



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas.

Maestría en Ciencias Área en Toxicología y/o Biotecnología
Vegetal.

Identificación de posible mecanismo molecular de captación de
Acetilcolina en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Presenta:

Marisol Pacheco Sánchez.

Comité tutorial.

Dr. Javier Ventura Juárez.

Dra. Sandra Luz Martínez Hernández.

Dr. Andrés Quintanar Stephano.

Aguascalientes, Ags.

14 de Abril 2023

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M en C. **JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ**
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **CO-TUTOR** designado del estudiante **MARISOL PACHECO SÁNCHEZ** con ID **308023** quien realizó la tesis titulado: **IDENTIFICACIÓN DE POSIBLE MECANISMO MOLECULAR DE CAPTACIÓN DE ACETILCOLINA EN TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.



Dr. Javier Ventura Juárez
Co-Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **CO-TUTOR** designado del estudiante **MARISOL PACHECO SÁNCHEZ** con ID **308023** quien realizó la tesis titulado: **IDENTIFICACIÓN DE POSIBLE MECANISMO MOLECULAR DE CAPTACIÓN DE ACETILCOLINA EN TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.



Dra. Sandra Luz Martínez Hernández
Co-Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres.

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

CARTA DE VOTO APROBATORIO
ENCUENADO

M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **MARISOL PACHECO SÁNCHEZ** con ID **308023** quien realizó la tesis titulado: **IDENTIFICACIÓN DE POSIBLE MECANISMO MOLECULAR DE CAPTACIÓN DE ACETILCOLINA EN TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 12 de abril de 2023.



Dr. Andrés Quintanar Stephano
Asesor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se pueden abreviar, ni omitir nombres

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 10/04/2023

NOMBRE: Marisol Pacheco Sánchez **ID** 308023
PROGRAMA: Maestría en Ciencias áreas Biotecnología Vegetal o toxicología **LGAC (del pos)** Toxicología

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis Trabajo práctico

TITULO: IDENTIFICACIÓN DE POSIBLE MECANISMO MOLECULAR DE CAPTACIÓN DE ACETILCOLINA EN TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se contribuye a un nuevo conocimiento sobre la expresión de moléculas presentes en el parásito que responden a estímulos provenientes del hospedero durante el proceso infeccioso.

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- N.A Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- N.A Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- N.A Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- NA El estudiante es el primer autor
- NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- NA La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI
 No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dra. Elsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dra. Rocío Guerrero Buitrago

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Juan Jauregui Rincón

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M en C Jorge Martín Aférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

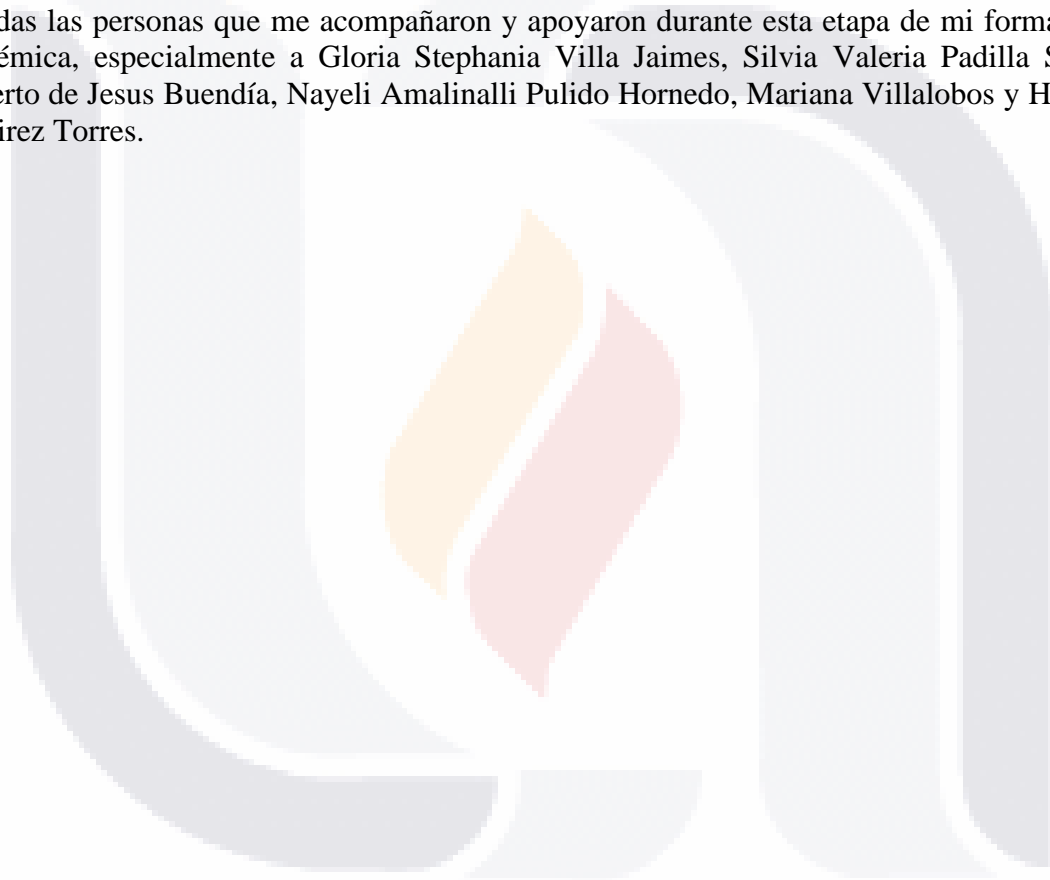
En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Calificar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, Revise

Agradecimientos

Quiero extender un profundo agradecimiento, a todas y cada una de las cosas que sucedieron en mi vida que me llevaron a vivir este hermoso aprendizaje. En especial al **Dr. Javier Ventura Juárez** por compartir sus conocimientos, su tiempo, y permitirme aprender de el gran ser humano que es. A la **Dra. Sandra Luz Martínez Hernández**, por contribuir a mi formación académica y personal a través de sus conocimientos, al **Dr. Andrés Quintanar Hernández** por sus aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y a CONACYT por otorgar la Beca para Maestría a Marisol Pacheco Sánchez (Número de CVU: 1075481).

A todas las personas que me acompañaron y apoyaron durante esta etapa de mi formación académica, especialmente a Gloria Stephania Villa Jaimes, Silvia Valeria Padilla Solís, Roberto de Jesus Buendía, Nayeli Amalinalli Pulido Hornedo, Mariana Villalobos y Héctor Ramirez Torres.



Dedicatoria

Este trabajo es dedicado con profundo amor, respeto y agradecimiento a mi hermano Ricardo Pacheco Sánchez quien a pesar de su estado de salud cada día lucha por seguir adelante y no darse por vencido, gracias por inspirarme a no rendirme y seguir adelante.



Índice general

Índice general _____	1
Indice de Figuras _____	3
Indice de tablas _____	4
Acrónimos _____	5
Resumen _____	6
Abstract _____	7
Capítulo 1. Introducción _____	8
1.1 Amebiasis _____	8
1.2 Patogenicidad _____	8
1.3 Epidemiología de la amebiasis _____	9
1.4 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> _____	9
1.5 Mecanismos de virulencia _____	10
1.5.1 Migración _____	10
1.5.2 Adhesión _____	11
1.5.3 Lisis por amebaporos _____	11
1.5.4 Trogocitosis _____	12
1.5.5 Lipopeptidofosfoglicano _____	13
1.6 Receptores de membrana _____	13
1.7 Receptores de membrana a células eucariotas _____	15
1.8 Sistema nervioso central _____	15
1.9 Acetilcolina _____	16
Capítulo 2. Antecedentes _____	17
Capítulo 3. Justificación _____	18
Capítulo 4. Hipótesis _____	19
Capítulo 5. Objetivo general _____	19
5.1 Objetivos específicos _____	19
Capítulo 6. Metodología _____	20
6.1 Cultivo axénico de <i>E. histolytica</i> . _____	20
6.2 Ensayo de viabilidad. _____	20
6.3 Ensayo de Inmunofluorescencia para la detección de ACh _____	20

6.4 PCR	21
6.4.1 Extracción de ARN	21
6.4.2 PCR en tiempo real (qPCR)	22
6.5 Dot – blot	23
6.6 Docking molecular	24
6.6.1 Modelado de la proteína y obtención de ligandos	24
6.6.2 Acoplamiento Molecular (Docking)	24
6.6.3 Interacciones Proteína-Ligando	24
Capítulo 7. Resultados	25
7.1 Colocalización de lectina Gal/GalNAc y ACh en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	25
7.2 Ensayo para determinar la posible presencia de un receptor muscarínico (M3) en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	31
7.3 La ACh estimula la expresión de GTPasas en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	33
7.4 Análisis para la identificación de proteínas involucradas en la síntesis de ACh en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	34
Capítulo 8. Discusión	38
Capítulo 9. Conclusiones	44
Capitulo 10. Bibliografía	45
Capitulo 11. Anexos	52
Anexo A.	52
Anexo B.	52
Anexo C.	52
Anexo D.	53

Índice de Figuras

Figura 1. Subunidades de lectina Gal/GalNac de Entamoeba histolytica _____	10
Figura 2. Proceso de muerte de células del huésped por fagocitosis amebiana _____	12
Figura 3 Receptores de membrana de E. histolytica. _____	14
Figura 4. Colocalización de ACh y lectina Gal/GalNac. _____	25
Figura 5. Colocalización de ACh y Lectina GalGalNac _____	26
Figura 6. Expresión relativa de trofozoítos. _____	27
Figura 7. Sitios de acoplamiento molecular entre la subunidad Intermedia de Gal/GalNac-ACh y Gal/GalNac-acetilgalactosamina. _____	30
Figura 8. Receptores de tipo muscarínico y nicotínico. _____	31
Figura 9. Colocalización de ACh y receptor muscarínico M3. _____	32
Figura 9 B. Colocalización entre ACh y M3 _____	33
Figura 10. Expresión relativa A) RAS, B) RAB _____	34
Figura 11. Detección de colina acetiltransferasa (ChAT). _____	35
Figura 12. Detección de transportador vesicular de ACh (VChT). _____	36
Figura 13. Detección de enzimas involucradas en la síntesis de ACh. _____	37
Figura 14. Ensayo de viabilidad celular. _____	37
<i>Figura 15. Diagrama</i> _____	43

Índice de tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para ensayos de inmunofluorescencia _____	21
Tabla 2. Oligonucleótidos dirigidos a genes de E. histolytica _____	23
Tabla 3. Sitios de unión _____	28
Tabla 4. Resultados de los acoplamientos moleculares entre la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc y los ligandos acetilcolina. _____	29

Acrónimos

µm	Micrómetro
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetiltransferasa
ARNm	ARN mensajero
DAG	Diacilglicerol
EP4	Receptor de prostaglandina E ₂
FN	Fibronectina
GTPasas	Guanosina trifosfatasa
IL	Interleucina
IP3	Trifosfato de inositol
kDa	Kilodaltons
LPPG	Lipopeptidofosfoglicano
NF- κB	Factor nuclear
NK	Natural killer
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Proteína quinasa C
qRT- PCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
TLR's	Receptor tipo toll
TMK	Quinasas transmembranales
TNF-α	El factor de necrosis tumoral

VAcHT Transportador vesicular de ACh

α Alfa

β Beta

Resumen

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es un protozooario causante de amebiasis intestinal en al menos 500 millones de personas al año, aunque solo el 10% de los infectados presenta síntomas graves. Se conoce que *E. histolytica* capta moléculas liberadas durante la respuesta inmune del hospedero a través de receptores de membrana que favorecen sus mecanismos patogénicos para el establecimiento de la invasión amebiana. Se ha descrito que *E. histolytica* interactúa con la Acetil colina (ACh) e incrementa factores de virulencia. El objetivo de este estudio fue identificar un receptor de membrana en trofozoítos de *E. histolytica* para ACh. Los métodos incluyen colocación para el receptor de ACh y lectina Gal/GalNAc por inmunofluorescencia, análisis bioinformáticos, y cuantificación de la expresión relativa de GTPasas Ras y Rab por qRT-PCR. Los resultados muestran que la lectina Gal/GalNAc subunidad intermedia de 150 kDa funciona como receptor para ACh y a su vez, esta interacción activa GTPasas, Ras y Rab en el citoplasma y están involucradas en el reacomodo del citoesqueleto y tráfico vesicular amebiano.

Abstract

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) is a protozoan that causes intestinal amebiasis in at least 500 million people per year, although only 10% of those infected show severe symptoms. It is known that *E. histolytica* captures molecules released during the host immune response through membrane receptors that favor its pathogenetic mechanisms for the establishment of amebic invasion. It has been described that *E. histolytica* interacts with acetylcholine (ACh) and increases virulence factors. The objective of this study was to identify a membrane receptor on *E. histolytica* trophozoites for acetylcholine. Methods included colocalization for the acetylcholine receptor and Gal/GalNAc lectin by immunofluorescence, bioinformatic analysis, and quantification of the relative expression of Ras and Rab GTPases by qPCR. The results show that the Gal/GalNAc lectin 150 kDa intermediate subunit functions as a receptor for acetylcholine and in turn, this interaction activates GTPases, Ras and Rab in the cytoplasm and are involved in the rearrangement of the cytoskeleton and amoebic vesicular trafficking.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Amebiasis

La amebiasis o disentería amebiana es una enfermedad intestinal provocada por el protozooario *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), una de las principales enfermedades causantes de diarrea en menores de cinco años, y la tercera causa de muerte en el mundo provocada por protozoarios después de la esquistosomosis y el paludismo (Catrileo et al., 2022). Infecta alrededor de 500 millones de personas al año con una mortalidad de 40,000 y 110,000 casos por año, aunque solo el 10% de los pacientes infectados presenta síntomas severos, el resto sufre una infección asintomática (Baxt & Singh, 2008).

Existen siete especies de amebas que invaden la boca y el tracto intestinal humano: *E. histolytica*, *E. gingivalis*, *E. harmanni*, *E. coli*, *Iodamoeba bütschlii*, *Diantamoeba fragilis* y *Endolimax nana*, aunque solo *E. histolytica* puede parasitar el colon del hombre y diseminarse a otros órganos (Fleta Zaragoza et al., 2000).

1.2 Patogenicidad

Durante la infección asintomática *E. histolytica* permanece como comensal en el lumen intestinal sin trasladarse a otros tejidos, mientras que en una infección sintomática los resultados pueden ser variables entre ellos diarrea, colitis invasiva o infección metastásica (Stanley, 2003)(Taherian et al., 2022).

Inicialmente el quiste se encuentra en la luz intestinal, pared del colon y otros órganos que pueden ser infestados, posteriormente pasa a estado de trofozoíto donde se aloja y multiplica en el intestino grueso del huésped (García et al., 2015) después, mediante la expresión de factores de virulencia *E. histolytica* degrada la mucosa del colon y se une a células epiteliales, posibilitando la penetración e infección en los tejidos del huésped (Wilson et al., 2012b).

El daño provocado por *E. histolytica* depende de factores como la temperatura corporal, dosis infectiva, virulencia de la amiba, respuesta inmune a nivel de mucosas, así como la presencia de alguna deficiencia inmunológica (García et al., 2015).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

No todas las personas infectadas por *E. histolytica* expresan síntomas graves, aunque las respuestas inflamatorias del huésped juegan un papel importante en el inicio y la progresión de la amebiasis invasiva, se sabe poco sobre los factores parasitarios que inician este evento. Incluso, se sabe menos acerca de los componentes del parásito que se secretan o liberan en el intestino y que pueden modular las funciones de las células epiteliales del colon (Labruyère et al., 2019).

1.3 Epidemiología de la amebiasis

La amebiasis es la segunda enfermedad intestinal parasitaria, la cual afecta principalmente a la población vulnerable como niños y ancianos, *E. histolytica* tiene una mayor distribución en países donde predominan condiciones económicas y sanitarias deficientes (Li et al., 2021a).

Los países con alta incidencia de infección amebiana son India, África, México y partes de América Central y del Sur, mientras que, países como Taiwán, Corea del Sur y Australia cuentan con una menor incidencia de amebiasis (Nagata et al., 2012) Particularmente los grupos de riesgo están encabezados por hombres que practican relaciones sexuales con otros hombres, personas que pertenecen a áreas epidémicas, trabajadores extranjeros e inmigrantes. A pesar de que la amebiasis infecta principalmente al ser humano también puede infectar a primates no humanos, perros, gatos, cerdos, vacas y ratones (Schuster & Visvesvara, 2004).

1.4 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica tiene un ciclo de vida que se divide en dos etapas, la fase infecciosa que persiste en el ambiente denominada quiste, y la fase infectante que se encuentra en el hospedero llamado trofozoíto el cual es potencialmente patógeno.

El quiste es la forma de vida infectante, tiene una forma ovalada, cuenta con 4 núcleos y su pared está formada de quitina la cual la vuelve resistente a las condiciones ambientales, mide de 10 a 15 μm y se dividen por mitosis hasta alcanzar la madurez. El quiste prevalece a las condiciones ambientales, por lo que ingresa al hospedero a través de agua o alimentos contaminados por residuos de heces fecales, desplazándose a través del esófago hasta llegar al estómago, donde gracias a la pared de quitina, el quiste logra sobrevivir al pH del estómago

pasa intacto al intestino y en este punto ocurre la desenquistación y migración del trofozoíto al colon (Li et al., 2021b).

El trofozoíto solo puede existir dentro del hospedero, es de tamaño irregular, cuenta con vacuolas y por medio del citoplasma forma pseudópodos, normalmente, durante el ciclo de vida, el trofozoíto se enquistas nuevamente y es liberado al ambiente a través de heces fecales, en esta etapa se considera que el ciclo de vida ha concluido (Guillen, 2021)

1.5 Mecanismos de virulencia

El desarrollo invasivo por *E. histolytica* se basa en tres etapas: Motilidad, adhesión, y lisis/toxicidad celular.

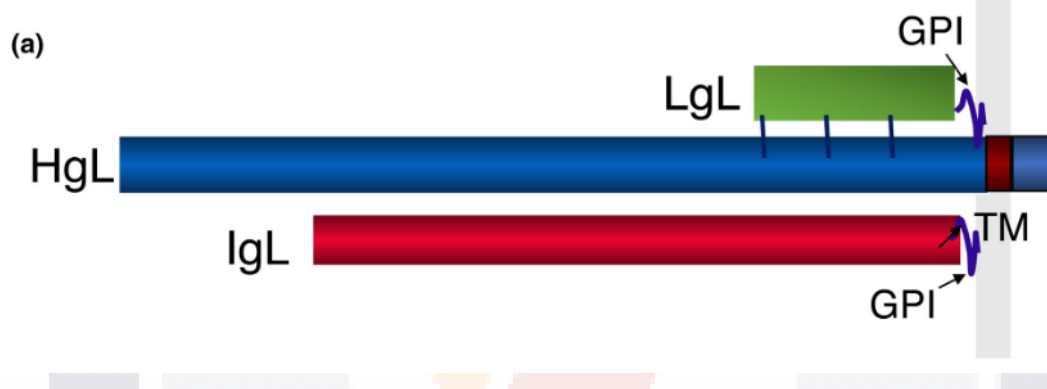


Figura 1. Subunidades de lectina Gal/GalNac de *Entamoeba histolytica*. La subunidad pesada de 170 kDa (HgL) compuesta/ligada por una subunidad ligera de 35 kDa (IgL) comparten un dominio de anclaje GPI el cual se asocia a la membrana. Así mismo una subunidad de 120 kDa unida de forma no covalente por enlaces disulfuro (Guillen, 2021).

1.5.1 Migración

Uno de los factores determinantes en la patogénesis amebiana es la motilidad, *E. histolytica* ya que le permite desplazarse de manera dirigida al sitio de inflamación a través de señales quimiotácticas. Esta capacidad depende de la organización y regulación del citoesqueleto de actina (formado por al menos 61 genes Rab) el cual determina el acoplamiento de los microfilamentos, esto ocasiona una rápida movilidad mediante pseudópodos y transporte vesicular (Javier-Reyna et al., 2012). El citoesqueleto de actina de *E. histolytica* es una proteína codificada por 8 genes (EHI_182900, EHI_159150, EHI_142730, EHI_126190, EHI_140120, EHI_107290, EHI_163750 y EHI_043640) y necesita la interacción con otras proteínas, que le ayuden a formar estructuras complejas,

responsables de los movimientos celulares. Posteriormente estas estructuras se conectan con los filamentos de actina por lo que pueden unirse a otras proteínas en el citoplasma (Manich et al., 2018).

1.5.2 Adhesión

Los microorganismos patógenos expresan factores de virulencia, que son moléculas implicadas en el establecimiento de la patología y generalmente requeridas en los procesos de adhesión y colonización, invasión tisular, evasión e inhibición de la respuesta inmune del huésped (Baxt & Singh, 2008).

Durante el proceso invasivo *E. histolytica* expresa una proteína de superficie llamada lectina GalGalNAc de 260 kDa que se une a la mucina del colon y al tejido del hospedero. Este complejo heterodímero tiene una alta afinidad por carbohidratos por lo que dicha lectina Gal/GalNAc se adhiere a acetil-D-galactosamina (Wilson et al., 2012a)

La lectina GalGalNAc está compuesta por una subunidad ligera de 35 kDa (Lgl) unida por enlaces disulfuro (Irmer et al., 2009), una subunidad intermedia de 150 kDa (Igl), rica en dominios CXXC anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Frederick & Petri, 2005) y una subunidad pesada de 170 kDa conformada por al menos 5 genes (EHI_012270, EHI_042370, EHI_046650, EHI_077500 y EHI_133900), la lectina GalGalNAc contiene una cola citoplasmática corta, y una proteína de membrana integral (compuesta por tres dominios: un dominio rico en cisteína, pseudo-repeticiones de 30 residuos y un dominio pobre en cisteína) (Mann et al., 1993)

Estudios realizados por (García et al., 2015) y colaboradores han evidenciado que el bloqueo de la subunidad pesada inhibe la citotoxicidad, pero no la adherencia, además de ser esencial en el proceso de invasión tisular migrando a través del parénquima hepático.

1.5.3 Lisis por amebaporos

Una vez que los trofozoítos se han adherido a los tejidos del huésped la ameba produce pequeños péptidos anfipáticos llamados amebaporos que tienen la capacidad de insertarse en las células dianas, formar poros y provocar lisis celular (Zhang et al., 2004). Los amebaporos son un péptido de entre 65 a 70 kDa, conformado por tres segmentos anfipáticos, dos hélices α y una lámina β . Se localizan en las vesículas citoplasmáticas y su principal objetivo es

destruir a las bacterias fagocitadas dañando la membrana citoplasmática que fungen como principal fuente de nutrientes para las amebas (Leippe et al., 1994). Este péptido se presenta en tres formas, amebaporo A, B y C, en una proporción de 35:10:1 respectivamente, de las cuales, el amebaporo C ha sido identificado como el más eficiente para lisar eritrocitos (Olivos-García et al., 2009).

1.5.4 Trogocitosis

Una vez que las células diana han sido lisadas por amebaporos, se activan vías de señalización en el trofozoíto que involucran la fosfatidilinositida 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa que contiene el dominio C2 (C2PK) (Boettner et al., 2005) que inducen a la reorganización del citoesqueleto del trofozoíto lo cual promueve la movilidad de la membrana para recubrir la superficie de las células del hospedero y tragarlas (Ralston, 2015).

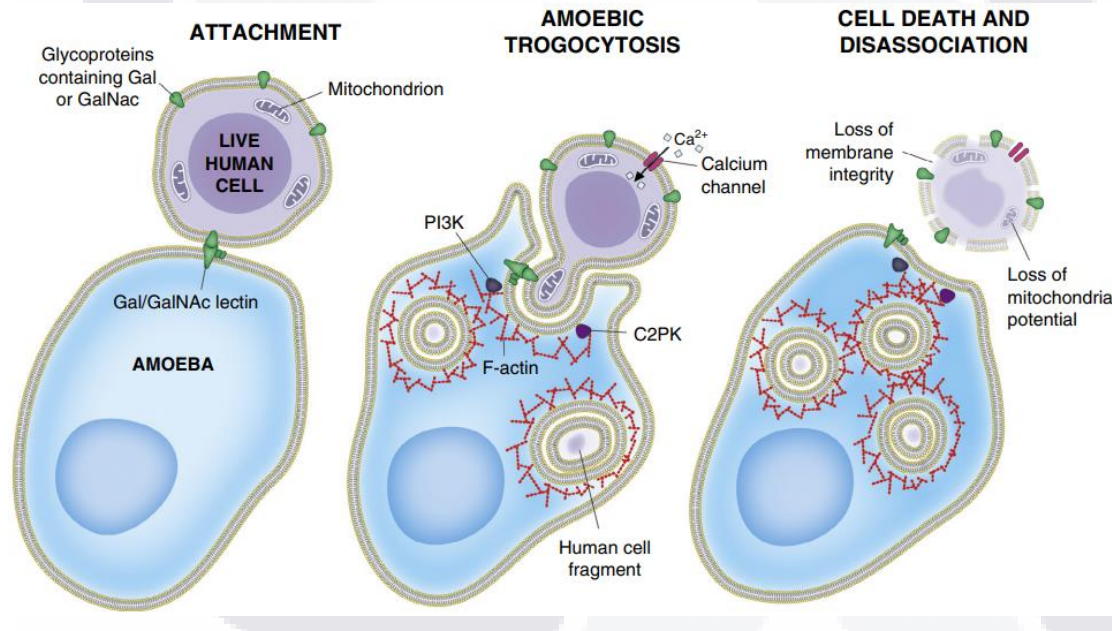


Figura 2. Proceso de muerte de células del huésped por fagocitosis amebiana (Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016)

Molecularmente han sido identificados dos métodos mediante los cuales el protozoo ingiere células: Fagocitosis y trogocitosis, durante la fagocitosis *E. histolytica* ingiere células como bacterias u hongos, mientras que en la trogocitosis el protozoo ingiere restos de la célula, viva o muerta, simulando un “mordisco”. Las diferencias moleculares entre fagocitosis y trogocitosis aun no son claras, se ha demostrado que existe la participación

de cinasas transmembranales (TMK) como TMKB3-96, TMB1.9 Y TMKC-36 involucradas en la trogocitosis, mientras que TMKC-36 está relacionada a la fagocitosis (Guillen, 2020).

1.5.5 Lipopeptidofosfoglicano

Los trofozoítos producen una molécula compuesta por 85% de carbohidratos, 8% péptidos, 2.5 de lípidos y 1% de fosfato, a la cual se le denominó lipopeptidofosfoglicano (LPPG) (Wong-Baeza et al., 2010). LPPG son complejos inmunogénicos que interactúan con el sistema inmune del hospedador, este polipéptido tiene residuos de serina que forman enlaces fosfodiéster con regiones de polisacáridos. Este complejo está estrechamente relacionado a factores de virulencia, ya que al realizar su bloqueo este complejo inhibe la adhesión a las células diana y la citotoxicidad (Marinets et al., 1997)

Los LPPG amebianos son reconocidos por el receptor TLR 2 y TLR 4 de macrófagos y células dendríticas del hospedero, esta interacción promueve en el humano la secreción de TNF- α , IL-8, IL-10 e IL-12 favoreciendo el proceso de inflamación (Weber et al., 2008).

1.6 Receptores de membrana

E. histolytica utiliza un complejo sistema de transducción de señales que le permiten comunicarse con el exterior a partir de receptores de membrana. Se han encontrado al menos 270 receptores para proteínas tirosina cinasas transmembrana (TMK) con dominios SH2, estas proteínas transmiten señales mediante la adición de grupos fosfato en los aminoácidos de tirosina, además de ser considerados elementos importantes involucrados en las cascadas de fosforilación que regulan la reorganización del citoesqueleto de actina (Ralston, 2015).

Los receptores tirosina quinasas identificados en *E. histolytica* contienen un dominio extracelular, una sola hélice transmembrana con un dominio citosólico tipo tirosina quinasa (TyrK) (Mehra et al., 2006) han sido clasificados en 9 grupos; A, B1-3, C, D1-2, E y F, este

agrupamiento se basa en el dominio quinasa y el número de cisteínas en el dominio extracelular (Beck et al., 2005).

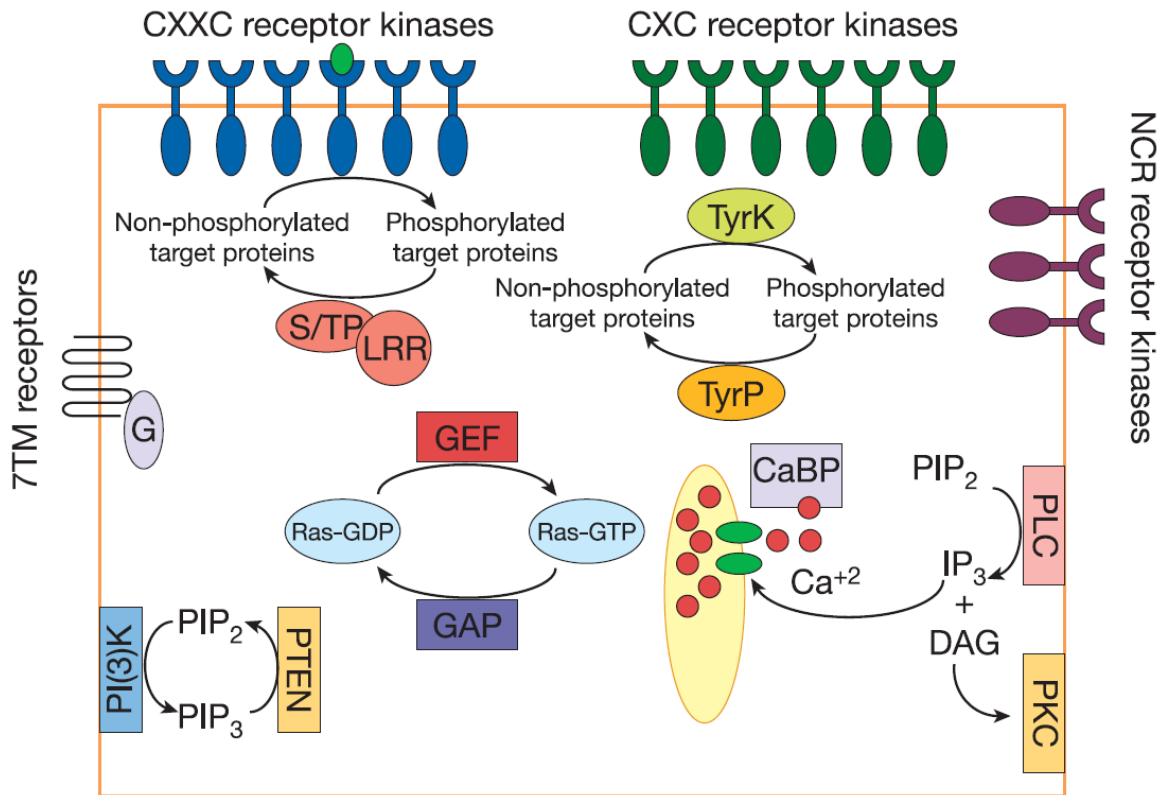


Figura 3. Receptores de membrana de *E. histolytica* (Loftus, Anderson, Davies, Cecilia, et al., 2005).

En la figura 3 se presentan los receptores quinasa transmembrana encontrados en *E. histolytica*; El primer grupo, compuesto por al menos 50 proteínas quinasa receptoras ricas en repeticiones CXXC, similares a las que se encuentran en la subunidad intermedia (Igl), un segundo grupo CXC conformado por proteínas con dominios ricos en cisteína y el tercer grupo de 8 proteínas tipo receptor quinasa con escasos dominios extracelulares ricos en cisteína. Así mismo dominios tirosina cinasa citosólicas (Tyrk), serina/treonina fosfatasa (S/TP) con un dominio LRR. Receptores acoplados a proteínas G, dominio para fosfolipasa C y proteína C quinasa. (Loftus, Anderson, Davies, Cecilia, et al., 2005).

Dentro del genoma de *E. histolytica*, destacan genes que codifican para proteínas G heterotriméricas, es probable que la señalización de esta vía regula la motilidad amebiana, la unión y destrucción de las células del huésped a través de un efector RGS-RhoGEF (Bosch et al., 2012), se han evaluado agonistas típicos de GPCR como histamina y serotonina

encontrando modificaciones interesantes en la patogenicidad, actividad fagocítica y un aumento de la virulencia (Bosch & Siderovski, 2013).

1.7 Receptores de membrana a células eucariotas

E. histolytica tiene la capacidad de expresar proteínas homologas a las células eucariotas que le permiten interactuar, degradar y unirse a proteínas pertenecientes a la matriz extracelular (Cheng et al., 2001).

Alguna de las moléculas descritas en *E. histolytica* es un receptor de membrana de 37 kDa que se une a fibronectina (el cual ha sido asociado a la lectina Gal/GalNAc particularmente la subunidad intermedia), esta unión actúa como medio de anclaje para la ameba por lo que puede adherirse a la matriz extracelular, posteriormente van a activarse vías de señalización que promuevan la reorganización del citoesqueleto de actina (Sengupta et al., 2009a).

Aunado a esto en 2009, Ventura Juárez y colaboradores identificaron en la superficie de la membrana de *E. histolytica* una proteína de masa molecular de aproximadamente 21 kDa similar a la glucoproteína CD59, por lo que la ameba es capaz de inhibir el sistema del complemento, sugiriendo que el parásito es resistente a la lisis por el complemento sanguíneo del humano y así explicar el que pueda viajar a través de la sangre desde el colon hasta el hígado y otros órganos (Ventura-Juárez et al., 2009).

Ahora bien, en 2015, Diaz Valencia y colaboradores, demostraron que la ameba responde a su vez a la presencia de IL-8 a través de un receptor de membrana de 29 kDa, la que al unirse a la membrana del trofozoíto activa vías de señalización que inducen a la reorganización del citoesqueleto (Diaz-Valencia et al., 2015a).

1.8 Sistema nervioso central

El sistema nervioso central regula la respuesta inmune frente a patógenos y tejidos dañados a través del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal utilizando hormonas de la respuesta neuroendocrina al estrés (hormona liberadora de corticotropina, hormona adrenocorticotropa y cortisol (Webster et al., 2003). Además, el sistema nervioso central mantiene una relación bidireccional con el sistema inmunitario a través de vías humorales y neuronales dirigidas por sus ramas simpática y parasimpática (Rosas-Ballina & Tracey, 2009).

El 75% de la actividad parasimpática es regulada por el nervio vago, el cual se distribuye a través de las estructuras viscerales del cuello, cavidad torácica y parte alta de la cavidad abdominal hasta el nivel del colon transversal (Furness et al., 2014). El nervio vago humano contiene entre 40 000 y 50 000 axones que liberan ACh, el principal neurotransmisor postganglionar del sistema nervioso parasimpático. La ACh regula la respuesta inmune produciendo un efecto antiinflamatorio, se une a la subunidad alfa 7 ($\alpha 7nAChR$) del receptor nicotínico en monocitos y macrófagos y otras células inmunitarias como linfocitos T y B, esta unión inhibe la activación del factor nuclear-kB (NF-kB) así como la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1beta, IL-6 e IL-18), pero no la citocina antiinflamatoria IL-10 (Borovikova et al., 2000) manteniendo una respuesta inmune humoral tipo TH2 (Eskandari et al., 2003).

1.9 Acetilcolina

La ACh es el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático se acumula hasta alcanzar altas concentraciones en organelos conocidos como vesículas sinápticas, y su liberación ocurre por exocitosis provocada por la entrada intracelular de calcio a la terminación nerviosa desencadenada por la llegada del estímulo eléctrico (Rivera et., al 2009).

La ACh se sintetizada en el interior de la terminación nerviosa colinérgica a partir de la unión de la acetilcoenzima A con la colina, esta unión es mediada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) (Lopez, M. 2003). La actividad de ChAT está presente en las fibras nerviosas, ya que se sintetiza en los cuerpos de las células neuronales y se transporta a las terminales nerviosas donde cataliza la síntesis de ACh (Soto & Torres, 2005). Actualmente, el marcador selectivo utilizado para identificar las fibras nerviosas colinérgicas es el transportador vesicular de ACh (VACHT) (Arvidsson et al., 1997). El VACHT son proteínas que resguardan ACh en las vesículas sinápticas, mediando la cantidad de neurotransmisor disponible y que puede ser liberado por exocitosis (Menéndez Méndez et al., 2018).

Tradicionalmente, el método de identificación de neuronas colinérgicas ha sido mediante la actividad enzimática de la colina acetiltransferasa (ChAT) que como ya se ha mencionado anteriormente es una enzima involucrada en la síntesis de ACh.

Capítulo 2. Antecedentes

En la actualidad la amebiasis sigue siendo una de las principales causas de muerte provocada por protozoarios, poco se sabe sobre los factores que desencadenan infecciones sintomáticas que posteriormente pueden desarrollar abscesos hepáticos, sin embargo, una de las principales cualidades de la *E. histolytica* es la expresión de proteínas homologas a las células eucariotas.

Durante el proceso inflamatorio, el sistema inmune se comunica con el sistema nervioso central para optimizar la respuesta inflamatoria local, esta respuesta, estimula el nervio vago liberando el principal neurotransmisor del sistema nervioso, la ACh. Dicho neurotransmisor se une a la subunidad alfa 7 ($\alpha 7$) del receptor nicotínico de la ACh, por lo que monocitos y macrófagos van a ser inactivados inhibiendo la respuesta inflamatoria (De La et al., 2011).

Estudios previos realizados desde 1986 evaluaron el efecto de la ACh, histamina, serotonina y cortisol durante el proceso infeccioso por *E. histolytica*, encontrando que el absceso hepático amebiano aumentaba (Kulkarni y Sen, 1986).

Aunado a esto, Medina Rosales y colaboradores evaluaron las propiedades de virulencia de trofozoítos de *E. histolytica* tras estar en contacto con ACh. Durante este estudio se observó que factores como la adhesión, amebaporos C, y cisteín proteasas EhCP-a2 y EhCP-a5 aumentaban positivamente, así mismo el desarrollo del absceso hepático amebiano presento una lesión de mayor daño cuando los trofozoítos de *E. histolytica* se habían estimulado con ACh (Medina-Rosales et al., 2021a). Este es el primer informe que describe la capacidad, *E. histolytica*, para captar ACh de manera exógena e incrementar sus factores de virulencia.

Evidencias previas en trofozoítos de *E. histolytica* han descrito receptores membranales que interactúan con proteínas liberadas por el hospedero durante el proceso infeccioso, por ejemplo, se ha observado que la presencia de IL-8 funciona como quimioatrayente para la ameba, esto mediante una proteína de 29 kDa que funciona como receptor para IL-8 por lo que es capaz de unirse a quimiocinas, y desplazarse al sitio de infección mediante el reacomodo del citoesqueleto (Diaz-Valencia et al., 2015b).

En 2019, Pulido Ortega y colaboradores describieron un receptor presente en la membrana de *E. histolytica* análogo al receptor 1 de IFN- γ humano, que además responde a la presencia de IFN- γ aumentando significativamente la expresión de genes implicados en la virulencia principalmente de *EhCP* (Pulido-Ortega et al., 2019).

Dichos informes respaldan que *E. histolytica* pudiera presentar un mecanismo molecular que le permite captar ACh e incrementar sus factores de virulencia, sin embargo, el mecanismo molecular de captación de ACh en trofozoítos de *E. histolytica* aún no ha sido caracterizado. También, se ha reportado que algunas de estas moléculas receptoras participan en la activación de proteínas G las cuales son uno de los principales interruptores moleculares que pueden ser activados por diferentes estímulos y también por la presencia de neurotransmisores como ACh (Maeda et al., 2019).

Capítulo 3. Justificación

La amebiasis provoca entre 40.000 y 100.000 muertes al año, y es responsable de causar disentería y abscesos amebianos principalmente en países como Asia, África e India.

Se conoce poco sobre la expresión de moléculas presentes en el parásito que puedan responder a estímulos provenientes del hospedero. Trabajos previos han demostrado que la ACh modifica el nivel de virulencia del parásito, posiblemente por la unión de esta molécula a proteínas de membrana encontradas en *E. histolytica*, sin embargo, se necesitan más estudios para conocer si esta modificación en la virulencia es mediada por la interacción de un posible receptor presente en los trofozoítos de la amiba, por ello, en este trabajo se pretende identificar un posible mecanismo mediante el cual la ACh este participando en la modulación de los factores de virulencia de *E. histolytica*.

Capítulo 4. Hipótesis

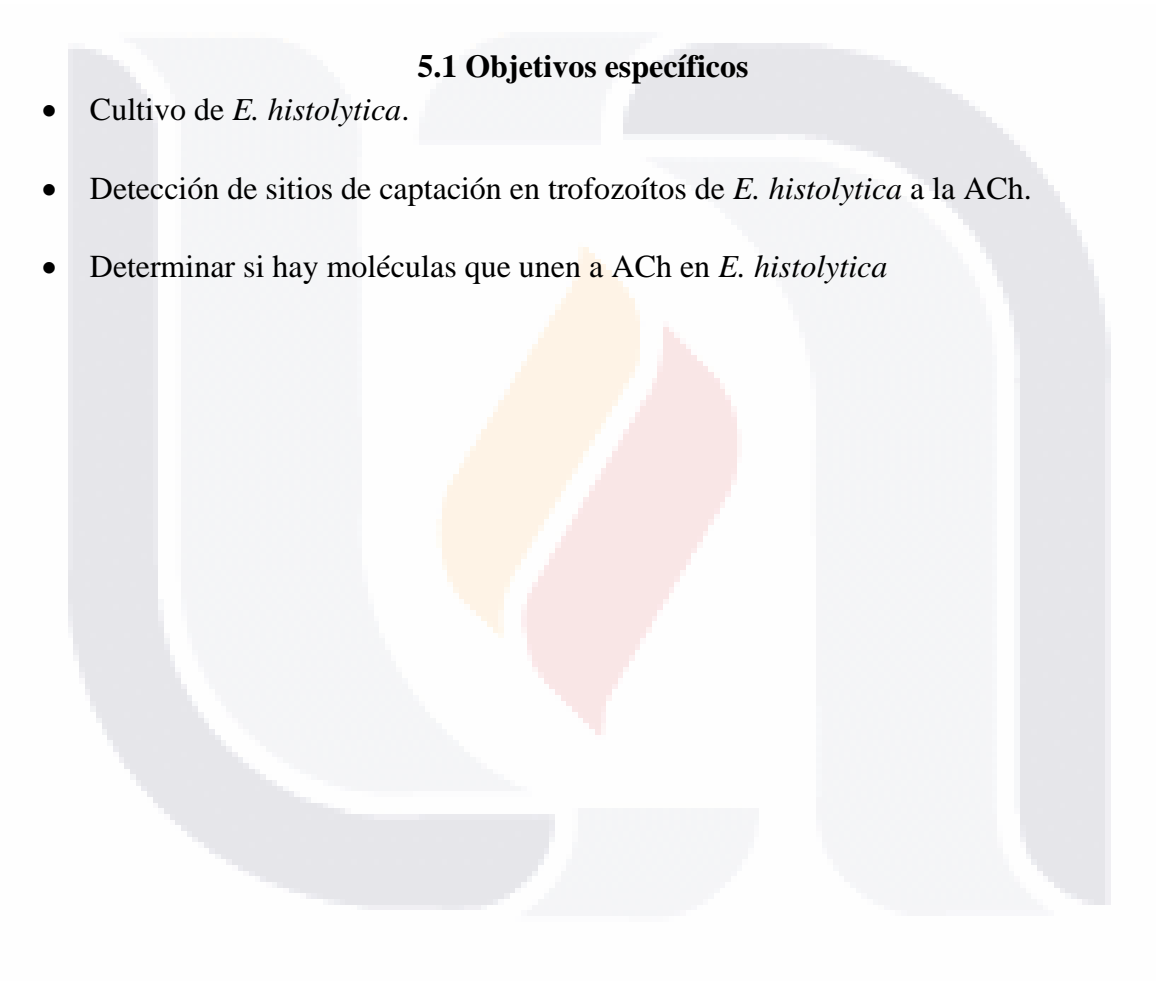
E. histolytica presenta un mecanismo molecular específico aun no caracterizado que maneja ACh.

Capítulo 5. Objetivo general

Caracterización de las posibles moléculas receptoras contenedoras de ACh en *E. histolytica*.

5.1 Objetivos específicos

- Cultivo de *E. histolytica*.
- Detección de sitios de captación en trofozoítos de *E. histolytica* a la ACh.
- Determinar si hay moléculas que unen a ACh en *E. histolytica*



Capítulo 6. Metodología

6.1 Cultivo axénico de *E. histolytica*.

Se cultivo la cepa HM-1: IMSS en condiciones axénicas en medio de cultivo TYI-S33, se suplemento con suero fetal bovino inactivado (SU-120), vitamina (M-2310), y antibac (MC-110) (Diamond et al., 1978).

6.2 Ensayo de viabilidad.

La viabilidad de los trofozoítos se evaluó después de 1 h de tratamiento con ACh 1×10^{-8} M durante 1 h a 37°C y 500 μl de bromuro de vecuronio 1×10^{-4} M un antagonista típico de la acetilcolina (Catrileo et al., 2022). Como control positivo se utilizaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de metronidazol. La viabilidad de las células se evaluó mediante exclusión del azul de tripán a las 24, 48 y 72 h de iniciado el cultivo. Las evaluaciones se realizaron con un microscopio Carl Zeiss 398 Axiovert 40CFL (Carl Zeiss AG, Alemania).

6.3 Ensayo de Inmunofluorescencia para la detección de ACh

Trofozoítos de *E. histolytica* (1×10^6) fueron cultivados en placas de 24 pozos para cultivo celular sobre cubreobjetos redondos con medio TYI-S-33 durante 15 min a 37°C . Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS 1X. En seguida, se estimularon con y sin ACh 1×10^{-8} M durante 1 h a 37°C . Los trofozoítos fueron lavados con PBS 1X, se fijaron por una hora con paraformaldehído al 2%, se bloquearon sitios de unión inespecíficos con SFB al 2% y se permeabilizaron con PBS 1X-Tritón al 0.2%. Posteriormente los trofozoítos se lavaron con PBS 1X y fueron incubados con el anticuerpo primario (véase tabla 1), el cual fue diluido con PBS 1X, durante 1 hora a 37°C , al finalizar los trofozoítos fueron lavados con PBS 1X, y enseguida fueron incubados con el anticuerpo secundario (véase tabla 1) correspondiente diluido en PBS 1X, 1 hora a 37°C . Para tinción nuclear se utilizó Hoechst 33342. Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para los ensayos de inhibición de lectina Gal/GalNac; Se utilizó N-acetilgalactosamina 200 mM. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de Epi-florescencia Axioskop 40, Zeiss y microscopía láser confocal LSM 700, utilizando el software Zen Black 2012 (black edition) (ZEISS). Las imágenes se analizaron con software ImageJ (Wayne Rasband, Nat. Inst. of Health, EE. UU.) para determinar la colocalización de ACh y la Gal/GalNAC.

Tabla 1. Anticuerpos primarios, secundarios y conjugados utilizados para ensayos de inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial
Ratón policlonal anti L220 (IgG1)	(1:1000)	(Ab00446-10.0, Absolute Antibody, Cleveland EE. UU.).
Conejo policlonal receptor muscarínico de acetilcolina M3/CHRM3.	(1:500)	(Ab126168 Abcam, Cambridge, Reino Unido.).
Ratón Ab – anti CHT1.	(1:1000)	(NB-11074570, Novus Biologicals, EE.UU.).
Ratón pAb a VAcHT.	(1:500)	(Ab235201 Novus Biologicals, EE.UU.).
Anticuerpo secundario	Dilución	Casa comercial
Alexa Fluor 594 (H+L) chivo anti-ratón IgG.	(1:1000)	(Invitrogen A-11005, Eugene, Oregón, EE. UU.).
Alexa Fluor 488 cabra anti IgG de conejo (H+L).	(1:1000)	(Invitrogen, Eugene, Oregon E.U.A.).
Day light (546) cabra anti – Ratón IgG (H+L).	(1:500)	(Invitrogen, Eugene, Oregon E.U.A.).
Anticuerpo primario acoplado	Dilución	Casa comercial
Conjugado de α -bungarotoxina Alexa Fluor 647.	(1:1000)	(B35450, Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.).
Anti-ACh-FITC IgG.	(1: 1000)	(LS-C691654 LifeSpan BioSciences, Seattle, WA.).

6.4 PCR

6.4.1 Extracción de ARN

Se utilizaron 2×10^5 trofozoítos los cuales se trabajaron con y sin estímulo, el estímulo fue la adición de una concentración de 1×10^{-8} M de ACh. Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Se agregaron 350 μ l de TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, UK), se homogenizaron durante 2 minutos en vortex, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos,

se añadieron 350 μ l de etanol al 100% y fueron mezclados durante 30 segundos en vortex. La muestra fue transferida a la columna RNeasy donde se centrifugo a 8000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante se descartó y se añadieron 700 μ l de Buffer de lavado 1 a la columna RNeasy, después se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante y se añadieron 700 μ l de buffer RW1, nuevamente se centrifugaron a 30 segundos a 8000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de Buffer RPE a la columna RNeasy, se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 segundos, se realizó este paso, pero la muestra se centrifugo durante 2 min. La muestra fue transferida rápidamente a un tubo colector y se añadieron 30 μ l de agua libre de RNAsas y se centrifugo durante 2 minutos a 8000 rpm.

Posteriormente se cuantifico la pureza del ARN obtenido en el BioDrop μ LITE (Isogen Life Science), en un rango de 260-280 nm. Para evaluar la integridad de las muestras se realizó una electroforesis, las muestras se colocaron en geles de agarosa al 1%, las muestras fueron mezcladas con 1 μ l de buffer de carga (5x Green Go Taq Flexi Buffer) y 4 μ l de la muestra, posteriormente fueron depositados en los carriles del gel, como marcador de peso molecular se utilizó Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). Al finalizar la electroforesis los geles fueron teñidos utilizando bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/ml durante 10 minutos, y fueron visualizadas en el transiluminador de luz UV.

Para la síntesis de DNA complementario, se utilizó el kit Reverse Transcription System (Promega, USA) a partir de 1 μ g de ARN obtenido se realizó la transcripción inversa, se agregaron 2 μ l de buffer 5x, para la retro transcriptasa, 0.5 μ l 10 mM de la mezcla de dNTP 50 U MMLV transcriptasa reversa y 1 μ l de 10 mM oligodT. La mezcla de reacción se incubó 60 minutos a 42°C en un termociclador con un ciclo final de 90°C durante 5 min.

6.4.2 PCR en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación de la expresión génica relativa se utilizaron 50 ng de cDNA. Los oligonucleótidos fueron diseñados para los genes de la lectina 170 kDa, lectina 150 kDa, Ras 5, Rab 7 y para el control endógeno, que en este caso fue la tubulina.

Tabla 2. Oligonucleótidos dirigidos a genes de *E. histolytica* utilizados en este estudio.

Target	Primers Sequence	
	5'	3'
Gal/GalNac suunidad pesada 170 kDa	Fwd: TGC ACA TGT CCA ATG TGT TG	
	Rev: CAC TTT TGG TTG GCA TGT GT	
Gal/GalNac suunidad intermedia 150 kDa.	Fwd: TGA TGA GTG CGA AGA TGG TT	
	Rev: TGA GCA ACG GCT TCA GTA CA	
Ras 5.	Fwd: TGC ATC AGG AGC AAT AGG AA	
	Rev: CCC TGA AAT TTT GCC TTT CTT	
Rab 7.	Fwd:TTG GTG ATT CAG GTG TTG GA	
	Rev: CGT TCA TTT CCG GCA GTA TC	
Tubulina.	Fwd: TGC ACC AAT TGT TAC ACC AGA	
	Rev: CAT GGA CAC CAT CCA ACA AA	

6.5 Dot – blot

Se utilizaron 7×10^5 trofozoítos los cuales fueron lavados con PBS 1X, para el lisado celular, se suspendieron en tampón RIPA (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EE. UU.) con un cóctel de inhibidores de proteasas (N-etilmaleimida 5 mM, p-cloromercuribenzoato 5 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 Mm (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail), se realizaron cinco ciclos de choque térmico en nitrógeno líquido y en agua a 37°C. Para la cuantificación de proteínas se siguió el método de Bradford (Bradford, 1976):

Se tomaron 15 µg del lisado celular y colocaron en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada con metanol durante 10 min. Se bloquearon los sitios de union inespecíficas durante 2 horas con solución salina tamponada con Tris (TBS 1X-T) y leche descremada al 5% a temperatura ambiente. Para la detección de proteínas de interés las membranas se incubaron con el anticuerpo primario; ratón anti-CHT1 (1:1000; NB110-74570) y un conejo anti-AChT (1:500; ab235201) la incubación se dejó durante toda

la noche a 4°C. Posteriormente las membranas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anti-ratón-HRP (IgG) (1:2000; AP127P, Chemicon, EE. UU.) y un anti-conejo-HRP (IgG) (1:2000; A0545, Sigma, EE. UU.). Después de la incubación las membranas fueron lavadas con TBST-1X al 0.05% y fueron reveladas con Diaminobencidina (3,3'-Diamino-benzidine, SIGMA).

6.6 Docking molecular

6.6.1 Modelado de la proteína y obtención de ligandos

La secuencia de aminoácidos en formato FASTA de la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc perteneciente al organismo *E. histolytica* se obtuvo a partir de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>) con el código de acceso C4LV76. La secuencia se modeló mediante el servidor I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) (Yang et al., 2014). Los ligandos usados para el acoplamiento molecular con la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc fueron la ACh (ID: 187) y la N-acetilgalactosamina (ID: 35717), ambos compuestos se obtuvieron de la base de datos PubChem.

6.6.2 Acoplamiento Molecular (Docking)

El procesamiento de la proteína consistió en la adhesión de los hidrógenos polares, la fusión de los no polares y el cálculo de las cargas de Kollman con AutoDock Tools v.1.5.6 (Morris et al., 2009). La preparación de los ligandos consistió en agregar hidrógenos bajo un pH de 7.4, minimizando sus energías bajo un campo de fuerza MMFF94 empleando el software Avogadro v.1.2.0, posteriormente se calcularon las cargas de Gaisteiger con AutoDock Tools v.1.5.6. Con la herramienta DoGSiteScorer del servidor ProteinPlus (<https://proteins.plus/>) (Schöning-Stierand et al., 2020) se predijeron las regiones de unión de la proteína, únicamente fueron evaluadas aquellas regiones con un puntaje de *drogabilidad* mayor o igual a 0.75. El acoplamiento molecular se realizó usando el software AutoDock v.4.2, se emplearon cajas de 64 X 64 X 64 abarcando de forma individual las regiones predichas anteriormente.

6.6.3 Interacciones Proteína-Ligando

Las mejores conformaciones obtenidas por cada sitio de unión se sometieron a un análisis de interacción Proteína-Ligando, donde se obtuvieron las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno formados entre los residuos de la proteína y los ligandos. Se empleó la herramienta PoseView del servidor en línea ProteinPlus para obtener las interacciones.

Capítulo 7. Resultados

7.1 Colocalización de lectina Gal/GalNAc y ACh en trofozoítos de *E. histolytica*.

Con el fin de identificar los sitios de captación a ACh en trofozoítos de *E. histolytica*, evaluamos dos posibles sitios de interacción en la ameba que pudieran estar funcionando como sitio de captación. Por un lado, evaluamos la lectina amebiana Gal/GalNAc que tiene la capacidad de reconocer y unirse a azúcares como Gal y N acetilgalactosamina, así como reconocer componentes de la matriz extracelular como, fibronectina (FN) (Sengupta et al., 2009b), colágena (Talamas-Rohana & Meza, 1988) y laminina (Cheng et al., 2001), además

A

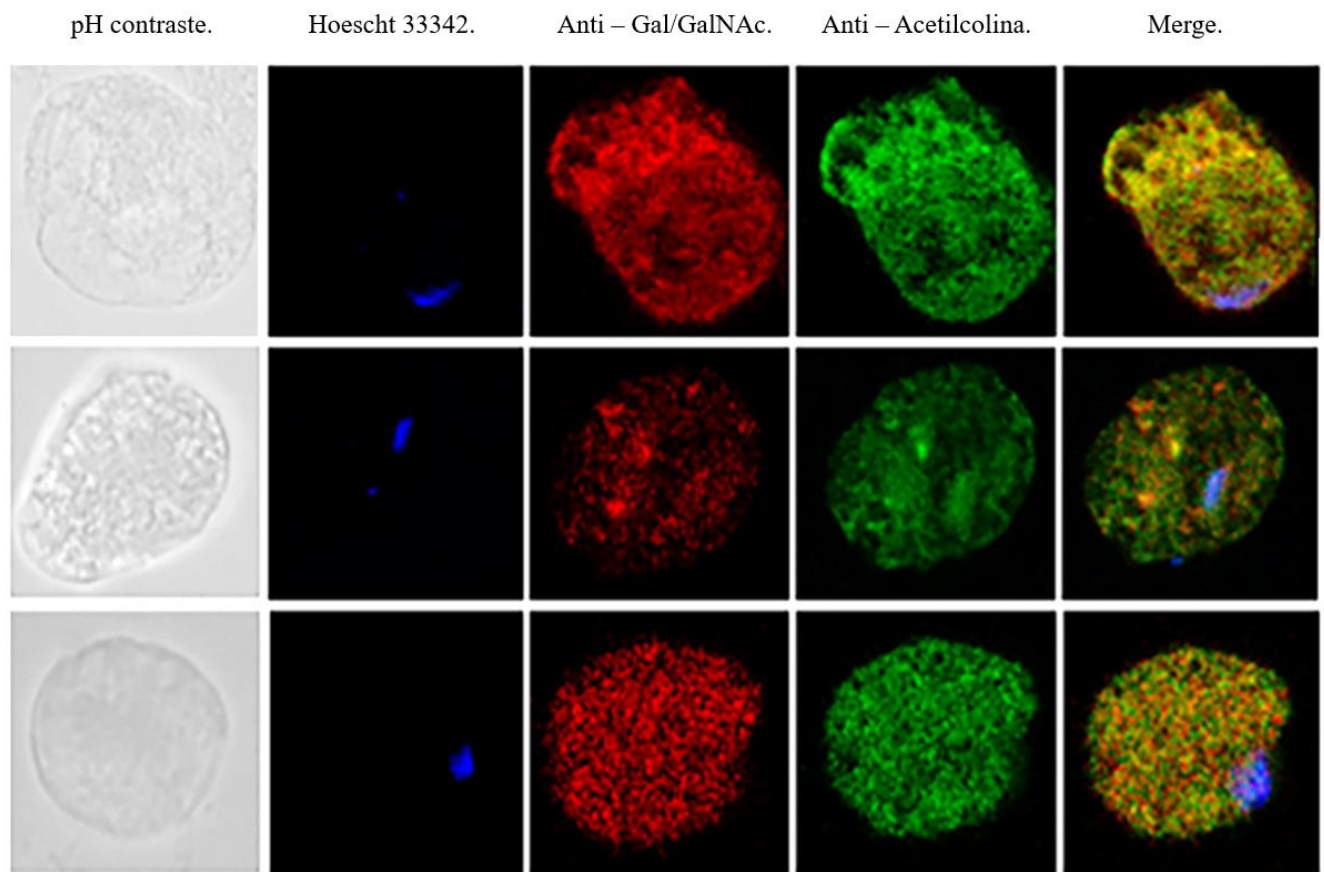


Figura 4. Colocalización de ACh y lectina Gal/GalNAc. A) Trofozoítos tratados con ACh 0.01 μ M durante una hora. Se fijaron y permeabilizaron. Para la doble inmunodetección, se usaron anticuerpos anti-Gal/GalNAc (1:1000) y anti-ACh-FITC (1:1000) Hoechst 33342 (azul) para la tinción nuclear. Las imágenes se obtuvieron con microscopía confocal.40X.

de compartir similitudes con receptores tirosina quinasa (Loftus, Anderson, Davies, Alsmark, et al., 2005).

Para determinar si la lectina Gal/GalNAc puede actuar como un receptor de ACh, utilizamos un primer anticuerpo IgG1 anti-Gal/GalNAc de ratón (1:1000; Ab00446-10.0, Absolute Antibody Cleveland USA) y un IgG Alexa anti-ratón de cabra. Fluor 594 (H+L) secundario (1:1000; Invitrogen A-11005, Eugene, Oregon, USA), sinérgicamente aplicamos un anticuerpo anti-acetilcolina-FITC (1:800; LifeSpan BioSciences LS-C305726, Seattle, Washington, EE. UU.) que reconoce la ACh en la membrana del trofozoíto.

Mediante microscopia cofocal se obtuvieron imágenes, al ser analizadas se detectaron y localizaron de manera independiente los sitios que corresponden a la lectina amebiana Gal/GalNAc (canal rojo), y sinérgicamente los sitios donde se une la ACh (canal verde) en la membrana del trofozoíto (Figura 1A) al realizar el Merge entre ambas imágenes se produce un color amarillo lo que indica una colocación entre ambos canales. El análisis de imágenes (Figura 5B) mostro a través del coeficiente de Mander's que los marcadores fluorescentes (independientes) correspondientes a la lectina Gal/GalNAc y ACh, colocaliza una misma área de la célula, mientras que el coeficiente de Spearman's se demostró que estos sitios correlacionan el 98% de los pixeles, lo que supone que el sitio donde se capta la ACh es la lectina amebiana Gal/GalNAc.

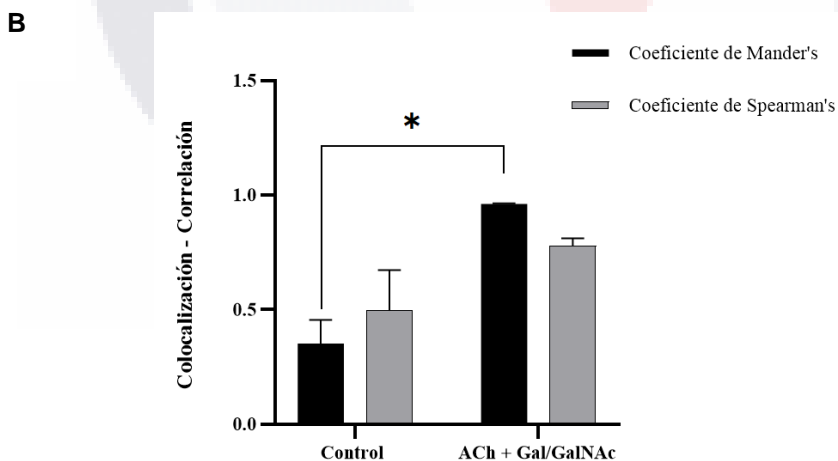


Figura 5 B) Colocalización de ACh y Lectina GalGalNAc cuantificada y comparada mediante los coeficientes de correlación de Spearman y Mander (considerando valores por encima del umbral de 0,6 como coeficientes R significativos). Los datos corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos independientes ($n = 5$). El análisis estadístico se realizó con el método ANOVA de una vía y el post-test de Tukey, donde se consideraron diferencias significativas los valores de $***p < 0.001$.

Para validar estos resultados, inhibimos la lectina Gal/GalNac con N-acetilgalactosamina 200 mM, posteriormente los trofozoítos fueron interactuados con ACh 0.01 μ M y detectamos los sitios de unión de la ACh en la membrana de los trofozoítos con un anti-acetilcolina-FITC, sin embargo, no detectamos señal para este neurotransmisor (#), por otro lado, realizamos el mismo ensayo, pero en este caso la lectina amebiana Gal/GalNac no fue inhibida, observamos positividad para la captación de ACh en la membrana de los trofozoítos (*).

También se evaluó la expresión relativa de los genes que codifican para la adhesión amebiana (un factor de virulencia esencial en la patogénesis) específicamente la subunidad pesada e intermedia de la lectina Gal/GalNac (170 y 150 kDa). Los niveles de expresión se normalizaron con los del gen constitutivo α -tubulina. Ha sido demostrado anteriormente que la expresión relativa de dichas subunidades aumenta en trofozoítos interactuados con ACh

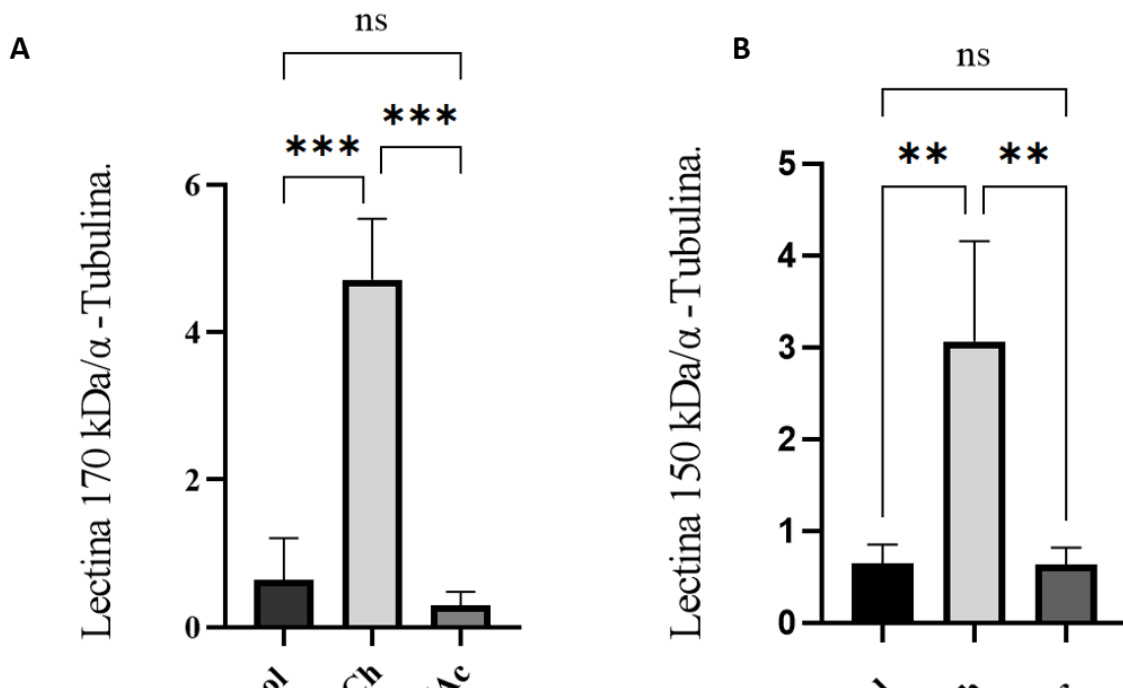


Figura 6. Expresión relativa de trofozoítos en condiciones basales (Control), estimulados con ACh (ACh) y con lectina inhibida por N-acetilgalactosamina (Gal/GalNac) A) Subunidad pesada de lectina Gal/GalNac (170 kDa) B) Subunidad intermedia de lectina Gal/GalNac (150 kDa) por amplificación RT-qPCR de trofozoítos tratados con ACh 1×10^{-8} durante 1 hora. Niveles de expresión relativos normalizados al gen constitutivo de α -tubulina. Los datos corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos independientes (n = 5).

(Medina-Rosales et al., 2021b), en este ensayo observamos (Figura 6) que la expresión relativa para la subunidad pesada e intermedia disminuyó cuando la lectina Gal/GalNAc se encontraba unida con N-acetilgalactosamina alcanzando niveles de expresión similares a los trofozoítos sin ningún tratamiento, estos resultados proponen que la ACh no está siendo captada por el trofozoíto ya que la lectina Gal/GalNAc no se encuentra disponible para funcionar como sitio de unión para la ACh. Por otro lado, comparando la expresión relativa de trofozoítos que fueron interaccionados directamente con ACh observamos un aumento en la expresión relativa de las subunidades Hgl e Igl.

Como ensayo adicional se realizaron acoplamientos moleculares (docking molecular) mediante herramientas bioinformáticas ampliamente utilizadas para predecir posibles sitios que enlazan ligandos y proteínas (Figura 7), los resultados mostraron que el sitio de unión entre ACh y subunidad intermedia (150 kDa) de la lectina Gal/GalNAc, se predijeron 4 sitios de unión (SU1, SU2, SU3 y SU4) (tabla 3) de la ACh, únicamente fueron evaluadas aquellas regiones con un puntaje de drogabilidad mayor o igual a 0.75 (Aretz et al., 2014). Como control positivo se realizó el ensayo interaccionando a esta lectina con su ligando N-acetilgalactosamina. El primero de ellos (SU1) contó con un puntaje de 0.8, siendo el más alto de todos y contando con un volumen de 911.74 Å³. El segundo (SU2) obtuvo un puntaje de 0.79 y un volumen de 869.72 Å³. Para el tercer sitio de unión (SU3) los resultados mostraron un puntaje de drogabilidad de 0.76 y un volumen de 683.55 Å³. Por último, el cuarto sitio de unión (SU4) contó con un puntaje de 0.75 y un volumen de 513.12 Å³.

Tabla 3. Sitios de unión previstos para la subunidad intermedia de lectina Gal/GalNAc obtenidos por la herramienta DoGSiteScorer del servidor ProteinPlus. Sólo se utilizaron aquellos sitios de unión con un valor igual o superior a 0,75 en la puntuación de capacidad de tratamiento.

Sitio de Unión	Drogabilidad	Volumen (Å ³)	Área de superficie (Å ²)
SU1	0.80	911.74	1303.08
SU2	0.79	869.72	1315.88
SU3	0.76	683.55	1168.48
SU4	0.75	513.12	875.93

Posteriormente interactuamos estos 4 posibles sitios de unión (SUs) con ACh, los resultados mostraron que para el SU1 la energía de unión fue de -5.14 Kcal/mol, mostrando una interacción con el residuo Val232. En el caso del SU2, la energía de unión fue de -5.66

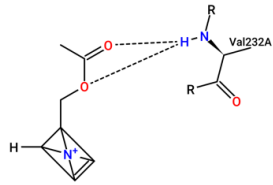
Kcal/mol y presentando una interacción con el residuo Glu101. Para el SU3, la interacción ocurrió con el aminoácido Glu69 con una energía de unión de -4.69 Kcal/mol. Por último, el SU4 mostró una energía de unión de -6.01 Kcal/mol y la interacción fue con Ile265 (Tabla 3 y figura 7).

Para el acoplamiento molecular entre la N-acetilgalactosamina y la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc, el SU1 arrojó una energía de unión de -4.54 Kcal/mol e interactuó con los residuos Tyr323, Tyr195, Cys191, Glu236 y Lys182. La energía de unión obtenida para el SU2 fue de -4.10 Kcal/mol, existiendo interacciones con los residuos Asn79, Gln49 y Gln81. El SU3 contó con una energía de unión de -4.38 Kcal/mol y las interacciones ocurrieron con los aminoácidos Lys67, Glu157, Asp151 y Thr159. Finalmente, el SU4 mostró una energía de unión de -4.16 Kcal/mol e interacciones con Glu320, Asn297 y Met311 (Tabla 4 y figura7).

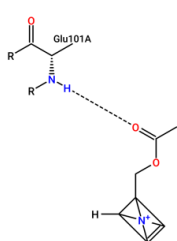
Tabla 4. Resultados de los acoplamientos moleculares entre la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc y los ligandos acetilcolina y N-acetilgalactosamina obtenidos con el programa AutoDock Tools v.1.5.6 para cada uno de los sitios de unión predichos.

Ligando	Sitio de Unión	Energía de Unión (Kcal/mol)	RMSD	Aminoácidos
ACh	SU1	-5.14	128.90	Val232
	SU2	-5.66	163.26	Glu101
	SU3	-4.69	163.65	Glu69
	SU4	-6.01	137.71	Ile265
N-acetilgalactosamina	SU1	-4.54	140.16	Tyr323, Tyr195, Cys191, Glu236 y Lys182
	SU2	-4.10	172.98	Asn79, Gln49 y Gln81
	SU3	-4.38	158.32	Lys67, Glu157, Asp151 y Thr159
	SU4	-4.16	142.57	Glu320, Asn297 y Met311

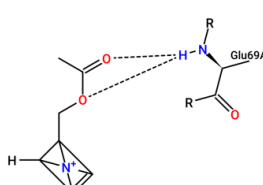
Sitios de unión entre lectina Gal/GalNAc subunidad intermedia y acetilcolina



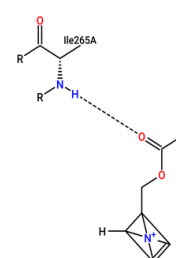
Sitio de Unión: SU1
Energía de Unión: -5.14 Kcal/mol



Sitio de Unión: SU2
Energía de Unión: -5.66 Kcal/mol

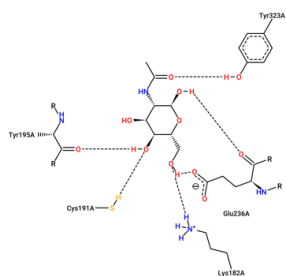


Sitio de Unión: SU3
Energía de Unión: -4.69 Kcal/mol

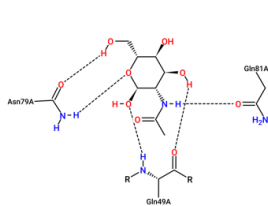


Sitio de Unión: SU4
Energía de Unión: -6.01 Kcal/mol

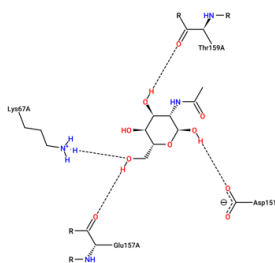
Sitios de unión entre lectina Gal/GalNAc subunidad intermedia y N – acetilgalactosamina



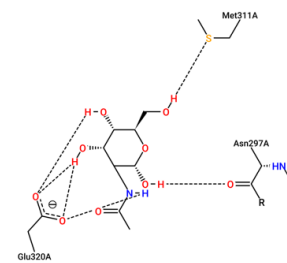
Sitio de Unión: SU1
Energía de Unión: -4.54 Kcal/mol



Sitio de Unión: SU2
Energía de Unión: -4.10 Kcal/mol



Sitio de Unión: SU3
Energía de Unión: -4.38 Kcal/mol



Sitio de Unión: SU4
Energía de Unión: -4.16 Kcal/mol

Figura 7. Sitios de acoplamiento molecular entre la subunidad Intermedia de Gal/GalNAc-ACh y Gal/GalNAc-acetilgalactosamina.

7.2 Ensayo para determinar la posible presencia de un receptor muscarínico (M3) en trofozoítos de *E. histolytica*

Previamente, se ha descrito la presencia de receptores acoplados a proteínas G presentes en la ameba (*EhGPCR*) (Brewer et al., 2013), sin embargo, se conoce poco sobre los receptores que interactúan con estas proteínas, por lo que fue de nuestro interés evaluar si dichas proteínas estaban participando en la captación de ACh mediante un receptor de tipo muscarínico o nicotínico.

Utilizamos un anti - M3 /CHRM3-Alexa Fluor 488 para detectar posibles receptores muscarínicos tipo M3, y un anti - bungarotoxina- Alexa Fluor 647 para identificar receptores de tipo nicotínico, detectamos positividad para el receptor M3 sin embargo no detectamos ninguna señal de Alexa Fluor 647.

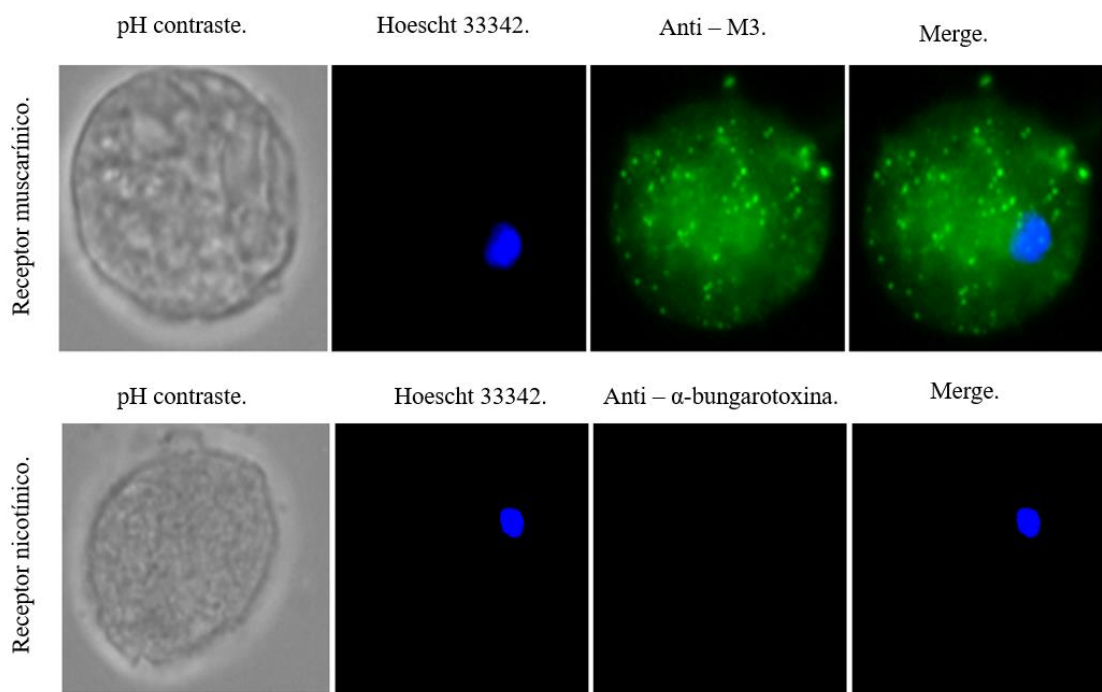


Figura 8. Receptores de tipo muscarínico y nicotínico. Trofozoítos tratados con ACh 1×10^{-8} durante una hora. Se fijaron y permeabilizaron. Se utilizaron anticuerpos anti- muscarinic acetylcholine receptor M3 (verde) (1:1000) α -bungarotoxina conjugada con Alexa Fluor 647 (rojo) (1:1000) y Hoechst 33342 (azul) para tinción nuclear. Fotografiado por microscopía de EPI fluorescencia (Axioskop 40, Zeiss) a 40x.

En este sentido realizamos una doble inmunofluorescencia para detectar los sitios donde se encuentran los receptores de tipo muscarínico M3 y sinérgicamente detectar los sitios donde se capta la ACh.

No encontramos una asociación entre los receptores muscarínicos M3 y la ACh, observamos que las señales fluorescentes se encuentran situadas de manera independiente. El análisis de imágenes mostro una baja correlación y colocalización entre los pixeles rojo y verde, por lo que no se considera una verdadera interacción entre el receptor muscarínico M3 y la ACh.

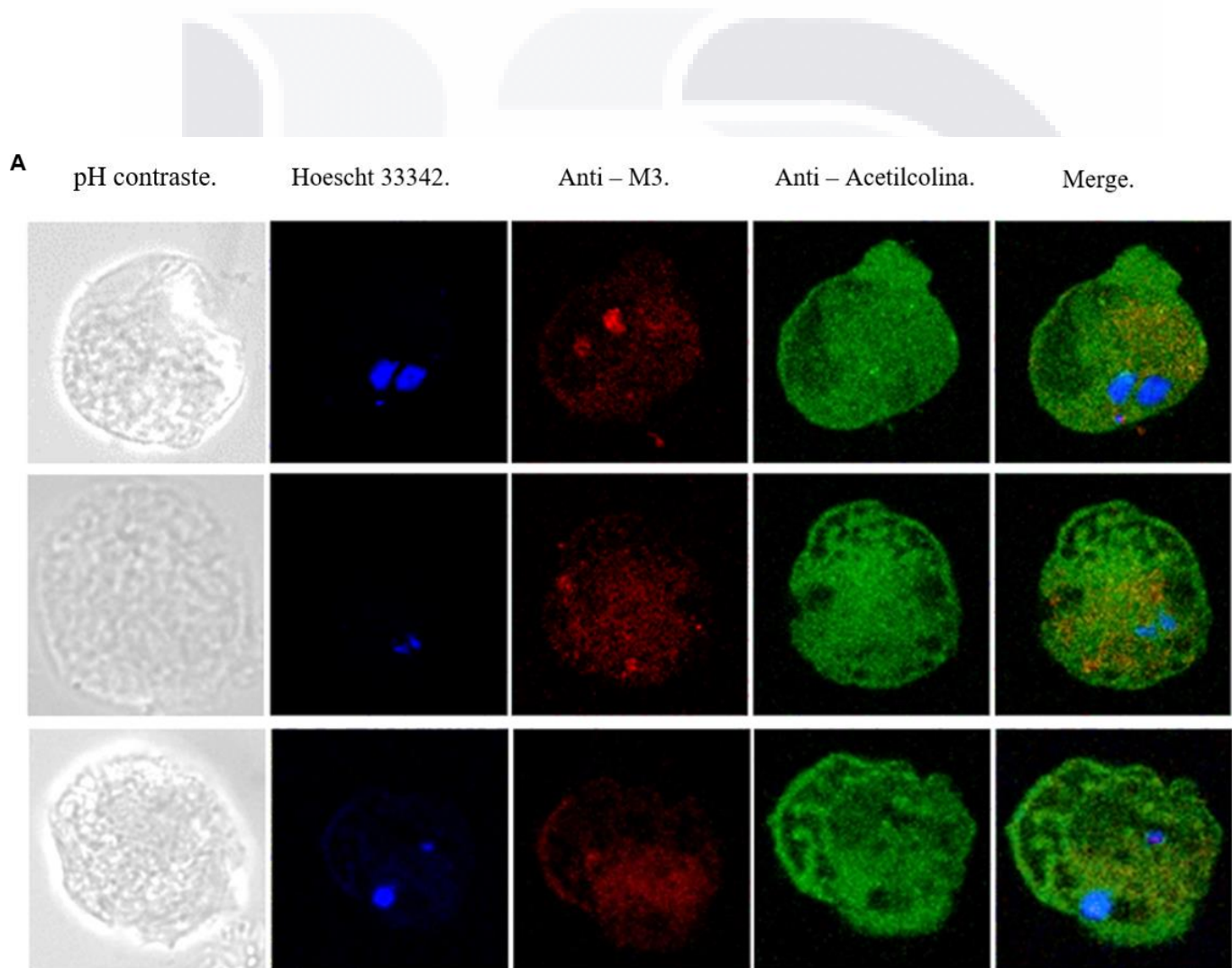


Figura 9A. Colocalización de ACh y receptor muscarínico M3. A) Trofozoítos tratados con ACh 0,01 μ M durante una hora. Se fijaron y permeabilizaron. Para la doble inmunodetección se utilizaron anticuerpos anti M3- Alexa Fluor 547 (rojo) (1:1000), anti-ACh-FITC (verde) (1:1000) Hoechst 33342 (azul) para tinción nuclear. Las imágenes se obtuvieron con microscopía confocal (40X).

B

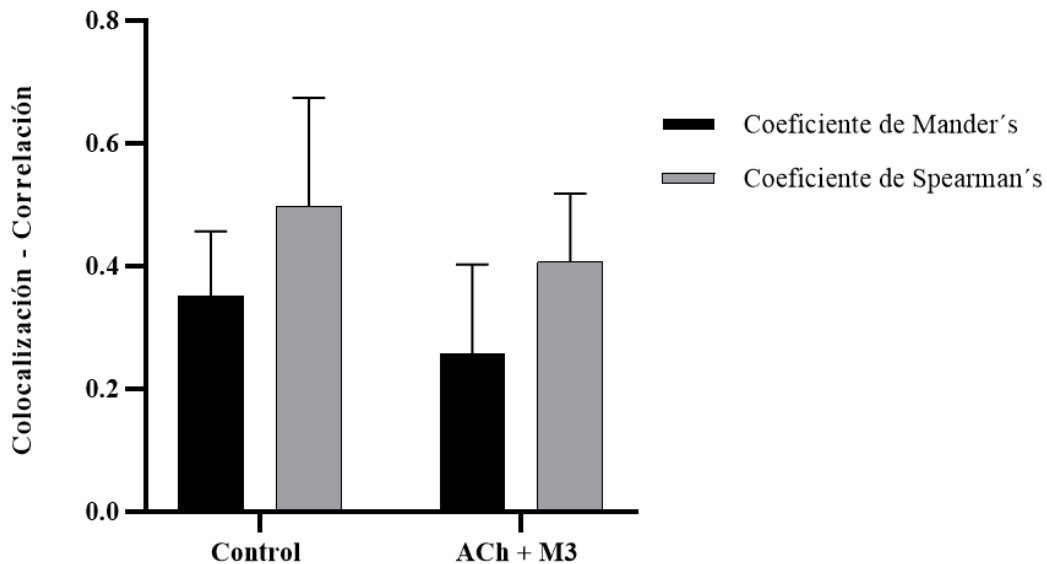


Figura 9 B) Colocalización entre ACh y M3 cuantificada y comparada utilizando los coeficientes de correlación de Pearson y Mander (considerando como coeficientes R significativos los valores por encima del umbral de 0,6). Los datos corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos independientes (n = 5). El análisis estadístico se realizó con el método ANOVA de una vía y postest de Tukey, donde se consideraron significativos los valores de $***p < 0,001$.

7.3 La ACh estimula la expresión de GTPasas en trofozoítos de *E. histolytica*.

Considerando que nuestros resultados sugieren que la lectina Gal/GalNAc pudiera estar funcionando como un sitio de unión para la ACh en trofozoítos de *E. histolytica* fue de nuestro interés indagar posibles vías de señalización activadas tras la exposición a ACh, por lo que evaluamos la expresión relativa de los genes que codifican para Ras 5 y Rab 7 pequeñas GTPasas cruciales en la activación de vías de señalización que promueven el reacomodo del citoesqueleto y trafico vesicular (Loftus, Anderson, Davies, Cecilia, et al., 2005; Verma et al., 2020)

Los resultados muestran que la expresión de Ras 5 y Rab 7 incrementan significativamente después de 1 hora de exposición a ACh 0,01 μ M en comparación con trofozoítos que no recibieron ningún tratamiento, mientras que en trofozoítos donde la Gal/GalNAc fue bloqueada uniéndola a N-acetilgalactosamina y estimulados con ACh 0,01 μ M, se observó

que la expresión relativa de Rab 7 se mantuvo en concentraciones basales, por el contrario, la expresión de Ras 5 aumento notablemente.

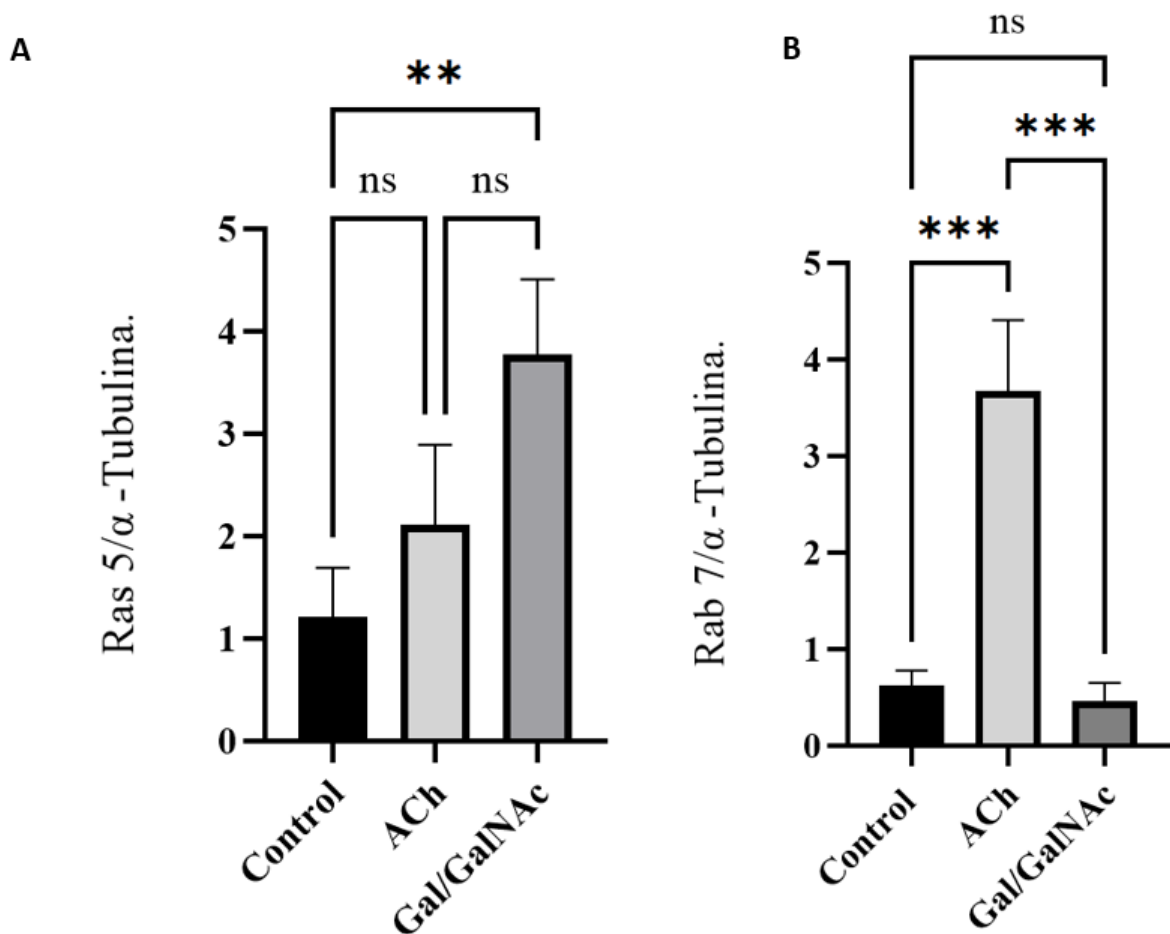


Figura 10. Expresión relativa A) RAS, B) RAB por amplificación RT-qPCR de trofozoítos tratados con acetilcolina 1×10^{-8} durante 1 hora (ACh), trofozoítos en condiciones basales (Control) Inhibición de lectina con N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc). Niveles de expresión relativos normalizados con el gen constitutivo de α -tubulina. Los datos corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos independientes (n = 5).

7.4 Análisis para la identificación de proteínas involucradas en la síntesis de ACh en trofozoítos de *E. histolytica*

En la mayoría de las células no neuronales, como las células endoteliales y epiteliales existe una liberación de acetilcolina que actúan como neurotransmisor (Campoy et al., 2016), la producción se realiza a través de un sistema colinérgico encabezado principalmente por la colina acetiltransferasa (ChAT) que une acetil – CoA con colina, posteriormente el enzima

transportador vesicular de ACh libera ACh al espacio extracelular en este sentido para ensayos de inmunofluorescencia utilizamos un anti ChAT – Alexa Fluor 549 que reconoce a la enzima acetiltransferasa y uno anti Rb pAb to VACHT - daylight 546 que reconoce al transportador vesicular de ACh (Liu et al., 2022) en trofozoítos con o sin ACh 0,01 μ M. Sin embargo, no logramos detectar positividad en trofozoítos que no fueron tratados con ACh 0.01 μ M, estos resultados sugieren que no existe la presencia un sistema colinérgico en trofozoítos de *E. histolytica* (Figura 11 y 12).

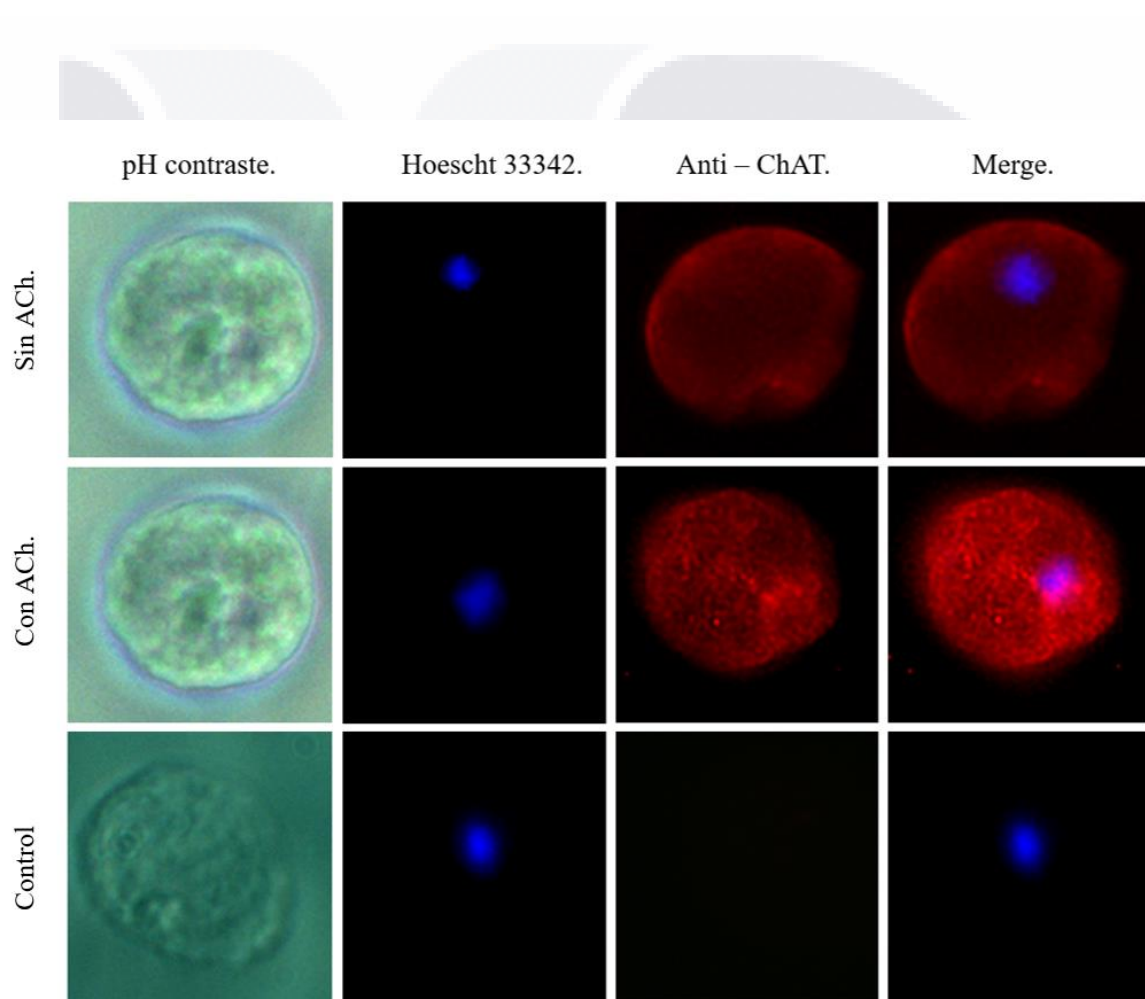


Figura 11. Detección de colina acetiltransferasa (ChAT). Trofozoítos tratados con ACh 1×10^{-8} durante una hora. Se fijaron y permeabilizaron. Se utilizaron anticuerpos m Ab – anti ChAT (1:1000; NB110-74570) y Hoechst 33342 (azul) para tinción nuclear y como anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 conjugado con IgG de cabra anti-ratón (H+L) (1:500; A-11005). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de EPI florescencia (Axioskop 40, Zeiss) a X40.

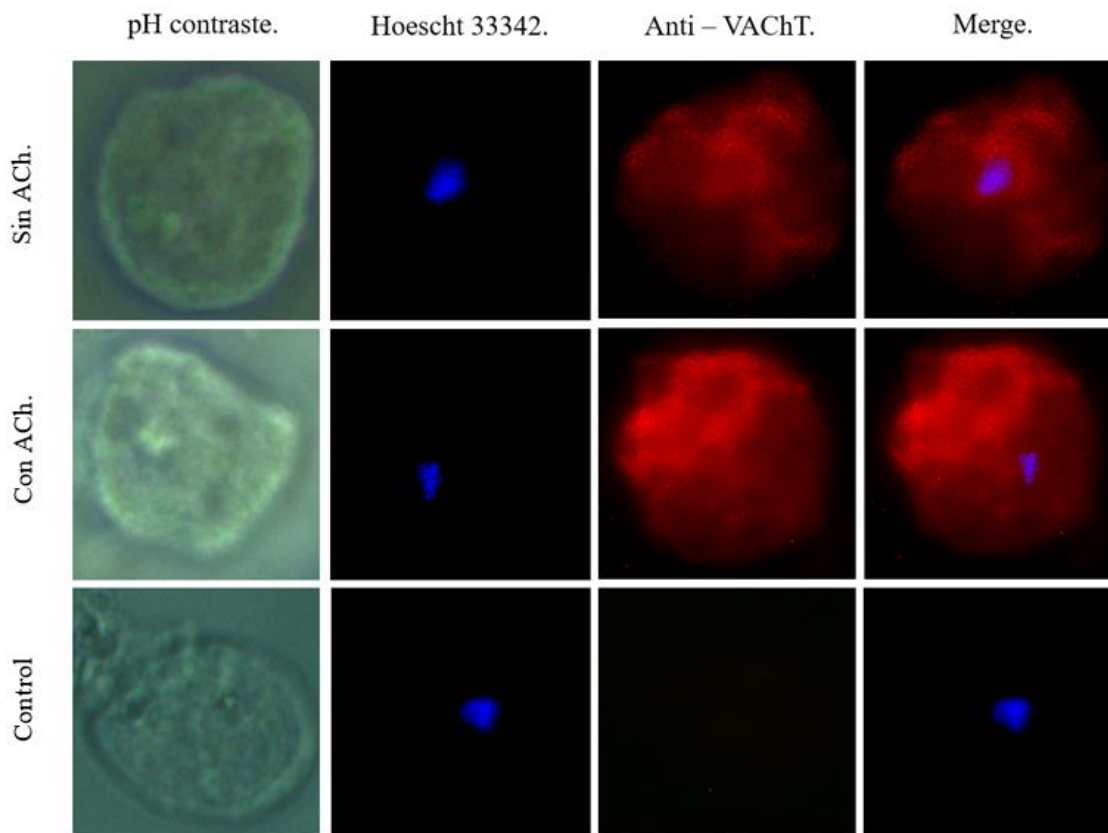
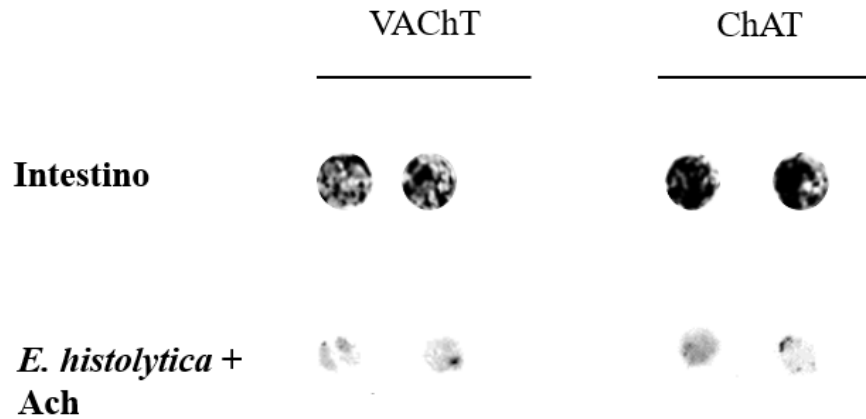


Figura 12. Detección de transportador vesicular de ACh (VACHT). Trofozoítos tratados con ACh 1×10^{-8} durante una hora. Se fijaron y permeabilizaron. Se utilizaron anticuerpos Rb pAb to VACHT (1:1000; ab235201) y Hoechst 33342 (azul) para tinción nuclear y como anticuerpo secundario daylight (546) goat anti - Mouse IgG (H+L). Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de EPI fluorescencia (Axioskop 40, Zeiss) a 40x.

Por otro lado, para tratar de validar los resultados obtenidos por fluorescencia, se realizó la técnica de Dot-blot una técnica de inmunodetección que se basa en la cuantificación de la proteína en una muestra mediante quimioluminiscencia (Ortega Ibarra et al., 2021). Para su desarrollo se utilizaron muestras de intestino grueso, y trofozoítos con y sin estímulo. Los resultados muestran que, para las muestras de intestino, el cual fue usado como control, se observa una evidente positividad, para la VACHT y ChAT. En lo que respecta a las muestras de proteínas obtenidas de los trofozoítos con y sin estímulo, observamos que, para los trofozoítos sin estímulo, el resultado fue negativo, mientras que para aquellos trofozoítos estimulados con ACh, se ve una ligera positividad para VACHT y ChAT (Figura 13).



E. histolytica

Figura 13. Detección de enzimas involucradas en la síntesis de ACh. Trofozoítos tratados con y sin ACh 1×10^{-8} durante una hora. Se fijaron y permeabilizaron. Se utilizaron anticuerpos m Ab – anti ChAT (1:1000; NB110-74570) y Rb pAb to VChT (1:1000; ab235201) las membranas fueron reveladas con Diamino-benzidine tablets (SIGMAFAST 3.3’).

Como parte de esta experimento evaluamos el efecto de un antagonista de la ACh, el bromuro de vecuronio (Catrileo et al., 2022) considerando que al bloquear en los trofozoítos el mecanismo de síntesis, el efecto sería una afectación en la viabilidad celular. Los resultados mostraron que el bromuro de vecuronio afectó la viabilidad celular durante las primeras horas, sin embargo, a medida que el tiempo fue transcurrido el crecimiento se mantuvo estable.

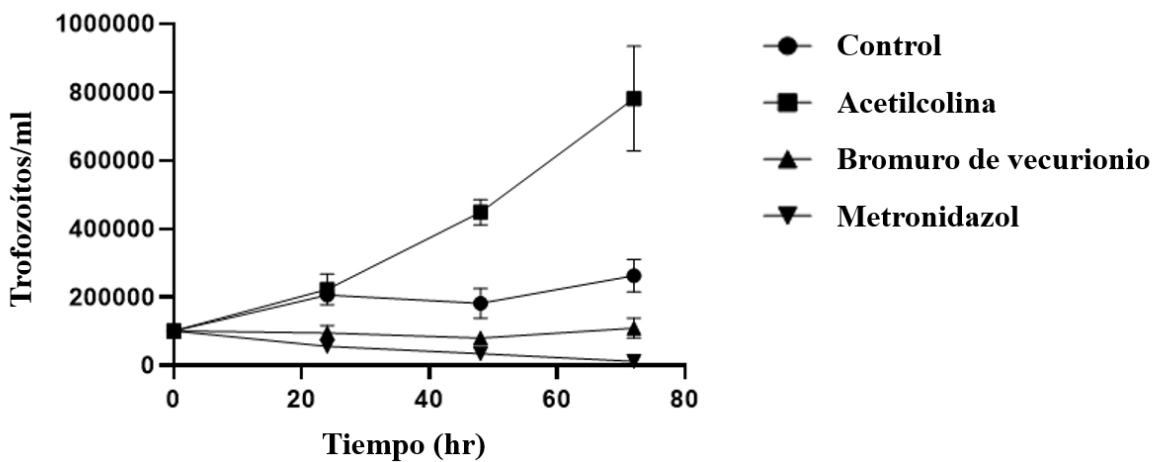


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular. Como control positivo se utilizaron trofozoítos sin ningún tratamiento, como control negativo se utilizó metronidazol. Los tratamientos a evaluar durante este ensayo fue el efecto de la ACh y bromuro de vecuronio

Capítulo 8. Discusión

Durante la invasión de *E. histolytica*, se promueve un proceso pro-inflamatorio donde se incrementa la expresión de IL-8, posteriormente se establece una respuesta celular y humoral tipo TH2 que permite la invasión del parásito, este proceso inflamatorio está regulado por el sistema nervioso autónomo parasimpático liberando ACh donde este arco-reflejo neuroinflamatorio regula la respuesta inmune manteniendo una respuesta inmune humoral. La ACh es el principal neurotransmisor del intestino grueso y es responsable del control de la motilidad y secreciones glandulares del tracto gastrointestinal (Eskandari et al., 2003) En general los neurotransmisores provocan un efecto proinflamatorio aumentando los niveles de macrófagos y neutrófilos (Elenkov, 2008). Previamente, en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la interacción entre ACh y *E. histolytica* provoca un aumento de los factores de virulencia como la adhesión, síntesis y secreción de amebaporo C, cisteína proteinasa 2 (EhCP-a2) cisteína proteinasa 5 (EhCP-a5) y un aumento significativo del absceso hepático amebiano en hámster (Medina-Rosales et al., 2021b)

En el transcurso del establecimiento de la amebiasis intestinal, el parásito debe superar la capa de mucina intestinal y esto se logra gracias a la expresión de numerosas moléculas en la membrana celular que contribuyen a la virulencia del parásito, una de ellas es la lectina amebiana Gal/GalNac. La lectina amebiana Gal/GalNac se caracterizó como el primer receptor amebiano que se une a las glicoproteínas galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNac) que se encuentran en la capa de mucina del huésped y en la superficie de las células epiteliales del colon (Petri et al., 2002), además de estar involucrado en procesos de citotoxicidad, evitando la acción del sistema del complemento, participando en el proceso de enquistamiento y produciendo la pared del quiste (Frederick & Petri, 2005).

La lectina Gal/GalNac, un heterotrímero molecular compuesto por una subunidad pesada (Hgl 170 kDa) y una ligera (Lgl 31 kDa) unidas covalentemente por una subunidad intermedia (Igl 150) (Pacheco et al., 2004) En particular la subunidad intermedia (Igl) ha sido reconocida por compartir secuencias que codifican para receptores tirosina quinasa CXXC (Cheng & Tachibana, 2001)

En este estudio, encontramos una función más para la lectina Gal/GalNac, la captación de acetilcolina exógena, lo que es coherente para otras moléculas descritas, Villalobos-

Gómez y colaboradores establecieron que la lectina amebiana Gal/GalNAc induce la activación de macrófagos y neutrófilos produciendo un efecto proinflamatorio temprano, proceso modulado por neurotransmisores como la ACh y adrenalina, esto confirma la capacidad de la lectina Gal/GalNAc para responder a neurotransmisores y adecuar las condiciones para el establecimiento de la infección amebiana (Villalobos-Gómez et al., 2018). Al respecto conviene decir que especialmente la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc funciona como receptor de fibronectina (Sengupta et al., 2009a) y que esta interacción implica la movilización de vesículas internas a la membrana citoplasmática (Hernández-Ramírez et al., 2000) realizada por GTPasas Rab 7, que inducen el reordenamiento del citoesqueleto y el transporte vesicular (Javier-Reyna et al., 2012).

Para explicar el posible mecanismo mediante el cual los trofozoítos de *E. histolytica* captan la ACh exógena provocando los cambios conformacionales y estructurales, consideramos que la subunidad intermedia compuesta por receptores similares a tirosin quinasa (Loftus, Anderson, Davies, Cecilia, et al., 2005) y un dominio péptido señal en el espacio extracelular (Jasni et al., 2022), tienen la estructura necesaria para captar acetilcolina exógena, mientras que la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc únicamente contiene un dominio transmembranal (Jasni et al., 2022), por lo que establece un flujo de información desde la matriz extracelular hasta el interior de la célula del parásito.

Lo anterior, supone que la acetilcolina exógena es captada por la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc, mientras que la vía de señalización está siendo activada por la subunidad pesada, la transducción de señales mediada por receptores de la MEC induce cambios en la reorganización del citoesqueleto, lo que aporta a la proliferación celular y tráfico vesicular (Hernández-Ramírez et al., 2000). (Nuestros resultados muestran un aumento de GTPasas Ras y Rab.)

La publicación del genoma completo de *E. histolytica* indica la presencia de genes que codifican para proteína G heterotrimérica ($G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$) y pequeñas GTPasas pertenecientes a la superfamilia Ras y Rab (Loftus, Anderson, Davies, Cecilia, et al., 2005). Además, se ha informado que la interacción entre la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc y fibronectina (FN) aumenta la expresión de Rab 7, por lo que fue de interés evaluar la expresión de GTPasas Ras 5 y Rab 7, proteínas que funcionan como mediadores moleculares

en procesos como la proliferación celular, reorganización del citoesqueleto y tráfico de membrana vesicular (Verma et al., 2018a).

Aun no es claro el mecanismo mediante el cual las proteínas G en *E. histolytica* son activadas (Picazarri et al., 2005), sin embargo, nuestros resultados sugieren la participación de proteínas G, durante la interacción de trofozoítos con ACh, ya que observamos un aumento en la expresión del gen Rab 7, esta GTPasa ha sido señalada por su importancia en la vía de transducción de señales, ya que regula procesos amebianos fundamentales para la supervivencia del parásito, como la fagocitosis y endocitosis, los cuales dependen del reacomodo del citoesqueleto y el tráfico vesicular (Saito-Nakano et al., 2021; Verma et al., 2018a). Nuestros resultados mostraron que la interacción de ACh en trofozoítos aumentó considerablemente la expresión de Rab 7.

La interacción de ACh en trofozoítos aumentó significativamente la expresión de Rab 7 y la inhibición de la lectina Gal/GalNAc con su ligando N-acetilgalactosamina afectó la expresión. Un efecto similar fue observado por (Emmanuel et al., 2015) quien reportó que los trofozoítos de *E. histolytica* al interactuar con la N-acetilgalactosamina inhibían la expresión de Rab 5, 7 y 21, así como la actividad del citoesqueleto. Por otro lado, la ACh no estimuló la expresión de Ras 5, y su aumento solo se observó cuando la lectina Gal/GalNAc interactuaba con su ligando, estos resultados indican que la ACh no participa significativamente en la activación de vías de señalización mediadas por Ras 5 (Naiyer et al., 2019). Este ensayo *in vitro* puede parecerse a la adhesión que se produce durante la interacción huésped-parásito, lo que provoca la sobreexpresión de Ras 5 GTPasas (Naiyer et al., 2019), esta proteína controla la proliferación celular, el metabolismo y la supervivencia celular. Además, la lectina Gal/GalNAc, luego de unirse a las células epiteliales del huésped, activa cascadas de señalización en el parásito, comenzando con la fosforilación de GDP a GTP (Ikawa et al., 1980); posteriormente activan cinasas como MEK-1, ERK-MAPK y p38; estas citocinas inducen la expresión de la ruta mitogénica, lo que conduce a una mayor proliferación y diferenciación celular (Ikawa et al., 1980).

Por otro lado, observamos que la expresión del gen Ras 5 aumentó en trofozoítos que fueron interactuados con ACh, sin embargo los resultados muestran que la estimulación de la lectina GalGal/NAc, es decir, al ser unida con su ligando N-acetilgalactosamina aumenta aún más

la expresión de este gen. Este ensayo *in vitro* es semejante a la adhesión que ocurre durante la interacción huésped-parásito, lo que provoca una sobre expresión de GTPasas Ras 5, esta proteína controla la proliferación celular (Verma et al., 2018b) lo que concuerda con informes anteriores donde se observa un incremento en la proliferación de trofozoítos después de ser estimulados con ACh (Medina-Rosales et al., 2021a).

En el presente trabajo, la participación de la lectina Gal/GalNAc en la captación de ACh exógena, pudiera estar activando esta vía de señalización ya que los niveles de Ras 5 y Rab 7 incrementaron, lo que finalmente condujo a un mayor tráfico vesicular, provocando un aumento en la secreción de amebaporo C, cisteína proteinasa y mayor adhesión a las células epiteliales del huésped (Medina-Rosales et al., 2021a).

La sobreexpresión de Ras 5 y Rab 7 propone un posible mecanismo molecular que pudiera asemejarse a lo que ocurre durante la unión entre fibronectina y trofozoítos de *E. histolytica*, lo que involucra la activación de proteínas similares a G, que conduce a la fosforilación de factores de transcripción que regulan el crecimiento y tráfico vesicular.

Por otro lado, para nuestro grupo fue también de interés indagar si en *E. histolytica*, al igual que en células eucariotas, la captación de ACh ocurre a través de receptores de tipo muscarínico y/o nicotínico, los cuales están acoplados a proteínas G.

Los receptores muscarínicos se clasifican en subtipos M1 - M5, en este trabajo, evaluamos el receptor M3, ya que este es el principal receptor para ACh (Nahorski S et al., 1997). Los resultados muestran positividad para este receptor, incluso cuando los trofozoítos no eran estimulados con ACh, sin embargo, al determinar si el receptor M3 colocalizaba con la ACh fijada en la membrana del trofozoíto, el análisis de imagen mostro una falsa superposición entre los pixeles por lo tanto la interacción no se considera una verdadera interacción entre los receptores de tipo muscarínico M3 y la ACh.

Así mismo evaluamos si *E. histolytica* además de unir ACh y aumentar sus factores de virulencia, presenta de manera constitutiva enzimas involucradas en la síntesis de ACh. Para esto, realizamos ensayos de inmunofluorescencia y Dot blot, con el fin de localizar la acetilcolinesterasa que une el acetil CoA con colina para formar ACh y del mismo modo, el

transportador vesicular de ACh, el cual libera ACh al medio (Soto & Torres, 2005) (Menéndez Méndez et al., 2018).

También exploramos la posibilidad de la de viabilidad pudiera verse afectado al bloquear la síntesis de ACh suponiendo que los trofozoítos presentaran este mecanismo molecular. Los resultados solo mostraron, una disminución pasajera durante las primeras horas, y al pasar el tiempo la viabilidad se mantuvo estable. Existe la posibilidad de que el bromuro de vecuronio afecte a la lectina Gal/GalNAc, como fue sugerido por Villalobos Gómez y colaboradores (2018), quienes observaron que la interacción del bromuro de vecuronio con la lectina Gal/GalNAc resultó en una viabilidad del 40-60% (Villalobos-Gómez et al., 2018), lo que fue corroborado por nuestros resultados.

Al respecto conviene decir que el único protozoario en el que se ha demostrado la presencia de un sistema colinérgico ha sido en la *Acanthamoeba spp.* Esto fue demostrado a través de bioinformática, en los que se hizo evidente la presencia de la enzima acetilcolinesterasa y el transportador vesicular de ACh (Baig et al., 2018). Esto contrasta con nuestros resultados, en los que se demuestra que *E. histolytica* no sintetiza ACh.

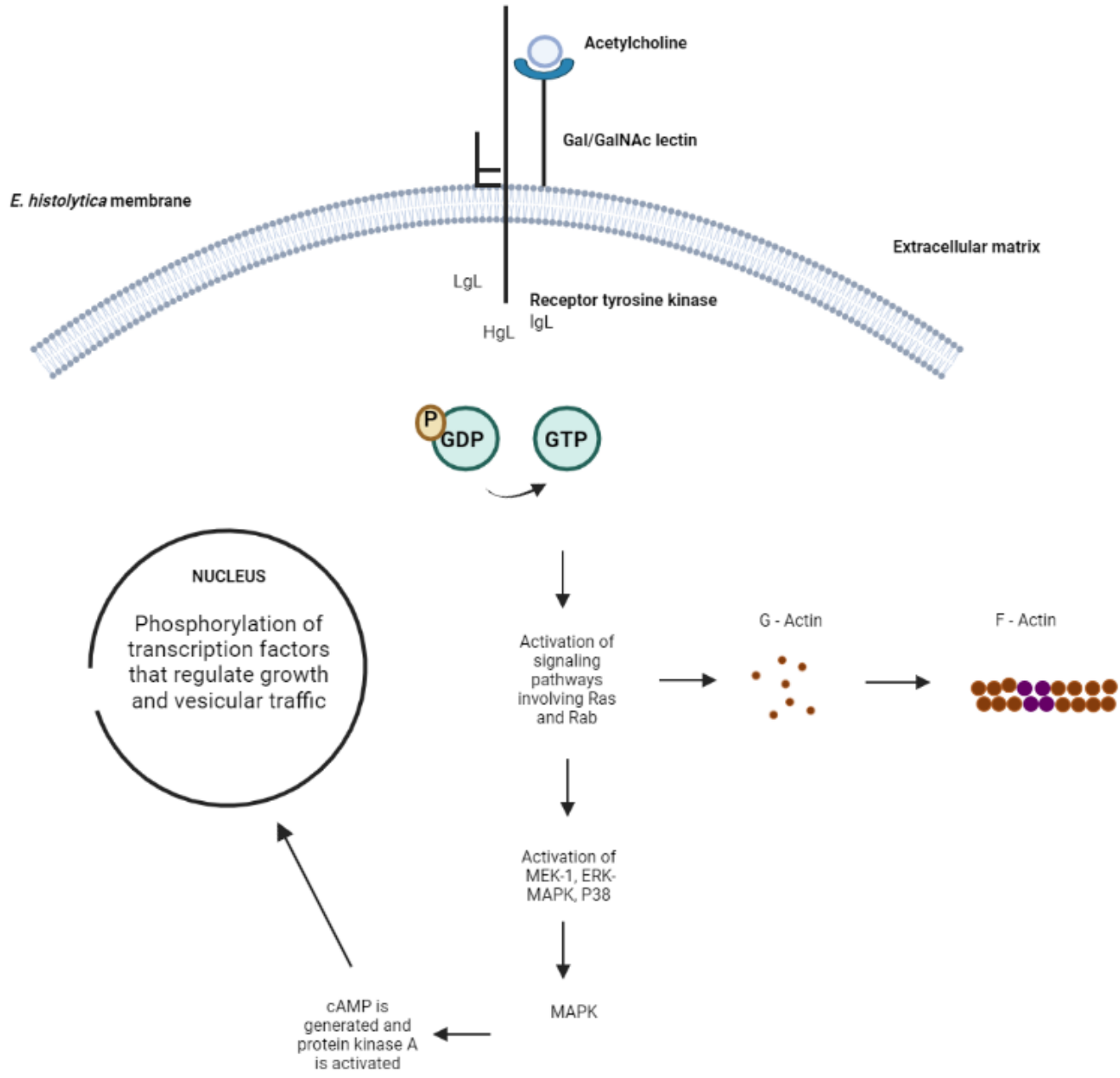


Figura 15. Diagrama que representa las posibles vías de señalización activadas durante la interacción de trofozoítos con ACh exógena captada por el receptor de la subunidad intermedia de la lectina Gal/GalNAc

Capítulo 9. Conclusiones

En resumen, tomados como un todo, nuestros resultados basados en estudios de microscopia confocal, expresión génica, y estudios bioinformáticos muestran que el sitio de unión para la ACh se localiza en la membrana de trofozoítos de *E. histolytica* y ocurre a través de la subunidad intermedia de la lectina amebiana Gal/GalNAc, y que esta unión promueve cambios conformacionales en el citoesqueleto y un mayor tráfico vesicular del trofozoito incrementando GTPasas Ras 5 y Rab 7 lo que finalmente favorece la patogenicidad amebiana.



Bibliografía

- Aretz, J., Wamhoff, E. C., Hanske, J., Heymann, D., & Rademacher, C. (2014). Computational and experimental prediction of human C-type lectin receptor druggability. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), 323. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00323/ABSTRACT>
- Baig, A. M., Rana, Z., Tariq, S., Lalani, S., & Ahmad, H. R. (2018). Traced on the Timeline: Discovery of Acetylcholine and the Components of the Human Cholinergic System in a Primitive Unicellular Eukaryote *Acanthamoeba* spp. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(3), 494–504. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00254>
- Baxt, L. A., & Singh, U. (2008). New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(5), 489. <https://doi.org/10.1097/QCO.0B013E32830CE75F>
- Beck, D. L., Boettner, D. R., Dragulev, B., Ready, K., Nozaki, T., & Petri, W. A. (2005). Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 722–732. <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.722-732.2005>
- Boettner, D. R., Huston, C. D., Sullivan, J. A., & Petri, W. A. (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infection and Immunity*, 73(6), 3422–3430. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3422-3430.2005>
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., & Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000 405:6785, 405(6785), 458–462. <https://doi.org/10.1038/35013070>
- Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(3). <https://doi.org/10.1038/EMM.2013.30>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brewer, M. T., Agbedanu, P. N., Zamanian, M., Day, T. A., & Carlson, S. A. (2013). Evidence for a bacterial lipopolysaccharide-recognizing G-protein-coupled receptor in the bacterial engulfment by *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell*, 12(11), 1433–1438. <https://doi.org/10.1128/EC.00150-13/ASSET/D54A55F3-7A11-4604-9A57-72430CAFEC72/ASSETS/GRAPHIC/ZEK9990941710005.JPEG>
- Campoy, F. J., Vidal, C. J., Muñoz-Delgado, E., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., & Nieto-Cerón, S. (2016). Cholinergic system and cell proliferation. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 257–265. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2016.04.014>
- Catrileo, D. L., Zulantay-Alfaro, I., Apt-Baruch, W., Canals-Lambarri, M., Catrileo, D. L., Zulantay-Alfaro, I., Apt-Baruch, W., & Canals-Lambarri, M. (2022). Mortalidad por parasitosis

endémicas e importadas en Chile. 1997-2020. *Revista Chilena de Infectología*, 39(2), 138–148. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182022000200138>

Cheng, X. J., Hughes, M. A., Huston, C. D., Loftus, B., Gilchrist, C. A., Lockhart, L. A., Ghosh, S., Miller-Sims, V., Mann, B. J., Petri, J., & Tachibana, H. (2001). Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infection and Immunity*, 69(9), 5892–5898. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5892-5898.2001/ASSET/33C0DCFD-5295-4D07-B06B-2C620AAAD5F5/ASSETS/GRAPHIC/II0910258004.JPEG>

Cheng, X. J., & Tachibana, H. (2001). Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunization with the 150- and 170-kDa surface antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research*, 87(2), 126–130. <https://doi.org/10.1007/S004360000323>

De La, D. L., Aguilera, C., Calleja-Castillo, J., Rangel-López, E., & Aguirre, L. (2011). *Vagotomía y respuesta inmune Molecular biology of Brain tumors View project Organized Stroke Care View project*.

Diamond, L. S., Harlow, D. R., & Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 431–432. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90144-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90144-X)

Diaz-Valencia, J. D., Pérez-Yépez, E. A., Ayala-Sumuano, J. T., Franco, E., & Meza, I. (2015a). A surface membrane protein of *Entamoeba histolytica* functions as a receptor for human chemokine IL-8: Its role in the attraction of trophozoites to inflammation sites. *International Journal for Parasitology*, 45(14), 915–923. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.007>

Diaz-Valencia, J. D., Pérez-Yépez, E. A., Ayala-Sumuano, J. T., Franco, E., & Meza, I. (2015b). A surface membrane protein of *Entamoeba histolytica* functions as a receptor for human chemokine IL-8: Its role in the attraction of trophozoites to inflammation sites. *International Journal for Parasitology*, 45(14), 915–923. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2015.07.007>

Elenkov, I. J. (2008). Neurohormonal-cytokine interactions: Implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochemistry International*, 52(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.037>

Emmanuel, M., Nakano, Y. S., Nozaki, T., & Datta, S. (2015). Small GTPase Rab21 Mediates Fibronectin Induced Actin Reorganization in *Entamoeba histolytica*: Implications in Pathogen Invasion. *PLOS Pathogens*, 11(3), e1004666. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004666>

Eskandari, F., Webster, J. I., & Sternberg, E. M. (2003). Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 2003 5:6, 5(6), 1–15. <https://doi.org/10.1186/AR1002>

Fleta Zaragozano, J., Bueno Lozano, O., & Bueno Lozano, M. (2000). Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. *Medicina Integral*, 36(3), 96–101.

- Frederick, J. R., & Petri, W. A. (2005). Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology*, *15*(12), 53R-59R. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWJ007>
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., Cho, H.-J., Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., Cho, H.-J., Lyte, M., & Cryan, J. F. (2014). The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *817*, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- García, M. A., Gutiérrez-Kobeh, L., & Vancell, R. L. (2015). *Entamoeba histolytica*: adhesins and lectins in the trophozoite surface. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(2), 2802–2815. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES20022802>
- Guillen, N. (2020). Eukaryome Impact on Human Intestine Homeostasis and Mucosal Immunology. In *Eukaryome Impact on Human Intestine Homeostasis and Mucosal Immunology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-44826-4>
- Guillen, N. (2021). Signals and signal transduction pathways in *Entamoeba histolytica* during the life cycle and when interacting with bacteria or human cells. *Molecular Microbiology*, *115*(5), 901–915. <https://doi.org/10.1111/MMI.14657>
- Hernández-Ramírez, V. I., Anaya-Ruiz, M., Rios, A., & Talamás-Rohana, P. (2000). *Entamoeba histolytica*: Tyrosine kinase activity induced by fibronectin through the b1-integrin-like molecule. *Experimental Parasitology*, *95*(2), 85–95. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4522>
- Ikawa, H., Yokoyama, J., Morikawa, Y., Hayashi, A., & Katsumata, K. (1980). A quantitative study of acetylcholine in Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, *15*(1), 48–52. [https://doi.org/10.1016/S0022-3468\(80\)80402-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3468(80)80402-7)
- Irmer, H., Tillack, M., Biller, L., Handal, G., Leippe, M., Roeder, T., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2009). Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Molecular Microbiology*, *72*(3), 658–667. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.06672.X>
- Jasni, N., Saidin, S., Kin, W. W., & Arifin, N. (2022). *Entamoeba histolytica* : Membrane and Non-Membrane Protein Structure , Function , Immune Response Interaction , and Vaccine Development.
- Javier-Reyna, R., Hernández-Ramírez, V. I., González-Robles, A., Galván-Mendoza, I., Osorio-Trujillo, C., & Talamás-Rohana, P. (2012). Rab7 and actin cytoskeleton participate during mobilization of β 1EHFNR in fibronectin-stimulated *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microscopy Research and Technique*, *75*(3), 285–293. <https://doi.org/10.1002/jemt.21056>
- Labruyère, E., Thibeaux, R., Olivo-Marin, J. C., & Guillén, N. (2019). Crosstalk between *Entamoeba histolytica* and the human intestinal tract during amoebiasis. *Parasitology*, *146*(9), 1140–1149. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002190>
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E., & Muller-Eberhard, H. J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*:

isolation, primary structure, and pore bacterial cytoplasmic membranes. *Molecular Microbiology*, 14(5), 895–904. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1994.TB01325.X>

Li, J., Cui, Z., Li, X., & Zhang, L. (2021a). Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. *Research in Veterinary Science*, 136, 174–181. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2021.02.021>

Li, J., Cui, Z., Li, X., & Zhang, L. (2021b). Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. *Research in Veterinary Science*, 136, 174–181. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2021.02.021>

Liu, J., Gao, S., Wei, L., Xiong, W., Lu, Y., Song, X., Zhang, Y., Gao, H., & Li, B. (2022). Choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter are required for metamorphosis, reproduction, and insecticide susceptibility in *Tribolium castaneum*. *Gene*, 842, 146794. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2022.146794>

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., ... Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433(7028), 865–868. <https://doi.org/10.1038/NATURE03291>

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Cecilia, U., Alsmark, M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., ... Hall, N. (2005). *The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica*. www.nature.com/nature

Maeda, S., Qu, Q., Robertson, M. J., Skiniotis, G., & Kobilka, B. K. (2019). Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science*, 364(6440), 552–557. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW5188>

Manich, M., Hernandez-Cuevas, N., Ospina-Villa, J. D., Syan, S., Marchat, L. A., Olivo-Marin, J. C., & Guillén, N. (2018). Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY), 179. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00179/BIBTEX>

Mann, B. J., Chung, C. Y., Dodson, J. M., Ashley, L. S., Braga, L. L., & Snodgrass, T. L. (1993). Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170-kilodalton subunit. *Infection and Immunity*, 61(5), 1772–1778. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.5.1772-1778.1993>

Marinets, A., Zhang, T., Guillén, N., Gounon, P., Bohle, B., Vollmann, U., Scheiner, O., Wiedermann, G., Stanley, S. L., & Duchêne, M. (1997). Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*, 186(9), 1557–1565. <https://doi.org/10.1084/jem.186.9.1557>

Medina-Rosales, M. N., Muñoz-Ortega, M. H., García-Hernández, M. H., Talamás-Rohana, P., Medina-Ramírez, I. E., Salas-Morón, L. G., Martínez-Hernández, S. L., Ávila-Blanco, M. E.,

- Medina-Rosales, B., & Ventura-Juárez, J. (2021a). Acetylcholine Upregulates Entamoeba histolytica Virulence Factors, Enhancing Parasite Pathogenicity in Experimental Liver Amebiasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 882. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.586354/BIBTEX>
- Medina-Rosales, M. N., Muñoz-Ortega, M. H., García-Hernández, M. H., Talamás-Rohana, P., Medina-Ramírez, I. E., Salas-Morón, L. G., Martínez-Hernández, S. L., Ávila-Blanco, M. E., Medina-Rosales, B., & Ventura-Juárez, J. (2021b). Acetylcholine Upregulates Entamoeba histolytica Virulence Factors, Enhancing Parasite Pathogenicity in Experimental Liver Amebiasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 1. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.586354/FULL>
- Menéndez Méndez, A., Díaz Hernández, J. I., Ortega, F., Gómez Villafuertes, R., & Gualix, J. (2018). ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. *Nº*, *84*, 16–38.
- Nagata, N., Shimbo, T., Akiyama, J., Nakashima, R., Nishimura, S., Yada, T., Watanabe, K., Oka, S., & Uemura, N. (2012). Risk Factors for Intestinal Invasive Amebiasis in Japan, 2003–2009 - Volume 18, Number 5—May 2012 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(5), 717–724. <https://doi.org/10.3201/EID1805.111275>
- Naiyer, S., Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2019). Advances in entamoeba histolytica biology through transcriptomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG), 1921. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01921/BIBTEX>
- Olivos-García, A., Saavedra, E., Ramos-Martínez, E., Nequiz, M., & Pérez-Tamayo, R. (2009). Molecular nature of virulence in Entamoeba histolytica. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *9*(6), 1033–1037. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2009.04.005>
- Ortega Ibarra, J. M., Cifuentes-Castro, V. H., Medina- Ceja, L., & Morales-Villagrán, A. (2021). Nano dot blot: An alternative technique for protein identification and quantification in a high throughput format. *Journal of Neuroscience Methods*, *358*, 109194. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2021.109194>
- Pacheco, J., Shibayama, M., Campos, R., Beck, D. L., Houpt, E., Petri, W. A., & Tsutsumi, V. (2004). In vitro and in vivo interaction of Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin with various target cells: An immunocytochemical analysis. *Parasitology International*, *53*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2003.10.005>
- Petri, W. A., Haque, R., & Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: Lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite Entamoeba histolytica. *Annual Review of Microbiology*, *56*, 39–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>
- Picazarri, K., Luna-Arias, J. P., Carrillo, E., Orozco, E., & Rodríguez, M. A. (2005). Entamoeba histolytica: Identification of EhGPCR-1, a novel putative G protein-coupled receptor that binds to EhRabB. *Experimental Parasitology*, *110*(3 SPEC. ISS.), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.02.014>

- Pulido-Ortega, J., Talamás-Rohana, P., Muñoz-Ortega, M. H., Aldaba-Muruato, L. R., Martínez-Hernández, S. L., Del Rosario Campos-Esparza, M., Cervantes-García, D., Leon-Coria, A., Moreau, F., Chadee, K., & Ventura-Juárez, J. (2019). Functional characterization of an interferon gamma receptor-like protein on entamoeba histolytica. *Infection and Immunity*, *87*(11). https://doi.org/10.1128/IAI.00540-19/SUPPL_FILE/IAI.00540-19-SM003.MP4
- Ralston, K. S. (2015). Taking a bite: Amoebic trophocytosis in *Entamoeba histolytica* and beyond. *Current Opinion in Microbiology*, *28*, 26–35. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2015.07.009>
- Rosas-Ballina, M., & Tracey, K. J. (2009). Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine*, *265*(6), 663–679. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2796.2009.02098.X>
- Saito-Nakano, Y., Wahyuni, R., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., & Nozaki, T. (2021). Rab7D small GTPase is involved in phago-, trophocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, *23*(1). <https://doi.org/10.1111/CMI.13267>
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*, *126*(1–2), 91–120. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2004.09.019>
- Sengupta, K., Hernández-Ramírez, V. I., Rosales-Encina, J. L., Mondragón, R., Garibay-Cerdenares, O. L., Flores-Robles, D., Javier-Reyna, R., Pertuz, S., & Talamás-Rohana, P. (2009a). Physical, structural, and functional properties of the β 1 integrin-like fibronectin receptor (β 1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(5), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.020>
- Sengupta, K., Hernández-Ramírez, V. I., Rosales-Encina, J. L., Mondragón, R., Garibay-Cerdenares, O. L., Flores-Robles, D., Javier-Reyna, R., Pertuz, S., & Talamás-Rohana, P. (2009b). Physical, structural, and functional properties of the β 1 integrin-like fibronectin receptor (β 1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(5), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.020>
- Stanley, S. L. (2003). Amoebiasis. *The Lancet*, *361*(9362), 1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)
- Taherian, M., Samankan, S., & Cagir, B. (2022). Amebic Colitis. *StatPearls*.
- Ventura-Juárez, J., Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, R. A., Muñoz-Fernández, L., Escario-G-Trevijano, J. A., Pérez-Serrano, J., Quintanar, J. L., Salinas, E., & Villalobos-Gómez, F. R. (2009). Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon. *Parasitology Research*, *104*(4), 821–826. <https://doi.org/10.1007/S00436-008-1262-3>
- Verma, K., Srivastava, V. K., & Datta, S. (2018a). Rab GTPases take centre stage in understanding *Entamoeba histolytica* biology. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>, *11*(5), 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>

- Verma, K., Srivastava, V. K., & Datta, S. (2018b). Rab GTPases take centre stage in understanding Entamoeba histolytica biology. *https://Doi.Org/10.1080/21541248.2018.1528840*, 11(5), 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>
- Verma, K., Srivastava, V. K., & Datta, S. (2020). Rab GTPases take centre stage in understanding Entamoeba histolytica biology. *Small GTPases*, 11(5), 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>
- Villalobos-Gómez, F. D. R., García-Lorenzana, M., Escobedo, G., Talamás-Rohana, P., Salinas-Gutiérrez, R., Hernández-Ramírez, V. I., Sánchez-Alemán, E., Campos-Esparza, M. D. R., Muñoz-Ortega, M. H., & Ventura-Juárez, J. (2018). Entamoeba histolytica L220 induces the in vitro activation of macrophages and neutrophils and is modulated by neurotransmitters. *Acta Parasitologica*, 63(2), 270–279. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0031>
- Weber, C., Blazquez, S., Marion, S., Ausseur, C., Vats, D., Krzeminski, M., Rigotherier, M. C., Maroun, R. C., Bhattacharya, A., & Guillén, N. (2008). Bioinformatics and Functional Analysis of an Entamoeba histolytica Mannosyltransferase Necessary for Parasite Complement Resistance and Hepatical Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(2), e165. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000165>
- Webster, J. I., Tonelli, L., & Sternberg, E. M. (2003). Neuroendocrine Regulation of Immunity*. *https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Immunol.20.082401.104914*, 20, 125–163. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.082401.104914>
- Wilson, I. W., Weedall, G. D., & Hall, N. (2012a). Host-Parasite interactions in Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: What have we learned from their genomes? *Parasite Immunology*, 34(2–3), 90–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01325.x>
- Wilson, I. W., Weedall, G. D., & Hall, N. (2012b). Host–Parasite interactions in Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: what have we learned from their genomes? *Parasite Immunology*, 34(2–3), 90–99. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2011.01325.X>
- Wong-Baeza, I., Alcántara-Hernández, M., Mancilla-Herrera, I., Ramírez-Saldívar, I., Arriaga-Pizano, L., Ferat-Osorio, E., López-Macías, C., & Isibasi, A. (2010). The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to entamoeba histolytica. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/254521>
- Zhang, X., Zhang, Z., Alexander, D., Bracha, R., Mirelman, D., & Stanley, S. L. (2004). 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. *Infection and Immunity*, 72(2), 678–683. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.678-683.2004>

ANEXOS

Anexo A. Medio de cultivo TYI-S33 para 1 L.

1. Pesar los siguientes reactivos:

Reactivo	Porción
Peptona	60 g
Dextrosa	20 g
Cloruro de sodio	4 g
Fosfato de potasio monobásico	1.2 g
Fosfato de potasio dibásico	2.0 g
Cisteína	2 g
Ácido ascórbico	0.4
Citrato férrico de amonio	0.0472 g

2. Aforar a 600 ml.
3. Disolver.
4. Ajustar pH entre 6.6 y 6.8 con NaOH y HCl.
5. Aforar a 1000 ml.
6. Colocar en 7ml en tubo de ensaye tapa roscada 16x100 mm marca *kimax* previamente esterilizado.
7. Esterilizar medio de cultivo.
8. Congelar a -4°C en oscuridad.

Anexo B. Inactivación de suero fetal bovino.

1. Calentar en baño maría a 55 – 57°C durante 30 minutos en agitación.
2. Colocar en tubos estériles.

Anexo C. Silanizado de cubreobjetos.

Anexo D. Paraformaldehído al 2%.

1. Calentar PBS 1X a 70 °C.
2. Agregar 2 g de p-formaldehído.
3. Agregar NaOH, hasta que se aclare la solución.
4. Ajustar pH y el volumen final a 100 mL con PBS 1X.

