17895996; PMCID: PMC1978536.
 180. Chu T, Sun J, Saksena S, Emr SD. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol*. **2006** Dec 4;175(5):815-23. doi: 10.1083/jcb.200608053. PMID: 17145965; PMCID: PMC2064680.
 181. Curtiss M, Jones C, Babst M. Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol Biol Cell*. **2007** Feb;18(2):636-45. doi: 10.1091/mbc.e06-07-0588. Epub 2006 Nov 29. PMID: 17135292; PMCID: PMC1783790.
 182. Kostelansky MS, Schluter C, Tam YY, Lee S, Ghirlando R, Beach B, Conibear E, Hurley JH. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell*. **2007** May 4;129(3):485-98. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.016. Epub 2007 Apr 19. PMID: 17442384; PMCID: PMC2065850.
 183. Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, Sundquist WI. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J*. **2007** Oct 3;26(19):4215-27. doi: 10.1038/sj.emboj.7601850. Epub 2007 Sep 13. Erratum in: *EMBO J*. 2012 Jul 18;31(14):3228. PMID: 17853893; PMCID: PMC2230844.
 184. Oestreich AJ, Davies BA, Payne JA, Katzmann DJ. Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway. *Mol Biol Cell*. **2007** Feb;18(2):646-57. doi: 10.1091/mbc.e06-07-0601. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17151358; PMCID: PMC1783776.
 185. Sundquist WI, Schubert HL, Kelly BN, Hill GC, Holton JM, Hill CP. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol Cell*. **2004** Mar 26;13(6):783-9. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00129-7. PMID: 15053872.
 186. Bilodeau PS, Winistorfer SC, Kearney WR, Robertson AD, Piper RC. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J Cell Biol*. **2003** Oct 27;163(2):237-43. doi: 10.1083/jcb.200305007. PMID: 14581452; PMCID: PMC2173515.
 187. Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*. **2003** Aug 4;162(3):413-23. doi: 10.1083/jcb.200302136. PMID: 12900393; PMCID: PMC2172707.
 188. Lu Q, Hope LW, Brasch M, Reinhard C, Cohen SN. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003** Jun 24;100(13):7626-31. doi: 10.1073/pnas.0932599100. Epub 2003 Jun 11. PMID: 12802020; PMCID: PMC164637.
 189. Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol*. **2003** Aug 4;162(3):425-34. doi: 10.1083/jcb.200302138. PMID: 12900394; PMCID: PMC2172688.