

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

**Proteínas de unión a oxisterol de *Entamoeba histolytica*
y el uso de las herramientas moleculares en la promoción de la salud**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

PRESENTA

Jessica Jazmín Gutiérrez Gallardo

Directora de la Tesis

Dra. Silvia Castellanos Castro

Codirector

Dr. Israel Felipe Canela Pérez

Ciudad de México febrero, 2025.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO

Presidenta: Dra. Laura Itzel Quintas Granados

Secretaria: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Vocal: Mtro. Edgar del Carmen Sierra Palacios

Directora

Dra. Silvia Castellanos Castro

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Codirector

Dr. Israel Felipe Canela Pérez

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

LECTORES DE TESIS

Dra. Laura Itzel Quintas Granados
Biología Humana, Plantel Cuauhtepc, UACM

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Posgrado en Ciencias Genómicas, Plantel del valle, UACM

Mtro. Edgar del Carmen Sierra Palacios
Biología, Plantel Casa Libertad, UACM

Este trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de biología y química del plantel Casa Libertad, UACM, en colaboración con el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN); con el apoyo de los proyectos POA-UACM del colegio de Ciencias y Humanidades con números de registro CCH-RGI-024-071 y CCH-RGI-019-027, además con el apoyo de la beca para el desarrollo de tesis por parte de la Coordinación de Servicios Estudiantiles, UACM.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Silvia Castellanos Castro, por su paciencia, su gran apoyo, a mi codirector el Dr. Israel Felipe Canela Pérez, por su apoyo y dedicación.

A mis lectores Mtro. Edgar del Carmen Sierra Palacios, Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga y la Dra. Laura Itzel Quintas Granados. También, agradezco a la Dra. Patricia Areli Cuellar Silva adscrita al Conachyt-Sechiti por su valiosa asesoría con el manejo de imágenes y la creación del diagrama de Ven. A la Dra. Jeni Bolaños Rebolledo por el diseño de oligonucleótidos para la RT-PCR.

Al equipo del laboratorio de biología y química del plantel Casa Libertad. También quiero agradecer al equipo administrativo de Casa Libertad por todas las gestiones que permitieron que yo pudiera realizar y concluir mi tesis.

Quiero agradecer a mi hijo Oscar Flores Gutiérrez por su paciencia, su comprensión, su gran apoyo para poder realizar y concluir este sueño que empezó hace años, a Arturo Flores Heredia por su apoyo, motivación para empezar el camino de retomar mis estudios y poder concluirlos.

A Concepción Malacara Márquez e Isabel Fabián Sánchez por buscarme y motivarme para que pudiera regresar a la universidad, además durante la carrera junto con Miguel Ángel Acevedo Rodríguez me apoyaron cuando más lo necesitaba, gracias infinitas; a Eduardo de la Rosa Guzmán por apoyarme para continuar y regresar a la universidad y retomar mis estudios.

Gracias a todos mis amigos que de una u otra forma me dieron ánimos para continuar y concluir mis estudios.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 AMEBIASIS	5
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	6
1.3 <i>Entamoeba histolytica</i>	8
1.4 QUISTE	8
1.5 TROFOZOÍTO	9
1.6 CICLO DE VIDA DE <i>E. histolytica</i>	10
1.7 TIPOS DE AMEBIASIS	11
a) AMEBIASIS INTRALUMINAL	11
b) COLITIS AMEBIANA	12
c) AMEBIASIS EXTRAINTestinal	12
1.8 FACTORES DE PATOGENICIDAD DE <i>E. histolytica</i>	14
1.9 DIAGNÓSTICO DE LA AMEBIASIS	22
1.10 TRATAMIENTO	23
1.11 PREVENCIÓN	24
II. MARCO TEÓRICO	25
2.1 LÍPIDOS DE <i>E. histolytica</i>	25
2.2 COLESTEROL EN <i>E. histolytica</i>	27
2.3 LAS PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS EN <i>E. histolytica</i>	28
2.4 PROTEÍNAS ORPs Y GENERALIDADES EN EUKARIONTES	31
III JUSTIFICACIÓN	33
IV HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVO GENERAL	34
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
VIII. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	37
8.1 IDENTIFICACIÓN DE PARÁLOGOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES	37
8.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ORTÓLOGOS	37
8.1.2 ALINEAMIENTO DE ORTÓLOGOS	37
8.1.3 CLADOGAMAS DE PROTEÍNAS EhORPs	38
8.1.4 PORCENTAJE DE SIMILITUD ENTRE ORTÓLOGOS	38
8.1.5 IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS Y MOTIVOS CONSERVADOS	38
8.1.6 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA 3D y DOCKING MOLECULAR	38
8.1.7 PREDICCIÓN DE INTERACTOMAS	39
8.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES	39
8.2.1 CULTIVO CELULAR DE TROFOZOÍTOS	39
8.2.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	40
8.2.3 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	40

8.2.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE RT-PCR	41
IX. RESULTADOS <i>in silico</i>	42
9.1 IDENTIFICACIÓN DE PARÁLOGOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES	42
9.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ORTÓLOGOS	47
9.1.2 ALINEAMIENTO DE ORTÓLOGOS	47
9.1.3 CLADOGRAMAS DE PROTEÍNAS EhORPs	60
9.1.4 PORCENTAJE DE SIMILITUD ENTRE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS	61
9.1.5 DOMINIOS DE UNIÓN A OXISTEROL DE LAS EhORPs	62
9.1.6 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS EhORPs	63
9.1.7 DOCKING MOLECULAR	64
9.1.8 INTERACTOMAS DE LAS PROTEÍNAS EhORPs	66
X. RESULTADOS EXPERIMENTALES	67
10.1 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE ARN TOTAL DE <i>E. histolytica</i> OBTENIDO BAJO CONDICIONES DE CULTIVO BASALES	68
10.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE RT-PCR	69
XI DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
XII. EL USO DE LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES EN LA PROMOCIÓN DE LA SALUD EN EL MODELO DE AMEBIASIS	75
XIII. CONCLUSIÓN	83
XIV. PERSPECTIVAS	84
XV. REFERENCIAS	85
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	93
ANEXO: PRESENTACIÓN EN CONGRESO INTERNACIONAL	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de diagnóstico de la amebiasis	22
Tabla 2. Proteínas de unión al mono fosfato de fosfatidilinositol	26
Tabla 3. Condiciones estandarizadas para la amplificación de ARNm de <i>ehorps</i>	41
Tabla 4. Genes codificantes para proteínas EhORPs	42
Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de las proteínas EhORPs	46
Tabla 6. Ortólogos para EhORPs	47
Tabla 7. Características fisicoquímicas, dominios y números de acceso de las proteínas EhORPs	62
Tabla 8. Diseño de los oligonucleótidos para RT-PCR	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Quiste de <i>E. histolytica</i>	9
Figura 2. Trofozoíto de <i>E. histolytica</i>	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	11
Figura 4. Proteínas que intervienen en la virulencia de <i>E. histolytica</i>	14
Figura 5. Fagocitosis de <i>E. histolytica</i>	18
Figura 6. Proceso de trogocitosis	19
Figura 7. Organización y clasificación de dominios de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) de humanos, levaduras y <i>E. histolytica</i>	30
Figura 8. Estrategia experimental <i>in silico</i>	35
Figura 9. Estrategia experimental	36
Figura 10. Las EhORPs se expresan de manera diferencial según las condiciones de cultivo en <i>E. histolytica</i>	45
Figura 11. Alineamiento de las secuencias ortólogas para EhORP1	50
Figura 12. Alineamiento de las secuencias ortólogas para EhORP2	55
Figura 13. Alineamiento de secuencias ortólogas para EhORP3	57
Figura 14. Alineamiento de las secuencias ortólogas para EhORP4	59
Figura 15: Cladogramas de las proteínas EhORPs	60
Figura 16. Porcentaje de identidad entre proteínas ortólogas de unión a oxisterol.61	
Figura 17. Estructura de las proteínas putativas ORPs de <i>E. histolytica</i>	63
Figura 18: Estructuras 3D de las proteínas EhORPs	64
Figura 19: Docking Molecular de las EhORPs con sus ligandos lipídicos	65
Figura 20. Interactomas de proteínas EhORPs	66
Figura 21: Corrimiento electroforético de ácidos nucleicos	68
Figura 22: Análisis de la expresión de los genes <i>ehorps</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura 1S. Datos fisicoquímicos de la unión del PI4P a las EhORPs obtenidos mediante el docking molecular	93
Figura 2S. Datos fisicoquímicos de la unión del colesterol a las EhORPs obtenidos mediante el docking molecular	93

ABREVIATURAS:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	absceso hepático amebiano
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNasas	Hidrolasa de ARN
ARN	Ácido ribonucleico
ARN Helicasa	Ácido ribonucleico Helicasa
ARNseq	Ácido ribonucleico de secuencia
ARN total	Ácido ribonucleico total
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EhCPAD	Complejo de adhesina y cisteína proteasa de <i>E. histolytica</i>
EhORPs	Proteínas de unión a oxisterol de <i>E. histolytica</i>
g	Gramos
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
InMeGen	Instituto Nacional de Medicina Genómica
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
Kcal/mol	Kilocaloría por mol
LTPs	Proteínas de Transferencia de Lípidos
L220	Lectina 220
min	Minutos
ng/μL	Nano gramos por microlitros
NIAID	Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetro
ORD	Dominio de unión a oxisterol
ORPs	Proteínas de unión a oxisterol
OSBP	Proteína relacionada con las proteínas de unión a oxisterol
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Fosfatidilinositol
PIPs	Fosfoinositidos
PI4P	Fosfatidilinositol 4 fosfato
RT	Transcripción reversa
SAPLIP	Proteína tipo saposina
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SREHP	Proteína rica en serina de <i>E. histolytica</i>
TA	Temperatura ambiente
TM	Dominio transmembranal
VAMP	Proteínas de membrana asociadas a vesículas
μL	mililitro
°C	Grados centígrados

RESUMEN

Las herramientas moleculares son un conjunto de técnicas que permiten estudiar los mecanismos celulares y genéticos a nivel molecular, han sido fundamentales en el área de la salud. Estas tecnologías permiten analizar metabolitos, ácidos nucleicos y proteínas y con su desarrollo, hemos ampliado nuestra comprensión de los procesos biológicos y las enfermedades, tanto infecciosas como no infecciosas, transformando el diagnóstico, la prevención y el tratamiento. Además de su impacto en la salud pública, el dominio de estas tecnologías es esencial en la formación de profesionales para abordar los desafíos sanitarios con un enfoque interdisciplinario y tecnológico, fortaleciendo su capacidad para responder con mayor precisión a problemáticas de salud a nivel regional e internacional.

En esta tesis, nos enfocamos en el uso de las herramientas moleculares para abordar la amebiasis, una enfermedad parasitaria presente en todo el mundo, endémica en los países en desarrollo como México y es causada por *Entamoeba histolytica*. Debido al alto número de contagios a nivel global, la falta de vacuna para esta infección, la resistencia de las amebas frente a los antiparasitarios y los efectos secundarios que generan estos medicamentos, es importante buscar nuevas alternativas diagnósticas y terapéuticas, así como estrategias de prevención.

El ciclo de vida del parásito consta de las etapas de quiste infeccioso y trofozoíto proliferativo, el metabolismo de los lípidos desempeñan un papel crucial en la biología del parásito, pues no los produce completamente y los necesita tomar del medio del cultivo y del cuerpo humano. Sin embargo, los mecanismos exactos que regulan el transporte y la regulación de lípidos en la patogénesis y en la relación del hospedero con la ameba aún son desconocidos. En el genoma de *E. histolytica*, existen cuatro genes que codifican para proteínas putativas de unión a oxisterol (EhORPs).

Nosotros realizamos un análisis bioinformático de para analizar su estructura, predecir su papel en las funciones celulares y capacidad de unión a los lípidos. Las cuatro EhORPs varían en longitud y puntos isoeléctricos, presentan los dominios conservados y muestran variabilidad estructural. Dos de ellas son proteínas citoplasmáticas y dos se anclan a la membrana. Estas moléculas se clasifican en dos grupos ortólogos con otros protozoarios y todos las EhORPs mostraron una baja identidad de aminoácidos con sus homólogos humanos y de levadura, lo que indica una divergencia evolutiva que facilita su uso como blancos terapéuticos seguros.

Nuestros modelos de acoplamiento molecular sugieren que las EhORPs unen colesterol y PI4P. Al analizar la expresión de estos genes en diferentes condiciones de cultivo, así como y el enriquecimiento funcional de los términos de ontología genética asociados con las proteínas que interactúan con las EhORPs, encontramos que estas moléculas interaccionan con moléculas que unen e hidrolizan el ATP y que participan en varios procesos vitales para el parásito, tales como la regulación durante condiciones de estrés por temperatura, oxidación y privación de suero, también en el transporte vesicular, invasión de colon, la adaptación a las condiciones del intestino y finalmente, las transiciones de etapas de desarrollo: el enquistamiento y desenquistamiento. Con nuestros resultados, podemos sugerir que estas proteínas pueden ser potenciales blancos farmacéuticos y vacunales en contra de la amebiasis.

I. INTRODUCCIÓN

En 1945, Henry Sigerist fue pionero en diferenciar la salud de la enfermedad, proponiendo que la medicina debía enfocarse en cuatro tareas esenciales: promover la salud, prevenir la enfermedad, tratar al enfermo y rehabilitar. Según Sigerist, la promoción de la salud implicaba garantizar condiciones de vida dignas, acceso a educación, trabajo en buenas condiciones, ejercicio físico, descanso y recreación (Esteban, 1998). En los años setenta, la salud pública experimentó una transformación significativa, centrada en la prevención y en estrategias individuales que cuestionaban los modelos médicos tradicionales. Uno de los aportes más destacados fue el de Blum, quien propuso entender la promoción de la salud como un esfuerzo intersectorial fundamentado en la participación y el desarrollo comunitario (Carmona et al., 2005).

Los cambios en el poder político de muchas naciones, el rol de los países no alineados, el reconocimiento de la pobreza como una causa clave de desigualdad en salud, y la crisis de los sistemas de salud llevaron a repensar las políticas públicas internacionales. Esto resultó en un cambio de un enfoque centrado solo en tratamientos médicos hacia un modelo más amplio enfocado en la promoción de la salud. En este escenario, las herramientas moleculares han transformado el campo de la salud al proporcionar métodos precisos y personalizados para comprender y mejorar el bienestar humano. Estas técnicas, que analizan moléculas como los ácidos nucleicos y los metabolitos, permiten investigar a fondo los procesos celulares y genéticos, lo que abre nuevas oportunidades para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades de manera más efectiva y con menos efectos secundarios (Lago-Sampedro and García-Escobar 2022).

Además, en la investigación de terapias y medicamentos, estas herramientas son indispensables para comprender la relación huésped-patógeno, las susceptibilidades a las enfermedades, la herencia de enfermedades

genéticas y desarrollar tratamientos más efectivos. También, las técnicas moleculares son útiles para analizar el ambiente (microorganismos, tóxicos, cultivos de alimentos, etc.) y su relación con la salud. Desde la perspectiva de la promoción de la salud, estas tecnologías contribuyen al bienestar colectivo, alineándose con el concepto de la Carta de Ottawa, que define la promoción de la salud como el proceso de proporcionar a las personas los medios para mejorar su bienestar físico, mental y social, permitiéndoles ejercer mayor control sobre su entorno y su vida (OMS, 2001). Este enfoque positivo resalta tanto los recursos sociales y personales como las aptitudes físicas, enfocándose en la salud como parte integral de la vida cotidiana. Para lograr la equidad en salud, es fundamental redistribuir poder y recursos, atender las necesidades específicas de las poblaciones, fortalecer sus capacidades y empoderarlas. La promoción de la salud, además de ser participativa, es intersectorial, contextual y puede operar en diversos niveles.

Las herramientas moleculares en México se usan en diversas instituciones de salud, particularmente en CDMX se brinda atención con base en las herramientas moleculares es el Instituto Nacional de Medicina Genómica (Inmegen) el cuál brinda servicios de alta especialidad sobre genética (enfermedades no infecciosas) como enfermedades cardiovasculares, metabólicas, psiquiátricas, neurodegenerativas y cáncer, como: pruebas de paternidad y parentesco, cáncer hereditario, análisis de mutaciones somáticas (tumores sólidos y hematológicos), trasplantes y análisis de enfermedades monogénicas (Secretaría de Salud, 2023).

También está el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), dependiente de la Secretaría de Salud de México y se encarga del diagnóstico, control, referencia, investigación y desarrollo tecnológico para la vigilancia de enfermedades epidemiológicas. Este ofrece los servicios de recepción de muestras, venta de insumos, cursos de capacitación y evaluación de pruebas diagnósticas (Secretaría de Salud, 2025). Se debe

presentar una solicitud, firma del médico solicitante y tipo de estudio requerido, resumen de historia clínica, el formato para el envío de muestras biológicas y cubrir el costo del estudio (Secretaría de Salud, 2025).

En esta tesis, utilizamos algunas herramientas moleculares para abordar la investigación de la amebiasis, una enfermedad gastrointestinal endémica en México y varios países del mundo.

1.1 AMEBIASIS

La disentería amebiana es una enfermedad parasitaria que se desarrolla en el ser humano y es causada por un protozooario que pertenece al género *Entamoeba*, de la especie *histolytica* (Saavedra 2017). Dicha enfermedad es más frecuente en los países en desarrollo, así como en los viajeros e inmigrantes que visitan los países endémicos. Esta infección puede ser asintomática, pero en algunas ocasiones puede desarrollar una infección grave como colitis amebiana y absceso hepático amebiano. México es considerado un país endémico debido a la alta prevalencia de esta infección en la población (Maestro, 2014).

Entamoeba histolytica se clasifica como un patógeno de biodefensa prioritario de categoría B por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID), esto es debido a su baja dosis infecciosa, resistencia al cloro y estabilidad ambiental. Estas propiedades pueden representar una amenaza social pues el parásito es de fácil diseminación a través de alimentos y agua contaminados con quistes y también puede existir una exposición a la materia fecal a través de insectos como moscas y cucarachas (Shirley *et al.*, 2018). La transmisión es fecal-oral y, además, se sabe que otra forma de transmisión de la amebiasis es con el contacto directo de persona a persona durante las prácticas sexuales de tipo oral-anal (Zhou 2013). Los hombres homosexuales, bisexuales y otros grupos de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) tienen en particular un mayor riesgo de adquirir

amebiasis, como lo destacan países de Asia, Europa, América del Norte y Australia; por ejemplo, en Taiwán los HSH infectados por el virus del VIH tenían 15 veces más probabilidades de tener infección con *E. histolytica* que otros grupos de riesgo, además en las provincias chinas de Beijing y Tianjin, la seroprevalencia de amebiasis alcanzó hasta el 41% entre los HSH (Swaminathan 2009).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

En 1903 Schaudinn fue el primero en describir y discriminar las especies patógenas *E. histolytica* de *E. coli* (no patógena), llamando a la primera, ameba *histolytica* por ser productora de la lisis tisular (Medina 2012). A nivel mundial, la amebiasis es la tercera enfermedad parasitaria que causan la muerte en el mundo, después de la malaria y la esquistosomiasis (enfermedad aguda causada por gusanos parásitos) (Candela Sentí, E., 2024). Aproximadamente del 7 al 10% de la población mundial está infectada por alguna de las tres especies infecciosas para el ser humano: *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii* (Royer 2012; Chacín-Bonilla, 2010). La prevalencia más alta es en regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur, Asia y África, Bangladesh, India, Brasil, Colombia, México y China son los países más afectados (Lozano *et al*, 2012). Se estima que hasta 50 millones de personas se ven afectadas por *E. histolytica* provocando más de 100,000 muertes al año (Kantor 2018). Existe un gran sistema internacional de vigilancia y monitoreo, con el que se ha demostrado que *E. histolytica* es el tercer patógeno aislado con mayor frecuencia entre los viajeros que regresan de países endémicos con enfermedad gastrointestinal infecciosa (Swaminathan 2009). La amebiasis representa el 12.5% de todos los casos confirmados, con una incidencia estimada de 14 de cada 1,000 viajeros que regresan a sus países de origen, Oriente Medio y América del Sur se consideran endémicos (Shirley 2019). También, la amebiasis se produce entre los inmigrantes, homosexuales o prisioneros (Ghenghesh 2016). Se realizaron exhaustivos exámenes clínicos que

demonstraron la prevalencia de *E. histolytica* en varios países, particularmente en Sudáfrica con una tasa de prevalencia del 12.4 %. (Samie 2006). La amibiasis intestinal por *E. histolytica* se estimó con una prevalencia del 58.3% en Kenia en 2012 (Kipyegen 2012), del 54.5% en Ruanda en 2020 (Emile 2013) y del 19.93% en Uganda en 2012 (Ekou 2012).

En el boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, hasta la semana epidemiológica 52 del 2024, Chiapas es el estado con un mayor número de casos acumulados de amebiasis intestinal, con un total de 8,276 hombres y 10,843 mujeres, mientras que CDMX tiene 1,149 hombres y 1,436 mujeres con un acumulado total de 2,937, incluyendo el año 2023. Por otro lado, Querétaro es el estado con menor número de casos, con 120 hombres y 200 mujeres (Boletín Epidemiológico Nacional, SINAVE, 2024).

La amebiasis intestinal puede complicarse con la migración de los parásitos hacia el hígado generando el absceso hepático amebiano. (AHA) que tiene una incidencia mundial de 50 millones de infecciones anuales (Petri, W.A 1999). En países en vías de desarrollo como Vietnam, donde es endémica la infección por *E. histolytica*, la incidencia anual de AHA es de 21 casos por 100,000 habitantes, mientras que en los países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica es infrecuente y habitualmente se detecta en inmigrantes de países en desarrollo o viajeros de esta procedencia (Haque 2003). Algunas complicaciones graves del AHA registradas en los pacientes con diagnóstico tardío fueron la trombosis y la embolia (Touré 2012). Se sabe que en África algunos factores de riesgo para contraer enfermedades son: la falta de higiene personal, el uso de agua estancada, la falta de un sistema sanitario de eliminación, el uso de heces humanas en la agricultura y la reproducción intensiva de moscas (Norhayati *et al.*, 2003). Estos factores de riesgo aplican a varios países en desarrollo.

En México existen reportes de hasta un 8.4% de amebiasis extra intestinal (Maestro, 2014; Tangpukdee 2009; Torres-Guerrero 2017). Con base en los datos del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de México en los últimos diez años, el número de casos de absceso hepático amebiano ha aumentado hasta 3 veces y es más frecuente en hombres en los estados de Jalisco y Sinaloa (SINAVE, 2024).

1.3. *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un parásito protozoario entérico que puede vivir en el intestino grueso y/o invadir la mucosa intestinal, provocando lesiones y diseminándose a diferentes órganos y es capaz de producir enfermedad en el ser humano (Botero, 2012). El ciclo de vida de la *E. histolytica* es simple y consta de dos estadios, el quiste y el trofozoíto.

1.4 QUISTE

Es la forma infectiva y de resistencia del parásito, de metabolismo latente y responsable de la transmisión de la enfermedad; tiene una estructura esférica u ovoide. Puede presentar de 1 a 4 núcleos y una capa gruesa de quitina, la cual funciona como una capa protectora, así resiste a las condiciones extremas del ambiente por tiempos prolongados (Saavedra 2017).

Mide de 10 a 15 μm , en el citoplasma tienen barras cromatóides de bordes curvos y una masa de glucógeno cuando son inmaduros; se dividen por mitosis sucesivas y al alcanzar la madurez tienen cuatro núcleos. Cuando los quistes maduros son ingeridos por un hospedero, estos se desenquistan al llegar al estómago donde se reblandece su pared de quitina debido al contacto con el contenido gástrico. Posteriormente, ocurre la división de núcleos resultando ocho trofozoítos de cada quiste tetra nucleado (Fig. 1) (Saavedra, A. 2017).



Figura 1. Quiste de *E. histolytica* (Monroy et al., 2011)

1.5 TROFOZOÍTO

Es la forma vegetativa responsable de la proliferación, alimentación y patogénesis; es móvil, invasivo e irregular; se distinguen el exoplasma que le sirve para desplazarse a la vez que emite pseudópodos y el endoplasma, que rodea al núcleo y se caracteriza por tener numerosas vacuolas (Fig. 2). El trofozoíto se reproduce a través de fisión binaria, mide entre 10-60 μm aproximadamente, se caracterizan por ser uninucleados y moverse muy rápido emitiendo pseudópodos anchos, unidireccionales. Tienen una alta capacidad fagocítica y pueden ingerir microorganismos y glóbulos rojos durante la invasión de tejidos. Los trofozoítos migran por el intestino delgado hasta llegar al colon donde proliferan, es decir, se multiplican y por mecanismos aún desconocidos algunos se vuelven a enquistar para salir junto con la materia fecal y así el parásito logra reiniciar su ciclo biológico (Saavedra 2017).

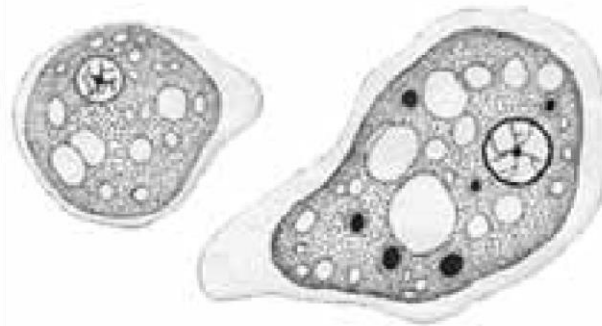


Figura 2. Trofozoíto de *E. histolytica* (Monroy et al., 2011).

1.6 CICLO DE VIDA DE *E. histolytica*

El ciclo de vida de este parásito es directo; es decir, tiene un solo hospedador. Los quistes pueden sobrevivir a días o semanas en el ambiente externo, mientras que los trofozoítos se mueren rápidamente una vez que están fuera del cuerpo al entrar en contacto con el oxígeno y también, se degradan por secreciones gástricas si se ingieren (Kantor, 2018). Por su parte los trofozoítos pueden invadir el epitelio intestinal e incluso pasar a sitios extraintestinales como el hígado a través de la circulación portal hepática o diseminarse a sitios distantes como el cerebro y los pulmones hematógicamente, es decir que se disemina por el torrente sanguíneo (Fig. 3). Los síntomas pueden presentarse después de la ingestión, sin embargo, también pueden desarrollarse años después de la infección (Shirley 2018).

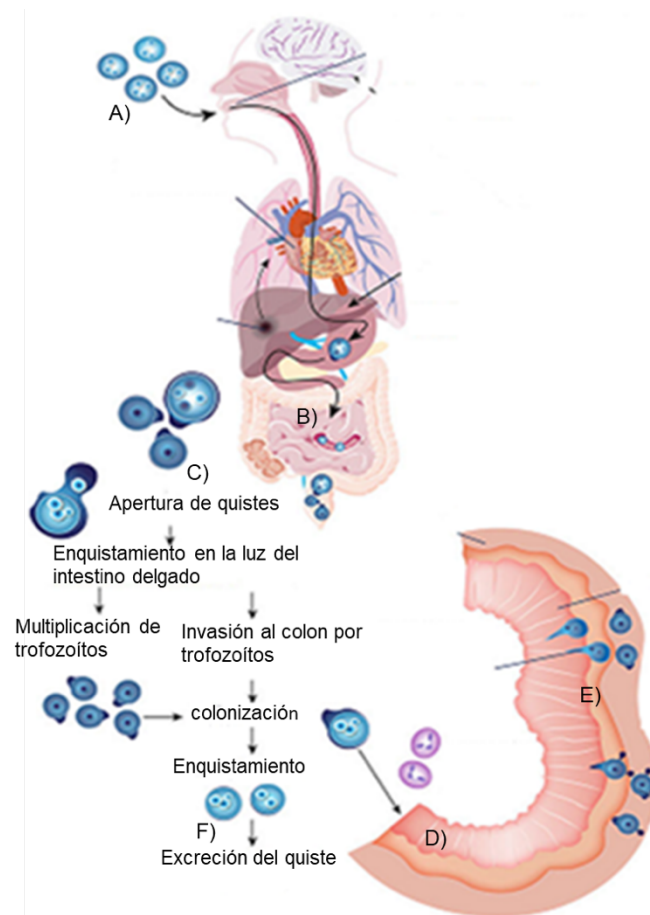


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*: A) Los quistes entran al cuerpo humano a través de la boca, contaminados con heces fecales humanas. B) En el estómago se reblandece la pared de quitina de los quistes. C) Los quistes desenquistan y cada uno genera ocho trofozoítos que avanzan por el intestino delgado. D) Los Trofozoítos llegan al colón, algunos se quedan ahí sin causar daño alguno al ser humano (Amibiasis asintomática). E) Otros atacan al ser humano a través de los diversos mecanismos de patogénesis causando colitis amebiana y otros, pueden llegar al torrente sanguíneo e invadir otros órganos. F) Otros trofozoítos se vuelven a enquistar y salen a través de las heces para comenzar nuevamente el ciclo modificada de (Manuel, C. P. 2011).

1.7 TIPOS DE AMEBIASIS

Según el nivel de virulencia de *E. histolytica*, así como de las condiciones del huésped, se pueden presentar distintos grados de enfermedad, por lo que existen tres tipos de amebiasis, a continuación, se explicará cada una. Por otro lado, no hay una diferencia de género en la frecuencia de amebiasis en los niños, sin embargo, en la población adulta, la infección intestinal es más frecuente en mujeres y la enfermedad invasiva es más común en hombres adultos (Shirley 2018).

a) AMEBIASIS INTRALUMINAL

Se conoce como amebiasis luminal a la infección intestinal asintomática, se deben considerar a aquellas personas con antecedentes de viaje o inmigración desde un área endémica o antecedentes de la infección en el hogar o contacto sexual (Cordel, H. 2013).

b) COLITIS AMEBIANA

También conocida como ulcerativa; esta infección intestinal sintomática puede tener varias manifestaciones, sin embargo, algo que distingue a la colitis amebiana es la diarrea que puede ser acuosa o sanguinolenta y presenta calambres abdominales, dolor, sensibilidad y pérdida de peso (Huston C, 2004). La colitis amebiana puede ser similar a la enfermedad inflamatoria intestinal y las manifestaciones mortales incluyen infección fulminante, que puede resultar en áreas masivas de afectación colónica con perforación y peritonitis, necrosis intestinal o megacolon tóxico (Shirley *et al.*, 2018). El uso de corticosteroides se ha descrito como un factor de riesgo para el desarrollo de formas fulminantes de colitis amebiana El riesgo de infección se incrementa con una alimentación alta en carbohidratos, el uso de corticoides, la desnutrición proteica, el embarazo, la infección por el virus VIH y otras condiciones que debilitan el sistema inmunológico (Fleta y Bueno Lozano., 2000).

La letalidad de la colitis amebiana fulminante varía de 40% a 89% en pacientes infectados, otros factores de riesgo implicados para la enfermedad fulminante incluyen diabetes mellitus, alcoholismo, neoplasia maligna; además puede presentarse como apendicitis aguda (Shirley 2018: (Mcgregor *et al.*, 2007).

c) AMEBIASIS EXTRAINTestinal

El más conocido es el AHA por ser el más frecuente, se desarrolla cuando los trofozoítos se diseminan al hígado; es más común en hombres que en mujeres, aproximadamente 10 veces más, y suele presentarse entre los 20 y 40 años (Nasrallah *et al.*, 2022). Aproximadamente el 50-80% de las personas con AHA presentarán síntomas dentro de 2 a 4 semanas, con fiebre y dolor constante en el cuadrante superior derecho. En hasta el 50% de los casos, los pacientes se presentan con un cuadro crónico de diarrea

prolongada, pérdida de peso y dolor abdominal. La tos, el dolor pleural derecho y el derrame pleural posterior pueden ocurrir cuando la superficie diafragmática del hígado está involucrada. La disentería es el síntoma asociado más común, presente en casi el 40% de los pacientes afectados. La anemia y la hipoalbuminemia son muy comunes en el AHA en comparación con los abscesos piogénicos (Kantor 2018).

Algunas de las complicaciones más graves del absceso hepático amebiano son la ruptura del hígado y la diseminación o movimiento del parásito a otros tejidos adyacentes, como los de la piel, los pulmones, el corazón e incluso el cerebro. La amebiasis pleuropulmonar puede ocurrir como una complicación de la ruptura del absceso hepático, se presenta con neumonitis o absceso pulmonar.

Se sabe que existe amebiasis cervico-vaginal, aunque se han reportado pocos casos y estos antecedentes confirman la transmisión sexual del amebiasis. Existen reportes de mujeres de 64, 66 y 36 años en los que se confundió la sintomatología con cáncer cervicouterino debido a la ulceración y sangrado y se confirmó la amebiasis con la observación de los trofozoítos en las biopsias. El caso de la paciente de 36 años se diagnosticó en el Hospital General San Juan de Dios, en Guatemala. Algunos de los síntomas que presentaron fueron: flujo vaginal blanco, cérvix ulcerado, fatiga y pérdida de apetito desde 2 meses atrás aproximadamente, una de las pacientes presentó sangrado vaginal durante un mes y flujo amarillento (Arvind *et al.*, 2016; Alarcón *et al.*, 2018). Todos los casos se resolvieron con metronidazol.

Es importante mencionar que el desarrollo de la amebiasis, como muchas otras infecciones, es de causa multifactorial y es diferente en cada uno de los individuos. Estudios recientes han demostrado que la interacción entre la flora intestinal del huésped y *E. histolytica* puede mediar el comportamiento patógeno, generando cepas más virulentas al adaptar los genes de bacterias

patógenas para resistir mejor el ambiente del cuerpo humano y evadir la respuesta inmunitaria (Ankri, S., 2021). También se sabe que las bacterias enteropatógenas pueden aumentar la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de adhesión y efectos citopáticos. La producción de citoquinas proinflamatorias también aumentó en presencia de ciertas bacterias intestinales, causando más daño epitelial y facilitando la invasión de trofozoítos. Por otro lado, la presencia de *Lactococcus acidophilus* en el intestino, resulta protector contra la amebiasis (Sarid, L., 2022).

1.8 FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *E. histolytica*.

El intestino está formado por un epitelio intestinal donde se encuentran todos los enterocitos formando una barrera, enseguida está la matriz extracelular que está conformado principalmente colágeno, por último, el torrente sanguíneo. En el ser humano adulto la mucosa gastrointestinal puede alcanzar una superficie de 300 a 400 metros cuadrados. Las células del epitelio intestinal secretan un moco llamado mucina que forma una capa que protege a las células de los agentes tóxicos que entran al organismo a través de la comida, y ahí se encuentra la microbiota. La flora intestinal es un ecosistema microbiano que coloniza el tracto intestinal cuyas principales actividades metabólicas son la recuperación de energía y nutrientes y la protección del huésped frente a invasión por microorganismos extraños (Guarner, F. 2003). Los trofozoítos que llegan al intestino, para colonizar deben adaptarse a este ambiente y modularlo para eventualmente, llegar al torrente sanguíneo e invadir otros órganos.

Los factores de patogenicidad son moléculas o estructuras producidas por microorganismos patógenos que contribuyen a su capacidad de invadir, colonizar y causar daño en el huésped. Estos factores pueden ser proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos que desempeñan funciones específicas o regulan mecanismos en la interacción huésped-parásito. Desde 1975, se han descrito diferentes tipos de factores de virulencia que utiliza *E.*

histolytica par invadir el intestino grueso y los tejidos extra intestinales. La capacidad patógena de los trofozoítos se ha atribuido a la capacidad que tiene este organismo para fagocitar, así como a su resistencia al sistema complemento y también, a la expresión de las adhesinas, proteasas de cisteínas, amebaporos, colagenasas o fosfolipasas, también, a su actividad citotóxica (Trejo-Suárez *et al.*, 2009).

La virulencia de *E. histolytica* es intrínseca y depende tanto de su capacidad infecciosa como invasiva y destructiva de los tejidos del huésped. La patogénesis de *E. histolytica* está caracterizada por tres eventos: muerte de la célula huésped, invasión de tejidos e inflamación. Los trofozoítos pueden matar células huésped a través de diferentes mecanismos como la citólisis por contacto, citotoxicidad, fagocitosis y trogocitosis (Ralson *et al.*, 2014):

a) ADHESIÓN

Los trofozoítos tienen en su membrana adhesinas, las cuales son moléculas de lectina (Trejo-Suárez, *et al.*, 2009). Estas proteínas se unen a carbohidratos y les permiten la unión membrana-membrana de las células humanas con el parásito; las principales moléculas que intervienen en la adhesión de *E. histolytica* son la lectina Gal/GalNAc, EhCPADH, SREHP, L220, como se muestran en la figura 4 (Petri Jr., W. 2002).

b) CITÓLISIS

A todas las células del epitelio que tiene contacto directo con la ameba son lisadas y además, las induce a la muerte por apoptosis. El término de apoptosis fue utilizado en un artículo en 1972, para describir morfológicamente distinta de muerte celular, es una muerte programada por parte de la célula, que implica la eliminación genética determinada de las células, este proceso generalmente ocurre durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener las

poblaciones celulares en los tejidos, además de ser un mecanismo de defensa, como las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por una enfermedad (Norbury, C. 2001).

c) CITOTOXICIDAD

También los parásitos secretan varias proteínas: los amebaporos, las cuales forman canales o poros en la membrana de las células huésped (Winkelmann, J. 2006). Estas proteínas son solubles y representan uno de los mayores factores patógenos de *E. histolytica*, pertenecen a la familia SAPLIP (saposin-like proteins) y se caracteriza por tener un motivo conservado de residuos de seis cisteínas unidas por tres puentes disulfuro (Wantanabe, 2021). Además, tienen tres isoformas, las cuales son: amebaporos A, amebaporos B y amebaporos C, las cuales son integradas por 77 aminoácidos y producidas en una porción de 35:10:1.

Se sabe que *E. histolytica* secreta diferentes enzimas que degradan carbohidratos como la glucosidasa, manosidasa, galactosidasa, fucosidasa, glucoronidasa y N-acetil-D-galactosaminidasa, para generar alteración de la mucosa intestinal y aumentar su afinidad por las proteasas y otras sustancias que la ameba secreta (Trejo Suárez, *et al.*, 2009). En el genoma de la ameba, se encuentran 88 genes putativos que codifican para peptidasas: 50 cisteín peptidasas, 22 metalo peptidasas, 10 serina peptidasas y 4 peptidasas de ácido aspártico.

Las proteasas de cisteína, permiten degradar casi todos los componentes de la matriz extracelular incluyendo laminina, colágeno tipo I y IV y fibronectina (Gómez, *et al*, 2007). Este mecanismo le facilita la invasión de la mucosa para llegar al torrente sanguíneo. La secreción de amebaporos y cisteín proteasas es para destruir a los neutrófilos que liberan el contenido de sus gránulos llenos de productos tóxicos que pueden amplificar las lesiones causadas por las amebas, y además generar áreas de necrosis en la mucosa

intestinal y focos de ulceración que condicionan los cuadros clínicos de mala absorción y disentería (Winkelmann, J. 2006). En la figura 4 se pueden visualizar las diferentes proteínas, así como los mecanismos que intervienen en el proceso de virulencia (Tillack *et al.*, 2007).

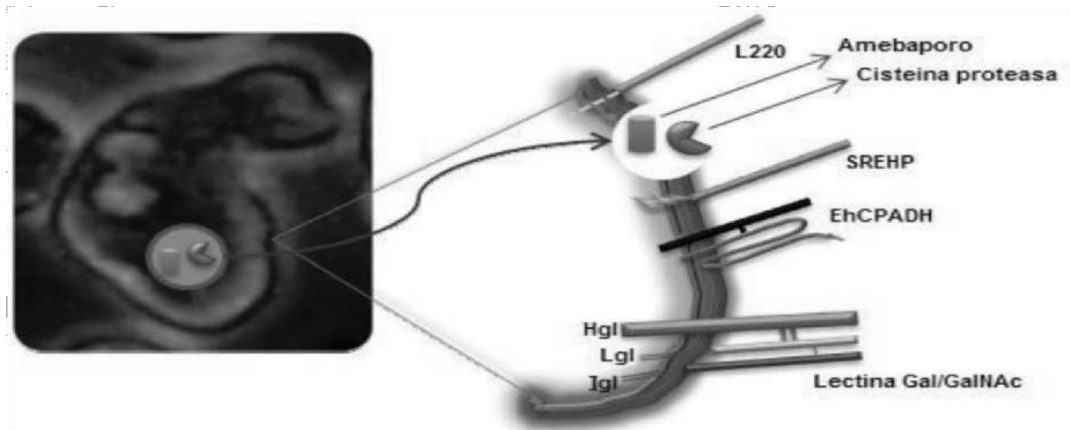


Figura 4. Proteínas que intervienen en la virulencia de *E. histolytica*: en el mecanismo de adhesión se encuentran las moléculas de lectina Gal/GalNAc, EhCPADH, SREHP, L220, mientras que para el mecanismo de citotoxicidad están las moléculas amebaporos y cisteinproteasas (Laughlin *et al.*, 2005).

d) FAGOCITOSIS

Los trofozoítos también fagocitan activamente bacterias y desechos de las células del huésped que le sirven de alimento (Gómez, *et al*, 2007). La fagocitosis es un proceso fundamental para el desarrollo y supervivencia de *E. histolytica*. Para llevar a cabo dicho proceso, el parásito debe entrar en contacto con la célula y lo hace a través de la lectina de adhesión con las lectinas y las células y restos celulares son englobados dentro del trofozoíto formando fagosomas. En el interior de los fagosomas de *E. histolytica* se encuentran hidrolasas, lisozimas y hexosaminidasas, que degradan las bacterias y células fagocitadas (Fig. 5) (Lejeune, A 1987).

E. histolytica es la única de las especies del género *Entamoeba* que presenta la capacidad de fagocitar eritrocitos, esto la diferencia de otras especies comensales. Esta ingestión la puede hacer de dos maneras: mediante la fagocitosis clásica, a través de la emisión de pseudópodo o una endocitosis, posterior a un ataque lítico (Terrero, Ana, 2015). La fagocitosis es uno de los factores determinantes de la virulencia del parásito. En estudios in vitro se ha visto que en cultivos xénicos, *E. histolytica* muestra un comportamiento fagocítico, mientras que en cultivos axénicos se alimenta por pinocitosis, siendo el desarrollo del parásito mucho más lento (Terrero, A. 2015).

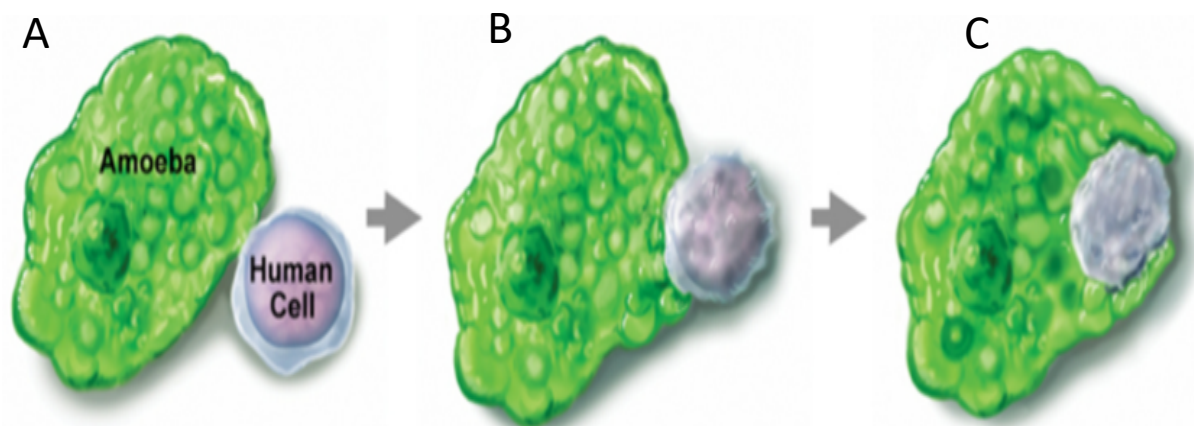


Figura 5. Fagocitosis de *E. histolytica*: A) la ameba y la célula humana, B) la ameba empieza a envolver (fagocitar) a la célula humana y C) la engulle completamente formando la vesícula digestiva (fagosoma). Modificada de <https://jovenesinvestigadoresparasitologia.wordpress.com/wp-content/uploads/2014/04/1.png>

e) TROGOCITOSIS

Se ha reportado que *E. histolytica* también mata a las células a través de la trogocitosis, que es el mecanismo para ingerir células vivas dando mordiscos a la membrana celular de la célula humana y así tomar el contenido intracelular (Miller *et al.*, 2019) (Fig. 6). La trogocitosis requiere reordenamiento de actina, además, requiere señalización iniciada por la lectina Gal-GalNac, la señalización del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y una quinasa que contiene el dominio C2 de *E. histolytica* (EhC2PK) (Trejo-Suárez 2009).

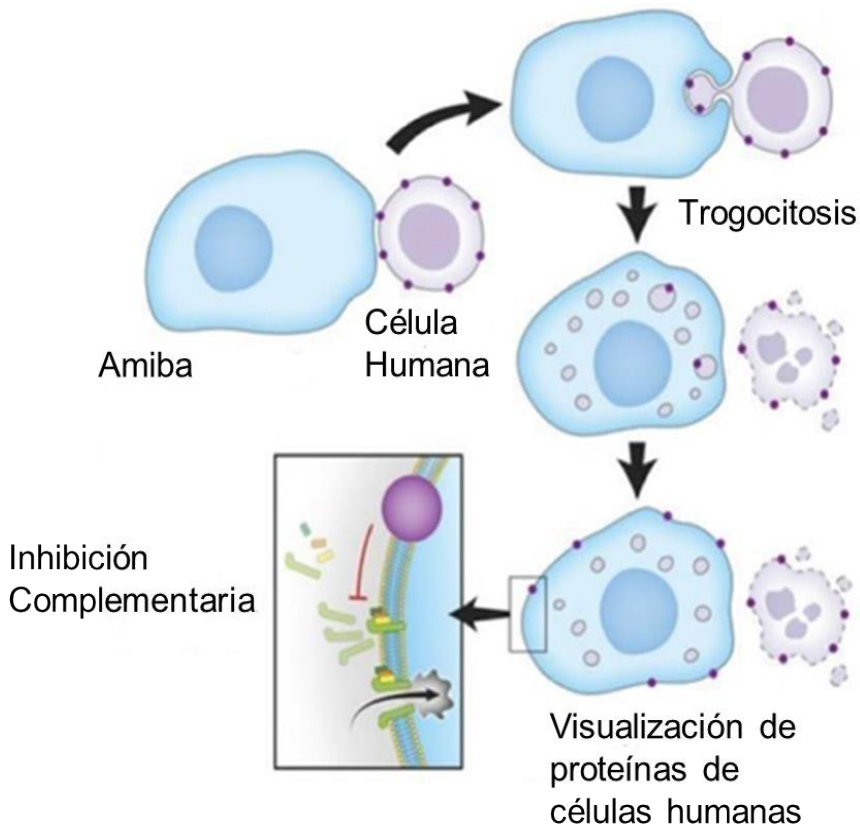


Figura 6. Proceso de trogocitosis (Miller, H. 2019). Se muestra la amiba mordiendo a la célula humana.

f) INVASIÓN

Los trofozoítos comensales pueden volverse invasivos, comienzan a destruir la barrera mucoepitelial induciendo así la sobreproducción de moco, matando a las células huésped y provocando inflamación y posteriormente disentería. La ruptura de la barrera intestinal y de los vasos sanguíneos provoca la pérdida de agua y sangre en las heces (Faust y Guillen, N., 2012). Una vez que se rompe la barrera epitelial, la ameba invade la matriz extracelular para posteriormente entrar al torrente sanguíneo, a esto se le conoce como invasión.

Además, con la trogocitosis y la fagocitosis, la ameba ingiere los restos de mucina y las células que va degradando, eritrocitos y bacterias (Faust y Guillen, N., 2012). Con todos estos mecanismos, se activa la respuesta inmune del huésped.

g) ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE A CONSECUENCIA DE LA INFECCIÓN POR *E. histolytica*

La respuesta inmune ante la infección por *E. histolytica* está dada por la inmunidad innata inespecífica, siendo el principal mecanismo de defensa la secreción de mucina. Una vez que la ameba logra degradar la capa del moco, se facilita el proceso de adhesión. La molécula Gal-GalNac se une con las glucoproteínas de la mucosa intestinal, generando la citólisis directa de las células humanas. Sin embargo, como mecanismo de defensa del huésped, la mucina del intestino puede inhibir la acción de la lectina Gal-GalNac.

Al mismo tiempo, los amebaporos generan la activación más fuerte de los mecanismos de defensa. Cuando hay invasión, las células del sistema inmune también secretan proteasas que ayudan a la destrucción de los parásitos, sin embargo, estas proteasas humanas también generan la

degradación de la matriz extracelular facilitando los procesos de invasión de los trofozoítos (Aguilar-Rojas, Castellanos-Castro, et al., 2020). Los macrófagos, al tocar a los trofozoítos generan una lisis; por lo tanto, si el sistema inmune logra atacar a las amebas, la infección dura un par de meses, si pasa lo contrario, los parásitos logran llegar al torrente sanguíneo se produce la amebiasis crónica (Reyes, L 2002).

Los neutrófilos infiltran la mucosa después de la liberación de IL-8 por las células epiteliales intestinales, lo cual es inducida por el trofozoíto. El reconocimiento del parásito se logra por medio de receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4 (Gómez 2007). Sin embargo, algunos autores proponen que *E. histolytica* puede variar sus patrones moleculares asociados al patógeno y no ser detectada. El complemento es inactivado por medio de reactividad cruzada de la lectina Gal-GalNac con el CD59, lo que lleva al bloqueo en la formación del complejo ataque a membrana y las proteasas de cisteína degradan las anafilotoxinas.

La lectina de 220 kDa de *E. histolytica* causa una disminución de IL5, IL6, IFN-gamma y TNF-alfa, con lo que se genera un efecto antiinflamatorio, atrayendo macrófagos inactivos o inactivando los más cercanos. Lo que conlleva a que el macrófago no pueda fagocitar adecuadamente los trofozoítos y que no se pueda iniciar una respuesta inmune específica (Trejo- Suárez, et al, 2009). También, se generan anticuerpos contra la amebiasis después de la infección (Haque et al., 2006)

Para el diagnóstico de la amebiasis existen diversas técnicas, algunas con un mayor porcentaje de efectividad, cómo se muestran en la siguiente tabla:

1.9 DIAGNÓSTICO DE LA AMEBIASIS

Tabla 1. Métodos de diagnóstico de la amebiasis

Prueba	Descripción	Sensibilidad	Ventajas	Limitaciones de la técnica
Examen coproparasitológico	Las heces frescas aumentan la recuperación de trofozoítos y quistes y se pueden preparar como montajes húmedos o preparaciones teñidas	25-60 %	Son indicadores potenciales para encontrar patógenos	La detección de quistes en las heces no permite identificar las diferentes especies de <i>Entamoeba</i> . Solo pueden confirmarse la presencia de <i>E. histolytica</i> cuando las muestras presentan trofozoítos hematófagos. Se requiere examinar el espécimen entre 20-30 min después de la recolección de la muestra porque los trofozoítos se destruyen. Requiere de gran experiencia profesional.
Estudios moleculares de heces (PCR)	Se toma una muestra de heces y se amplifican regiones de ADN.	100%	Detecta el agente etiológico directamente de la muestra sin necesidad de un cultivo previo prolongado, reduce el tiempo del diagnóstico	Son costosos, necesitan requerimientos técnicos y de infraestructura
Pruebas serológicas ELISA	Se usan antígenos específicos del parásito para buscar anticuerpos anti-ameba en sueros de pacientes	92-97 %	Son de bajo costo	Han mostrado valores altos de anticuerpos. No permite diferenciar una infección aguda de una pasada. Pueden ser negativas en los primeros siete días

1.10 TRATAMIENTO

Para tratar a los pacientes con amebiasis, se debe considerar para la selección del medicamento su vía de administración, la localización de los trofozoítos pues pueden localizarse en la pared intestinal o en tejidos extra intestinales, también se debe considerar la edad, el daño en el cuerpo, la presencia de otros parásitos intestinales, condiciones mórbidas, así como la disponibilidad de los fármacos, la eficacia clínica y parasitológica de los medicamentos, los daños colaterales y la presencia de embarazo (Botero, D., 2012).

Los fármacos se pueden agrupar dependiendo del sitio donde actúan. Los de acción tisular, son los que atacan a los trofozoítos que han invadido a los tejidos; son los derivados del 5-nitroimidazol, son efectivos casi exclusivamente en los tejidos, debido a que se absorben más rápido en el intestino delgado. Estos medicamentos son prescritos en casos de amebiasis intestinal sintomática, en la que las amibas han invadido la pared intestinal (Petri, W.A. 2003). Existen diferentes 5-nitroimidazólicos, sin embargo, los más usados son el metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol, de los cuales el metronidazol ha dado mejores resultados, ya que actúa alterando el ADN e impidiendo su síntesis, y también generan grandes cantidades de sustancias reactivas de oxígeno, aunque estos medicamentos presentan severos efectos secundarios en los pacientes (Haque, R., 2003). En los últimos años, se ha reportado una alta resistencia a los antiparasitarios y también, la aparición de nuevas cepas hipervirulentas (Shirley 2019), lo que conlleva la necesidad de diseñar nuevos fármacos y una vacuna anti-amebiasis.

1.11 PREVENCIÓN

Antes de viajar a áreas endémicas se debe asesorar a los pacientes sobre la seguridad alimentaria para prevenir las enfermedades entéricas. Aún no existe una vacuna para prevenir la amebiasis, sin embargo, la primera propuesta se está investigando en modelos de roedores y primates no humanos (Das *et al*, 2018). Mientras tanto, la prevención primaria sigue siendo la seguridad de los alimentos y agua, la atención a la higiene de las manos y evitar la exposición fecal-oral, incluso a través de las prácticas sexuales (Hung, C 2012). Además de dar a conocer sobre la importancia del lavado de manos. La desinfección de alimentos y la higiene son la forma más eficiente de prevenir la propagación de la amebiasis.

La Promoción de la salud es multidisciplinaria. Por lo tanto, puede enfrentar un problema de salud pública, vinculándose con la biología molecular. De tal manera, que el estudio de las proteínas, a través de las herramientas moleculares, promueven intervenciones más precisas y efectivas para reducir la carga de enfermedades infecciosas, disminuir la mortalidad asociada a la amebiasis, generar vacunas que disminuyan la prevalencia de la enfermedad y así mejorar las condiciones de vida en las comunidades más vulnerables. Por lo tanto, la Promoción de la Salud debe utilizar todas las herramientas moleculares para un mejor diagnóstico de la amebiasis y así reducir el contagio y la propagación de dicha enfermedad (Sampieri R and Clara L, 2009).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 LÍPIDOS DE *E. histolytica*

Los lípidos son actores esenciales en la patogénesis de los parásitos. En particular, los trofozoítos altamente fagocíticos de *E. histolytica*, presenta una fusión y fisión dinámica de membrana, en la que los lípidos participan activamente durante la fagocitosis y motilidad para alcanzar y atacar los epitelios. La síntesis y el metabolismo de los lípidos en este protozoo presentan una diferencia notable con los realizados por otros eucariotas. Los trofozoítos sintetizan algunos fosfolípidos como esfingolípidos, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, mediante procesos similares a los utilizados por otros eucariotas. Sin embargo, los trofozoítos carecen de enzimas para la síntesis de colesterol y ácidos grasos, por lo que necesitan obtener estos lípidos del huésped o del cultivo por mecanismos específicos (Castellanos-Castro et al., 2020). El estudio de la adquisición y transporte de lípidos en *E. histolytica*, aún es un campo poco estudiado. El fosfatidilinositol (PI) pertenece a una familia de glicerofosfolípidos que tiene como estructura un anillo de inositol, un esqueleto de glicerol, un fosfato y dos cadenas de acilo. El PI se fosforila en todas las combinaciones de las posiciones C-3, 4 y 5 del anillo de inositol para formar siete isotipos de fosfatos de fosfatidilinositol llamados fosfoinositidos (PIPs).

Los PIPs que se encuentran en organelos específicos o dominios de membranas que se unen y se reclutan varias proteínas de manera espaciotemporal específica a través de dominios que se unen selectivamente a una sola molécula de PIP o a una matriz de PIPs (Di Paolo 2006), algunos ejemplos en la Tabla 2.

En *E. histolytica*, se ha demostrado que los PIPs y las proteínas de unión a PIP están implicadas en sus mecanismos asociados a la virulencia, como la motilidad celular, el tráfico vesicular, la trogocitosis y la fagocitosis (Nakada-

Tsuki, et al, 2019). Se sabe que los PIPs se encuentran en diferentes espacios celulares de *E. histolytica* de acuerdo con su función: PI3P se localiza en la copa trogocítica, los trogosomas y las vesículas internas (Nakada-Tsuki, K, 2009). PI4P se localiza en el núcleo; PI (4,5) P 2 se encuentra en la membrana plasmática y media la señalización de Ca²⁺ durante la adhesión celular (Koushik, A.B, 2013); PI(3,4,5)P3 recluta a la quinasa EhAGC1 y 2 para regular la formación de estructuras citoesqueléticas asociadas a la trogocitosis, como el túnel trogocítico (Somlata et al., 2017; Watanabe et al, 2020).

Tabla 2. Proteínas de unión al mono fosfato de fosfatidilinositol

FOSFATIDILINOSITOL MONO FOSFATO	DOMINIO DE UNIÓN
PI3P	Fab1 YOTB Vac1 y EEA1 FYVE
PI4P	PH(ORP5) ORP8(OSH1 MOTIVOS OSBP1 FAPP1
PI5P	Homeodominio vegetal (PHD)

El PI3P es indispensable para la clasificación de proteínas en los lisosomas y para las funciones endosomales (Wallroth, 2018). Se sabe que dos dominios se unen específicamente a PI3P: los dominios FYVE y PX. El dominio PX tiene aproximadamente 110 aminoácidos de largo y generalmente forma un pliegue globular; consta de tres hebras β y tres α -hélices y una importante bolsa básica electropositiva entre α 1 y α 2, que sirve para la unión directa de fosfatos de fosfoinositidos (Teasdale, 2012). Se predice que el genoma de *E. histolytica* codifica once proteínas que contienen el dominio FYVE cuando se utilizó Hrs-FYVE como consulta en la búsqueda

BLAST con un valor e de $< 1,00E-5$ (Teasdale, 2012). La proteína EhFP4 que contiene el dominio FYVE (EHI_153510) fue reclutado a la copa trogofagocítica y asociado con F-actina cercano a la membrana plasmática. Recientemente, se demostró que EhFP10 se une a EhMyosinIB y está involucrado en la regulación del citoesqueleto, pero su unión a lípidos no se ha estudiado (Gautam, 2019). El genoma de *E. histolytica* codifica dos proteínas, EhSNX1 y EhSNX2, mostrando una similitud en la secuencia con el dominio PX de SNX3 humano (Wantabe, 2020). Se demostró que EhSNX1 y EhSNX2 se unieron específicamente a PI3P, como se predijo. Es importante destacar que mediante inmunofluorescencia se demostró que EhSNX1 se localiza en las copas trogofagocíticas, mientras que EhSNX2 se localiza en trogo/fagosomas. Estos datos sugieren que estos EhSNXs están involucrados en diferentes etapas de la trogocitosis y la fagocitosis y que estos eventos están regulados por la presencia de los PIPs en las membranas (Wantabe, 2020).

2.2 COLESTEROL EN *E. histolytica*

En el genoma de la ameba, no se han encontrado genes que participan en la síntesis *de novo* del colesterol ni moléculas homólogas a las lipoproteínas que lo transportan HDL y LDL (Castellanos-Castro, 2020). Únicamente se conocen las proteínas amebianas EhNPC1 y EhNPC2 que ayudan a internalizar el colesterol por la vía endocítica y después, participan en la distribución del colesterol en el interior de la célula. También, estas moléculas participan activamente en los factores de virulencia como la fagocitosis y la migración (Bolaños 2020). Sin embargo, estas proteínas no son esenciales para la vida de los trofozoítos, por lo que es necesario encontrar otras proteínas que transportan el colesterol, idealmente esenciales para proponer nuevos blancos farmacéuticos.

2.3 LAS PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS EN *E. histolytica*

En eucariontes, el transporte de lípidos por mecanismos no vesiculares es catalizado por las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), las cuáles pueden extraer de una membrana donante lípidos y entregarlos a otra membrana receptora. Esta transferencia se realiza a través de un dominio especial de transferencia de lípidos (LTD) y se han caracterizado varios tipos en eucariontes (Helle *et al*, 2013). Las LTPs se clasifican principalmente en función de la arquitectura de su dominio en dos clases:

- I. LTP citosólicas las cuales carecen de cualquier dominio de unión a membrana.
- II. LTP ancladas a la membrana, éstas contienen algunos dominios de unión a la membrana y funcionan para formar un sitio de contacto de membrana (MCS).

Las LTP citosólicas pueden facilitar el transporte intracelular de lípidos a través de un proceso que implica la interacción de la LTP con la membrana donante (Lev, 2012). Posteriormente, abre su cavidad hidrofóbica, sucede la extracción de lípidos y la disociación de la LTP de la membrana donante (Kasper y Helmkamp, 1981; Helmkamp 1986; Nichols, 1988; Rueckert y Schmidt, 1990; Wirtz, 1991; Gadella y Wirtz, 1994; Wirfz 2005; Lev, 2013). Por otro lado, el transporte se completa mediante la interacción de la LTP con una membrana receptora, la apertura de la cavidad de unión de lípidos y finalmente, la integración del lípido en esta última (Lev, 2012). Las LTPs con dos dominios/ motivos de orientación para dos membranas de organelos diferentes, forman los sitios de contacto entre membranas (MCS) de dos compartimientos celulares diferentes (Lev, 2010; Helle 2013).

Las LTPs tienen diversas funciones:

1. Pueden facilitar la transferencia vectorial y a menudo bidireccional de lípidos, cómo se muestra en las células vivas intactas e *in vitro* (Helle *et al.*, 2013).
2. Las LTPs también han sido reconocidas como proteínas presentadoras de lípidos para las enzimas metabolizadoras de lípidos (Cockcroft, S., y Raghu, P., 2018).
3. Son capaces de actuar como sensores de lípidos al alterar su afinidad con otras proteínas asociadas en respuesta a la unión a lípidos (Lev, 2010).
4. Pueden facilitar alteraciones transitorias en la distribución de lípidos de una membrana a través de la extracción o el suministro de moléculas de lípidos a una determinada región de la membrana o mediante el cambio de la distribución de moléculas en una porción particular de la membrana a la que está unida (Lev, 2010).

En *E. histolytica*, se han descrito 22 LTPs agrupadas en distintas familias de proteínas, la mayoría putativas (Fig. 7) (Das *et al.*, 2018).

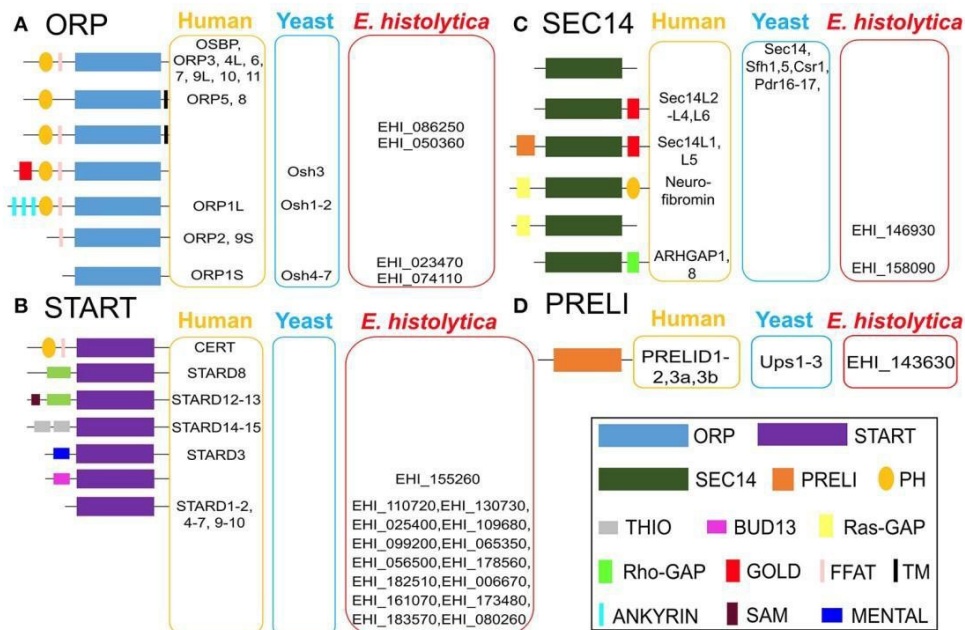


Figura 7. Organización y clasificación de dominios de las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) de humanos, levaduras y *E. histolytica*.

Las LTPs citosólicas poseen solo dominios de transferencia de lípidos (LTD), como el dominio relacionado con la proteína de unión a oxisterol (OSBP) (ORD, se une a esteroides y PI4P), el dominio de transferencia de lípidos relacionado con la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) (START), (se une a esteroides, fosfolípidos o ceramidas), el dominio Sec 14 (se une a PC y PIPs) y la proteína de interés evolutivo y linfocitario relevante (dominio PRELI, se une a PA). Todos estos dominios pueden proteger las fracciones hidrofóbicas de varios ligandos lípidos del entorno acuoso. Las LTPs unidas a la membrana tienen varias combinaciones del LTD con otros dominios/motivos de anclaje a la membrana, como el dominio de PH, el motivo de difenilalanina en un tracto ácido (FFAT), el dominio de dinámica de Golgi (GOLD), que funciona como regulador de los MCSs. El genoma de *E. histolytica* tiene 22 homólogos potenciales de LTP, (A) cuatro proteínas relacionadas con la proteína de unión al oxisterol OSBP (ORP), (B) 15 START, (C) dos Sec 14 y (D) candidatos individuales de PRELI (Das 2018).

2.4 PROTEÍNAS ORPs Y GENERALIDADES EN EUKARIOTES

Las proteínas de unión a oxisterol (ORPs) son un tipo de proteínas de transferencia de lípidos que se conservan desde levaduras hasta los seres humanos y se identifican como homólogos de OSBP (proteína de unión a oxisterol de humano), que fue la primera en identificarse (Taylor 1984). Están implicadas en muchos procesos celulares, como la señalización, el tráfico vesicular, el metabolismo lipídico y el transporte de esteroides no vesiculares. Todas las ORPs contienen un dominio de unión a oxisterol (ORD) que tiene una bolsa hidrofóbica que se une a una sola molécula lipídica a la vez. Los ORDs también contienen superficies de unión a membranas adicionales, de las cuales, algunas se unen a los fosfoinosítidos y pueden regular el transporte de esteroides (Im *et al.*, 2005). El dominio ORD no solamente se une a oxisteroides si no también a otros lípidos como los PIPs (Raychaudhuri y Prinz, 2010; Pietrangelo y Ridgway, 2018). El análisis estructural de Osh4 de *Saccharomyces cerevisiae* reveló una estructura de un barril beta que contiene un bolsillo hidrofóbico que se une al oxisterol o al colesterol (Im 2005). Interesantemente los ligandos de los dominios ORD incluyen oxisterol, colesterol, fosfolípidos, tal como; fosfoinosítidos, fosfatidilserina y fosfatidilcolina. Los dominios ORD contienen los residuos conservados EQVSHHPP, como un motivo consenso de unión a lípidos localizada en el bolsillo (de Saint-Jean 2011; Tong 2013). En humanos y levaduras, el mecanismo de transporte de lípidos a través de las ORPs es por el intercambio de PI4P de una membrana donante por colesterol o fosfatidilserina de una membrana receptora en los sitios de contacto entre dos organelos diferentes, donde el PI4P se mueve a favor del gradiente y el colesterol en contra del gradiente de concentración. El intercambio sucede entre el retículo

endoplasmático, el aparato de Golgi y la membrana plasmática controlando los niveles de PI4P entre compartimentos asegurando el reconocimiento y la formación de los sitios de contacto de membrana (Graham and Burd, 2011; Nakutsu y Kawasaki, 2021).

Muchas ORPs poseen un dominio de homología a pleckstrina (PH) en su región N-terminal para mediar la unión a la membrana (Lemmon, 2007; Lemmon, 2008). Muchos de estos han sido caracterizados por su alta afinidad a fosfoinosítidos tales como: PI4P y PI(4,5)P₂ (Di Paolo y De Camilli, 2006). El motivo FFAT (dos fenilalaninas en un tracto ácido) es reconocido por la proteína de membrana asociada a vesículas del retículo endoplasmático (VAMP) (Loewen 2003).

Das y Nozaki (2018), reportaron con base en la información de la base de datos Ameba DB cuatro homólogos de las proteínas putativas ORPs en *E. histolytica*, dos con dominio transmembranal: EHI_086250 y EHI_050360 y dos citosólicas: EHI_074110 y EHI_023470 (Das y Nozaki 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la amebiasis es un problema de salud pública en el mundo y *E. histolytica* tiene un metabolismo del colesterol diferente a los humanos, los usos de las herramientas moleculares nos permiten el estudio de los genes putativos amebianos que codifican para posibles proteínas transportadoras de colesterol, y eventualmente, determinar y proponer algunas moléculas como nuevos blancos farmacéuticos y para el diseño de nuevas estrategias de diagnóstico y vacunación promoviendo así el control del amebiasis. Estas acciones son necesarias debido a que México es un país endémico para la amebiasis, al igual que muchos otros, y la resistencia a los antiparasitarios y la evolución de algunas cepas hipervirulentas están cada vez más presentes. Aunado a esto, es fundamental seguir investigando los mecanismos moleculares de la interacción huésped parásito de *E. histolytica* relacionados con el transporte y metabolismo de lípidos. En esta tesis, nos enfocamos en las proteínas putativas de unión al oxisterol, con base al reporte previo de su identificación, consideramos importante actualizar el análisis bioinformático de manera más profunda para predecir la unión a lípidos y las funciones celulares para eventualmente y como perspectiva, planear los ensayos *in vivo* para confirmar su potencial uso como blancos farmacéuticos y diagnóstico.

IV. HIPÓTESIS

Las proteínas de unión a oxisterol de *E. histolytica*, potencialmente se unen a lípidos y participan en algunas de sus funciones vitales.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las proteínas putativas de unión a oxisterol en *E. histolytica* mediante un análisis bioinformático completo.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar *in silico* las moléculas putativas ORP de *E. histolytica*.
- b) Estandarizar la cuantificación de la expresión de los genes *ehorps* mediante RT-PCR

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cubrir el objetivo 1 de esta investigación, se abordó el análisis *in silico* de las proteínas putativas de unión a oxisterol de *E. histolytica* con el uso de diversas herramientas y bases de datos (Fig. 8). El objetivo 2 se cubrió de acuerdo a la estrategia experimental descrita en la figura 9.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL BIOINFORMATICA

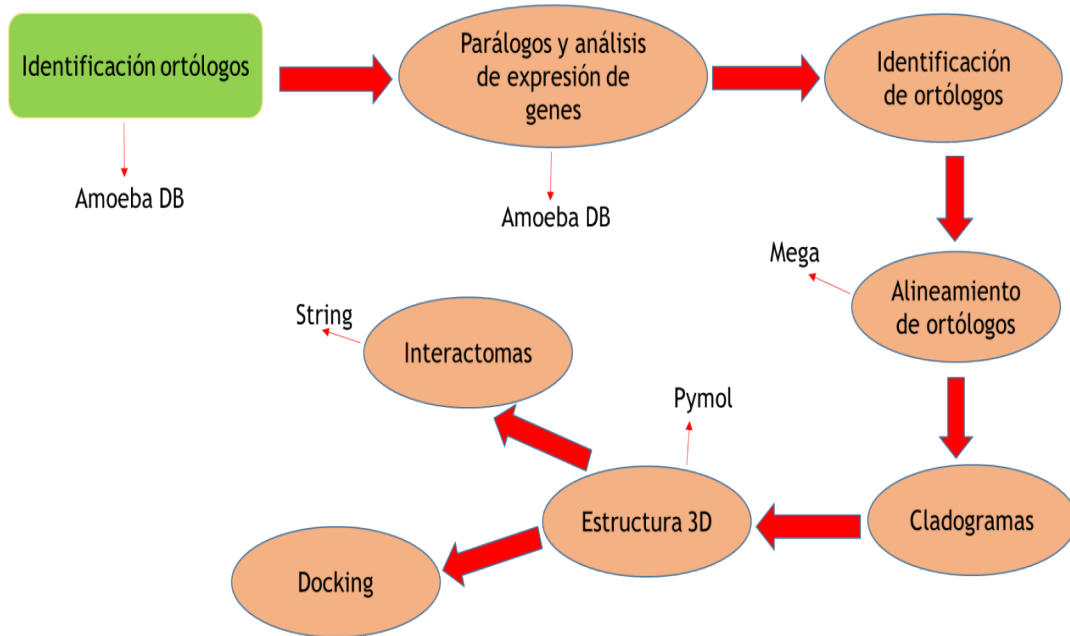


Figura 8. Estrategia experimental *in silico*: Se identificaron los parálogos y se analizó la expresión de genes en diferentes condiciones al analizar los transcriptomas reportados en la base de datos. Después, se buscaron los ortólogos de proteínas ORPs en el género *Entamoeba*, posteriormente se localizaron las familias y se realizó el alineamiento para checar las similitudes entre las proteínas, posteriormente se modeló un cladograma para observar la relación evolutiva de las proteínas. También, se predijo la estructura 3D y el acoplamiento (docking molecular) de las proteínas con ligandos lipídicos y finalmente, se predijeron las proteínas que interaccionan con las proteínas ORPs de *E. histolytica* para identificar las funciones celulares, mismas que se complementaron con el análisis de la expresión de estos genes a través de los transcriptomas reportados en la base de datos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

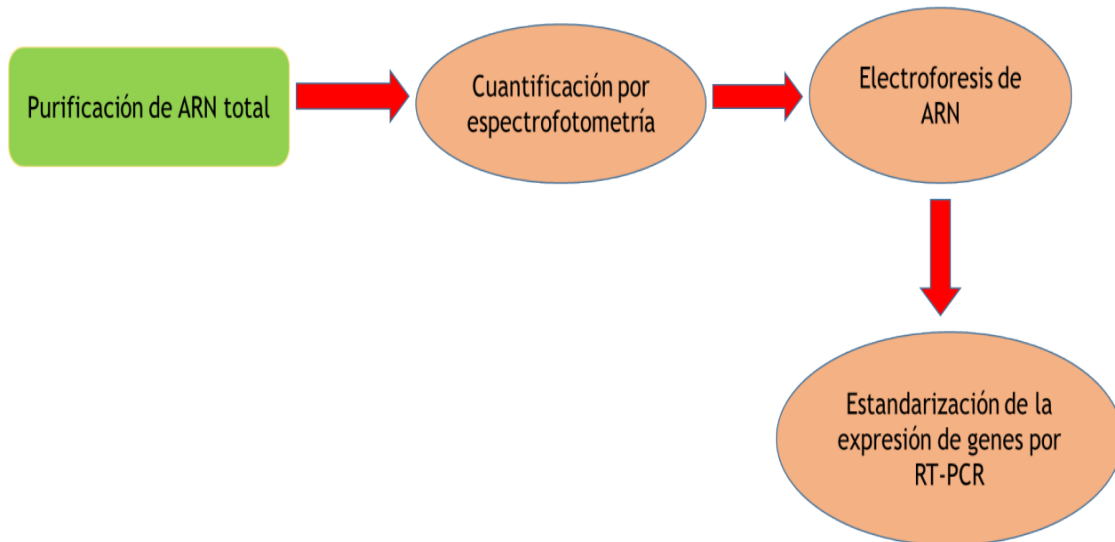


Figura 9. Estrategia experimental: Se realizó la purificación de ARN total con trizol para posteriormente realizar su cuantificación y validación de integridad por electroforesis para finalmente, estandarizar las condiciones de RT-PCR.

VIII. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

8.1 IDENTIFICACIÓN DE PARÁLOGOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES

Para identificar los genes parálogos se utilizó la base de datos AmoebaDB (Figura 8) y para comprender mejor la función de las EhORPs, se realizó un análisis los patrones de expresión basal de los genes (transcriptoma obtenido por Illumina ARNseq de cultivo axénico recolectado después de 48 horas por y en diferentes condiciones de cultivo en el transcriptoma para *E. histolytica* HM1:IMSS mediante secuenciación ARNseq y micro arreglos reportados en la base de datos AmoebaDB (Alvarez-Jarreta, *et al.*, 2024). Con los datos obtenidos de los transcriptomas, se generaron los mapas de calor con el software heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>) (Babicki *et al.*, 2016) y para visualizar las funciones compartidas en los genes, realizamos diagrama de Ven con el plugin jvenn. toulouse (<https://jvenn.toulouse.inrae.fr>) (Bardou *et al.*, 2014).

8.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ORTÓLOGOS

Se utilizó la Base de datos VeupathDB Released 68 (Amoes *et al.*, 2022) el 7 de mayo 2024 (VeupathDB) (Amos *et al.*, 2022) para realizar el análisis de las secuencias de nucleótidos de los genes de interés y buscar ortólogos y parálogos en especies del género *Entamoeba* con el fin de comprender mejor la evolución molecular.

8.1.2 ALINEAMIENTO DE ORTÓLOGOS

Se usó el programa Clustal Omega y las secuencias fueron ingresadas en formato FASTA (Clustal Omega < EMBL-EBI) (The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024) y el resultado fue el porcentaje de la similitud entre los genes (Percent Identity Matrix). Se usaron

los parámetros preestablecidos por el software.

8.1.3 CLADOGRAMAS DE PROTEINAS EhORPs

En la página Clustal omega (Clustal Omega < EMBL-EBI) (The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024) se realizó el alineamiento de las proteínas ortólogas de unión a oxisterol en el género *Entamoeba* ingresando las secuencias en formato FASTA. Los cladogramas se obtuvieron con los porcentajes de identidad entre las secuencias ortólogas; en este último experimento, es importante señalar que no se arrojan valores que indiquen un parentesco evolutivo).

8.1.4 PORCENTAJE DE SIMILITUD ENTRE ORTOLOGOS

Se utilizó el programa de la página Pfam versión 37.1 (Pfam is now hosted by InterPro) para obtener los dominios de las proteínas ortólogas de unión a oxisterol ingresando las secuencias de los genes de interés en formato FASTA. Los datos se obtuvieron en junio del año 2024.

8.1.5 IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS Y MOTIVOS CONSERVADOS

Para hacer la predicción de la estructura 3D, se ingresaron las secuencias de los genes de interés en formato FASTA a la página de Alpha fold (Alpha Fold Protein Structure Database) y las estructuras fueron trabajadas en PyMol versión 3.1 (PyMOL | pymol.org). Los datos se obtuvieron en junio del año 2024.

8.1.6 PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA 3D y DOCKING MOLECULAR

Inicialmente se obtuvieron las estructuras de las cuatro EhORPs el programa alpha fold, mientras que las estructuras del PI4P (Compound CID: 9547150, IUPAC Name: [(2R)-1-heptadecanoyloxy-3-[hydroxy-[(3S)-

2,3,5,6- tetrahydroxy-4-phosphonooxycyclohexyl]oxyphosphoryl]oxypropan-2-yl] (5Z,8Z,11Z,14Z)-icos 5, 8, 11,14-tetraenoate) y colesterol (Compound CID: 5997, IUPAC Name: (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R)-6-methylheptan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H- cyclopenta[a] phenanthre n-3-ol) se obtuvieron de la base de datos PubChem (PubChem). Para realizar el docking se utilizó el programa Seamdock (SeamDock) (Murail *et al.*, 2021) con un pH de 7.0, 37°C a 1.0 Å y los valores se expresaron en Kcal/mol⁻¹. Los datos se obtuvieron en octubre del año 2024. Las imágenes se visualizaron con Pymol.

8.1.7 PREDICCIÓN DE INTERACTOMAS

En cuanto al análisis de interacción proteína-proteína, se llevó a cabo a través del servidor STRING (versión 12) (<https://string-db.org>), ingresando el número de acceso de las proteínas de interés y seleccionando el organismo *E. histolytica*. Se establecieron como parámetros un puntaje de interacción de confianza media (0.400) como valor de corte y un número máximo de no más de 10 interactuantes. Para el análisis ontológico (GO) en función molecular y proceso biológico de las moléculas interactuantes, se utilizó el servidor PantherDB (<http://www.pantherdb.org>), donde se introdujo la lista de genes de interés.

8.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

8.2.1 CULTIVO CELULAR DE TROFOZOÍTOS

Se preparó y esterilizó el medio TYI (peptona 11.2 g, extracto de levadura 6 g, glucosa anhidra 5.22875 g, NaCl 1.14875 g, KH₂PO₄ 0.345 g, K₂HPO₄ 0.57375 g, L(+) Ácido ascórbico .0143625 g, L(+) Cisteína 0.7175 g, Citrato de amonio férrico 0.01425 g y agua bidestilada 500 mL, a un pH 6.8). Por otro lado, se inactivó el suero de adulto bovino a 56 °C y posteriormente se suplementó con vitamina Diamond y una mezcla de los antibióticos

penicilina y estreptomicina. El medio TYI se complementó con la mezcla descrita anteriormente. Los cultivos de trofozoítos se incubaron a 37°C con una inclinación de 65°.

8.2.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para extraer el ARN total, se despegaron las células de un cultivo confluyente al 85% y se observaron en el microscopio para verificar su morfología. Después, se centrifugaron a 17,000 g durante 5 min. Después se añadió 1 mL de trizol a la pastilla celular, se agitó por inversión y se dejó en hielo por 5 min. Pasado el tiempo se agregaron 200 µL de cloroformo. Se agitó por inversión y se incubó 3 min a temperatura ambiente (TA). Se dejó en hielo por 5 min. Después se volvió a centrifugar a 12,000 g por 15 min. Al finalizar, se pudo apreciar la separación de la fase orgánica con las proteínas y los ácidos nucleicos en la fase acuosa. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo para agregar 500 µL de isopropanol, se agitó por inversión y se incubó a TA por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 g por 20 min. Una vez terminado el tiempo se desechó el sobrante y se agregaron 500 µL de etanol al 75% y se agitó por inversión para lavar el ARN. Se volvió a centrifugar a 10,000 g por 10 min. Nuevamente se desechó el sobrante y se dejó abierto para dejar secar, posteriormente se añadieron 30 µL de agua libre de ARNasas para re suspender y se guardó a -20°C. La cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y la pureza se realizó midiendo la relación de las absorbancias a longitudes de onda 260/280 nm.

8.2.3 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Para validar la integridad del ARN, se prepararon geles de agarosa al 1.5% con Gelred (Tinción de ácidos nucleicos GelRed® X10000 DMSO, Sigma Aldrich). Después se corrió la electroforesis con buffer TAE al 0.5X a 80 V por 30 minutos y se observaron en el fotodocumentador con luz UV.

8.2.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE RT-PCR

Usando el ARN total de los trofozoítos, se realizó la RT-PCR con el kit de un solo paso de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor (Thermo Scientific), se usó la polimerasa Superscript IV para la transcripción reversa (RT) y el ADN polimerasa Platino SuperFi (ThermoFisher) para la PCR. La amplificación de los genes de interés se verificó mediante un gel después de la electroforesis de ácidos nucleicos correspondientes.

Tabla 3. Condiciones estandarizadas para la amplificación de ARNm de *ehorps*

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Transcripción reversa	45-60°C	10 minutos	1
RT Inactivación / desnaturalización inicial	98°C	2 minutos	
Amplificación	98°C	10 segundos	35-40
	55-72°C	10 segundos	
	72°C	30 segundos	
Extensión Final	72°C	5 min.	1

IX. RESULTADOS *in silico*

Se buscaron los genes codificantes para las proteínas putativas de unión a oxisterol y se encontraron cuatro con las características que se describen en la siguiente tabla, en esta tesis nombramos a estas proteínas como: EhORP1: EHI_086250, EhORP2: EHI_050360, EhORP3: EHI_074110 y EhORP4: EHI_023470.

Tabla 4. Genes codificantes para proteínas EhORPs

Número de acceso	Secuencia de referencia NCBI	Gen ID Amoeba DB	Anotación	Longitud	Intrón
<i>ehorp1</i>	XP_653103.1 XM_648011.1	3407410	Proteína de unión a oxisterol putativa	2097	2
<i>ehorp2</i>	XP_656568.1 XM_651476.2	3410884	Proteína de unión a oxisterol putativa	2176	1
<i>ehorp3</i>	XP_653552.1 XM_648460.1	3407863	Proteína de unión a oxisterol putativa	1473	-
<i>ehorp4</i>	XP_655624.1 XM_650532.1	3409941	Proteína de unión a oxisterol putativa	1233	-

9.1 IDENTIFICACIÓN DE PARÁLOGOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES

Esta familia de cuatro ORPs de *E. histolytica*, está clasificada en dos subgrupos de ortólogos según su homología de secuencia y organización de dominios: tres (*ehorp1*, *ehorp2* y *ehorp3*) pertenecen al grupo OG6_102132 mientras que *ehorp4* es única en el OG6_101238. Ambos grupos están relacionados con proteínas fijadoras de lípidos. En nuestro análisis, encontramos que el gen *ehorp2* coincide como parálogo con *ehorp3* y no se encontraron otros parálogos.

Para determinar la expresión basal de estos genes putativos, se buscó información de los transcriptomas en la base de datos ameba DB, donde encontramos que los transcritos por millón son de 11.5 (*ehorp1*), 15.65 (*ehorp2*), 51.81 (*ehorp3*) y 73.19 (*ehorp4*). Es decir, las proteínas citosólicas tienen mayor expresión basal que las proteínas de membrana (Shabardina *et al.*, 2018).

Estudiar los patrones de expresión de los genes en diferentes condiciones es fundamental para comprender mejor la biología de los parásitos y su relación con el huésped. En la base de datos AmoebaDB hay reportes de transcriptomas obtenidos por RNAseq de trofozoítos de *E. histolytica* durante el estrés oxidativo por adaptación a la Auranofina (Shaulov *et al.*, 2021), modelo de virulencia (Weber *et al.*, 2016), estrés por cambios de (Monrico *et al.*, 2020) y modelo de estrés por privación de suero durante 24h y después de 2h de su recuperación, los genes se cuantificaron (Naiyer *et al.*, 2019) (Fig. 11A). Por otro lado, también se analizaron los transcriptomas obtenidos por microarreglos reportados en la misma base de datos durante el modelo de cambios de estadíos y de enquistamiento cultivando los trofozoítos con el medio de Robinson (Ehrenkauf, *et al.*, 2007), también, pudimos registrar la expresión de los genes codificantes para las EhORPs durante el modelo murino de colonización e invasión intestinal durante 1 y 29 días (Gilchrist, *et al.* 2006) (Fig. 11B).

Con los datos de los transcriptomas, creamos los mapas de calor con el software Heatmapper (Babicki *et al.*, 2016) donde podemos ver que la expresión de las cuatro EhORPs durante las diferentes condiciones es bastante dinámica. En verde se observa la sobreexpresión de los genes, en rosa la regulación negativa de la expresión y en blanco, se muestra cuando no hay cambios en la expresión. Para visualizar mejor la función de cada uno de los genes, usamos la aplicación Jvarkit Toulouse; durante la adaptación al estrés oxidativo, participan EhORP1, EhORP2 y EhORP3. Durante la colonización e invasión de colon en modelo murino, se observan

cambios en la expresión de las cuatro EhORPs. En el modelo de enquistamiento, la dinámica en la expresión génica se observa en la EhORP1 y EhORP4; durante la transición de estadios, la actividad se mostró en la EhORP3 y EhORP4. EhORP2 participa en los eventos mencionados para EhORP1 y además, durante la privación del suero. Los trofozoítos mostraron cambios de expresión de EhORP2 durante la privación del suero y de EhORP4 en el modelo de virulencia (Fig. 10C).

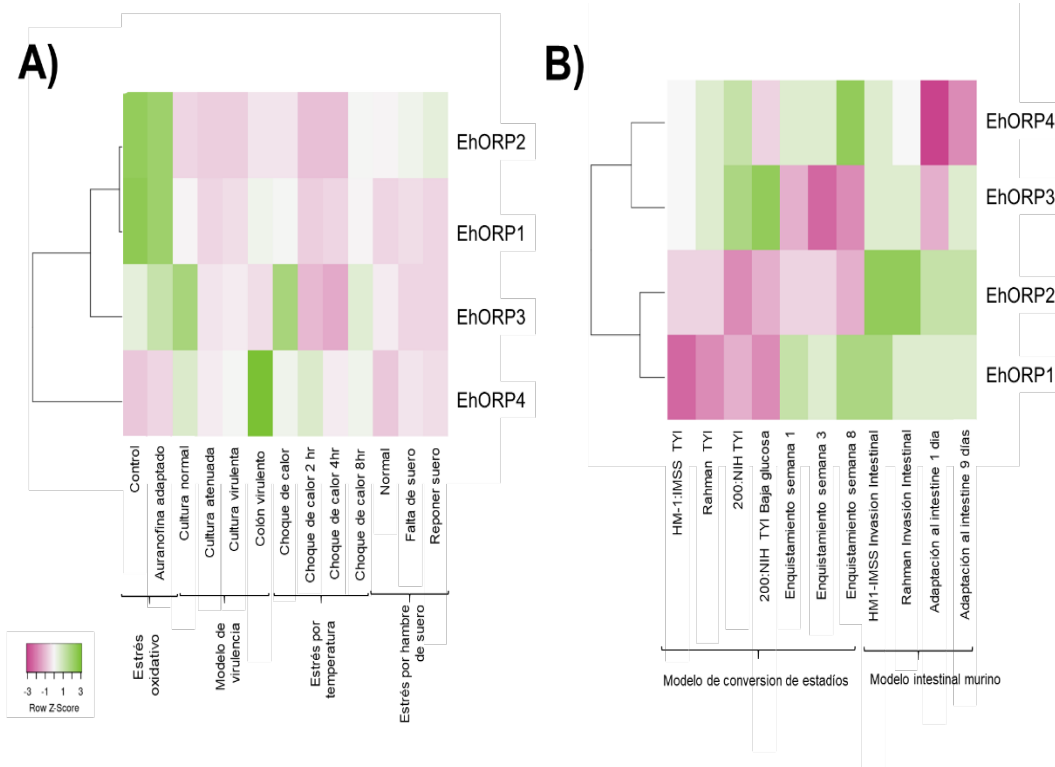




Figura 10. Las EhORPs se expresan de manera diferencial según las condiciones de cultivo en *E. histolytica*. A) Mapas de calor de datos transcriptómicos de condiciones de estrés oxidativo, de temperatura y de falta de suero y un modelo de virulencia. B) Microarreglos de trofozoítos en modelos murinos y durante la conversión de estadíos (AmoebaDB). C) Diagrama de Venn que muestra la expresión diferencial de los EhORPs.

Para los experimentos que se van a describir a continuación, se usaron las secuencias de aminoácidos reportados en AmoebaDB para cada una de las proteínas putativas de unión a oxisterol de *E. histolytica*.

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de las proteínas EhORPs

A) EhORP1
MSLQYQYPYFSFMALNPEIREKLPLTQIASIHEDLLNRSTMKGTILLRNEIVKQGFEEYIVITTPYLLI FESELKLNKMEYYAIVNLCDAILSRRESKLSGFCFKIEATNKTMCYKYGLCGEKLSRYHDNILVFR DENISRKGKEWYSQFENAFALAYTKYNSPSSHENKTPVQSPKIVAEPNVNPNSSSESVTIKETSSSS DIEDIVDVSLLDKKSTSHYVLAQNTLKEFFDATEEGKSIIWDLKQLRPGMDLGRISFP SHILEPR SFLVKTTDYFAHIQYFKPISEEPDPLRMLGLVKWLLSGFYLMPTGIKKPYNPILNETFRMTWKHE DGSRSYLVGEQVSHRPTISAFYATNRQQGWMGNGYIDFTTKFNGLSASIILGGKIDIYLLNFNEHY TMTFPEALASGFFVGPMLMEIAGKSVFECKETGYKAEVIFNVKGTFSDDKYQTVDAKITKNGEEV YKIWGNYYKELFYCGKDKVKKSLLKIDDIRGKSVPRYTIDMNQQGEWESDKLWKKVTD AIYKGD QITATEEKCKNEEKQRKMENEYLSTGTVHIPKYFVKDSFLGWKYVDFNNSKFNPDKELGDYEDK YHIKTLLEQNECIDDGKQIKEELLTSSSIETNNSPIITNKESNQLIDLKNELET LKNQLQYSIDSIQSS TSQYLHKQIEPLQRR LFIVILMNVALIGMLIYLLH
B) EhORP2
MSLQYQHPYLSFMALDPSIKKKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLNLRNVNICECSIHVRESKMPGF CFKIEALKKTLCYKHGLNGETLSKHNDLFLVFRNENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPTSTVR EQFDSSSKIKPSLPPKTFEMIKSTPYINVHSYNEEDIKVKPLSPSSLSQINALKTKQIEQIQVPEI KDTKKQKKEETLKEEKVINNSLQQSLSHYVLAQN DLKEFFDATEEGKSIIWELLKQVRPGMDLS RITFPSHILEPRSFVVKTTDYFAHIQYFKPISEEPDPLRMLGLVKWLLSGFYLMPTGIKKPYNPILG ETFRMTWKHEDGSRSYLLGEQVSHHPPVSAFYATNRQQGWMGNGYIDFTTKFNGLSASIILGG KIDIYLLNFNEHYTMTFPEALASGFFVGPMLMEIAGKSVFECKETGYKAEVIFNLRGTFSSDKYQ VDAKITKNGEEVYKIWGNYYKELFYCGKDKVKKSLLKIDDIRGKSVPRYTIDMNQQGKMESDKLW IKVTNAIYKGDQITATEEK CILEEAQREEVRKHESEGTVHIPKYFVKDSFLGWKYVDFNNSKFNPD KELGDYEDEYHIKPLLEQNDICIGDGKQVKEELLTSSNETNNSSETLKT DHQSSMNTQNSGDEKC KKVDELKEELNQVE ARIKNITFTQNQKTIDIIKQLKKFIVILLSINIVLIALVLKLLK
C) EhORP3
MTTPIRIDSDAIKQLHGTVVYVQEEKTQEFVDAMEKGDGKSIWEILKQLRPGMSLERITMPHVM EPRSLLEKLT DYFTHLDLVNAAANAPTAER MVKLVQFFLSGFYITPKACKKPYNPLLGEFYRTS WSHADGSKTFFIAEQTSHHPPVSSIYACNRQAGWVGTGSLDFVTTFNGLSASAGIQGLIKAKFTK FDEDYEWNFPMALVTGIYIPPLTMEIGGVLNFVCKQSGYKAKVEFKTMSMFSSSNYRQINGIISDP EGKPYEINGRYDEELFITDKRTKEKKSFFKVEELKKTKEQRLVREFDKLHPFESEKLFKRVSDAIK NDQNLAMEEK FVLEEAQRTQRKLNDEKKVEQERRLFDKQGS DHDWKYK WENWNKYDPETEG EELEIGGKIVTLKKNVLENERIKEILSDIPYPDWKEGEEPPHML ESFKLLDRYK KVEDNKDKEEE NKEDNKETEEKKEEAPINENDSLCPKAVVAKA
D) EhORP4
MSTATTSNPETERIMKKFSKYGEINEISQQYEPTPYKKVEAEPVAKDLWNNNIW EFAKGLSPGV DLTRIPFPVCITQARSFLQNFTDYFEHWNYLSLAANEDDPYKRAKLVAQWYLSGFAHAMKVVRK PYNPILGEVFRM WEDPKSKSKTHYIAEQVSHHPPISAFYVSNREDGWIGSGTITFSVSFYGVSA WAYLNGVQKIKLLKYDEEYTWAFPPTKASGFFVGP FIMEMGGVVEIRC NKNPYWASLDFKTTSM FSSANLYKEGKIMNGSKQVDTIQQQYFEKITLNNKETFFDAKNPPESPIRYEVPFENLWGKESQY VWQDLTKAVIKGDGQEAADKKYEVEEWQRQERIQDQKQ GKTYVPKFFEKVNDTTYKYL FYNEA PFQKGEEAYEMAGMIMSRRKQL

9.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ORTÓLOGOS

Se realizó una búsqueda con el ID de nuestras moléculas de interés, con el objetivo de identificar moléculas ortólogas en otras especies del género *Entamoeba*. En la tabla 6 mostramos que encontramos ortólogos en las especies de *Acanthamoeba castellanii* str. Neff, *Entamoeba dispar* SAW760, *Entamoeba invadens* IP1, *Entamoeba moshkovskii* Laredo, *Entamoeba nuttalli* P19. Se utilizaron los parámetros predeterminados por el software.

Tabla 6. Ortólogos para EhORPs

ORGANISMO	ID	ID	ID	ID
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	EhORP1	EhORP2	EhORP3	Ehorp4
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	ACA1_329470	ACA1_329470	ACA1_329470	ACA1_142130
<i>Entamoeba dispar</i> SAW760	EDI_249070	EDI_291100A	EDI_249070	EDI_2258 00
<i>Entamoeba invadens</i> IP1	EIN_275280	EIN_047360	EIN_047360	EIN_1529 90
<i>Entamoeba moshkovskii</i> Laredo	EMO_027000	EMO_027000	EMO_027000	EMO_101 900
<i>Entamoeba nuttalli</i> P19	ENU1_151500	ENU1_207470	ENU1_181930	ENU1_050460

9.1.2 ALINEAMIENTO DE ORTÓLOGOS

Para identificar el porcentaje de similitud de las proteínas EhORPs de ameba con sus ortólogas, realizamos los alineamientos entre las secuencias de aminoácidos (Fig. 11-14).

ACA1_329470-t26_1	-----	0
EIN_275280-t26_1	MSIQFYQYPYFTFLDLDYTVRRKLPATQLNTVHDDL VNRSSMSGLVLRTEI IKQWYEYV	60
EMO_027000-1	MALQYQHPYFNFMALDYSVKKKLPITQIVSIHDDL SNRTT MKGELL LRNEL TKQWYFV	60
ENU1_151500-t26_1	-----	0
EDI_249070A	-----	0
EhORP1	MSLQYQYPYFSFMALNPEIREKLP L TQIASIHEDLLNRSTMKG T I L LRNEIVKQGF EYI	60
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EIN_275280-t26_1	VLCAPYILIFENEKFRHKEYYAIINICNAVMSPRQSKMPGVCFKIEAVKVMCLKYGFF	120
EMO_027000-1	KITSPYILIFESEKMHNL EYYAIVNICDSTLSIRESKMPGFCFKIESTKKALCYKYGIS	120
ENU1_151500-t26_1	-----MEYYAIVNLCDAILSRRESKLSGFCFKIEATNKTMCKYKGLC	42
EDI_249070A	-----MEYYAIVNLCDAILSRRESKLSGFCFKIEATNKTMCKYKGLC	42
EHI_086250A	VITTPYLLIFESLKL NKMEYYAIVNLCDAILSRRESKLSGFCFKIEATNKTMCKYKGLC	120
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EIN_275280-t26_1	GEALSRHSEREILFRIENMNGKGDWFDQVQSAFSLSTTKFGNGEDG-----NPTPKVPP	174
EMO_027000-1	GETLSKHNESILVFRHENV TQGKEWYEEIQTAISLAVSKYKNPQPQISRESSDNLKSKP	180
ENU1_151500-t26_1	GEKLSRYHDN I LVFRDENISRGEWYSQFENAFALAYTKYNNPSAH IENKTIQSPKIV-	101
EDI_249070A	GEKLSRYHDN I LVFRDENISRGEWYSQFENAFV LAYTKYNSPSSH IENKTSIQSPKIVT	102
EHI_086250A	GEKLSRYHDN I LVFRDENISRGEWYSQFENAFALAYTKYNSPSSH IENKTPVQSPKIV-	179
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EIN_275280-t26_1	TLPPKNIVNNTLSDQSNLFSKSQDDIQVKSQRNRNSTSV DQSESVLPSQF GGL EQITRSE	234
EMO_027000-1	SLPPKPT ELNKSNRNS--L-----GEADQKEI IK-----	207
ENU1_151500-t26_1	---AEPNV---NPNS-----SEPVT-----	115
EDI_249070A	NMVT EPNV---NPNS-----SESIT-----	119
EHI_086250A	---AEPNV---NPNS-----SESVT-----	193
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EIN_275280-t26_1	SFDVKLQNSRNSEVPNVLDLLPLQKTPITKKPEEKVEVNT PPKSELKSPENKEEVL PQT P	294
EMO_027000-1	-----LTQSKST--SQLKT-----LTPEECASLSS-----	230
ENU1_151500-t26_1	-----I-----	116
EDI_249070A	-----I-----	120
EHI_086250A	-----I-----	194
ACA1_329470-t26_1	-----MDGKDGRKKDK----KHKKKDKDKKEIEEAMDQGGEEQQQI	37
EIN_275280-t26_1	QEVEKEEKEQNEKITTTETISNSKESTENVIEKLESSSHYVHAENDLKAFFDATEEGKSII	354
EMO_027000-1	-----SQKQIKQEGEVK----EWDNKVKDQSDKSLYVPAQNDLKEFFDATEEGKSII	280
ENU1_151500-t26_1	-----KEASSSSDIE----DIADVDSL LDKKSTSHYVLAQNTLKEFFDATEEGKSII	164
EDI_249070A	-----KETSSSSDIE----DIVDVDTLLDKKSTSHYVLAQNSLKEFFDASEEGKSII	168
EHI_086250A	-----KETSSSSDIE----DIVDVDSL LDKKSTSHYVLAQNTLKEFFDATEEGKSII	242
 : : : : * * : . *	
ACA1_329470-t26_1	EGTETEVRIGMDLSRVTLP TFILEPKSFLEKLTDFTHPDVMLSSVECQSPVERLVAITR	97
EIN_275280-t26_1	WDL LKQVRPGMDL SRI SFPSHILEPRSF LVKTTDYF SHIQMFEKISSEPDASRRML L LVS	414
EMO_027000-1	WDL LKQVRPGMDL SRI TFP SHILEPRSF LVKTTDYFAHIQYFKPISEEQDPGLRMLGLVK	340
ENU1_151500-t26_1	WDL LKQLRPGMDL-----	177
EDI_249070A	WDL LKQLRPGMDLGRISFP SHILEPRSF LVKTTDYFAHIQYFKPISEEPDPGLRMLGLVK	228
EHI_086250A	WDL LKQLRPGMDLGRISFP SHILEPRSF LVKTTDYFAHIQYFKPISEEPDPGLRMLGLVK	302
	. . : : * ****	

ACA1_329470-t26_1	WYLSGFYIRPKGVKKPYNPILGEIFRAQWDHGT-SKSFYVSEQVSHHPPVSFAFYASNRAV	156
EIN_275280-t26_1	WLLSGFYLMPTGIKKPYNPVLGETFRFTMWKHPDGTSHSYLIGEQVSHHPPISAFYASNRAQ	474
EMO_027000-1	WLLSGFYLMPTGIKKPYNPILGEIFRTMWNHEDGSHSYLLEGEQVSHHPPVSFAFYATNRQQ	400
ENU1_151500-t26_1	-----	177
EDI_249070A	WLLSGFYLMPTGIKKPYNPILNEFTRTMWKHEDGSRSYLLEGEQVSHRPTISAFYATNRQQ	288
EHI_086250A	WLLSGFYLMPTGIKKPYNPILNEFTRTMWKHEDGSRSYLVGEQVSHRPTISAFYATNRQQ	362
ACA1_329470-t26_1	GLAINGYINFRSKFMGSSAAIMDGEAVLYFLRIPGESYITTFPTAYARGILWGTLLEMEM	216
EIN_275280-t26_1	GWMGNGYIKFSTVFRGLSAGIILGGGIDIYLLKW-NEHYTMTFPEALASGFFVGPMLMEI	533
EMO_027000-1	GWMGNGYIEFSTKFNGLSASIIILGGKIDIYFLKY-NEHYTMTFPEALASGFFVGPMLLEI	459
ENU1_151500-t26_1	-----	177
EDI_249070A	GWMGNGYIDFTTKFNGLSASIIILGGKIDIYLLNF-NEHYTMTFPEALASGFFVGPMLMEI	347
EHI_086250A	GWMGNGYIDFTTKFNGLSASIIILGGKIDIYLLNF-NEHYTMTFPEALASGFFVGPMLMEI	421
ACA1_329470-t26_1	GGTVYITCEKTLQSEIEFKTKPYFGG-GYNYVAGKIKETSGKKTLYTISGKNDDEEIFI	275
EIN_275280-t26_1	AGKSTFNCKESGYSAEITFNTRGTFSDWKYQTVTGKITH---EGKEVYTVSGNYYKELFY	590
EMO_027000-1	AGKSLFECKETGYSAEIVNFVKGTFSDDKYQTVDAKITK---NGQDVYKVMGNYYKELYY	516
ENU1_151500-t26_1	-----VDAKITK---NGEEVYKIWGNYYKELFY	202
EDI_249070A	AGKSVFECKETGYKAEVIFNVKGTFSDDKYQTVDAKITK---NGEEVYKIWGNYYKELFY	404
EHI_086250A	AGKSVFECKETGYKAEVIFNVKGTFSDDKYQTVDAKITK---NGEEVYKIWGNYYKELFY	478
	* . * . * . : : : * . : * : : * . : *	
ACA1_329470-t26_1	KPADTKKDELLWDPK----NAPPKVTMDIRPLDKQDECESRRLWQHVSAAALRKNQDETAT	331
EIN_275280-t26_1	TGSDKVKKSLLDINKLKMEKGAERFTV--DKKTQGAFESDKLWEKVTEAIYKGDQKVAT	647
EMO_027000-1	CGKDKIKKSLLLKIEDIR-GKSVPRLTV--DLDKQGMESDKLWRKVTEAIYKGDQITAT	572
ENU1_151500-t26_1	CGKDKVKKSLLLKIDDIK-GKSVPRYTI--DMNQQGEWESDKLWKKVTDAIYKGDQITAT	258
EDI_249070A	CGRDKVKKSLLLKIDEIR-GKNVPRYTI--DMNQQGEWESDRLLWKNVTDAIYKGDQITAT	460
EHI_086250A	CGKDKVKKSLLLKIDDIR-GKSVPRYTI--DMNQQGEWESDKLWKKVTDAIYKGDQITAT	534
	* . * . * . : : : * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
ACA1_329470-t26_1	TEKCKIEDAQREAVRRREEEKETEYEVKYFEKDENGWVYKWNLEPFPLDELQWEEYEE	391
EIN_275280-t26_1	DEKCILEEQRERVRVNEINGTPYETKYFVADDTLGWKYVDFNPKQFN--SELEVCYEEK	705
EMO_027000-1	EKCKVLEEQRAEVKRHEAEGTVHMPNYFVKDEYLGWKYVDFNPKPFD--PIHELEDYEE	630
ENU1_151500-t26_1	EKCKNEEKQRNMESEYLSTGTVHIPKYFVRDSFLGWN-----	296
EDI_249070A	EKCKNEEKQKNMENEYLSTGTVHIPKYFVKDSFLGWKYIDFNNSKFN--PDKELGDYED	518
EHI_086250A	EKCKNEEKQRKMENEYLSTGTVHIPKYFVKDSFLGWKYVDFNNSKFN--PDKELGDYED	592
	*** * : * : : * . * . * . *	
ACA1_329470-t26_1	DCVIGARKK-----	400
EIN_275280-t26_1	DYHIKTLTKEDLMQQNVLKVEETPKNEVITSENTTSQCVSQITNEEKTECSTLVLGEQLL	765
EMO_027000-1	DYHIKTLTKDQNEENNEEKE-----NIDQQELI I KEELL	663
ENU1_151500-t26_1	-----	296
EDI_249070A	NYHIKTLLEQNECVDDGN-----QIKEE-----LL	544
EHI_086250A	KYHIKTLLEQNECIDDGK-----QIKEE-----LL	618
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EIN_275280-t26_1	TKEKEEKT--SVIVRNVS---VEDVEKIVEINVKQA---EKHLQNIIN---TQGDKNK	812
EMO_027000-1	TKKDDFRSENNFLLQSTPAISPIQFEPKIEEIQQELSKMENRIKTMVIDQ---NNKTS	719
ENU1_151500-t26_1	-----PIITNK-----ESNQLIELKNELETLRNQLQYSIDSISQSSSTQYIH	337
EDI_249070A	TSSIET--NNKPIITNK-----ESNQLIELKNELETLRNQLQCSINSIQSSTLQQIH	594
EHI_086250A	TSSIET--NNSPIITNK-----ESNQLIDLKNELETLRNQLQYSIDSISQSSSTQYVH	668

ACA1_329470-t26_1	-----	400
EIN_275280-t26_1	QGIDKISKRESTVILNVIIILVLLVILFIR-----	842
EMO_027000-1	ANIKQLKKFIATAIITINIVLLALIVKTMIN-----	749
ENU1_151500-t26_1	KQIEPLQRLLLVILMNSIGSSFELVAIKPMSDKVFVDACTSFQIDLITFNYPEQLPFR	397
EDI_249070A	KQIEPLQRLLLVILMNLVLSMLIYLLQ-----	624
EHI_086250A	KQIEPLQRRLFIVILMNVALIGMLIYLLH-----	698
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EIN_275280-t26_1	-----	842
EMO_027000-1	-----	749
ENU1_151500-t26_1	FHVPTLRTAMNRLFFEINLSPLLEESDQKQKQFCILNATDLITSTKGKNIILSSGATTN	457
EDI_249070A	-----	624
EHI_086250A	-----	698
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EIN_275280-t26_1	-----	842
EMO_027000-1	-----	749
ENU1_151500-t26_1	NGFKGTKDLIAMGIMLGLTTSQAYDAVVVNPMKCITRSRRRFPINSMISIE	508
EDI_249070A	-----	624
EHI_086250A	-----	698

Figura 11. Alineamiento de las secuencias ortólogas para EhORP1.

```

EDI_244000A ----- 0
EHI_074110A ----- 0
EIN_047360-t26_1 ----- 0
ACA1_329470-t26_1 ----- 0
EMO_027000-1 MALQYQHPYFNFMALDYSVKKKLPITQIVSIHDDLNRRTTMKGELLRLNELTKQWYNYFV 60
EDI_291100A MSIQYQHPYLSFMALDPSIKKKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLRLNELTKQWYFYFV 60
EhORP 2 MSLQYQHPYLSFMALDPSIKKKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLRLRN----- 49
ENU1_181930-t26_1 MSLQYQHPYLSFMALDPSIKKKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLRLRN----- 49

EDI_244000A ----- 0
EHI_074110A ----- 0
EIN_047360-t26_1 ----- 0
ACA1_329470-t26_1 ----- 0
EMO_027000-1 KITSPLYILIFESEKMHNLEYAIVNICDSTLSIRESKMPGFCFKIESTKKALCYKYGIS 120
EDI_291100A IVTTPYLLIFESEKMNKMYAIVNICCECSIHVRESKMPGFCFKIEAVKILCYKHGLY 120
EHI_050360A -----VNICCECSIHVRESKMPGFCFKIEALKKTLCKYHGLN 85
ENU1_181930-t26_1 -----VNICCECSIHVRESKMPGFCFKIEALKKTLCKYHGLN 85

EDI_244000A -----MKKEFIS-----SLE---- 10
EHI_074110A ----- 0
EIN_047360-t26_1 ----- 0
ACA1_329470-t26_1 ----- 0
EMO_027000-1 GETLSKHNESILVFRHENVTOGKEWYEEIQTAISLAVSKYKNPQPQISRESSDNLKSKP 180
EDI_291100A GETLSKHNDFLVFRDENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPINTLREQLDSSSKIKP 180
EHI_050360A GETLSKHNDFLVFRNENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPTSTVREQFDSSSKIKP 145
ENU1_181930-t26_1 GETLSKHNDFLVFRNENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPTSTVREQFDSSSKIKP 145

EDI_244000A -----LNNSLKEMKT-----RYFLFVIL-----WVISLGKECPAKKPIVFIPG 48
EHI_074110A -----MTTP-----IR---- 6
EIN_047360-t26_1 -----M---- 1
ACA1_329470-t26_1 -----MDGKD 5
EMO_027000-1 SLPPKPTLKNKSNRNS---LGEADQKEI IKLTQSKSTS QLKTLTPEECASLS-----S 230
EDI_291100A SLPPKAFVTKSTSNINLHSYNEEDLKKVKPLSPSSLSQINVLKAKQIEQVQHVHEIKD 240
EHI_050360A SLPPKTFEMIKSTPYINVHSYNEEDIKKVKPLSPSSLSQINALKTKQIEQIQVPEIKD 205
ENU1_181930-t26_1 SLPPKTFEMTKSTSYINVHSYNEEDIKKVKPLSPSNLSQINTLTKTKQIEQIQHVHEIKE 205

EDI_244000A -----ILASMLEGDI-----NIKDISKTPLP---EKCDTQVEYERLWVALKNVR 89
EHI_074110A -----IDSDAIKQLHGTVYVQEEKTQEFVDAMEKGDGKSI IWEILKQLR 51
EIN_047360-t26_1 -----FFFTSSDLLKATEYVSQSPKQDYIDAMEKDDGKSI IWEIVKQLR 46
ACA1_329470-t26_1 GRK-----KDKKHK-K-----KDKKDKEIEEAMDQ--GGEQQQIEGTETEV 45
EMO_027000-1 SQKQIKQEGEVKEVVDNKVKDQGSQSKSLYVPAQNDLKEFFDA--TEEGKSI IWDLLKQVR 288
EDI_291100A TKKQKQ--EEQFKEEKVVTTNNSLQQSLSHYVLAQNDLKEFFDA--TEEGKSI IWELLKQVR 297
EHI_050360A TKKQKQ--EETLKEEKGVINNSLQQSLSHYVLAQNDLKEFFDA--TEEGKSI IWELLKQVR 262
ENU1_181930-t26_1 TKKQKQ--EETLKEEKGVINNSLQQSLSHYVLAQNDLKEFFDA--TEEGKSI IWELLKQVR 262
. : . : . : . : *

EDI_244000A PLKNECS----- 96
EHI_074110A PGMSLERITMPTHVMEPRSLLEKLTDFTHLDLVNAAANAPTAERMVKLVQFFLSSGFYI 111
EIN_047360-t26_1 PGMSLDRVTLPTFILEPRSLLEKLTDFTHIELVNEAANLPTPEERFVKLVQFFLSSGFYV 106
ACA1_329470-t26_1 IGMDSLRTVTLPTFILEPKSFLKLTDFTHDPDVMLSSVECPVERLVAITRWYLSGFYI 105
EMO_027000-1 PGMDLSRITFPSSHILEPRSLVKTDDYFAHIQYFKPISEEPDGLRMLGLVKWLLSGFYL 348
EDI_291100A PGMDLSRITFPSSHILEPRSLVKTDDYFAHIQYFKPISEEPDGLRMLGLVKWLLSGFYL 357
EHI_050360A PGMDLSRITFPSSHILEPRSLVKTDDYFAHIQYFKPISEEPDGLRMLGLVKWLLSGFYL 322
ENU1_181930-t26_1 PGMDLSRITFPSSHILEPRSLVKTDDYFAHIQYFKPISEEPDGLRMLGLVKWLLSGFYL 322

EDI_244000A -----LGYLTPMWNSTSKEQ--IDIEGVNII SPKFGSTYACDEIDPNWPVVSIF 142
EHI_074110A TPKACKKPYNPLLGEFYRTSWSHADGSKTFFIAEQTSHHPPVSSIYACNRQ----- 162
EIN_047360-t26_1 NPKTKCKPYNPLLGEFYRTSWEHSDGSKSFFIAEQTSHHPPISSIYACNRK----- 157
ACA1_329470-t26_1 RPKGVKKPYNPLLGEIFRAQWDHGT-SKSFYVSEQVSHHPPVSAFYASNRA----- 155
EMO_027000-1 MPTGIKKPYNPLLGETFRMTMWNHEDGSHSYLLGEQVSHHPPVSAFYATNRQ----- 399
EDI_291100A MPTGIKKPYNPLLGETFRMTMWNHEDGSHSYLLGEQVSHHPPVSAFYATNRQ----- 408
EHI_050360A MPTGIKKPYNPLLGETFRMTMWNHEDGSHSYLLGEQVSHHPPVSAFYATNRQ----- 373
ENU1_181930-t26_1 MPTGIKKPYNPLLGETFRMTMWNHEDGSHSYLLGEQVSHHPPVSAFYATNRQ----- 373
* . : . : * . : . : * . : . : *

EDI_244000A AKCFHDLIKKFKKLGVDGDDMVGASYDWRYYRYGEYKHKRNWFEDTKELIINTYKNGK 202

```


EDI_244000A	-----	0
EHI_074110A	-----	0
EIN_047360-t26_1	-----	0
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EMO_027000-1	MALQYQHPYFNFMALDYSVKKKLPITQIVSIHDDLSNRRTMKGELLLRNELTKQWYFYV	60
EDI_291100A	MSIQYQHPYLSFMALDPSTKMKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLLLRNELTKQWYEFYV	60
EhORP2	MSLQYQHPYLSFMALDPSIKKKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLLLRN-----	49
ENU1_181930-t26_1	MSLQYQHPYLSFMALEPSIKKKMPLTQIVAIHDDLISRSTIRGTLLLRN-----	49
EDI_244000A	-----	0
EHI_074110A	-----	0
EIN_047360-t26_1	-----	0
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EMO_027000-1	KITSPYILIFESEKMHNLEYAIVNICDSTLSIRESKMPGFCFKIESTKKALCYKGIS	120
EDI_291100A	IVTTPYLLIFESEKMNKMEYYAIVNICECSIHVRESKMPGFCFKIEAVKKILCYKHGLY	120
EHI_050360A	-----VNICECSIHVRESKMPGFCFKIEALKKTLCKYKHGLN	85
ENU1_181930-t26_1	-----VNICECSIHVRESKMPGFCFKIEALKKTLCKYKHGLN	85
EDI_244000A	-----MKKEFIS-----SLE----	10
EHI_074110A	-----	0
EIN_047360-t26_1	-----	0
ACA1_329470-t26_1	-----	0
EMO_027000-1	GETLSKHNESILVFRHENVTQKGEWYEEIQTAISLAVSKYKNPQPQISRESSDNLKSKP	180
EDI_291100A	GETLSKHNDLFLVFRDENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPINTLREQLDSSSKIKP	180
EHI_050360A	GETLSKHNDLFLVFRNENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPTSTVREQFDSSSKIKP	145
ENU1_181930-t26_1	GETLSKHNDLFLVFRNENVIKGKEWFTQIENAI SLAITKYKTQPTSTVREQFDSSSKIKP	145
EDI_244000A	-----LNNSLKEMKT-----RYFLFVIL-----WVISLGKECPAKKPIVFIPG	48
EHI_074110A	-----MTP-----IR----	6
EIN_047360-t26_1	-----M-----	1
ACA1_329470-t26_1	-----MDGKD	5
EMO_027000-1	SLPPKPTLNKSNRNS----LGEADQKEI IKLTQSKSTSOLKTLTPEECASLS-----S	230
EDI_291100A	SLPPKAFEVTKSTSNINLHSYNEEDIKVKVPLSPSSLSQINVLKAKQIEQVQHVHEIKD	240
EHI_050360A	SLPPKTFEMIKSTPYINVHSYNEEDIKVKVPLSPSSLSQINALKTKQIEQIQVPEIKD	205
ENU1_181930-t26_1	SLPPKTFEMTKSTSYINVHSYNEEDIKVKVPLSPSSLSQINTLTKQIEQIQHVHEIKE	205
EDI_244000A	-ILASMLEGDI-----NIKDISKTPLP---EKCDTQVEYERLWVALKNVR	89
EHI_074110A	-----IDSDAIKQLHGTVYVQQEKTQEFVDAMEKGDGKSI IWEILKQLR	51
EIN_047360-t26_1	-----FPFTSSDLLKATEYVSQSPKQDY IDAMEKDDGKSI IWEIVKQLR	46
ACA1_329470-t26_1	GRK-----KDKKHK-K-----KDKKDEIEEAMDQ--GGEQQQIEGTETEVR	45
EMO_027000-1	SQKQIKQEGEVKEVVDNKVKDGGQSDKSLYVPAQNDLKEFFDA--TEEGKSI IWDLLKQVR	288

EHI_050360A	WIKVTNAIYKGDQITATEEKCILEEAAQREEVKRHESEGTVHIPKYFVKDS-FLGWKYVDF	588
ENU1_181930-t26_1	WIKVTNAIYKGDQITATEKCILEEAAQREEVKRHEAEGTVHIPKYFVKDS-FLGWKYVDF	588
	: : . . : : . . :	
EDI_244000A	-----ENESYSDSKLLYGDGETVNLNSL-EFCKNIGATTFKNLGKYTHTGIL	413
EHI_074110A	NWNK--YDPETEGEREELEIGGKIVTLKKNVLENEERIKELSDI-----PYPDWKEG	429
EIN_047360-t26_1	NWNV--YDETTEGEEIEVGGKLVTLKKGESLNEERIIEIVKDV-----PYVDWEID	423
ACA1_329470-t26_1	NLEPFPLDELQWEEYEEDCVIGARKK-----	400
EMO_027000-1	NNKP--FDPITHELEDYEEDYHIKTLTKDQENNEEKENIDQQE-----LIIKEELL	663
EDI_291100A	NNSK--LNPDKELGDYEDEYHIKTLKQSECINDGKQLKEEV-----L	665
EHI_050360A	NNSK--FNPDKELGDYEDEYHIKPLLKEQNCIGDGKQVKEEL-----L	630
ENU1_181930-t26_1	NNSK--LNPDKELGDYEDEYHIKTLKQNECIDDGKQVKEEL-----L	630
	: . : :	
EDI_244000A	DDKASYE-----SVYPYVCN-----	428
EHI_074110A	EEPPH-----MLESFKFLLDRYKKVEDNKKDEEENKEDNKETEKKKEEAPIN	476
EIN_047360-t26_1	QEPPH-----IMKSFRFLLEDDTNKKNKSDGVSIL-----	452
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EMO_027000-1	TKKDDFRSENNFILQSTPAISPI---QFEPKIEEIQ--QELSKM-----ENRIKTMVID	713
EDI_291100A	TSSIE TNNSERLKNDCQGNISTQNFVDEKYKKVDELK--EELNQV----EARIKNITFT	718
EHI_050360A	TSSNETNNSETLKTDRQSSMNTQNSGDEKCKKVDLQVDELK--EELNQV----EARIKNITFT	683
ENU1_181930-t26_1	TSSIESNNSETLKTDRQSSMITQNSGDEKCKKVDLQVDELK--EELNQV----EARIKNITFT	683
EDI_244000A	-----	428
EHI_074110A	ENDSLCP-----K-----AVVAKA---	490
EIN_047360-t26_1	-----	452
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EMO_027000-1	QNNKTSANIKQLKKFIAIAIIINIVLLALIVKTMIN	749
EDI_291100A	QNQKTIDMIKQLKKFIVILLSVNIILIALVLKLLK	754
EHI_050360A	QNQKTIDMIKQLKKFIVILLSINIVLIALVLKLLK	719
ENU1_181930-t26_1	QNQKTIDMIKQLKKFIVILLSINVVLIALVIKLLK	719

Figura 12. Alineamiento de las secuencias ortólogas para EhORP2

EIN_047360-t26_1	GVTASAGIEGTIHAKFTKY-NEDYTNFNSAIVGGLYIPPLVMEIGGELNFEICIQSKYKA	232
EHI_074110A	GLSASAGIQGLIKAKFTKF-DEDYEWNFPMALVTGIYIPPLTMEIGGVLNFVCKQSGYKA	237
ENU1_050460-t26_1	GLSASAGIQGLIKAKFTKF-DEDYEWNFPMALVTGIYIPPLTMEIGGVLNFVCKQSGYKA	237
ACA1_329470-t26_1	GNSSAAIMDGEAVLYFLRIPGESYITIFPTAYARGILWGTLLMEMGGTVYITCEKTLGLQS	231
EDI_249070A	GLSASIIILGGKIDYFLNF-NEHYTMTFPEALASGFFVGPMLMEIAGKSVFECKETGYKA	362
EMO_027000-1	GLSASIIILGGKIDYFLNF-NEHYTMTFPEALASGFFVGPMLLEIAGKSLFECKETGYSA	474
	* : : : : * : . . . * * . * * . * : : : * : . * : * : : . :	
EIN_047360-t26_1	TVLFKTKPFFGDDGFRIDGTVYSP--KGDKIMKIVGKYDKELFITDLRTGITKSFFNVD	290
EHI_074110A	KVEFKTMSMFSSSNYRQINGIISDP--EGKPIYEINGRYDEELFITDKRTKEKKSFFKVE	295
ENU1_050460-t26_1	KVEFKTMSMFSSSNYRQINGIISDP--EGKPIYEINGRYDEELFITDKRTKEKKSFFKVE	295
ACA1_329470-t26_1	EIEFKTKPYFGGG-YNYVAGKIKETSQKKTLYTISGKWDEEIEFKPA-DTKKDELWDP	289
EDI_249070A	EVI FNVKGT FSSDKYQTVDAKITK--NGEEVYKIWGNYYKELFYCGR-DKVKKSLKID	418
EMO_027000-1	EVNFNVKGT FSSDKYQTVDAKITK--NGQDVYKVGNYKELYCGK-DKIKKSLKIE	530
	: * : . * . . . : . . . : . . . : * : : * : : : :	
EIN_047360-t26_1	ELKKTEERKVRREKLPFSEKLFKRVSDAIINNDQEKAMKEKFLVEEAQRAEKKLN	350
EHI_074110A	ELKKTKEQRLVREFDKLHPFSEKLFKRVSDAIKNDQNLAMEEKFLVEEAQRTQRKLN	355
ENU1_050460-t26_1	ELKKTKEQRLVREFDKLHPFSEKLFKRVSDAIKNDQNLAMEEKFLVEEAQRTQRKLN	355
ACA1_329470-t26_1	KNAPPKVTMDIRPLDKQDECSRRLWQHVSAALRKNQDETATTEKCKIEDAQREAVRRRE	349
EDI_249070A	EIRGKNVPRYTIMNQQGEWESDRLWKNVTDIYKGDQITATEEKCKNEEKQKNMENEYL	478
EMO_027000-1	DIRGKSVPRLTVDLQKQKMSDKLWRKVTEATYKGDQITATEEKCVLEEAQRAEVRKHE	590
	. . . : : * * : * : * : * : * : * * * * * * * * * * * * :	
EIN_047360-t26_1	DNGTEHVTKLFKKDE-FGVYRYKWNWVNY--DETTEGEEIEVGGKLVTLKKGESLNEER	407
EHI_074110A	EKKVEQERRLFDKQGSDDHWYKWNWVNY--DPETEGERLEIGGKIVTLKKNNEVLNEER	413
ENU1_050460-t26_1	EKKVEQERRLFDKQGSDDHWYKWNWVNY--DPETEGERLEIGGKIVTLKKNNEVLNEER	413
ACA1_329470-t26_1	EETKTYEVKYFEKDE-NGGWYKWNLEPPFLDELQWEEYEDCVIGARKK-----	400
EDI_249070A	STGTVHIPKYFVKDS-FLGWKYIDFNNSKF--NPKDELGDYEDNYHIKTLLEKQNECVDD	535
EMO_027000-1	AEGTVHVPNYFVKDE-YLWGWYVDFNNKPF--DPIHELEDYEDYHIKTLLEKQNEENEE	647
	. * * : : * * . : : : : * . : : * :	
EIN_047360-t26_1	IIEIVKDVPPYVDWEIQDEPPHIMKSRFLLEDNTNKNKSDGVSIL-----	452
EHI_074110A	IKEILSDIPYPDWKEGEEPPHMLSEFKFLLDRYKKVEDNKDKEENKE-DNKETEEKKEE	472
ENU1_050460-t26_1	IKEILSDIPYPDWKEGEEPPHMLSEFKFLLDRYKKVEDNKDKEENKEENKETEKKKEE	473
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EDI_249070A	GNQIKEE-----LLTSSIET--NNKPIITNK-----ESNQLIELKNE	570
EMO_027000-1	KENIDQQELIIEKELLTKKDDFRSENNFLLQSTPAIS-----PI--QFEPKIEEIQQE	699
EIN_047360-t26_1	-----	452
EHI_074110A	APINENDSLCPKAVVAKA-----	490
ENU1_050460-t26_1	TPTNENDSLCPKAVVAKA-----	491
ACA1_329470-t26_1	-----	400
EDI_249070A	LETLRNQLQCSINSIQSSTLQQIHKQIEPLQRRLLVVILMNLVLSMLIYLLLQ	624
EMO_027000-1	LSKMENRIKTMVID---QNNKTSANIKQLKKFIAIAIINIVLLALIVKTMIN	749

Figura 13. Alineamiento de secuencias ortólogas para EhORP3.

EDI_244000A	-----MKKEFISSL	9
ACA1_142130.R501	MEGQQGGGDGAVEDVARDIERFQLSGEGGYQPQRGSASDAPHAAPTGVELQRRIFTHNK	60
EIN_152990-t26_1	-----MSQPTLSDAQKAIL--GKFSGYE	21
EMO_101900-1	-----MSTPTSKPDAEKIL--KKFSKYG	21
EDI_225800A	-----MSTTSSNPETERIM--KKFSKYG	22
EHORP4	-----MSTATTSNPETERIM--KKFSKYG	22
ENU1_207470-t26_1	-----MSTATTSNPETERIM--KKFSKYG	22
	*	
EDI_244000A	ELNN-----SLKEMKTRYFLFVILWVLSLGKECPAKKPIVFIGILASMLEG	56
ACA1_142130.R501	PHSSGGLQWVD-----EVELKKQRSVAVDVLKQLG-----QN	92
EIN_152990-t26_1	THHEITQQYEDTPYKKTTEPPAKDLWNNNIWEFA-----KG	59
EMO_101900-1	DINEITQQLEPTPYEKVEGEPQAKDLWNNNIWEFA-----KG	59
EDI_225800A	EINEISQQYEPTPYKKEAEPVAKDLWNNNIWEFA-----KG	60
EHI_023470A	EINEISQQYEPTPYKKEAEPVAKDLWNNNIWEFA-----KG	60
ENU1_207470-t26_1	EINEISQQYEPTPYKKEAEPVAKDLWNNNIWEFA-----KG	60
	. : : : .	
EDI_244000A	DINIKDISKTPLPEKCDTQ-----VEYERLWVALK----NVRPLKNECSLGYLTPMW	104
ACA1_142130.R501	I LEGKDLTKIALPVYLFEPFRSFLERLADGFSFAPHFLRKAFAKDALER---LK-YVIAF	148
EIN_152990-t26_1	LSPGMDLTKIPFPVCITQARSFLQNF TDYFEHW-NL ISKAANEDDPYKR---MK-LVTQW	114
EMO_101900-1	LSPGMDLTRIPFPVCITQARSFLQNF TDYFEHW-NYLSQAANEDDPYKR---IK-LMAQW	114
EDI_225800A	LSPGVDLTRIPFPVCITQARSFLQNF TDYFEHW-NYLSLAANEDDPYKR---TK-LVAQW	115
EHI_023470A	LSPGVDLTRIPFPVCITQARSFLQNF TDYFEHW-NYLSLAANEDDPYKR---AK-LVAQW	115
ENU1_207470-t26_1	LSPGVDLTRIPFPVCITQARSFLQNF TDYFEHW-NYLSLAANEDDPYKR---AK-LVAQW	115
	* : : : * : : : *	
EDI_244000A	NSTSKEQIDIEGVNIIISPKFGSTY-----ACDEIDPNWPVSI FAKCFHDL	149
ACA1_142130.R501	SVAGL-HLTATQKPFNPILGETHQAFFEDG-----TAVYCEQSSHPPASNFQV-----	197
EIN_152990-t26_1	YLSGF AHAMKVVRKPYNPILGEVFRCMWQNTGSKTHYIAEQVSHHPPISSFYV-----	169
EMO_101900-1	YLSGF AHAMKVVRKPYNPILGEVFRCMWEDPKTGSKTHYVAEQVSHHPPISAFYI-----	169
EDI_225800A	YLSGF AHAMKVVRKPYNPILGEVFRCMWEDPKSKSKTHYIAEQVSHHPPISAFYV-----	170
EHI_023470A	YLSGF AHAMKVVRKPYNPILGEVFRCMWEDPKSKSKTHYIAEQVSHHPPISAFYV-----	170
ENU1_207470-t26_1	YLSGF AHAMKVVRKPYNPILGEVFRCMWEDPKSKSKTHYIAEQVSHHPPISAFYV-----	170
	: . : : : * : * . . : : : * * *	
EDI_244000A	IKKFKKLG YVDGDMVGAS YDWRYYRYGEYKHKRNWFEDTKELII-----NTYNKYGKVV	204
ACA1_142130.R501	-----LPP-----DDAYRLYGF G I F --SAHWKGNVIHGLQKGNLVEFPADGTII	240
EIN_152990-t26_1	-----TNR-----EDGWVGYGT V T F --SVSYGVSAWAYLNGNHKIKLLKYDEEY	212

EMO_101900-1	-----SNR-----	EDGWVGTGTVTF--SVSFYGVSAWAYLHGVTVKLLKYGEEY	212
EDI_225800A	-----SNR-----	EDGWIGSGTITF--SVSFYGVSAWAYLNGVQKIKLLKYDEEY	213
EHI_023470A	-----SNR-----	EDGWIGSGTITF--SVSFYGVSAWAYLNGVQKIKLLKYDEEY	213
ENU1_207470-t26_1	-----SNR-----	EDGWIGSGTITF--SVSFYGVSAWAYLNGVQKIKLLKYDEEY	213
	. : . : .	.	
EDI_244000A	VIS---	HSMGGLMFYKFLDYVGKE--FADKYIDNWIAMSTPFLGSGKAIAAFPGNLGL	259
ACA1_142130.R501	SIELPHAI	FKGLIWGDRIQDYGGSITFTDKKNDLACELT--FEAPGW-ASWFST-----	292
EIN_152990-t26_1	TWCFPP	TKASGFFVGPFIEMGGVVTIKNNKNDYWANLD--FKTSSM-----	257
EMO_101900-1	TWSFP	TKASGFFVGPFIEMGGVVKLKCDKNPYWATFD--FKTTGM-----	257
EDI_225800A	TWAFPP	TKASGFFVGPFIEMGGVVEIKCNKNPYWASLD--FKTSSM-----	258
EHI_023470A	TWAFPP	TKASGFFVGPFIEMGGVVEIRCNNKNPYWASLD--FKTSSM-----	258
ENU1_207470-t26_1	TWAFPP	TKASGFFVGPFIEMGGVVEIRCNNKNPYWASLD--FKTSSM-----	258
	*:: : * : . : * .		
EDI_244000A	PISGDKLRPF	ARRTETVALLPIGGTKIFGEEILMKIKSTGKTYNADQIEELIKTLDDKE	319
ACA1_142130.R501	PKH-----	PSDWLSGAIY--RMSRTRTKNKKDVL--A-----K	320
EIN_152990-t26_1	-----	FSSANLY--KVEGKIMQKDTIV--D-----T	279
EMO_101900-1	-----	FSSNLY--KVEGKIMNGNKQV--D-----S	279
EDI_225800A	-----	FSSANLY--KVEGKIMNGSKQV--D-----T	280
EHI_023470A	-----	FSSANLY--KVEGKIMNGSKQV--D-----T	280
ENU1_207470-t26_1	-----	FSSANLY--KVEGKIMNGSKQV--D-----T	280
	: . : : : : .		
EDI_244000A	FQENYLHTVQ	HGMKELY-----EKYNYKLPFPIKMHCMISSGYESIKGVEMENES	369
ACA1_142130.R501	VEGSWL	SHVDVVGKRYWDLKEVAPMSIRPADNPLPS-----DCRY	360
EIN_152990-t26_1	LQGQY	FEKIFI--GKEIFLDAKVPPEP--PTRYEVPEDEK-----LWGKESQYVW	324
EMO_101900-1	IQGQY	FERIMI--NKDILFDAKNPPEP--PIRYEVPFDK-----LWGKESQYIW	324
EDI_225800A	IQGQY	FEKITLNNKDTFFDAKNPPEP--PIRYEVPFEN-----LWGKESQYVW	326
EHI_023470A	IQGQY	FEKITLNNKETFFDAKNPPEP--PIRYEVPFEN-----LWGKESQYVW	326
ENU1_207470-t26_1	IQGQY	FEKITLNNKETFFDAKNPPEP--PIRYEVPFEN-----LWGKESQYVW	326
	. : . : : * : *	.	
EDI_244000A	YSDSKLLY	GDGETVNLNS-----LEFCKNIGATTFKN----	403
ACA1_142130.R501	REDLQ	ALLRGDEEEAQRLLKVKLEEKQRREARLRDEGEAAARAKR-----	404
EIN_152990-t26_1	KDLTAA	VVKGDDGQDASDKKWEVEEWQRLEQE--NERKQVVKPRFFFEKVNDETYHYIYAN	383
EMO_101900-1	QDLTKA	VIKGDGQEAADKKYEVEEWQRLEQE--DEKHNNKFTPRFFEKVNDETYRYLFYN	383
EDI_225800A	QDLTKA	VIKGDGQDAADKKYEVEEWQRQERIQ--DQKQGKIYVVPKFFEKVNDDTTYKLYFYN	385
EHI_023470A	QDLTKA	VIKGDGQEAADKKYEVEEWQRQERIQ--DQKQGKIYVVPKFFEKVNDDTTYKLYFYN	385
ENU1_207470-t26_1	QDLTKA	VIKGDGQEAADKKYEVEEWQRQERIQ--DQKQGKIYVVPKFFEKVNDDTTYKLYFYN	385
	: : * * : : :	.	
EDI_244000A	-----	LGKYTHGTGILDDKASYESVYPPVCN	428
ACA1_142130.R501	----	SRGDKGAK-----	412
EIN_152990-t26_1	EAPF	SKGEEEFEMAGMIMSRKK-----	407
EMO_101900-1	EAPF	QKGEEEAAYEMAGMIMSRKKQ-----	408
EDI_225800A	EAPF	QKGEEEAAYEMAGMIMSRKKQL-----	410
EHI_023470A	EAPF	QKGEEEAAYEMAGMIMSRKKQL-----	410
ENU1_207470-t26_1	EAPF	QKGEEEAAYEMAGMIMSRKKQL-----	410

Figura 14. Alineamiento de las secuencias ortólogas para EhORP4

9.1.3 CLADOGRAMAS DE PROTEÍNAS EhORPs

Para analizar las relaciones evolutivas de estas las proteínas ORP en el grupo de protozoarios Amoebozoa se obtuvo un cladograma (Fig. 15) para cada una de las 4 proteínas EhORP de *E. histolytica* y miembros del género *Entamoeba* como *E. dispar*, *E. invadens*, *E. nutalli* y *E. moshkovskii*. También se incluyeron la secuencia identificada para *Acanthamoeba*.

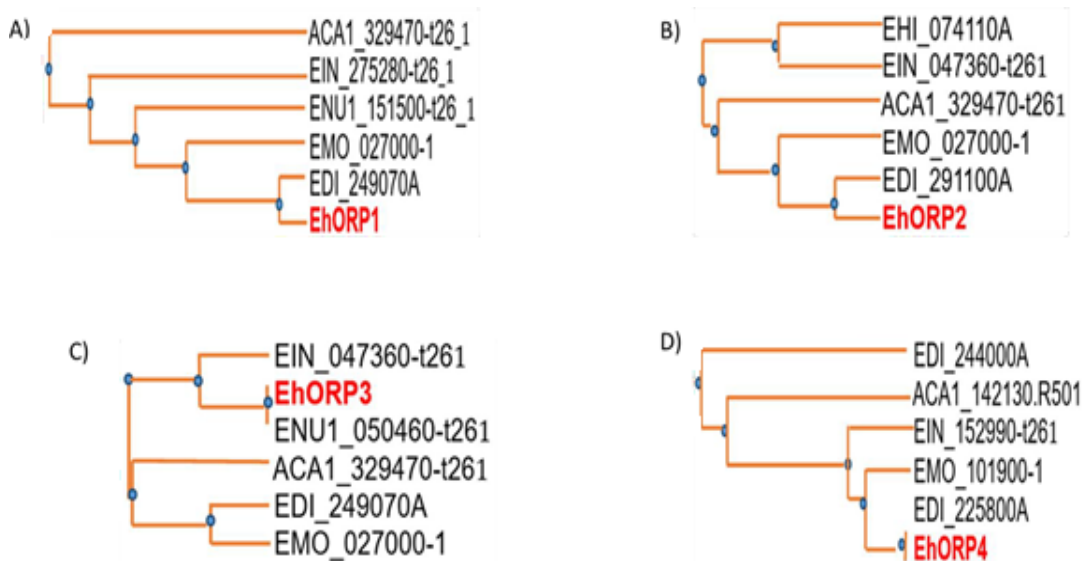


Figura 15: Cladogramas de las proteínas EhORPs: Se indica en cada cladograma la primera proteína en la evolución: A) Cladogramas de proteínas ortólogas representativas con dominio de unión a oxisterol, en rojo la molécula que se usó como blanco.

9.1.4 PORCENTAJE DE SIMILITUD ENTRE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS

Posteriormente, identificamos el porcentaje de identidad de otras proteínas con las proteínas ortólogas de unión a oxisterol del género *Entamoeba* (Figura 16).

A)								B)							
ID	%	%	%	%	%	%	%	ID	%	%	%	%	%	%	%
ACA1_329470-t26_1	100.00	39.39	31.33	41.86	38.50	38.76	41.11	EHI_074110A	100.00	65.04	37.24	39.11	39.07	38.85	39.07
EIN_275280-t26_1	39.39	100.00	47.31	56.85	57.40	58.36	66.32	EIN_047360-t26_1	65.04	100.00	36.46	38.46	38.72	37.59	38.27
ENU1_151500-t26_1	31.33	47.31	100.00	51.79	87.19	90.63	95.65	ACA1_329470-t26_1	37.24	36.46	100.00	41.79	41.12	40.61	40.36
EMO_027000-1	41.86	56.85	51.79	100.00	64.03	64.70	73.06	EMO_027000-1	39.11	38.46	41.79	100.00	69.10	68.70	68.56
EDI_249070A	38.50	57.40	87.19	64.03	100.00	94.52	97.67	EDI_291100A	39.07	38.72	41.12	69.10	100.00	92.21	92.21
EhORP1	38.76	58.36	90.63	64.70	94.52	100.00	100.00	EhORP2	38.85	37.59	40.61	68.70	92.21	100.00	96.11

C)								D)							
ID	%	%	%	%	%	%	%	ID	%	%	%	%	%	%	%
EIN_047360-t26_1	100.00	65.04	65.27	35.55	37.26	39.41	EDI_244000A	100.00	17.83	17.61	18.21	17.49	18.15	18.15	
EhORP3	65.04	100.00	99.18	37.08	37.89	38.94	ACA1_142130R501	17.83	100.00	25.92	25.35	24.65	25.21	25.21	
ENU1_050460-t261	65.27	99.18	100.00	37.08	38.33	39.07	EIN_152990-t26_1	17.61	25.92	100.00	76.41	76.66	76.66	76.66	
ACA1_329470-t26_1	35.55	37.08	37.08	100.00	38.11	42.20	EMO_101900-1	18.21	25.35	76.41	100.00	84.07	83.82	83.82	
EDI_249070A	37.26	37.89	38.33	38.11	100.00	63.87	EDI_225800A	17.49	24.65	76.66	84.07	100.00	98.29	98.29	
EMO_027000-1	39.41	38.94	39.07	42.20	63.87	100.00	EhORP4	18.15	25.21	76.66	83.82	98.29	100.00	100.00	

Figura 16. Porcentaje de identidad entre proteínas ortólogas de unión a oxisterol. En rojo se resaltan el porcentaje y el número de acceso de cada una de las EhORPs que se usaron como blanco. Los datos se obtuvieron con Clustal Omega.

Una vez que analizamos los genes codificantes para las proteínas de unión a oxisterol, procedimos a evaluar con diferentes herramientas bioinformáticas las características fisicoquímicas de las proteínas de unión a oxisterol de *E. histolytica*, así como su estructura 3D y sus funciones. Encontramos que las cuatro proteínas presentan puntos isoeléctricos entre 5,3 y 8.69. Las dos proteínas de membrana contienen el motivo FFAT con la secuencia EFFDATE y se ha reportado que está presente en proteínas ancladas al retículo endoplasmático. Únicamente EhORP1 contiene un dominio PH-like, a diferencia del reporte de Das y colaboradores en 2018 que encontraron

este dominio en las dos moléculas transmembranales, esto puede deberse a la actualización constante en la base de datos de los genomas. También, encontramos que las cuatro proteínas presentan en dominio conservado EQVSHHPP de los ORD (Fig. 18 y Tabla 4). Todos estos datos muestran que son moléculas altamente conservadas dentro de la familia de las ORPs de eucariontes, y a su vez, son divergentes en *E. histolytica*, por lo que podrían estar involucradas en diferentes procesos celulares.

Tabla 7. Características fisicoquímicas, dominios y números de acceso de las proteínas EhORPs

ID de Transcripción	Identificador	Punto isoelectrico	Peso molecular daltones	Localización del dominio de Membrana	Motivo conservado	Localización del dominio ORD	Localización del dominio de PH	Localización del motivo FFAT EFFDATE	Longitud a
EhORP1	C4M380	6,69	80766	677-697	EQVSH RPT	177-556	38-154	230-236	698
EhORP2	C4LTR1	8,69	82703	698-718	EQVSH HPP	102-578	-	241-248	719
EhORP3	C4M300	5,3	56894	-	EQTSH HPP	33-384	-	-	490
EhORP4	C4LUQ6	6,97	47700	-	EQVSH HPP	48-382	-	-	410

9.1.5 DOMINIOS DE UNIÓN A OXISTEROL DE LAS EhORPs

Para analizar la estructura de estas moléculas, buscamos los dominios analizando las secuencias de aminoácidos con el programa Pfam encontrando el dominio de unión a oxisterol, el dominio de PH, el dominio transmembrana, así como el motivo FFAT y el motivo conservado de ORD (Fig. 17).

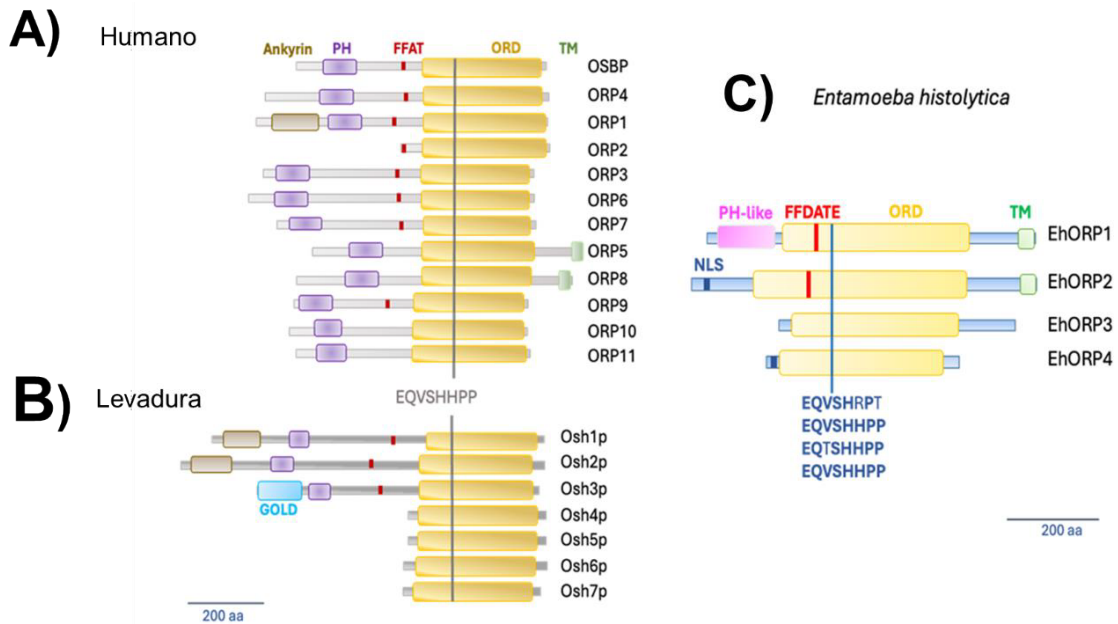


Figura 17. Estructura de las proteínas putativas ORPs de *E. histolytica*:

En color azul se muestra la longitud de la proteína, el amarillo representa el dominio de unión a oxisterol (ORD). La línea azul representa la señal de localización nuclear (NLS). El dominio PH de color naranja, de color verde se encuentra el dominio transmembranal TM. La línea roja representa el motivo FFAT y la línea negra larga indica la alineación del motivo conservado del ORD.

9.1.6 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS EhORPs

La estructura 3D se obtuvo en alpha fold y se visualizó con Pymol (Fig. 18). Los ensayos de acoplamiento se realizaron con el software Seamdock con ligandos lipídicos de PI4P y colesterol (Fig. 18).

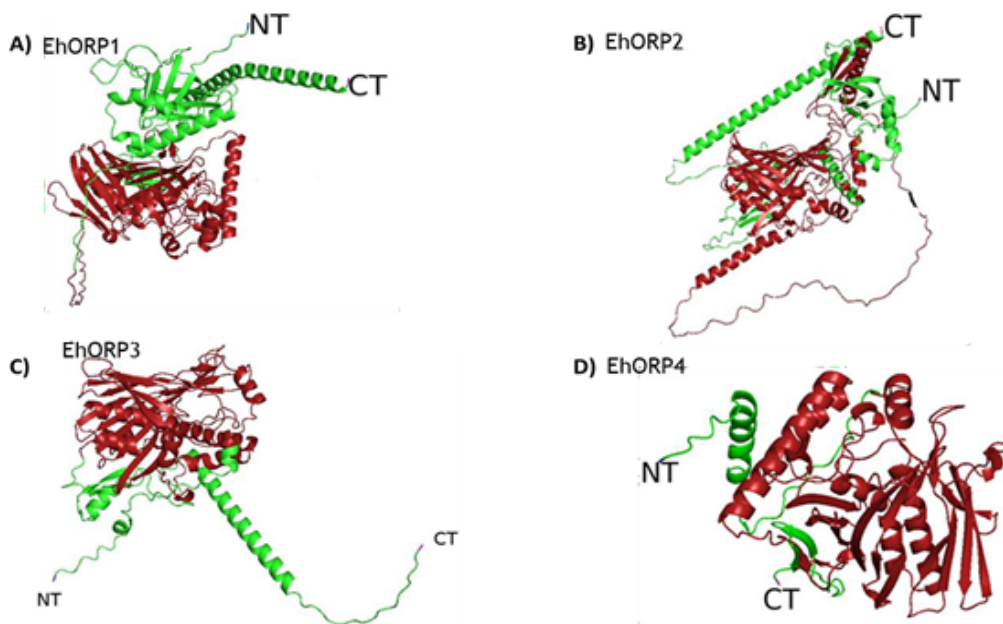


Figura 18: Estructuras 3D de las proteínas EhORPs. En rojo se indican los dominios de unión a oxisterol. Extremo amino (NT) y extremo carboxilo (CT).

9.1.7 DOCKING MOLECULAR

Para determinar si el PI4P y el colesterol son ligandos para las EhORPs como sucede en otros eucariontes, realizamos con el apoyo del Dr. Israel Canela los ensayos de acoplamiento molecular (docking) con el software Seamdock (Fig. 19) y encontramos que, en las cuatro moléculas, la unión con el colesterol es más estable (-7.3 a 8-1 Kcal/mol), aunque existen mayores puntos de unión con el PI4P (-5.6 a 6.7 Kcal/mol), como se observa en las tablas complementarias.

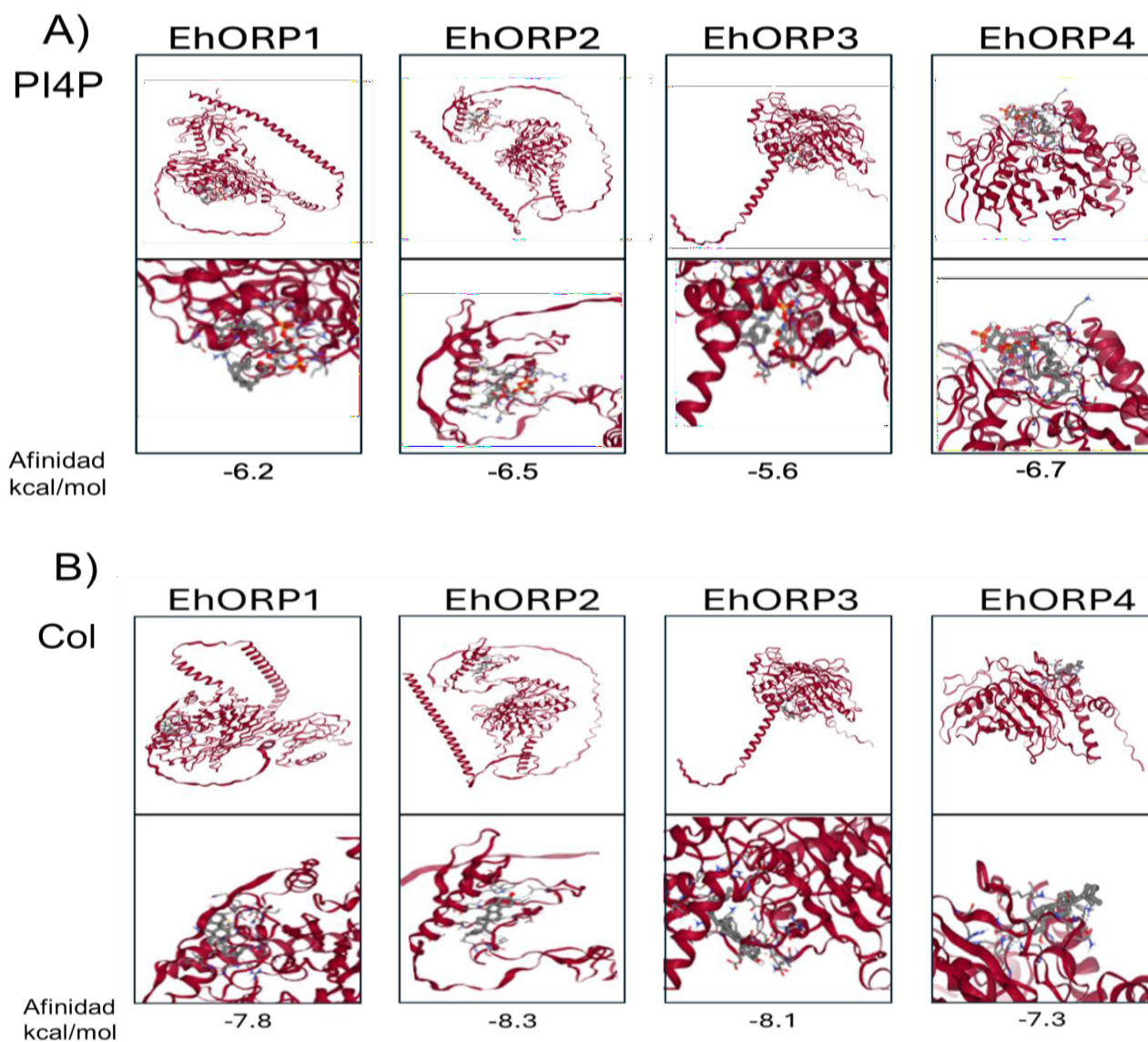


Figura 19: Docking Molecular de las EhORPs con sus ligandos lipídicos: A) Con PI4P, B) Con colesterol. El ligando (gris) fue acoplado con las proteínas putativas de *E. histolytica*, (rojo) mostrando los modelos resultantes de las interacciones energéticamente más favorables.

9.1.8 INTERACTOMAS DE LAS PROTEÍNAS EhORPs

Para predecir la función de las proteínas de unión a oxisterol de *E. histolytica*, analizamos los interactomas de cada uno de ellos mediante el programa String (Fig. 20). Con este experimento, pudimos predecir que los interactomas de las cuatro EhORPs presentan variación en las proteínas a las que se unen.

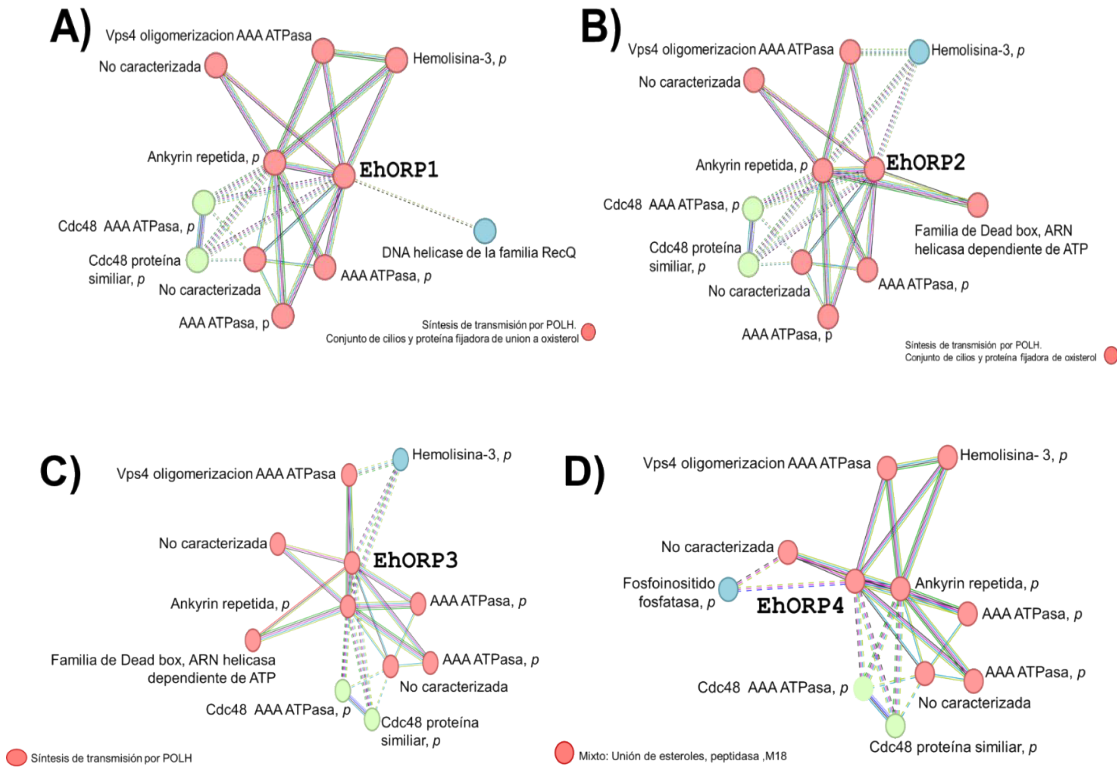


Figura 20. Interactomas de las proteínas EhORPs. Las proteínas que interactúan con las EhORPs se agruparon según la predicción de sus funciones de GO term y se muestran en distintos colores: en rosa, las proteínas asociadas con actividad de unión e hidrólisis de ATP, en verde, proteínas asociadas a la diferenciación celular, y en azul, proteínas con la función que las nombra. Las líneas en el interactoma representan el tipo de unión entre las proteínas según el software: en rosa las interacciones determinadas experimentalmente, en azul cielo, las identificadas por la base de datos y el resto, son interacciones determinadas por homología.

X. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Para estandarizar la RT-PCR y analizar la expresión de estos cuatro genes codificantes para las EhORPs de manera experimental, primero realizamos la extracción de ARN total con una concentración de 680 ng/ μ L y una pureza de $DO_{260/280} = 2.23$, y este se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% después de la electroforesis (Fig. 21). Los oligonucleótidos se diseñaron con la ayuda de la Dra. Jeni Bolaños Rebolledo y se utilizó la herramienta disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica llamado Primer desingning tool – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Los resultados obtenidos con esta herramienta se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Diseño de los oligonucleótidos para RT-PCR

<i>ehorp1</i>	SECUENCIA 5´-3´	TAMAÑO	GC%	Tm (°C)
SENTIDO	actaagaccaggaatggacc	20	50	60.8
ANTISENTIDO	ccaagcattcttagtccagg	20	50	60.1
<i>ehorp2</i>	SECUENCIA	TAMAÑO	GC%	Tm (°C)
SENTIDO	tcaccatcctccagtatctgc	21	52.4	63.1
ANTISENTIDO	caagtgcctcaggaatgtc	20	55	62.6
<i>ehorp3</i>	SECUENCIA	TAMAÑO	GC%	Tm (°C)
SENTIDO	tcacatcatccacctgtttc	20	45	56
ANTISENTIDO	cagcagatgctgataatcca	20	45	57
<i>ehorp4</i>	SECUENCIA	TAMAÑO	GC%	Tm (°C)
SENTIDO	aaccacctgaatcaccaat	20	45	57
ANTISENTIDO	tgcttctgtccatcacctt	20	45	57

Este tipo de algoritmos para el diseño de primers es una herramienta molecular esencial que permite predecir una amplificación específica de ácidos nucleicos, en este caso del ARN para estudios de expresión génica y su cuantificación precisa. Un diseño adecuado asegura la especificidad al

evitar productos de RT-PCR no deseados. El éxito de los experimentos depende de un diseño óptimo que considere factores como la longitud, contenido de GC, temperatura de alineamiento y ausencia de estructuras secundarias. También, nos ayuda a determinar el tamaño del producto de PCR esperado.

10.1 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE ARN TOTAL DE *E. histolytica* OBTENIDO BAJO CONDICIONES DE CULTIVO BASALES

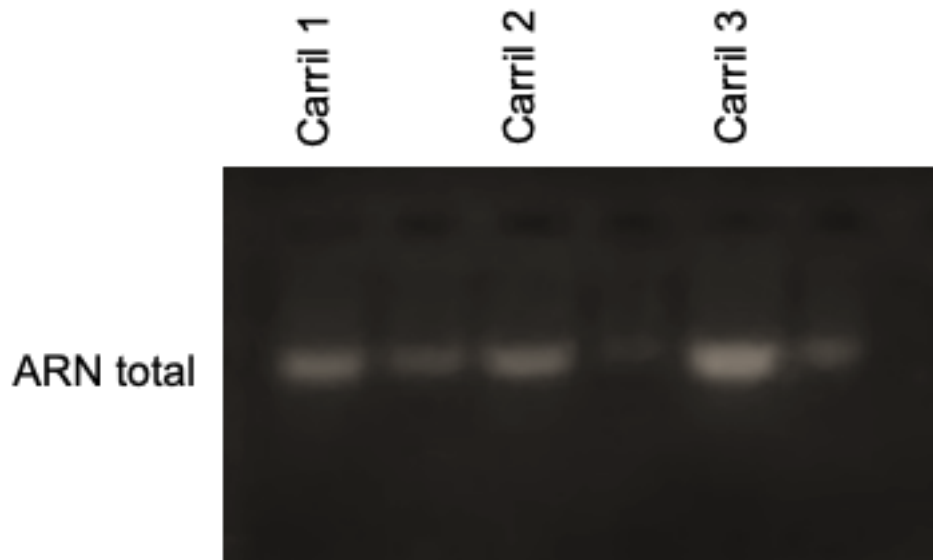


Figura 21: Corrimiento electroforético de ácidos nucleicos. Se cargó un volumen total de 30 μL con un gradiente de concentración de la muestra de ARN total de *E. histolytica*: Carril 1: 680 ng/ μL ; Carril 3: 1 360 ng/ μL y Carril 5: 2,040 ng/ μL .

10.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE RT-PCR

Se realizó la RT-PCR con 1 μ g de ARN total de acuerdo con el protocolo indicado por el proveedor, mismo que indicamos en la tabla 2 en la sección de material y métodos. Los amplicones esperados son de tamaños: *ehorp1* (153 pb), *ehorp2* (185 pb), *ehorp3* (153 pb) y *ehorp4* (120 pb). Con nuestras condiciones experimentales, logramos amplificar los genes *ehorp1* y *ehorp2* (Fig. 22).

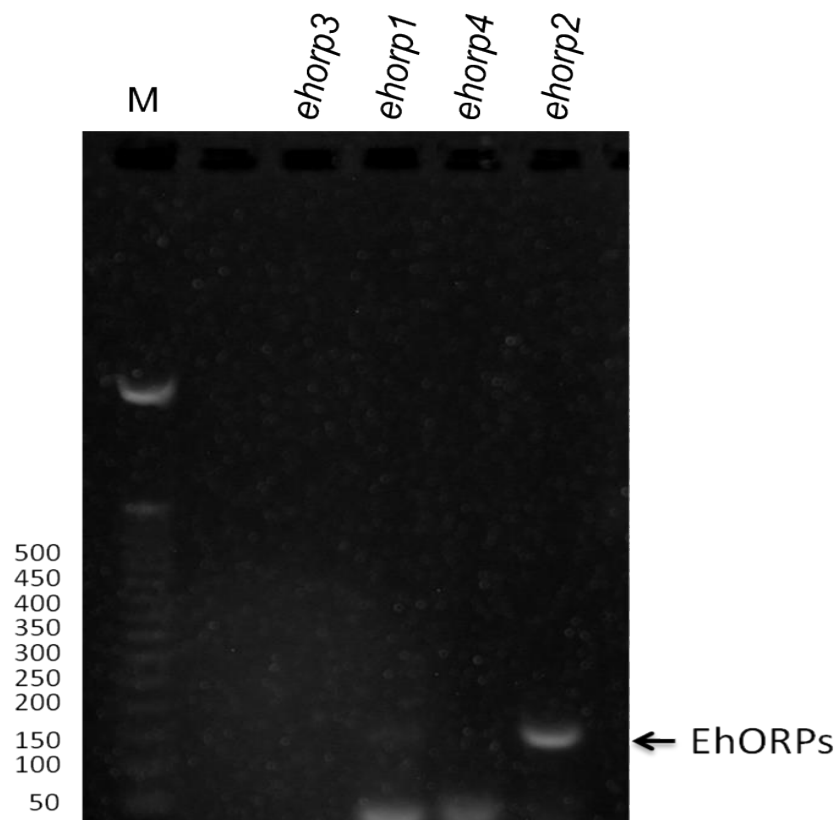


Figura 22: Análisis de la expresión de los genes *ehorps*. Los genes se amplificaron a partir de cDNA y los productos amplificados se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5% y se tiñeron con GelRed.

XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ingresó a la página de AmebaDB para la búsqueda de genes ortólogos en el mes de junio de 2024. Con respecto a la búsqueda de genes de unión a oxisterol de *E. histolytica* encontramos que las cuatro EhORPs se encuentran conservadas al compararlas con otros organismos eucariontes como *S. cerevisiae*, *Plasmodium falciparum* y *Homo sapiens*. Esto nos sugiere que la vía de transporte de lípidos en *E. histolytica* a través de las proteínas ORP se encuentra presente y potencialmente funcional.

Interesantemente, al analizar los datos de la transcriptómica en la base de datos AmebaDB, los genes con mayor expresión basal son los genes *ehorp3* y *ehorp4*, sin embargo, con nuestro ensayo de RT-PCR logramos amplificar los genes *ehorp1* y *ehorp2*, que son las que menos se expresan en el transcriptoma de condición basal (Shabardina *et al.*, 2018), posiblemente nuestras condiciones experimentales favorecen la amplificación de estos dos genes y no son óptimas para la amplificación de los genes *ehorp3* y *ehorp4*. Con relación a la expresión de los genes en diferentes condiciones, *ehorp1*, *ehorp2*, *ehorp3* y se expresan más en condiciones de estrés oxidativo indicando una posible respuesta de defensa y adaptación del parásito en esta condición. Sin embargo, en el caso de *ehorp3* también se expresa en condiciones de virulencia y choque térmico (Hon *et al.*, 2013) en el modelo de virulencia y choque de calor, sugiriendo una respuesta de este gen de aumentar a su expresión durante el estrés inducido por choque térmico.

Por otro lado, *ehorp4* se expresa en la condición del colon virulento, lo que podría indicar que esta proteína podría fungir como un factor de virulencia de invasión en el colon, por lo que puede ser un blanco potencial para diseño de nuevos fármacos, ya que es altamente divergente a los genes humanos. De manera interesante, los genes codificantes para algunas proteínas EhORPs

modifican su expresión durante el proceso de transición de trofozoíto a quiste y de enquistamiento, lo que sugiere que podrían participar activamente en la conversión de quiste a trofozoíto y viceversa, por lo que la continuación de su estudio promete generar estrategias en el control de la transmisión del parásito.

Los datos correspondientes a los genes ortólogos de las EhORPs indican una conservación evolutiva en el género *Entamoeba* y *Acanthamoeba* ya que se encuentran presentes en las especies *Acanthamoeba castellanii*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba invadens*, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba nuttalli*. Esto nos podría indicar que el metabolismo y transporte de lípidos en *E. histolytica* puede ser similar al de otros eucariontes unicelulares y que el estudio en estas especies es importante para comprender mejor los mecanismos de interacción huésped-parásito tanto en comensales como en patógenos.

El alineamiento de secuencias proteínicas muestra la conservación de la región del extremo amino y la zona central entre las secuencias proteínicas ortólogas de *Acanthamoeba castellanii* (ACA1_329470-t26_1), *Entamoeba invadens* (EIN_275280-t26_1), *Entamoeba nuttalli* (ENU1_151500-t26_1), *Entamoeba moshkovskii* (EMO_027000-1), *Entamoeba dispar* (EDI_249070A). Estos datos sugieren que el extremo amino funge un papel fundamental para las proteínas de unión a oxisterol en diferentes actividades celulares, mientras que la zona central que contiene el dominio ORD posiblemente participe en la unión de lípidos como sucede en *S. cerevisiae*.

Se puede apreciar que la secuencia correspondiente a la EhORP1 está conservada en la región del extremo amino y la zona central entre las secuencias proteínicas de *Acanthamoeba castellanii* (ACA1_329470-t26_1), *Entamoeba invadens* (EIN_275280-t26_1), *Entamoeba nuttalli* (ENU1_151500-t26_1), *Entamoeba moshkovskii* (EMO_027000-1), *Entamoeba dispar* (EDI_249070A). Nuestros datos sugieren que la

secuencia correspondiente a la EhORP2, la región central se encuentra conservada entre las secuencias proteínicas de *Entamoeba invadens* (EIN_047360-t26_1), *Acanthamoeba castellanii* (ACA1_329470-t26_1), *Entamoeba moshkovskii* (EMO_027000-1), *Entamoeba dispar* (EDI_291100A), *Entamoeba nutalli* (ENU1_181930-t26_1). Los datos indican que la zona central de la secuencia proteínica correspondiente a la EhORP3 se encuentra conservada entre *Entamoeba invadens* (EIN_047360), *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba nutalli* (ENU1_050460-t26_1), *Acanthamoeba castellanii* (ACA1_329470-t26_1), *Entamoeba dispar* (EDI_249070A) y *Entamoeba moshkovskii* (EMO_027000-1). Nuestros resultados sugieren que la región central se encuentra conservada entre la secuencia proteínica correspondiente a la EhORP4 de *Entamoeba invadens* (EIN_152990-t26_1), *Acanthamoeba castellanii* (ACA1_142130.R501), *Entamoeba moshkovskii* (EMO_101900-1), *Entamoeba dispar* (EDI_244000A) y *Entamoeba nutalli* (ENU1_207470-t26_1).

En el caso de la EhORP1 se encuentra emparentada con la proteína ortóloga de *Entamoeba* EhORP3 y a su vez, se emparenta con la proteína ortóloga de *Entamoeba invadens* y finalmente, la EhORP4 se encuentra emparentada con la proteína ortóloga de *Entamoeba Moshkovski*. Nuestros resultados indican que las EhORPs se emparentan con especies distintas, sugiriendo una divergencia distinta. Se observó que las EhORP1, EhORP2 y EhORP4 tienen un porcentaje de identidad arriba de 90% con la proteína ortóloga de *Entamoeba dispar*, indicando que estas proteínas en ambas especies podrían tener una estructura y función similar. La proteína EDI_225800A tiene un porcentaje de similitud del 98.29% con la EhORP4.

Por otra parte, la EhORP3 tiene un porcentaje de identidad del 99% con la proteína ortóloga de *Entamoeba nutalli*, sugiriendo una situación similar. Estos resultados son relevantes, ya que *E. dispar* no es una cepa virulenta a diferencia de *E. nutalli*, que es una especie altamente patógena en

primates no humanos, con lo que podemos asociar esta EhORP3 con la virulencia del parásito y es necesario realizar experimentos funcionales para comprobar esta hipótesis.

Los alineamientos de los dominios ORD indican que las EhORP1 y EhORP2 contienen un extremo amino más largo que las proteínas de unión a oxisterol EhORP3 y EhORP4, mientras que la parte central se encuentra altamente conservada. Cabe destacar que estos dominios se encuentran conservados en *S. cerevisiae* y *Homo sapiens* (Das 2018).

Se puede apreciar que las estructuras de las cuatro EhORPs están conformadas principalmente por hélices alfa. Esto se correlaciona con la estructura de la proteína OSH4 que es homóloga a OSBP1 de humano (Singh 2009). y a su vez ortóloga de las EhORPs. Los resultados arrojados por swiss model (SWISS-MODEL - SIB Swiss Institute of Bioinformatics | Expasy) indican que las EhORP4 y EhORP3 tienen una identidad estructural de 39.03% y 40.06% respectivamente con el cristal de ORP8 de humano a una resolución de 2.6Å. Con alpha fold (Base de datos de estructura de proteínas AlphaFold) los resultados indican que EhORP1 y EhORP2 tienen una identidad estructural de 76.64% y 93.79 % respectivamente con su ortólogo en *E. dispar*.

En los interactomas observamos que las de las EhORPs es con otras moléculas putativas, lo que resulta relevante, pues el estudio de las EhORPs es un campo abierto para la investigación en el transporte de lípidos del parásito. Cuando hacemos el enriquecimiento funcional (GO term) de la lista de proteínas que interactúan con las EhORPs, se encontró que la función molecular esta descrita como actividad de unión e hidrólisis del ATP. Las ATPasas que se han relacionado con las ORPs participan en el transporte de colesterol en contra de su gradiente y también se ha visto que la ATPasa4 es importante para desensamblar la maquinaria molecular de las membranas (Heckle 2023).

La ARN Helicasa dependiente de ATP que pertenece a la familia helicasa DEAD box de la subfamilia DDX54/DBP10, es una proteína involucrada en la regulación post transcripcional durante la transición de estadios en otros parásitos, sugiriendo la participación de las EhORPs en el enquistamiento o des enquistamiento de *E. histolytica*. La regulación transcripcional consiste en la represión de los ARN mensajeros para conservarlos en un estado de reserva para una traducción posterior; este mecanismo es para preparar a las células cuando se transmiten a un huésped, como sucede en *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Giardia* (Balan *et al.*, 2021). La proteína Cdc48- like en levadura, es una proteína para el control de la división celular, conocida como vcpATPasa (Valsolin-containing); esta proteína está involucrada en la transferencia de vesículas desde el retículo endoplasmático hacia al aparato de Golgi. Con esto podemos predecir que las EhORPs están involucradas en el transporte de lípidos entre estos organelos, mismo que es esencial para las funciones celulares del parásito, Esto también se sustenta con la presencia del motivo FFAT en la estructura de algunas EhORPs.

La hemolisina-3 es una proteína formadora de poros identificada en bacterias que se inserta en la membrana para contactar con el colesterol y posteriormente formar un poro, esta proteína se ha estudiado para entender mejor el cambio de estadio en el ciclo de vida de *Plasmodium* y puede estar asociada a la virulencia de *E. histolytica*. Estos datos del interactoma nos permiten predecir las funciones de las EhORPs, también porque los resultados obtenidos se asocian con la expresión de los genes en las distintas condiciones que se mencionaron anteriormente.

Con estos datos, podemos sugerir que la familia de EhORPs participa en varias funciones celulares como en la transición de estadios que depende de la remodelación de los componentes de las membranas, el transporte de lípidos entre organelos y también, participan en la regulación transcripcional

de *E. histolytica*. Nuestros resultados indican que las interacciones de las cuatro ORPs de *E. histolytica* con sus ligandos PI4P y colesterol se llevan a cabo principalmente por interacciones no covalentes y por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces iónicos. Es importante señalar que las cuatro EhORPs generan un número mayor de interacciones con el PI4P que, con el colesterol, sin embargo, la afinidad que se mide en kcal/mol es mayor con el colesterol (-7.3 a -8.3) con respecto a los niveles energéticos obtenidos con PI4P (-5.6 a -6.7).

En nuestros resultados experimentales, podemos observar la amplificación de los genes *ehorps*: *ehorp1* (153 pb) y *ehorp2* (185 pb) a partir de ARN total. Estos datos indican que estos genes se expresan en *E. histolytica*, sin embargo, con estas condiciones no logramos amplificar a *ehorp3* y *ehorp4*, por lo que queda como perspectiva estandarizar las condiciones de RT-PCR para estos dos últimos genes.

XII. EL USO DE LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES EN LA PROMOCIÓN DE LA SALUD

Desde el punto de vista de la promoción de la salud del modelo higiénico preventivista, plantea tres determinantes del proceso salud enfermedad, las cuales están relacionadas con diferentes factores de riesgo. Para abordar los conceptos de promoción de la salud, es fundamental situarse dentro de los enfoques del proceso salud-enfermedad, ya que este está influenciado tanto por la filosofía como por las prácticas relacionadas con la enfermedad. Con Galeno, médico griego de la Roma imperial, la higiene toma significado como promotora de salud, la cual estaba centrada en el cuidado del cuerpo y se podría asociar con estilos de vida saludables. Varios siglos después, con el paradigma microbiano, en el cual la enfermedad era producto de los microbios, la salud pública y la promoción de la salud quedaron suspendidas a la práctica médica. El agente causal de la enfermedad debería ser

controlado o eliminado por acciones públicas (Esteban, 1998). El simultáneo desarrollo de la farmacología, los procedimientos diagnósticos instrumentales, así como de la biología celular y la bioquímica contribuyeron a reafirmar esta idea (Carmona *et al.*, 2005).

Posteriormente, a partir del concepto de medicina preventiva se identifica la promoción de la salud como la esfera más grande de la prevención de la enfermedad; el paradigma que subyace en tal propuesta es el higiénico-preventivista. La enfermedad es la ruptura del equilibrio existente entre el huésped, un agente etiológico y el medio con el que interactúan. La promoción de la salud, de acuerdo con esta visión, tenía que ver con el fortalecimiento de la resistencia del huésped hacia los agentes de enfermedad, con la disminución o eliminación del contacto con el agente y con acciones generales sobre el ambiente (el ambiente incluye la parte social) (Carmona *et al.*, 2005).

La Organización Mundial de la Salud indica en la Carta de Ottawa que la Promoción de la Salud constituye un proceso político y social global que abarca acciones dirigidas a fortalecer las habilidades y capacidades de los individuos y de las comunidades y, aún más importante, acciones dirigidas a fortalecer las habilidades y capacidades de los individuos y de las comunidades y también, acciones dirigidas a modificar las condiciones sociales, ambientales y económicas, con el fin de favorecer su impacto positivo en la salud individual y colectiva.

Aunque la salud es un concepto dinámico, habitualmente se aborda desde la visión de pérdida (enfermedades o factores de riesgo). La promoción de la salud reconoce la salud como un concepto positivo y se centra en los factores que contribuyen a ella. Busca que todas las personas desarrollen su mayor potencial de salud tomando en cuenta los activos de la comunidad y las condiciones sociales subyacentes que determinan una mejor o peor salud - los Determinantes Sociales de la Salud - sabiendo que para alcanzar la equidad es necesario una redistribución del poder y los recursos.

El abordaje de Promoción de la Salud implica una manera particular de colaborar: parte de las diferentes necesidades de la población, fomenta sus capacidades y sus fortalezas, empodera, es participativa, intersectorial, sensible al contexto y opera en múltiples niveles. “Comunidades, organizaciones, e instituciones trabajando juntas para crear condiciones y entornos que aseguren la salud y el bienestar para todas las personas, sin dejar a nadie atrás” (OMS, 2005).

El mandato actual de promoción de la salud para la región de las Américas conocido como la Estrategia y Plan de Acción sobre Promoción de la Salud en el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sustentable 2019-2030 aprobada en el 57 Consejo Directivo (2019), propone 4 líneas estratégicas de acción esenciales para promover la salud:

1. Fortalecer entornos saludables:

La Promoción de la Salud fomenta cambios en el entorno para generar salud y bienestar; opera en los lugares o contextos en los que las personas participan en actividades diarias, donde los factores sociales, económicos, ambientales, organizacionales y personales interactúan. Escuelas, universidades, viviendas, lugares de trabajo, mercados y otros espacios comunes son entornos clave para ganar salud a lo largo de todo el curso de vida.

2. Facilitar la participación y el empoderamiento de la comunidad:

La participación genera salud en sí misma y, además, es esencial para la efectividad y sostenibilidad de las acciones de promoción de la salud. Promover la salud es generar espacios de participación, trabajar en red, reforzar el papel de las comunidades y potenciar sus activos y capacidades para que puedan abogar por sus necesidades y perspectivas. Además, para promover la salud es clave empoderar a las personas y las comunidades

para que puedan ser involucradas de forma significativa en la toma de decisiones que afectan a su vida.

3. Fortalecer la gobernanza y la acción intersectorial de la comunidad:

Una buena gobernanza para la salud implica incluir la acción intersectorial, la participación social y la equidad. Es crucial considerar el impacto que las políticas de sectores como educación, empleo, economía, vivienda, transporte o urbanismo tienen en la salud. Por eso, para promover la salud se hace indispensable un enfoque de todo el gobierno y la sociedad que genere soluciones colectivas que mejoren la salud como parte integral del bienestar y el desarrollo económico y social. La evidencia científica muestra que tener un trabajo fijo o no, mayor o menor nivel de estudios, de ingresos, mejores o peores condiciones de vivienda, más o menos zonas verdes, espacios para caminar, disponibilidad de agua potable, información sobre cómo funciona el cuerpo, conocimientos generales sobre las infecciones y uso de medicamentos, dieta, etc., influye directamente en la salud. También la evidencia nos muestra que existen políticas públicas efectivas para promover la salud con equidad.

4. Fortalecer los sistemas y servicios de salud:

A partir de la Carta de Ottawa, la promoción de la salud adquiere un papel protagónico reconociéndose que los sistemas y servicios de salud van más allá de la provisión de servicios clínicos y médicos, de forma que debe producirse un cambio de enfoque y de organización para que las necesidades de las personas se sitúen en el centro y se aborden como un todo. La Promoción de la Salud es un elemento clave para el fortalecimiento de los sistemas de salud y su capacidad para responder a las necesidades de salud de las personas, familias y comunidades, centrándose en garantizar la salud al más alto nivel posible con solidaridad y equidad. Cada contacto con una persona puede ser una oportunidad no sólo para brindar un servicio

clínico, sino también para evaluar las condiciones en las que vive y trabaja, conocer su contexto familiar y social y conectar con los activos de la comunidad. También brinda la oportunidad de coordinarse con otros servicios como protección social y vivienda para atender las necesidades detectadas de las personas. El sector de la salud debe lograr que la promoción de la salud sea más pertinente y concreta, y colaborar con las comunidades para crear condiciones de vida saludables, sobre la base de la atención primaria de salud. La promoción de la salud es además una función esencial de salud pública, que debe ser incluida en los procesos de evaluación, desarrollo de políticas, asignación de recursos y en las dimensiones del acceso a los servicios de salud (FESP) (OPS, 2019).

El este último objetivo podemos incluir a las herramientas moleculares como parte de las estrategias de la promoción de la salud. El conocimiento de los principios y la aplicación práctica de técnicas de biología molecular y bioinformática brinda a los promotores de salud una herramienta clave para educar a la población sobre la salud y la enfermedad desde una perspectiva molecular. Su labor es fundamental para desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas basadas en evidencia científica y transmitir este conocimiento de manera accesible al público. Al explicar los procesos biológicos de las enfermedades con fundamentos científicos, los promotores de salud ayudan a que las personas comprendan su estado de salud, tomen decisiones informadas y sigan adecuadamente los tratamientos. Esto contribuye a reducir la desinformación, fomentar la prevención y detección temprana, y mejorar el seguimiento terapéutico al entender los mecanismos y efectos de los tratamientos. Además, empoderan a los pacientes y sus familias, promoviendo su participación en el autocuidado y fortaleciendo la confianza en los sistemas de salud, lo que favorece una sociedad más informada y comprometida con su bienestar.

El desarrollo de herramientas moleculares desempeña un papel crucial en el fortalecimiento de los sistemas y servicios de salud al proporcionar tecnologías avanzadas para el diagnóstico, monitoreo y tratamiento de enfermedades, mejorando la capacidad de respuesta frente a emergencias sanitarias. Estas herramientas han demostrado su eficacia en la detección temprana y el seguimiento de brotes, permitiendo intervenciones rápidas y basadas en evidencia científica. Aunado a esto, contribuyen a crear entornos saludables al ser aplicadas en hospitales, laboratorios y comunidades para controlar factores de riesgo y prevenir la propagación de enfermedades (Pin *et al.*, 2023). Además, fortalecen la participación comunitaria al generar datos que informan sobre prevención y detección temprana, empoderando a las personas para tomar decisiones informadas sobre su salud. Por último, integran la investigación científica con políticas públicas, como se evidenció durante la pandemia de COVID-19 en el 2020, al fomentar la acción intersectorial y la gobernanza para diseñar intervenciones equitativas y sostenibles que respondan a desafíos globales en salud.

Como ya mencionamos, la amebiasis es una infección multifactorial, alrededor del 90% de personas infectadas son asintomáticas, por lo que también es fundamental aplicar la promoción de la salud de manera integral, considerando las condiciones físicas como el sexo, edad, sistema inmune, dieta, nutrición, condiciones genéticas, socioculturales, económicas y ambientales de los pacientes. En este caso, la PCR utilizando sondas para genes específicos del parásito, funciona como una técnica molecular para detectar la amebiasis en personas asintomáticas que facilita hacer un diagnóstico diferencial a otras patologías intestinales y hepáticas (Pin *et al.*, 2023).

En esta tesis, demostramos que las herramientas moleculares son de importancia para el diagnóstico de enfermedades transmisibles, y ayudan a entender mejor las causas o la etiología, para así poder elaborar nuevos

medicamentos que reduzcan los efectos secundarios en el ser humano. La bioinformática nos permite caracterizar genes con potencial uso en el diagnóstico y tratamiento. Con la predicción de la función de las proteínas EhORPs en el enquistamiento y desenquistamiento, eventualmente se pueden proponer para la intervención farmacéutica en la unión de las EhORPs con sus ligandos y así prevenir la transmisión de la infección en el ser humano. Las proteínas ORPs se han reportado como potenciales blancos para inhibir parasitosis como la giardiasis, toxoplasmosis y la malaria (Balan et al., 2021) y también, la angiogénesis en células endoteliales que juegan un papel importante durante la formación y evolución de los tumores cancerígenos (Kim, 2017).

Por otro lado, el costo de las técnicas moleculares experimentales es alto, se requiere alta especialización para desarrollarlas y solo algunos tienen acceso, por lo tanto, es necesario la creación de políticas públicas para ofrecer menores costos y toda la población tenga acceso al uso de las herramientas moleculares para el diagnóstico oportuno y también, para la ciencia básica que es la fuente para el desarrollo farmacéutico.

Además, como promotores de salud es importante promover la orientación a la población en la manejo y preparación de alimentos, así como en el lavado de manos, la higiene, el evitar la automedicación y la educación sexual con el fin de disminuir los contagios y por lo tanto las muertes causadas por la amebiasis y la población tenga una mejor calidad de vida. Aunado a esto, es fundamental apoyar a las comunidades con información sobre las enfermedades infecciosas, ya que la mayoría de la gente toma remedios caseros para aliviar algunos dolores del estómago, así como diarreas, esto solo mitiga un poco el dolor, sin embargo, el parásito no sale del cuerpo, no obstante, algunas veces consultan al médico cuando el dolor aumenta y el remedio casero ya no ayuda a calmar el dolor y la infección se puede volver crónica.

En este sentido, el número de casos de amebiasis intestinal y hepática reportadas en el Boletín epidemiológico disminuyeron considerablemente durante el 2020 al 2022, periodo que coincidió con la pandemia, lo que sugiere que probablemente las medidas sanitarias tuvieron un impacto en la transmisión y vigilancia de esta infección y probablemente otras más.

XIII. CONCLUSIÓN

Las EhORPs están conservadas evolutivamente al ser comparadas con otros eucariontes, así como con miembros del género *Entamoeba*, aunque divergen entre ellas. Con respecto a la estructura de las ORPs se puede observar una similitud con la estructura de OSH4 de *Saccharomises cerevisiae*. Además, se logró caracterizar a las proteínas putativas de unión a oxisterol de *E. histolytica*, a través del análisis bioinformático, identificando los dominios de unión a oxisterol, así como su región central conservada. Por otro lado, los resultados de los dockings fortalecen la hipótesis que se planteó en esta tesis, debido a la unión y el potencial transporte de PI4P y colesterol mediante las EhORPs. Finalmente, de acuerdo con las proteínas que interaccionan con las ORPs de *E. histolytica* las cuatro proteínas EhORPs participan en diferentes funciones celulares del parásito.

Por otro lado, con la implementación de las herramientas moleculares se ha cambiado la forma de diagnosticar enfermedades parasitarias, debido a que es más fácil detectar parásitos en el ser humano, lo que conlleva a un rápido y oportuno tratamiento, de tal manera se previenen más contagios y muertes.

Mientras la Promoción de la Salud puede intervenir para la creación de nuevas políticas públicas para que el acceso a las herramientas moleculares sea más fácil y económico, así mismo, se verifique que la distribución de los servicios como el agua potable y el drenaje sea equitativamente, esto con el fin de que la población tenga los servicios mínimos básicos para mantener la limpieza necesaria, además, es necesario reeducar a la gente en el lavado de manos, así como, en la limpieza y preparación de alimentos.

XIV. PERSPECTIVAS

- Determinar la función *in vivo* de las EhORPs a través del silenciamiento y sobreexpresión de sus genes.
- Promover el adecuado manejo de los alimentos, así como el lavado de manos, entre la comunidad.
- Implementar pláticas en las escuelas sobre la amebiasis su prevención para reducir el contagio y disminuir la mortalidad.

XV. REFERENCIAS

Aguilar-Rojas, A., Castellanos-Castro, S., Matondo, M., Gianetto, Q. G., Varet, H., Sismeiro, O., ... & Guillen, N. (2020). Insights into amebiasis using a human 3D-intestinal model. *Cellular Microbiology*, 22(8), e13203.

Alarcón, W., De la Rosa, E., Argueta, V., & Orozco, R. (2018). Amebiasis de cuello uterino. Reporte de caso. *Revista médica (Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala)*, 157(1), 32-33.

Alvarez-Jarreta et al., VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center in 2023, *Nucleic Acids Research, Nucleic Acids Research*, Volume 52, Issue D1, 5 January 2024, Pages D808–D816.

Amos B, Aurrecochea C, Barba M, Barreto A, Basenko EY, Bazant W, Belnap R, Blevins AS, Böhme U, Brestelli J, Brunk BP, Caddick M, Callan D, Campbell L, Christensen MB, Christophides GK, Crouch K, Davis K, DeBarry J, Doherty R, Duan Y, Dunn M, Falke D, Fisher S, Flicek P, Fox B, Gajria B, Giraldo-Calderón GI, Harb OS, Harper E, Hertz-Fowler C, Hickman MJ, Howington C, Hu S, Humphrey J, Iodice J, Jones A, Judkins J, Kelly SA, Kissinger JC, Kwon DK, Lamoureux K, Lawson D, Li W, Lies K, Lodha D, Long J, MacCallum RM, Maslen G, McDowell MA, Nabrzyski J, Roos DS, Rund SSC, Schulman SW, Shanmugasundram A, Sitnik V, Spruill D, Starns D, Stoeckert CJ, Tomko SS, Wang H, Warrenfeltz S, Wieck R, Wilkinson PA, Xu L, Zheng J. VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D898-D911.

Ankri, S. (2021). *Entamoeba histolytica*—gut microbiota interaction: more than meets the eye. *Microorganisms*, 9(3), 581.

Arvind Ahuja, Minakshi Bhardwaj, Cervical amoebiasis mimicking cervical carcinoma: A rare presentation of a common infection, *Journal of Infection and Public Health*, Volumen 9, Issue 4, 2016, Pages 516-518.

Babicki Sasha, Arndt David, Marcu Ana, YLiang ongjie, Grant Jason R., Maciejewski Adam, and Wishart David S. (2016). Heatmapper: web- David enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* May 17.

Balan, B., Emery-Corbin, S. J., Sandow, J. J., Ansell, B. R. E., Tichkule, S., Webb, A. I., ... & Jex, A. R. (2021). Multimodal regulation of encystation in *Giardia duodenalis* revealed by deep proteomics. *International Journal for Parasitology*, 51(10), 809-824.

Bardou Philippe, Mariette Jérôme, Escudie Frédéric, Djemiel Christophe and Klopp Christophe. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 2014, 15:293.

Bolaños J., Betanzos A., Javier-Reyna R., García- Rivera G., Huerta M., Pais-Morales J., et al.. (2016). EhNPC1 and EhNPC2 proteins participate in trafficking of exogenous cholesterol in *Entamoeba histolytica* trophozoites: relevance for phagocytosis. *PLoS Pathog.* 12:e1006089.

Botero, D., & Restrepo, M. (2012). Parasitosis humanas. *Corporación para investigaciones Biológicas CIB*.

Candela Senti, E. (2024). Caracterización epidemiológica de la infección por parásitos intestinales en poblaciones indígenas de la Provincia de Misiones (región del noreste) y de la Provincia de

Salta (región del noroeste), Argentina.

Chacín-Bonilla, L. (2010). Amibiasis: implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. *Investigación Clínica*, 51(2), 239-256.

Carmona Moreno, L. D., Roza Reyes, C. M., & Mogollón Pérez, A. S. (2005). La salud y la promoción de la salud: una aproximación a su desarrollo histórico y social. *Revista ciencias de la Salud*, 3(1), 62-77.

Castellanos-Castro S, Bolaños J, Orozco E. Lipids in *Entamoeba histolytica*: Host-Dependence and Virulence Factors. *Front Cell InfectMicrobiol*. 2020 Mar 10;10:75.

Cockcroft, S., & Raghu, P. (2018). Phospholipid transport protein function at organelle contact sites. *Current Opinion in Cell Biology*, 53, 52-60.

Cordel, H., Prendki, V., Madec, Y., Houze, S., Paris, L., Bourée, P., ... & ALA Study Group. (2013). Absceso hepático amebiano importado en Francia. *PLoS neglected tropical diseases*, 7 (8), e2333.

Das, K., & Nozaki, T. (2018). Non-vesicular lipid transport machinery in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 315.

de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastra, B., Bourguet, W., ... & Drin, G. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *Journal of Cell Biology*, 195(6), 965-978.

Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651-657.

Ehrenkauf GM, Haque R, Hackney JA, Eichinger DJ, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol*. 2007 Jun;9(6):1426-44.

Ekou, J., Nakavuma, J., Ocaido, M., & Erume, J. (2012). Prevalence of *Entamoeba histolytica* among hospital patients in Soroti, Eastern Uganda. *Afr J Anim Biomed Sci*, 7(1), 81-5.

Emile, N., Bosco, N. J., & Karine, B. (2013). Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among Kigali Institute of Education students in Kigali, Rwanda.

Esteban J. Marcos conceptuales de la promoción de la salud, reflexiones para la práctica. En: Centro Interamericano de Estudios de Seguridad Social. OPS Manos a la salud. México: OPS; 1998. p. 34.

Faust, D. M., & Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection*, 14(15), 1428-1441.

Fleta Zaragozano, J., Bueno Lozano, M., & Bueno Lozano, O. (2000). Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. *Med. integral* (Ed. impr), 96-101.

Gautam, G., Ali, M. S., Bhattacharya, A., & Gourinath, S. (2019). EhFP10: A FYVE family GEF interacts with myosin IB to regulate cytoskeletal dynamics during endocytosis in *Entamoeba*

histolytica. *PLoS Pathogens*, 15(2), e1007573.

Ghenghesh, K. S., Ghanghish, K., BenDarif, E. T., Shembesh, K., & Franka, E. (2016). Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium spp.* in Libya: 2000-2015. *Libyan Journal of Medicine*, 11(1).

Gilchrist CA, Hout E, Trapaidze N, Fei Z, Crasta O, Asgharpour A, Evans C, Martino-Catt S, Baba DJ, Stroup S, Hamano S, Ehrenkauf G, Okada M, Singh U, Nozaki T, Mann BJ, Petri WA Jr. (2006). Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol*. Jun;147(2):163-76.

Gómez. Julio, Cortes Jorge. Cuervo Sonia, López Miriam, (2007), "Amebiasis intestinal", Bogotá, Vol. 11.

Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The lancet*, 361(9356), 512-519.

Graham, T. R., & Burd, C. G. (2011). Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends in cell biology*, 21(2), 113-121.

Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Hout, E., & Petri, W. A. (2003). *Entamoeba histolytica*. *N Engl J Med*, 348, 1565-73.

Haque, R., Mondal, D., Duggal, P., Kabir, M., Roy, S., Farr, B. M., ... & Petri Jr, W. A. (2006). *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infection and immunity*, 74(2), 904-909.

Heckle, L. A., & Kozminski, K. G. (2023). Osh-dependent and- independent Regulation of PI4P Levels During Polarized Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 34(11), ar104.

Helle, S. C., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A. H., and Kornmann, B. (2013). Organization and function of membrane contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833, 2526–2541.

Hung, C. C., Chang, S. Y., & Ji, D. D. (2012). *Entamoeba histolytica* infection in men who have sex with men. *The Lancet infectious diseases*, 12(9), 729-736.

Huston, C. D. (2004). Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends in parasitology*, 20(2), 23-26.

Im, Y. J., Raychaudhuri, S., Prinz, W. A., & Hurley, J. H. (2005). Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature*, 437(7055), 154-158.

Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., & Ochner, C. (2018). *Entamoeba Histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. *In Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*.

Kim, G. D. (2017). Myricetin inhibits angiogenesis by inducing apoptosis and suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling in endothelial cells. *Journal of cancer prevention*, 22(4), 219.

Kipyegen, C. K., Shivairo, R. S., & Odhiambo, R. O. (2012). Prevalence of intestinal parasites

among HIV patients in Baringo, Kenya. *Pan African Medical Journal*, 13(1).

Koushik, A. B., Powell, R. R., & Temesvari, L. A. (2013). Localization of phosphatidylinositol 4, 5bisphosphate to lipid rafts and uroids in the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, 81(6), 2145-2155.

Lago-Sampedro, A. M., & García-Escobar, E. (2022). Importancia de la bioinformática en la medicina actual. ¿ Es realmente necesaria la bioinformática en la práctica clínica?. *Nutrición Hospitalaria*, 39(3), 487-488.

Laughlin, R. C., & Temesvari, L. A. (2005). Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(13), 1-19.

Lejeune, A., & Gicquaud, C. (1987). Evidence for two mechanisms of human erythrocyte endocytosis by *Entamoeba histolytica*-like amoebae (Laredo strain). *Biology of the Cell*, 59(3), 239-245.

Lemmon, M. A. (2007, January). Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 74, pp. 81-93). Portland Press Ltd.

Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 99-111.

Lev, S. (2006). Lipid homeostasis and Golgi secretory function. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 363–366.

Lev, S. (2012). Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a013300.

Loewen, C. J., Roy, A., & Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO journal*, 22(9), 2025-2035.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., & Ahn, S. (2012). Mortalidad mundial y regional por 235 causas de muerte para 20 grupos de edad en 1990 y 2010: un análisis sistemático para el Estudio de la carga mundial de la enfermedad 2010. *Lancet*, 380(2095), 61728-0.

Manuel, C. P. J., Monroy, V. S., & D'Artagnan, V. M. J. (2011). *Entamoeba histolytica* y su relación huésped parásito. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(2), 63-70.

McGregor, A., Brown, M., Thway, K., & Wright, S. G. (2007). Fulminant amoebic colitis following loperamide use. *Journal of travel medicine*, 14(1), 61-62.

Medina-De la Garza, C., Koschwitz, M., & Velasco-Castañón, J. G. (2012). Fritz Schaudinn: zoólogo y protozoólogo. *Medicina Universitaria*, 14(57), 231-8.

Miller, H. W., Suleiman, R. L., & Ralston, K. S. (2019). Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* mediates acquisition and display of human cell membrane proteins and evasion of lysis by human serum. *MBio*, 10(2), 10-1128.

Mornico D, Hon CC, Koutero M, Weber C, Coppee JY, Dillies MA, Guillen N. (2020). Genomic determinants for initiation and length of natural antisense transcripts in *Entamoeba histolytica*. *Sci Rep*. Nov 19;10(1):20190.

Murail S, de Vries SJ, Rey J, Moroy G, Tufféry P. (2021). SeamDock: An Interactive and Collaborative Online Docking Resource to Assist Small Compound Molecular Docking. *Front Mol Biosci*. Sep 17;8:716466.

Naiyer S, Kaur D, Ahamad J, Singh SS, Singh YP, Thakur V, Bhattacharya A, Bhattacharya S. (2019). Transcriptomic analysis reveals novel downstream regulatory motifs and highly transcribed virulence factor genes of *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics*. Mar 12;20(1):206.

Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N., Maehama, T., & Nozaki, T. (2019). Phosphatidylinositol kinases and phosphatases in *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 150.

Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., & Nozaki, T. (2009). Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 11(10), 1471-1491.

Nasrallah, J., Akhoundi, M., Haouchine, D., Marteau, A., Mantelet, S., Wind, P., ... & Izri, A. (2022). Updates on the worldwide burden of amoebiasis: A case series and literature review. *Journal of infection and public health*, 15(10), 1134-1141.

Nakatsu, F., & Kawasaki, A. (2021). Functions of oxysterol-binding proteins at membrane contact sites and their control by phosphoinositide metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 664788.

Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). Respuestas celulares al daño del ADN. *Revista anual de farmacología y toxicología*, 41(1), 367-401.

Norhayati, M., Fatmah, M. S., Yusof, S., & Edariah, A. B. (2003). Intestinal parasitic infections in man: a review. *Medical Journal of Malaysia*, 58(2), 296-305.

Organización Mundial de la Salud. 2001. Carta de Ottawa para la promoción de la Salud. Conferencia internacional de promoción de la salud Salud Publica. Salud Pública Educ Salud.

Organización Mundial de la Salud Promoción de la salud - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.

Petri, W. A., & Singh, U. (1999). Diagnosis and management of amebiasis. *Clinical infectious diseases*, 29(5), 1117-1125.

Petri Jr, W. A., Haque, R., & Mann, B. J. (2002). La interfaz agri dulce del parásito y el huésped: interacciones lectina-carbohidratos durante la invasión humana por el parásito. *Revisiones anuales en microbiología*, 56(1), 39-64.

Petri, W. A. (2003). Therapy of intestinal protozoa. *Trends in parasitology*, 19(11), 523-526.

Pietrangolo, A., & Ridgway, N. D. (2018). Bridging the molecular and biological functions of the

oxysterolbinding protein family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 3079-3098.

Pin, J. A. B., Cerón, D. A. R., Rezabala, J. M. B., & Pinta, J. P. P. (2023). Técnicas de biología molecular aplicada al diagnóstico de laboratorio de múltiples enfermedades. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 5(6), 276-289.

Ralston, K. S., Solga, M. D., Mackey-Lawrence, N. M., Somlata, Bhattacharya, A., & Petri Jr, W. A. (2014). Trogocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature*, 508(7497), 526-530.

Raychaudhuri, S., Im, Y. J., Hurley, J. H., & Prinz, W. A. (2006). Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein–related proteins and phosphoinositides. *The Journal of cell biology*, 173(1), 107-119.

Reyes, L., & León, R. (2002). Diferenciación de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amebiasis intestinal. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 23(3-4), 161-173.

Royer, T. L., Gilchrist, C., Kabir, M., Arju, T., Ralston, K. S., Haque, R., ... & Petri Jr, W. A. (2012). *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerging infectious diseases*, 18(9), 1543.

Saavedra, Emma y Olivos, Alfonso, Amebiasis, *ciencia*, 2017, pág. 14

Samie, A., Obi, L. C., Bessong, P. O., Stroup, S., Houpt, E., & Guarrant, R. L. (2006). Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 565-571.

Sampieri Ramírez, Clara Luz. (2009). Educación en salud pública: impacto de las nuevas tecnologías. *Salud Pública de México*, 51(5), 358.

Sarid, L., Zanditenas, E., Ye, J., Trebicz-Geffen, M. y Ankri, S. (2022). Perspectivas sobre los mecanismos de la actividad de *Lactobacillus acidophilus* contra *Entamoeba histolytica* mediante proteómica redox de tiol. *Antioxidants* 11 (5), 814.

Secretaría de Salud: Servicios del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos | Secretaría de Salud | Gobierno | gov.mx

Secretaría de Salud: Instituto Nacional de Medicina Genómica brinda servicios de alta especialidad sobre genética | Secretaría de Salud | Gobierno | gov.mx.

Serrano-Luna J., Gutiérrez-Meza M., Mejía-Zepeda R., Galindo-Gómez S., Tsutsumi V., Shibayama M. (2010). Effect of phosphatidylcholine– cholesterol liposomes on *Entamoeba histolytica* virulence. *Can. J. Microbiol.* 56, 987–995. 10.1139/W10-088.

Shabardina V, Kischka T, Kmita H, Suzuki Y, Makalowski W. (2018). Environmental adaptation of *Acanthamoeba castellanii* and *Entamoeba histolytica* at genome level as seen by comparative genomic analysis. *Int J Biol Sci.* Feb 12;14(3):306-320.

Shaulov Y, Sarid L, Trebicz-Geffen M, Ankri S. *Entamoeba histolytica* Adaption to Auranofin: A Phenotypic and Multi-Omics Characterization. *Antioxidants* (Basel). 2021 Aug 2;10(8):1240.

Singh, R. P., Brooks, B. R., & Klauda, J. B. (2009). Binding and release of cholesterol in the Osh4 protein of yeast. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 75(2), 468-477.

Shirley DT, Farr L, Watanabe K, Moonah S. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Jul 5;5(7):ofy161.

Shirley, D. A. T., Watanabe, K., & Moonah, S. (2019). Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut. *In PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 13, Issue 11).

Somlata, Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2017). AGC family kinase 1 participates in trogocytosis but not in phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Nature communications*, 8(1), 101.

Swaminathan, A., Torresi, J., Schlagenhauf, P., Thursky, K., Wilder-Smith, A., Connor, B. A., ... & O'Brien, D. P. (2009). A global study of pathogens and host risk factors associated with infectious gastrointestinal disease in returned international travellers. *Journal of Infection*, 59(1), 19-27.

Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., & Krudsood, S. (2009). Malaria diagnosis: a brief review. *The Korean journal of parasitology*, 47(2), 93.

Taylor, F. R., Saucier, S. E., Shown, E. P., Parish, E. J., & Kandutsch, A. (1984). Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 259(20), 12382-12387.

Teasdale, R. D., & Collins, B. M. (2012). Insights into the PX (phox- homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochemical Journal*, 441(1), 39-59.

Terreros García Ana María, (2015), *Entamoeba histolytica*: Factores de virulencia

Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M. A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC genomics*, 8, 1-15.

Tong, J., Yang, H., Yang, H., Eom, S. H., & Im, Y. J. (2013). Structure of Osh3 reveals a conserved mode of phosphoinositide binding in oxysterol-binding proteins. *Structure*, 21(7), 1203-1213.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6.

Touré, P. S., Lèye, Y. M., Diop, M. M., Diop, M., Lèye, A., & Ka, M. M. (2012). Thrombosis of the inferior vena cava and right atrium: a rare complication of an amebic liver abscess in Dakar, Senegal. *Médecine et Santé Tropicales*, 22(1), 91-94.

Maestro, C. (2014). GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA GPC ABSCESO HEPÁTICO AMEBIANO.

Trejos-Suárez Juanita, Castaño-Osorio Jhon Carlos, (2009), "Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*", *Revista Infection*, volumen 13 núm. 2, pág. 101.

Wallroth, A., & Haucke, V. (2018). Phosphoinositide conversion in endocytosis and the endolysosomal system. *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1526-1535.

Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2020). Two isotypes of phosphatidylinositol 3-phosphatebinding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 22(3), e13144.

Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., Maehama, T., & Nozaki, T. (2020). Dynamism of PI4-phosphate during interactions with human erythrocytes in *Entamoeba histolytica*. *Microorganisms*, 8(7), 1050.

Weber C, Koutero M, Dillies MA, Varet H, Lopez-Camarillo C, Coppée JY, Hon CC, Guillén N. (2016). Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. *Sci Rep*. Oct 21;6:35852.

Wills, R. C., Goulden, B. D., & Hammond, G. R. (2018). Genetically encoded lipid biosensors. *Molecular Biology of the Cell*, 29(13), 1526- 1532.

Winkelmann, J., Leippe, M., & Bruhn, H. (2006). A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Molecular and biochemical parasitology*, 147(1), 85-94.

Zhou, F., Li, M., Li, X., Yang, Y., Gao, C., Jin, Q., & Gao, L. (2013). Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection among Chinese men who have sex with men. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2232

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

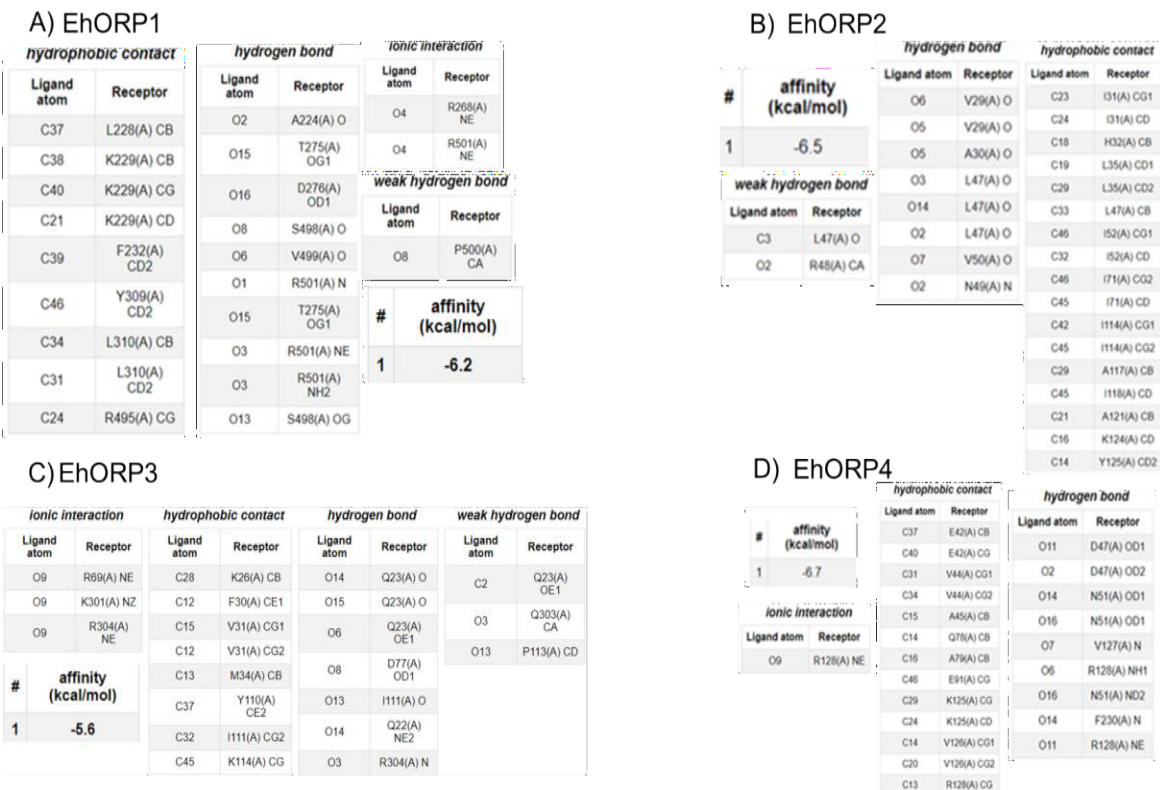


Fig. 1S. Datos fisicoquímicos de la unión del PI4P a las EhORPs obtenidos del docking molecular

A) EhORP1

<i>hydrophobic contact</i>		#	affinity (kcal/mol)
Ligand atom	Receptor		
C19	V222(A) CG2	1	-7.8
C23	L228(A) CG		
C24	L228(A) CD1		
C24	R268(A) CB		
C27	V272(A) CG1		
C17	T503(A) CG2		
C15	M506(A) CB		
C6	D515(A) CB		
C20	T522(A) CG2		

B) EhORP2

<i>hydrophobic contact</i>		#	affinity (kcal/mol)
Ligand atom	Receptor		
C27	I31(A) CG1	1	-8.3
C22	I31(A) CD		
C23	L35(A) CD1		
C20	L35(A) CD2		
C22	I36(A) CD		
C2	I41(A) CD		
C27	I52(A) CD		
C19	L84(A) CD2		
C18	W110(A) CG		
C11	Q113(A) CB		
C3	I114(A) CG1		
C17	I114(A) CD		
C10	A117(A) CB		

C) EhORP3

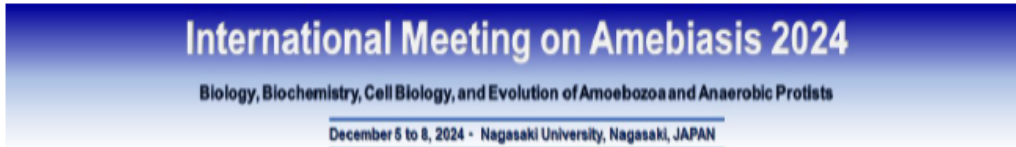
<i>hydrophobic contact</i>		#	affinity (kcal/mol)
Ligand atom	Receptor		
C18	V21(A) CG2	1	-8.1
C11	E24(A) CB		
C16	E24(A) CG		
C10	K26(A) CD		
C20	F30(A) CD2		
C17	F309(A) CB		
C9	F309(A) CD2		
C27	E318(A) CG		
C20	I329(A) CD		

D) EhORP4

<i>hydrogen bond</i>		<i>hydrophobic contact</i>	
Ligand atom	Receptor	Ligand atom	Receptor
O1	Q84(A) OE1	C8	F314(A) CB
O1	Q84(A) NE2	C25	F314(A) CD1
#	affinity (kcal/mol)	C2	F314(A) CD2
		C22	F314(A) CE1
		C6	F314(A) CE2
		C9	Q327(A) CB
		C19	T330(A) CG2
		1	-7.3

Fig. 2S. Datos fisicoquímicos de la unión del colesterol a las EhORPs obtenidos con el docking molecular.

ANEXO: PRESENTACIÓN EN CONGRESO INTERNACIONAL



December 21, 2024

Dear Prof. Silvia Castellanos Castro,

Thank you for your participation and your oral presentation "Oxysterol binding proteins in *Entamoeba histolytica*" in the International Meeting on Amebiasis 2024, Nagasaki, on December 5-7, 2024. This letter is to prove your attendance and your presentation.

Sincerely yours,

Tomoyoshi Nozaki, M.D., Ph.D.,

Fumika Mi-ichi, Ph.D.,

Organizers, International Meeting on Amebiasis 2024, Nagasaki, Japan

