



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO DEL LIGANDO EN  
CÉLULAS DE ORIGEN HEPÁTICO AL  
QUE SE UNE LA LECTINA GAL/GALNAC  
DE *ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**CLARISA RETANA GONZÁLEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** ABEL GUTIÉRREZ RAMOS  
**VOCAL:** ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ  
**SECRETARIO:** MARÍA DEL ROSARIO LÓPEZ VANCELL  
**1er. SUPLENTE:** JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ  
**2° SUPLENTE:** LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL**  
**LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. María del Rosario López Vancell**

## **SUSTENTANTE (S):**

**Clarisa Retana González**

" IL EST IMPORTANT D'AVOIR DES REVES ASSEZ GRANDS  
POUR NE PAS LES PERDRE DE VUE LORSQU'ON LES POURSUIT"

- Oscar Wilde.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, incluido en el proyecto "Mecanismos moleculares de acción del complejo de lectina Gal/GalNAc de *Entamoeba histolytica*", con clave IN216217, fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

Al Técnico en Histopatología Pedro Balderas Flores por su ayuda en la realización de la tinción de nuestras muestras.

Al M. en C. José Luis Cruz Colín, por brindar los cultivos de células HepG2 utilizados en este trabajo.

A Arturo Simoni Nieves, Benjamín Pérez Aguilar y a todo el laboratorio de fisiología celular de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, por tal bienvenida y estadía, por todo el tiempo que me estuvieron ayudando con consejos y técnicas, importantes para desarrollar mi tesis. Les agradezco mucho.

A mi familia, por siempre apoyarme en mis decisiones para perseguir mis sueños y poder cumplir mis metas. Ha sido un camino largo y difícil, pero sin ellos no lo hubiera podido lograr. No pude haber tenido una mejor familia. Gracias por todo el amor, apoyo y enseñanzas que me han brindado.

A mi Amor, quien me dio demasiado para ser quien soy, me cuidó y me sigue cuidando. Me hubiera gustado compartir este momento con ella.

A la Dra. Rosario López Vancell, quien me brindó la oportunidad de trabajar en este proyecto tan interesante y tan para mí. También le doy las gracias por haberme apoyado en varios de los momentos más difíciles de mi vida, gracias por los consejos, cuidados y palabras, le estoy eternamente agradecida.

A mis compañeros de laboratorio, Jesús, Gabriela, Arizaí y Julia, quienes con el tiempo se convirtieron en grandes amigos. Que en un futuro no falten las risas y la hora del amigo.

A mis amigos que conocí en la H. Facultad de Química. Hugo quien es una de las personas más importantes en mi vida y espero nunca salga de ella; Osvaldo, amigo a quien quiero y admiro mucho, con quien compartí muchas horas de clases, estudio y risas; Dany amiga y compañera de locuras y aventuras, July amiga quien siempre apoya y tiene los consejos precisos, y Julián amigo impredecible y ocurrente (¡te gané!), todos ellos son amigos con los que tengo la fortuna de seguir compartiendo momentos únicos.

A mis amigos "lillois" Rodrigo y Aymeric, quienes tal vez no perciben del todo lo mucho que me han ayudado en momentos difíciles. Merci de tout cœur.

A mis amigos IQs, Oscar, Pepe y Estrella, que si bien no nos vemos muy seguido, tengo una amistad muy valiosa con ellos.

También quiero agradecer a Sandra, Rudy, Laura y Mai, de mis mejores amigos en quienes confío plenamente.

A la Universidad de Lille, a la H. Facultad de Química, a la UNAM.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que han estado a lo largo de mi vida y que de alguna u otra forma, me han brindado algún consejo o aprendizaje.

Merci beaucoup !

## CONTENIDO

GLOSARIO .....	8
PRÓLOGO.....	11
AMEBIASIS, <i>Entamoeba histolytica</i> Y LA LECTINA Gal/GalNAc .....	13
FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SU RECEPTOR c-Met.....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	33
Hipótesis.....	33
Objetivo .....	33
METODOLOGÍA .....	34
Cultivo amebiano.....	34
Cultivo de la línea celular HepG2 .....	35
Co-cultivos parásito:célula blanco .....	36
Cuantificación de proteínas .....	37
Inmunoprecipitación .....	38
Electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) .....	40
Tinción de Plata.....	41
Inmunotransferencia (Western blot).....	43
Co-cultivos parásito:célula blanco y tratamiento con HGF .....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
Trofozoitos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS expresan la lectina Gal/GalNAc. ....	48
Inmunodetección de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc con un anticuerpo comercial anti-HGF de humano.....	50
Expresión de c-Met en células HepG2 utilizadas en los cocultivos .....	52

Análisis de Western blot de la muestra proveniente de un cocultivo trofozoitos:células HepG2 inmunoprecipitada con anticuerpo anti-Lectina o con anticuerpo anti-c-Met reveladas con anticuerpo anti-c-Met.....	53
Análisis electroforético de las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-Lectina o con anticuerpo anti-c-Met, provenientes de un cocultivo trofozoitos:células HepG2 mediante tinción de plata .....	55
Análisis microscópico de cocultivos entre <i>E. histolytica</i> y células HepG2 .....	58
CONCLUSIONES .....	61
ANEXO I .....	63
ANEXO II .....	64
ANEXO III .....	74
BIBLIOGRAFÍA .....	79

# GLOSARIO

Ab: Anticuerpo.

Abs: Absorbancia.

Ac-DEVD-CHO: N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp aldehido.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AgNO<sub>3</sub>: Nitrato de Plata.

APG: Agarosa proteína-G.

APS: Persulfato de amonio.

ATCC: Colección Americana de Cultivos Celulares.

BCA: Ácido bicinconínico.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidrato.

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGTA: Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético.

Gal: Galactosa.

GalNAc: N-acetilgalactosamina.

GPI: Glicosilfosfatidilinositol.

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.

HRP: Peroxidasa de rábano.

IA: Iodoacetamida.

IgA: Inmunoglobulina tipo A.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

IL-2: Interleucina-2.

INF- $\gamma$ : Interferón-  $\gamma$ .

IP C: Muestra inmunoprecipitada con anticuerpo anti-c-Met.

IP L: Muestra inmunoprecipitada con anticuerpo anti-Lectina.

Ipp.: Anticuerpo inmunoprecipitante

kDa: Kilodalton

M: Molar.

mM: Milimolar.

MPM: Marcadores de peso molecular.

nm: Nanómetro.

PAO: Óxido de fenilarsina.

PBS: Buffer salino de fosfatos.

PBS-A: Buffer de fosfatos amebiano.

PFA: Paraformaldehido.

pI: Punto isoeléctrico.

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol bifosfato.

PM: Peso molecular

PRR's: Receptores de reconocimiento de patrones.

PTP: Proteína tirosina fosfatasa.

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

Rpm: Revoluciones por minuto.

SAPLIPs: Proteínas de tipo saposina.

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio.

TBS: Tris buffer salino.

TBS-T20: Tris buffer salino con tween 20.

TEMED: N,N,N,N-Tetrametiletildiamina.

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano.

TYI-S-33: Trypticaseína, levadura, hierro y suero, ensayo 33.

$\mu$ L: Microlitro.

# PRÓLOGO

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario responsable de la amebiasis en humanos y otros mamíferos (primates, cánidos, felinos, porcinos, roedores, bovinos).. El ciclo de vida del parásito es simple, está constituido por el quiste infeccioso y el trofozoito invasivo. Esta infección ocurre cuando el quiste es ingerido en agua o comida contaminada. Las dos principales entidades clínicas derivadas de la infección con *E. histolytica*: la colitis amebiana y el absceso hepático, son responsables de al menos 100,000 muertes a nivel mundial cada año, siendo países subdesarrollados los más afectados. La infección puede desencadenar afecciones graves como la disentería e incluso la amibiasis extraintestinal, llegando a formar en ocasiones absceso hepático. Aunque el tratamiento de la amibiasis invasiva con antibióticos y antiparasitarios como metronidazol es efectivo, se tiene la desventaja de la presencia de efectos secundarios tóxicos no deseados, así como la necesidad del uso de medicamentos adicionales en un 50% de los pacientes.

La patogenicidad del parásito parece ser el resultado su potente actividad citotóxica, la cual permite al parásito matar a las células del hospedero en minutos de manera contacto-dependiente. El mecanismo exacto se desconoce actualmente, aunque se sabe con certeza que las interacciones entre proteína y carbohidrato son imprescindibles en este proceso, donde una lectina de la superficie de los trofozoitos se une a galactosa (Gal) y N-Acetilgalactosamida (GalNAc) en la superficie de las células del hospedero. Esta lectina está constituida por un heterodímero con un peso molecular de 260 kDa formado por una subunidad pesada de 170 kDa y una ligera de 35/31 kDa, siendo el dominio extracelular de la subunidad pesada, el que contiene el dominio de reconocimiento de carbohidrato (CRD, por sus siglas en inglés). La función precisa de las

subunidades ligera e intermedia en la adherencia y en la citotoxicidad aún se desconoce con exactitud.

El análisis de la secuencia del CRD de la lectina amebiana Gal/GalNAc reveló que ésta es similar a la secuencia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), justamente en la región de este último que se une al receptor c-Met. Posteriormente, se demostró que el péptido recombinante del CRD de la lectina amebiana compite con el HGF por la unión al receptor c-Met, y que esto no se debe a la actividad de unión de carbohidrato del CRD.

Esta información, sumada al hecho de que la lectina amebiana parece funcionar en la adherencia, pero también en la citotoxicidad debido a características intrínsecas de su estructura molecular, me ha llevado a proponer que la lectina se une a un ligando más específico, tal como el receptor c-Met expresado en la superficie de solamente algunos tipo de células, como por ejemplo, hepatocitos (lo cual podría tener relación con el tropismo del parásito por el hígado), resultando en la activación de alguna vía de señalización al interior de la célula o bien bloqueando el único receptor para el HGF.

En esta tesis, se llevó a cabo un análisis de la unión entre la lectina y el receptor c-Met mediante inmunoprecipitación y ensayos *in vitro* provenientes de cocultivos entre trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y células HepG2.

# AMEBIASIS, *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* Y LA LECTINA GAL/GALNAC

La amebiasis en humanos, es una enfermedad generada por el protozoario *Entamoeba histolytica* y responsable de 100,000 muertes al año a nivel mundial debido a su progresión intrainestinal o extraintestinal, haciendo esta la segunda causa de muerte debido a un parásito después de *Plasmodium* [1]. Se estima que es responsable de la infección de aproximadamente 500 millones de personas o al menos el 10% de la población mundial [2]. En México durante el 2016 se registraron 220, 205 casos de amebiasis intestinal a nivel nacional, constituyéndose como la 15va. causa de enfermedad a nivel nacional [3]\*, esta cifra no ha variado mucho a lo largo del tiempo por lo que es de suma importancia en la salud poblacional.

Por otra parte, aunque el tratamiento de la amebiasis invasiva con metronidazol es bastante efectivo, éste tiene la desventaja de los efectos colaterales, así como la necesidad del uso de medicamentos adicionales para curar la infección en un 40-60% de los pacientes. Además, si bien la resistencia al metronidazol no ha sido referida, se han obtenido *in vitro* clones amebianos resistentes al mismo; de ahí la preocupación del surgimiento de la resistencia a dicho medicamento; además, la morbilidad y mortalidad causadas por la amebiasis indican que la terapia disponible es insuficiente [4]. La transmisión de este parásito es por medio de comida y agua contaminadas, haciendo que la incidencia sea mayor en zonas con deficiencias en sanidad [1], como los son países en vías en desarrollo debido a los hábitos de higiene personal. así como el incorrecto manejo de los alimentos.

---

\* Anexo 1. Se muestran las estadísticas de las 20 principales causas de enfermedad a nivel nacional reportadas en 2016 por grupos de edad.

El ciclo de vida de *E. histolytica* empieza con la forma de quiste infeccioso (tetranucleado) adquirido vía oral por contaminación fecal presente en agua y comida, en el intestino se desenquista para convertirse en un total de ocho trofozoitos (mononucleados), esta última forma es móvil e invasiva ya que se adhiere a la mucosa y al epitelio intestinal mediante la lectina de superficie Gal/GalNAc al unirse a carbohidratos de superficie en las células del hospedero [5]. El trofozoito genera enfermedades invasivas, con mayor o menor daño en el tejido, como: absceso hepático y enfermedades metastásicas (Figura 1).

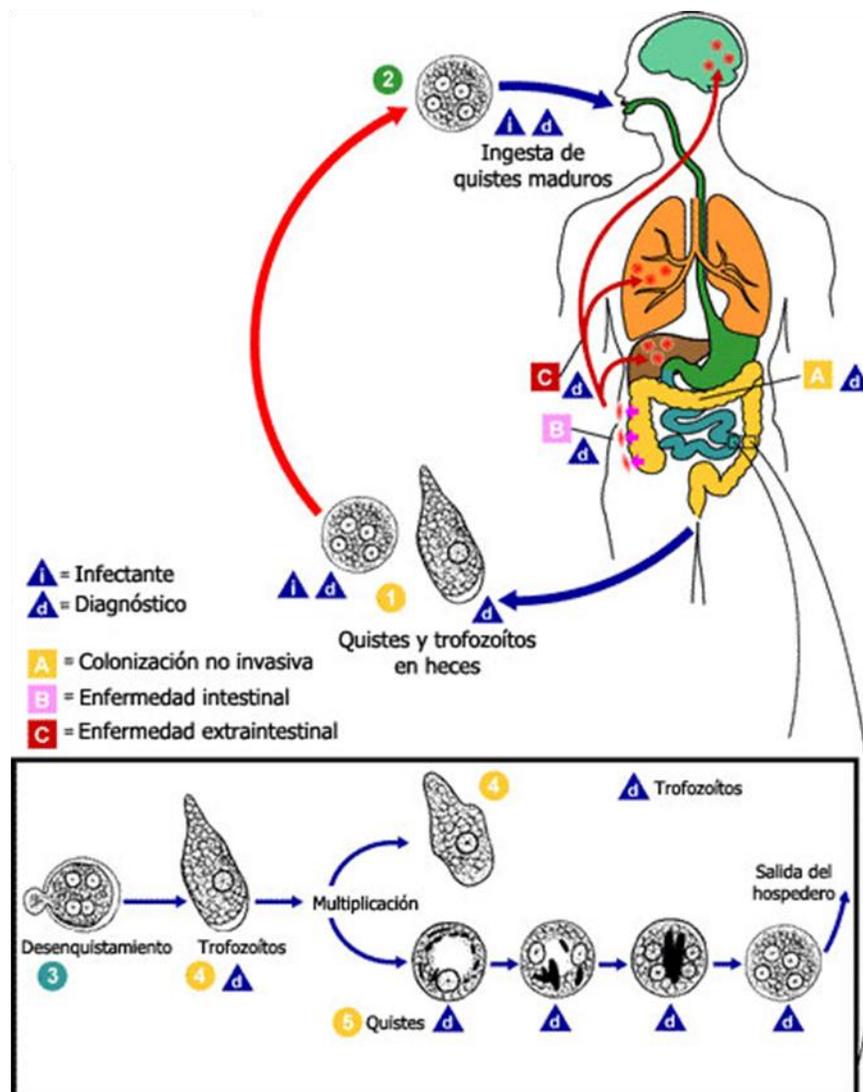
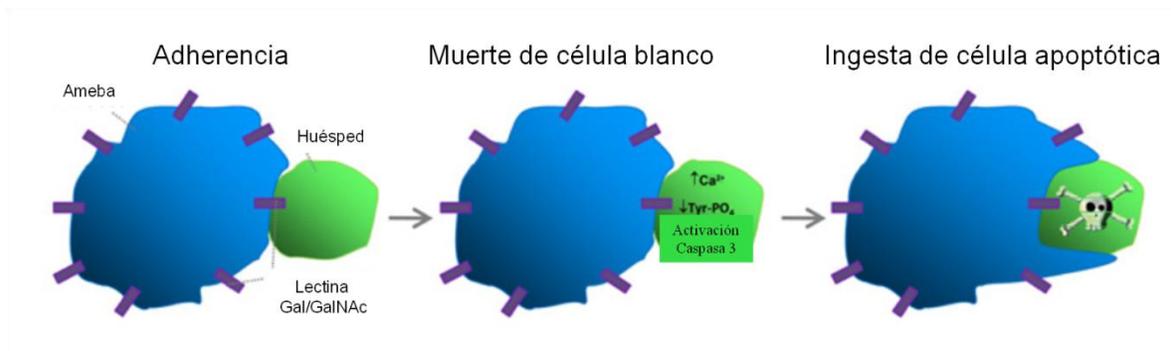


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* en el humano. (Modificada de Center for Disease, Control and Prevention)

Dicho daño se atribuye a la potente actividad citotóxica del parásito, y es por dicha razón que Schaudinn le nombró "*histolytica*" en 1903 [6]. La actividad citotóxica de *E. histolytica* es muy potente contra una gran variedad de tipos celulares en mamíferos, incluyendo neutrófilos, linfocitos-T y macrófagos, así como diversas líneas celulares. Sin embargo, el mecanismo por el cual el parásito logra la muerte celular en el hospedero sigue sin conocerse con exactitud [1]. Se han realizado numerosos estudios, identificando diversos mecanismos así como algunas moléculas involucradas en la muerte celular; no obstante, la vía precisa no se conoce aún. En 2011, Ralston y Petri [1] establecieron un modelo que explicaba la citotoxicidad de la ameba sobre la célula hospedera; basados en los avances de la investigación; en este se distinguen varios sucesos: 1) la ameba se adhiere a la célula blanco vía su lectina Gal/GalNAc, 2) la ameba induce un influjo de calcio al interior de la célula, así como la activación de fosfatasa con la consecuente desfosforilación de tirosinas y la activación de la apoptosis (mediante la acción de la caspasa-3) y, 3) la fagocitosis de la célula apoptótica (Figura 2). A continuación se describe el mecanismo **CITOTÓXICO**.



**Figura 2. Diagrama esquematizado del mecanismo citotóxico de la célula blanco por *E. histolytica*. (Modificada de Ralston K.S. et al., 2011)**

○ Mecanismo citotóxico

1) Adherencia

La lectina de superficie Gal/GalNAc tiene la función de unirse a los dominios de carbohidratos (Gal y/o GalNAc) presentes en las células del

hospedero. Se ha demostrado la unión a una variedad de sustratos incluyendo glicoproteínas de mucina de colon, neutrófilos, eritrocitos, algunas bacterias y diversas líneas celulares provenientes de mamíferos [5].

## 2) Inducción de muerte celular

### ○ Flujo de calcio

Varios inhibidores y agentes quelantes de calcio logran inhibir la citotoxicidad amebiana, por lo que se piensa el flujo de calcio contribuye a la muerte celular. Esto fue demostrado por primera vez cuando se bloqueó el canal de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  con verapamilo y bepridil, teniendo como consecuencia el bloqueo de la actividad citotóxica, por el contrario el bloqueador tetrodotoxin del canal de  $\text{Na}^+$  no tuvo el efecto antes mencionado [7]. Por otra parte, los agentes quelantes extracelulares como el EGTA y el etilen-glicol, también inhiben la citotoxicidad [8]. Esto quiere decir que el flujo de calcio extracelular al interior de la célula es crítico para generar daño. Por otro lado, se ha demostrado que el flujo de calcio al interior del parásito también es necesario al haber sido previamente tratado con bloqueadores de los canales de calcio y evitar la citotoxicidad de este [7].

### ○ Desfosforilación

El parásito *E. histolytica*, tiene la capacidad de alterar la fosforilación de las tirosinas. Después de entrar en contacto el parásito con la célula blanco, se ha podido detectar un decremento en las fosfotirosinas [9]. El pretratamiento de células blanco con PAO (óxido de fenilarsina, por sus siglas en inglés) un inhibidor permeable de proteína tirosina fosfatasa (PTP, por sus siglas en inglés), bloqueó la desfosforilación de tirosina inducida por *E. histolytica*. Sin embargo, al ser tratado el parásito con PAO, no se inhibe la desfosforilación de la célula blanco. Cabe mencionar, que el pretratamiento de las células blanco con dicho inhibidor, se previene la muerte celular; esto quiere decir que la desfosforilación contribuye a la muerte provocada por la interacción con *E. histolytica* [9].

- Activación de caspasa-3.

Después del aumento en el flujo de calcio al interior de la célula, así como la desfosforilación, se produce la muerte celular. Para conocer este mecanismo se han realizado diversos estudios, los cuales indican de manera tanto *in vitro* como *in vivo*, que es mediante la activación del mecanismo apoptótico dependiente de la caspasa-3 al entrar en contacto con *E. histolytica*. A células Jurkat se les añadió Ac-DEVD-CHO (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp aldehído) un inhibidor de caspasa 3, previniendo así el efecto citotóxico del parásito [10]. Por otro lado, de manera genética y farmacológica, se inhibieron las caspasas 8 ó 9 sin producir un cambio en la citotoxicidad del parásito, por lo que se deduce que la apoptosis no depende de estas vías de señalización [10].

Asimismo, en modelos animales, estudios de la formación de abscesos hepáticos han demostrado que existe una degradación del ADN [11]. Esta vía de apoptosis no es dependiente de los receptores Fas y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), dado que la degradación del ADN sigue presente aún en ratones con falta de dichos receptores [11]. Inhibidores de caspasas de amplio espectro reducen considerablemente la formación de abscesos hepáticos en ratones SCID [12]; además, ratones silenciados de caspasa-3 presentan una mayor resistencia a la amibiasis intestinal que los ratones silvestres [13]. Esta información en conjunto, hace notar que no se activa la respuesta inmunológica por parte del hospedero y podría explicar el por qué se presenta una débil respuesta inflamatoria en la amibiasis invasiva a pesar de haber una destrucción de tejido muy extensa. Finalmente, es un completo misterio el hecho de provocar apoptosis en cuestión de minutos dado que normalmente es un proceso que tarda horas y también es posible que *E. histolytica* sea capaz de activar una vía apoptótica no clásica [1].

### 3) Fagocitosis de la célula apoptótica

La célula muerta por apoptosis es fagocitada por la ameba; de hecho, estudios realizados coincubadas células Jurkat con amibas demostraron que la ameba fagocita mayormente a aquellas células que muestran fosfatidilserina en la cara externa de su membrana plasmática (Huston et al, 2003).

El mecanismo recién descrito constituyó el modelo de acción de la ameba durante varios años. Sin embargo, Ralston *et al.* (2014) demostraron que *Entamoeba histolytica* lleva a cabo el proceso de **TROGOCITOSIS**, (de la palabra griega “*trogo*”, morder) éste es un proceso que ha sido descrito en la activación de los linfocitos para iniciar una respuesta inmune específica a un determinado antígeno [14], [15]. Ralston *et al.* demostraron que la ameba ingiere “bocados” o pedazos de la célula hospedera, y que este “mordisqueo” ocurre repetidas veces hasta terminar en muerte celular; una vez muerta la célula hospedera, la ameba se separa. Este mecanismo también es gradual y se distinguen tres eventos, como se muestra en la Figura 3:

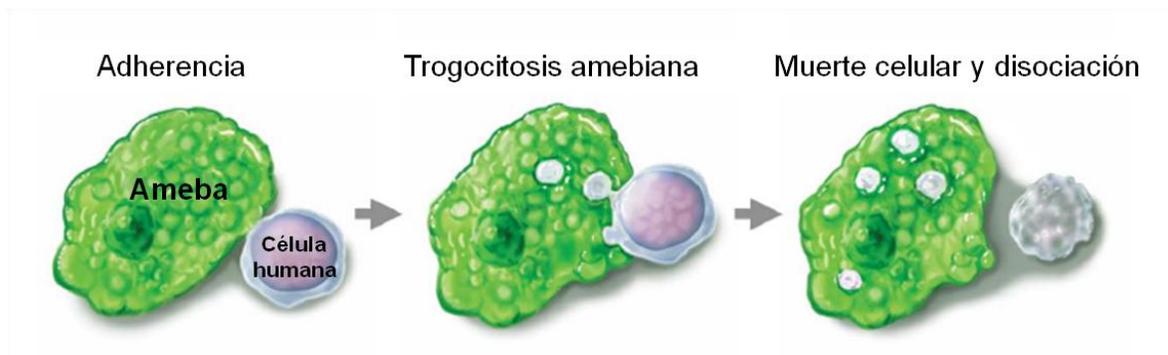


Figura 3. Diagrama esquematizado del proceso de trogocitosis de la célula blanco por *E histolytica*. (Modificada de Ralston K. S. *et al.*, 2014).

- Trogocitosis

- 1) Adherencia

El proceso de adherencia en este último mecanismo mencionado, se lleva a cabo de igual manera que como se describió en un inicio, por lo que a continuación sólo se mencionan las diferencias entre trogocitosis y apoptosis.

- 2) Trogocitosis amebiana

Después de la adherencia, los trofozoitos de *E. histolytica* ingieren "pedazos" de las célula blanco [16]. Es un proceso rápido que sucede en un minuto después de haberse adherido a la superficie celular del huésped. Al realizar experimentos entre amebas y células Jurkat, se observó que los trofozoitos al ser incubados con este tipo de células, tanto muertas como vivas, sólo las células vivas fueron afectadas por trogocitosis, mientras que las muertas fueron ingeridas en su totalidad. Debido a este fenómeno observado, se sugiere que las características de la superficie de células previamente muertas son diferentes y es así cómo el parásito determina el tipo de ingesta a realizar [16]. Además, al ser un proceso rápido, depende de ciertas condiciones como temperatura fisiológica, rearreglos de la actina amebiana, la expresión y señalización de la lectina Gal/GalNAc, de EhC2PK (dominio C2 de proteína cinasa de *E. histolytica*, por sus siglas en inglés) y de PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa, por sus siglas en inglés) y de haber interferencia con cualquiera de estas proteínas, se ve disminuida la trogocitosis y por tanto la muerte celular [16].

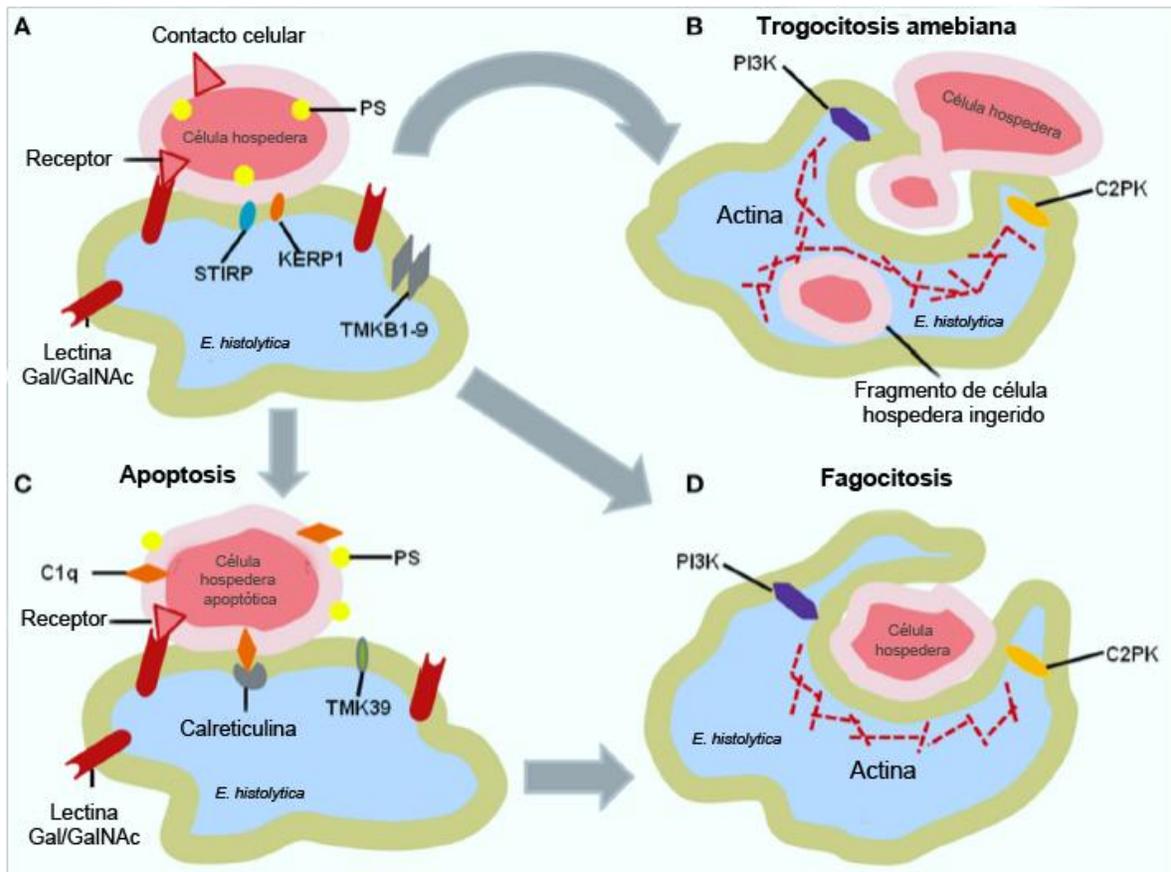
Interesantemente Ralston *et al.* encontraron que las amebas que previamente habían trogocitado eran "cebadas" adquiriendo una mayor actividad de trogocitosis. Por otra parte, el mismo grupo demostró que el proceso se lleva a cabo en distintos tipos celulares, incluyendo enterocitos, linfocitos, células de tejido intestinal y eritrocitos; a pesar de que estos tipos celulares presentan

diferentes constituyentes en su superficie, pareciera que una interacción ubicua es la que ocurre en las superficies celulares durante el proceso de trogocitosis [17].

### 3) Muerte celular y disociación

Después de la ingesta de pedazos de la célula blanco, el trofozoito se separa y eventualmente la célula muere [16].

En 2015, Begum, del grupo Chadee [18], tratando de unificar los conceptos acerca del mecanismo por el cual la amiba daña a la célula hospedera, propuso un modelo en el que se conjuntan los dos modelos que acabamos de describir, y otro más, **FAGOCITOCIS**, que pudiera dar cuenta de la ingesta de eritrocitos. Estos, se esquematizan en la Figura 4. Los procesos descritos: a) inducción de apoptosis (por un mecanismo a la fecha desconocido pero que se cree involucra la participación de la lectina Gal/GalNAc), b) el proceso de trogocitosis y el de c) fagocitosis de la célula en la que se indujo previamente apoptosis.



**Figura 4.** (A) El contacto celular entre *E. histolytica* y la célula hospedera es mediado por la lectina Gal/GalNAc y receptores de Gal y GalNAc en la superficie de la célula hospedera. Otras proteínas amebianas están involucradas en la adherencia del parásito, como las proteínas de serina, treonina e isoleucina transmembranales (STIRP, por sus siglas en inglés) y TMKb1-9, miembro de la familia de cinasas transmembranales. Después de suceder este contacto, tres eventos pueden tener lugar: (B) Trogocitosis amebiana, (C) muerte celular apoptótica y (D) fagocitosis. En (B) células grandes son dañadas mediante la trogocitosis amebiana. Este proceso, requiere la traducción de señales de PI3K y C2PK para la polimerización de actina. (C) Células hospederas que ya fueron inducidas a la muerte apoptótica, expresan fosfatidilserina y la proteína del complemento C1q que inducen la opsonización por parte de la ameba, involucrando al receptor de calreticulina amebiano. Finalmente, en (D) tanto las células apoptóticas y pequeñas células, experimentan el proceso de fagocitosis. La vía de señalización para la fagocitosis también es mediada por PI3K y EhC2PK, provocando también la polimerización de actina. (Modificado de Begum S. *et al.*, 2015)

- Fagocitosis

- 1) Adherencia

A pesar de saber que la adherencia se lleva a cabo por medio de la lectina Gal/GalNAc, se ha visto que *E. histolytica* para realizar la fagocitosis en células

previamente muertas, no necesita la actividad de la lectina, dado que al bloquear el CRD con exceso de galactosa no se previene este proceso [19]. Esto sugiere que células muertas o en vías de muerte celular, exponen en la superficie celular otro tipo de ligandos y el parásito recluta otro tipo de receptores además de la lectina Gal/GalNAc.

## 2) Fagocitosis

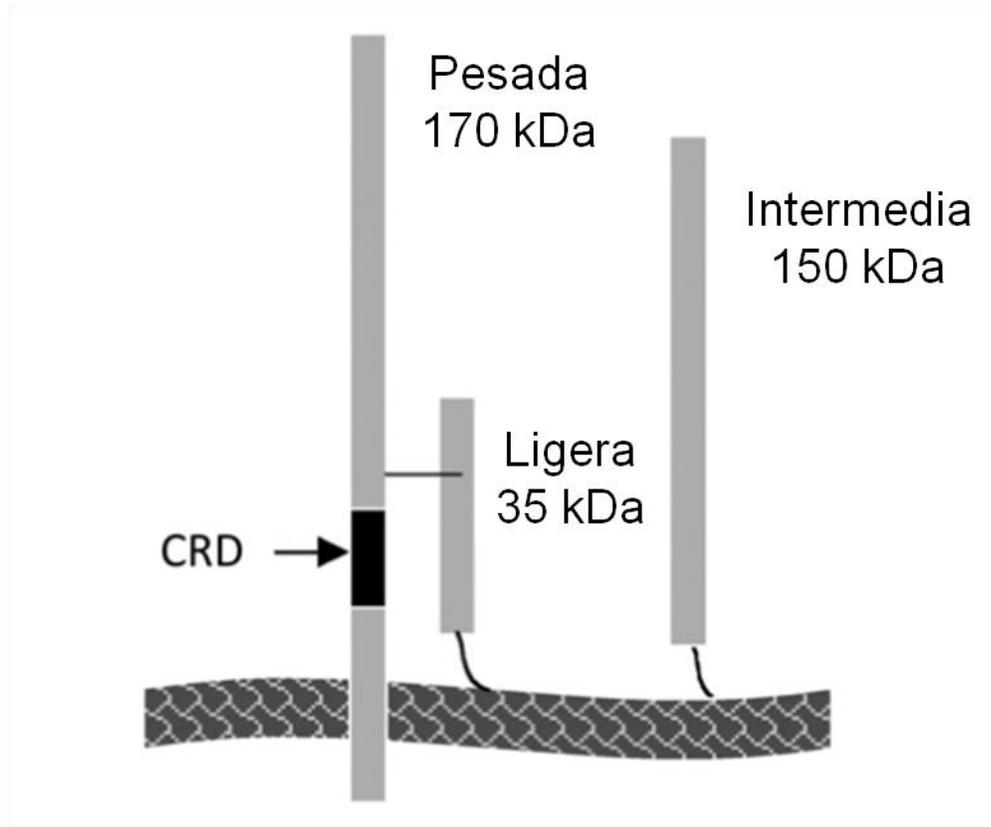
Este mecanismo de acción es una manera para eliminar a las células previamente muertas sin provocar una respuesta inflamatoria debido a las moléculas remanentes que provoca la muerte celular [20], [21]. Células apoptóticas son fagocitadas por el reconocimiento de fosfatidilserina en la superficie celular, esto se demostró al observar que células Jurkat al pasar por un proceso apoptótico exponían esta molécula en la superficie. Asimismo, células Jurkat sanas, las cuales no son propensas a ser fagocitadas, fueron modificadas para contar con fosfatidilserina en superficie, esto provocó que se activara el proceso de fagocitosis mediado por la ameba [22]. Por otra parte, ha sido demostrado que en la superficie amebiana hay moléculas, como la PATMK [23] que reconocen ligandos presentes en células del hospedero que han muerto por un mecanismo distinto al de apoptosis.

Por otro lado, este parásito cuenta con otros efectores citotóxicos además de la lectina Gal/GalNAc, dichos efectores son: ameboporos (A, B y C) [24], diversas SAPLIPs (proteínas de tipo saposina por sus siglas en inglés) [25]–[27], alrededor de 50 proteasas de cisteína [28]–[32], la peroxidasa dependiente de tiol (proteína de superficie asociada a una lectina) [33], proteínas no asociadas a lectina, como: la familia de EhSTIRPs [34], EhTMKB1-9 [35], y KERP1 [36], [37], así también, cuenta con vesículas intracelulares ácidas con un importante papel en la citotoxicidad [38].

## Lectina Gal/GalNAc

En 1986, Radvin y colaboradores [39], obtuvieron, mediante el uso de hibridomas, anticuerpos monoclonales contra *Entamoeba histolytica*, uno de estos anticuerpos fue utilizado para poder purificar la lectina amebiana Gal/GalNAc. Posteriormente, gracias a este trabajo de Radvin, en 1987, Petri y colaboradores, realizaron una purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando galactosa, Mab H8-5 y ASOR (el inhibidor de adherencia amebiana más potente), obteniendo una muestra, que al ser analizada electroforéticamente bajo condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol, mostró una proteína con un peso molecular de 170 kDa. Además, se demostró que esta proteína, mediante un análisis de Western blot, es reconocida por anticuerpos que inhiben la adherencia a células glicosiladas [39], indicando así que es una lectina de membrana, al ser anticuerpos que se unen a la superficie de los trofozoitos. Después de realizada la purificación, el análisis estructural reveló una molécula glicosilada, bajo condiciones no reductoras, con un peso de 260 kDa y un pI (punto isoeléctrico) de 6.2 [40]. Sin embargo, el tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol mostró dos subunidades, conformando así un heterodímero, el cual tiene una subunidad pesada (170 kDa) y una subunidad ligera (31/35 kDa) unidas por un enlace disulfuro, y a su vez están unidas no covalentemente a una subunidad intermedia (150 kDa) [41][42] (Figura 5). Al secuenciar la subunidad pesada, el resultado reveló que consiste en 1,291 residuos aminoacídicos, 26 correspondientes al dominio transmembranal, 41 al dominio citoplasmático y el resto a la región extracelular con una abundante región rica en cisteína [43], [44]. La subunidad pesada pertenece a una familia de cinco genes, los cuales cuentan con una homología entre ellos que va desde el 89 al 95 % [45]. Sin embargo, la subunidad ligera está codificada por 6 o 7 genes, de los cuáles se obtienen isoformas con diferentes modificaciones postraduccionales con una homología de entre 79 % y 85 % [46].

Estas isoformas cuentan con una composición de aminoácidos muy similar; además, tienen un peso molecular que varía desde 31 hasta 35 kDa [46], [47].



**Figura 5. Composición de la lectina Gal/GalNAc. (Modificada de Petri, Jr., W.A et al., 2002)**

Las subunidades intermedia y ligera están ancladas a la membrana mediante un glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que la subunidad pesada es una proteína integral de membrana. El dominio extracelular rico en cisteínas de la subunidad pesada contiene el CRD (Dominio de Reconocimiento del Carbohidrato, por sus siglas en inglés), el cual interviene en la unión a carbohidratos [5].

Aunque se desconocen las funciones de las subunidades intermedia y ligera en la adherencia y la citotoxicidad, se sabe que la adherencia mediada por el CRD ubicado en la subunidad pesada, es necesaria para la actividad citotóxica del parásito, ya que un exceso de Gal o GalNAc previene dicha adherencia y la

muerte celular [14][15]. Además, se han utilizado líneas celulares modificadas con ausencia de glicosilación en superficie y resultaron ser resistentes a la citotoxicidad [50].

Así también, se ha visto que al coincubar el parásito con células blanco, en presencia de un exceso de Gal o GalNAc siendo forzada la interacción entre estos tipos celulares mediante centrifugación, da como resultado la adherencia pero no así la muerte celular [51]. Por otro lado, se ha probado que la lectina desempeña diferentes roles en la adherencia y la citotoxicidad, al poner en contacto el parásito con anticuerpos anti-Lectina Gal/GalNAc produciendo un bloqueo en la citotoxicidad pero no en la adherencia [52].

Asimismo, Goldston *et al.* [53], demostraron que la unión a diferentes ligandos, tales como el colágeno y los eritrocitos, desencadenan un aumento de la lectina en las balsas lipídica ubicadas en la membrana amebiana; también, notaron un incremento en el calcio intracelular y del fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), sugiriendo así la activación de una vía de señalización en el parásito.

Por otra parte, diversos estudios han podido correlacionar la actividad de adherencia de la lectina en las mucinas colorectales, provocando la infección parasitaria [54], [55]. Además, se ha demostrado que la lectina Gal/GalNAc, por medio del CRD, provoca la inducción de una respuesta pro-inflamatoria en macrófagos [56]–[59] y probablemente, mediante los PRR's (receptores de reconocimiento de patrones, por sus siglas en inglés), la lectina Gal/GalNAc al hacer contacto es capaz de inducir el inflamosoma en macrófagos [60]. Experimentos *in vitro*, han demostrado que la lectina induce en células T la producción de IL-2 y de INF- $\gamma$ , evadiendo así una respuesta T<sub>H</sub>1 [61]. Así también, se le atribuye a la lectina la maduración y activación de células dendríticas debido a la producción de citocinas de tipo T<sub>H</sub>1 [62].

Así también, se observó en macrófagos murinos que la lectina Gal/GalNAc, induce la activación de una vía de señalización en receptores tipo Toll.

Kammanadiminti *et al.* (2003), demostraron que el CRD es la molécula responsable de estimular la expresión del ARNm del receptor TLR-2, al inhibir mediante el uso de anticuerpos monoclonales, la región donde se ubica el CRD de la lectina, dando como resultado la falta de expresión de este ARNm. Además, demostraron que la regulación en la transcripción del gen de TLR-2 es dependiente de NF- $\kappa$ B y de p38 (una MAPK o proteína quinasa activada por mitógenos), provocando de esta manera la activación de macrófagos [58]. Por otro lado, Galván-Moroyoqui *et al.* (2011), demostraron que tanto los trofozoitos como el CRD de la lectina, inducen la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4 en la superficie de células CaCo2 (células de adenocarcinoma de colon humano), mediante las vías de activación clásicas, esto da lugar a la expresión y liberación de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, al inhibir estas vías de señalización se observó una disminución en la adhesión y efecto citotóxico del parásito. De manera interesante, al poner un exceso de galactosa en células con la expresión inducida de los receptores TLR-2 y TLR-4 en superficie, la unión con el CRD se observó disminuida. Estos resultados indican la importancia de la adherencia del trofozoito mediante el CRD ubicado en la lectina Gal/GalNAc, el cual podría ser considerado como un PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) ya que propicia la activación de los receptores TLR, así como la secreción de citocinas pro-inflamatorias, todo contribuyendo al daño y la destrucción celular [63].

Asimismo, se sabe que las amebas tiene la capacidad de evadir la respuesta del complemento, dado que adquieren mediante la eritrofagocitosis proteínas reguladoras del complemento [64], aunque recientemente se ha sugerido la existencia de una proteína en superficie de los trofozoitos con un peso de 21 kDa que cumple con esta función [65]. Además, se ha visto que hay IgG e IgA presentes en pacientes con amebiasis, esto correspondería a la respuesta humoral del huésped [66]–[68],



# FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SU RECEPTOR c-MET

En humanos, el receptor c-Met es el producto proteico del proto-oncogen MET ubicado en el cromosoma 7q21-31 [70]. Así mismo, se conoce a MET como oncogen, dado que una respuesta exacerbada provocada por su producto proteico, tiene como consecuencia el desarrollo de cáncer [71]. Por otra parte, este receptor pertenece a la familia de las tirosin cinasas [71]–[73]. Este receptor, es expresado en la superficie de células epiteliales de diversos órganos, tales como hígado, páncreas, próstata, riñón, músculo y médula ósea, desde la embriogénesis hasta la edad adulta [74]. La estructura del receptor c-Met, se estudió a partir de su amplificación y sobreexpresión en la línea celular GTL16 [75]. La proteína es un heterodímero de 190 kDa, compuesto por una subunidad  $\alpha$  de 50 kDa, unida mediante un enlace disulfuro a la subunidad  $\beta$  de 150 kDa. La molécula se sintetiza a partir de un precursor de 170 kDa; esta cadena sencilla se glicosila de manera cotraduccional [76]. Posteriormente, ocurren rearrreglos y procesamientos proteolíticos, dando lugar al heterodímero de 190 kDa [77]. La subunidad  $\alpha$  junto con el N-terminal de la subunidad  $\beta$  se encuentran expuestas en la superficie, esta última embebida en la membrana celular [78]. En cuanto al C-terminal, este se encuentra de manera

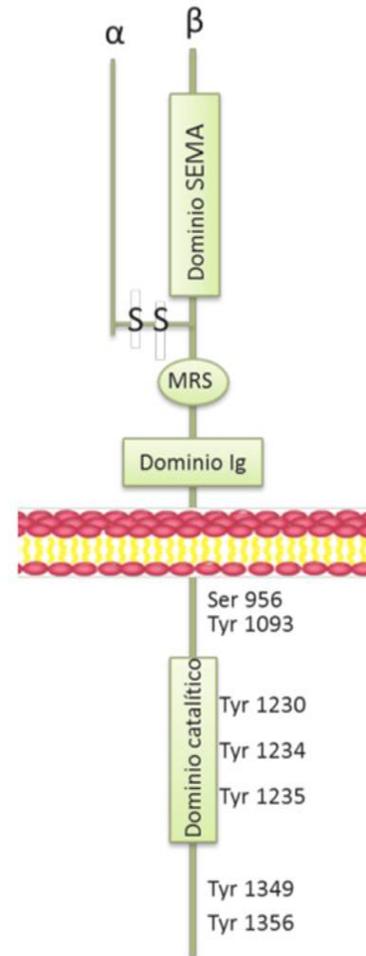
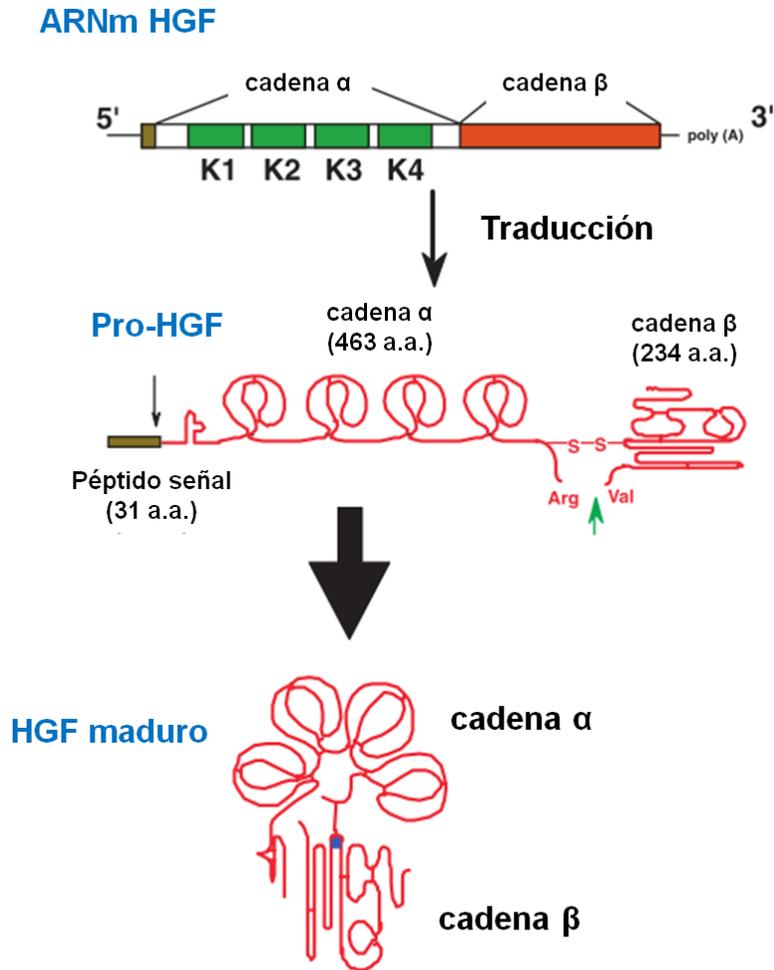


Figura 7. Estructura del receptor c-Met. (Palestino-Domingues M. et al., 2012)

citoplasmática y es en esta porción en la que se encuentra el dominio de tirosin cinasa [70], [73], [79], así como los sitios de fosforilación involucrados en la regulación de su actividad [80] [81] (Figura 7).

Por otra parte, el ligando de este receptor es el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés). Anteriormente, se pensaba que el Factor de Dispersión (SF, por sus siglas en inglés), llamado así por su actividad en el aumento de la motilidad e invasividad de células epiteliales [82], [83] y el HGF eran moléculas distintas. Posteriormente, se realizaron diversos estudios en los que se llegó a la conclusión que tanto el SF como el HGF se trataban de la misma molécula [76], [84]–[87] Sin embargo, no fue sino hasta 1991, que Bottaro *et al.*, así como Naldini *et al.*, encontraron que el HGF es el ligando del receptor c-Met [76], [88].

En la actualidad, se sabe que el gen en humanos que codifica el HGF se encuentra en el cromosoma 7q21.1, es secretado por células mesenquimales como una cadena sencilla a lo que se llama precursor sin actividad biológica (pro-HGF), consta de 729 residuos aminoacídicos y un peso de 92 kDa, este se activa por la acción de la serina proteasa uPA (activador del plasminógenos tipo urinasa) de manera extracelular, efectuando una lisis entre los residuos Arg494 y Val495 [85], [89]–[91]. Como consecuencia de esta lisis, se obtienen dos subunidades: la pesada ( $\alpha$ ) con 463 residuos aminoacídicos, cuatro dominios tipo Kringle y un peso de 55-65 kDa, y la ligera ( $\beta$ ) con 234 residuos aminoacídicos de 32 o 36 kDa, cabe mencionar que la subunidad  $\beta$  es homóloga las proteasas de serina que participan en la cascada de coagulación, pero carece de actividad proteolítica. Estas subunidades se encuentran unidas mediante un enlace disulfuro [74], [89], [92], [93]. (Figura 8)



**Figura 8. Producción, activación y estructura del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)**  
(Modificada de Nakamura T. *et al.*, 2010)

Por otra parte, se sabe que el HGF actúa como un factor pleiotrópico y citocina; promueve en las células la proliferación, supervivencia, movilidad, diseminación, diferenciación y morfogénesis [94]–[96]. Además, tiene un papel protector en diferentes enfermedades como: cirrosis hepática [97], fibrosis pulmonar [98] y nefropatías [99], [100].

Así pues, la unión entre el receptor c-Met y su ligando, el HGF, genera una autofosforilación varias tirosinas localizadas en el dominio citoplásmico de la cadena  $\beta$  [101]. Al llevarse a cabo estas fosforilaciones, se reclutan diversos efectores de señalización, tales como: GRB2 [102], SHC [103], así como

moléculas efectoras: fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) [104], SHIP-2 [105], y STAT-3 [106], [107], que conducen a la activación de factores de transcripción disparando distintas acciones biológicas como se indican en la Figura 9.

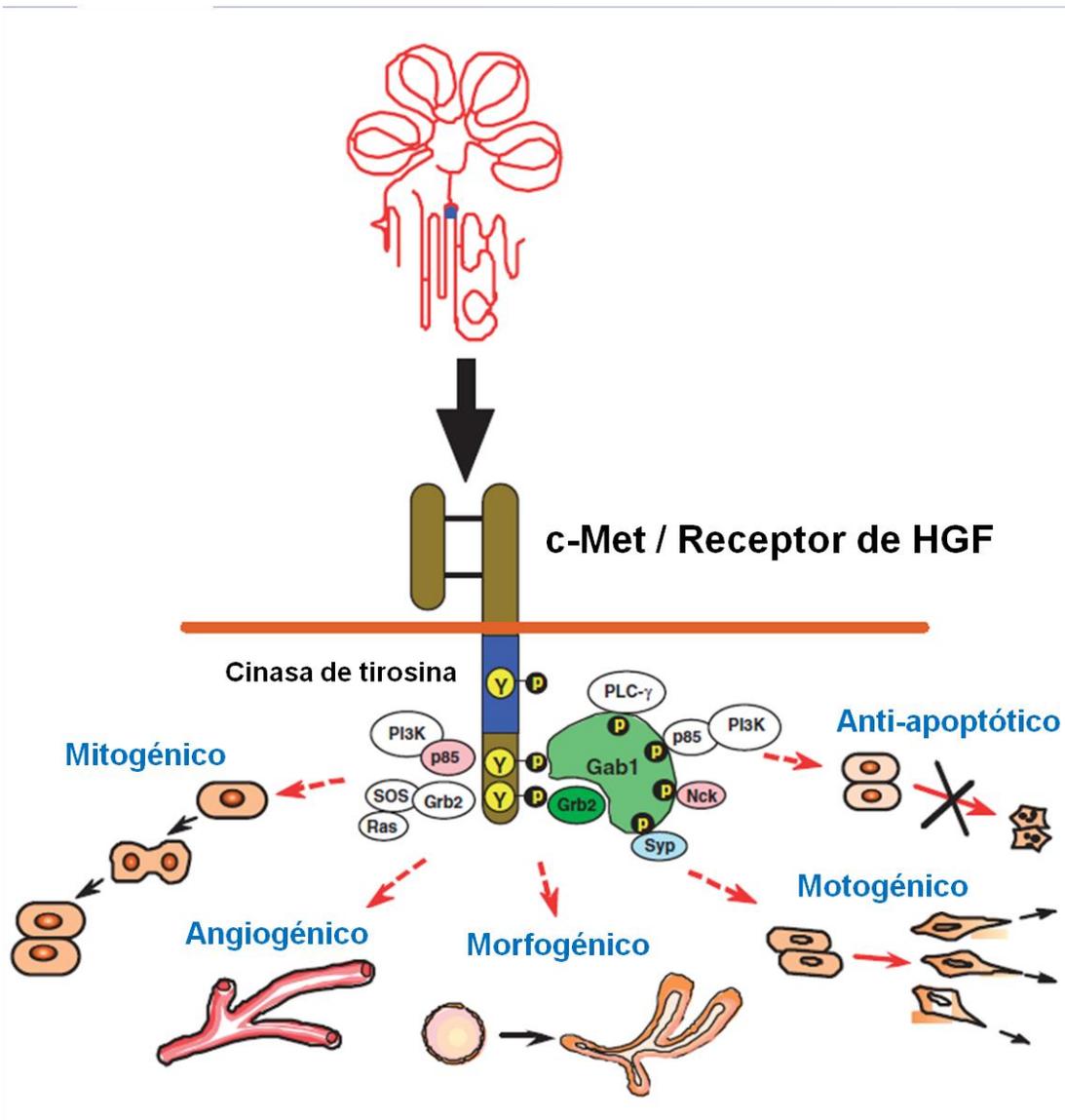


Figura 9. Diversas acciones biológicas generadas por la unión del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y el receptor c-Met. (Modificada de Nakamura T. *et al.*, 2010)

Entre las diversas funciones mediadas por la señalización HGF/c-Met se encuentra la regeneración hepática. Esto ha sido demostrado en un modelo animal en ratas con hepatectomía parcial, detectándose un incremento tanto de ARNm de HGF como del HGF en la porción remanente del hígado; sin embargo, también ha sido demostrado que la señalización se lleva a cabo de manera endocrina, al verse incrementados los niveles de HGF en sangre circulante mucho antes de la síntesis de ADN en hígado [108]. Asimismo, la pérdida de la expresión de c-Met en ratones, parece indicar que no tiene consecuencias graves en condiciones fisiológicas normales; no obstante, la respuesta adaptativa a lesiones en el hígado se ve muy afectada. Igualmente, ratones carentes del gen para c-Met, mostraron ser hipersensibles a la apoptosis inducida por Fas. Del mismo modo, este tipo de ratones modificados en la expresión del receptor c-Met, al ser expuestos a tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), un necrogénico, manifestaron una alteración en la regeneración de las lesiones provocadas en lugar de un déficit en la proliferación de hepatocitos. Este retraso en la sanación del tejido, se puede asociar a una persistente respuesta inflamatoria, sobreproducción de osteopontina, temprana y prominente distrofia en la calcificación y la migración alterada de hepatocitos al área dañada [109].

Por otra lado, al ser fosforilados los residuos 956 y 1093 que se encuentran en el dominio yuxtamembranal del receptor c-Met, se inicia la endocitosis y el reclutamiento de ligasas de ubiquitina para iniciar la degradación del receptor después de la activación, representando así un punto de regulación negativa para las rutas activadas por la unión con el HGF [110], [111].

Todo en conjunto, nos indica que la interacción entre el receptor c-Met y su ligando el HGF, tiene como consecuencia primordial la supervivencia y reparación de tejidos, es por esta razón que al verse interrumpidas o modificadas las vías de señalización dependientes de esta unión, se conduce a la muerte celular y por tanto daño en tejidos y órganos.

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que *Entamoeba histolytica* es un patógeno capaz de producir en el humano absceso hepático amebiano. Se desconoce la interacción del parásito a nivel molecular con las células del hígado y por qué en el modelo experimental de absceso hepático amebiano en hámster (AHAH) pese a que inicialmente hay cierta proliferación de las células para reparar el daño conforme transcurre el tiempo la inducción de abscesos acaba por anular la regeneración.

Sin embargo, se sabe que existe una homología entre el CRD de la lectina amebiana Gal/GalNAc y la región de unión del HGF a su receptor, esta similitud y posible interacción con el receptor c-Met no se ha estudiado con anterioridad, es por esto que nos preguntamos si existe algún impedimento por parte del parásito para la correcta unión HGF/c-Met y sea esta la razón por la cual no sólo hay daño, sino que no existe una correcta regeneración hepática.

## Hipótesis

La lectina amebiana, por medio de la pequeña secuencia homóloga al HGF (localizada en el CRD), se une al receptor c-Met expresado en la superficie de las células de origen hepático, impidiendo de esta manera la interacción HGF-receptor.

## Objetivo

Explorar si la similitud estructural de la lectina amebiana con el HGF conlleva a que dicha lectina se una al receptor c-Met expresado en la superficie de las células de origen hepático.

# METODOLOGÍA<sup>†</sup>

## Cultivo amebiano

Se define una inoculación de amebas virulenta como la capacidad que tienen entre  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS para generar diversos abscesos hepáticos en 4/4 hámsters (*Mesocricetus auratus*) de sexo indistinto con un peso de 100 g [112].

Los trofozoitos se obtuvieron a partir de las lesiones provocadas en el hígado de hámsters, con un peso aproximado entre 100 - 120 gramos, que se anestesiaron con pentobarbital (8.3 mg/mL), por vía intraperitoneal en una dosis de 400 uL / 150 gramos de peso. El inóculo se administró por vía porta con una cantidad de  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  trofozoitos contenidos en 200 uL de buffer de fosfatos amebiano (PBS-A), después de siete días de haber sido inoculados, los hámsters fueron sacrificados por exposición prolongada a éter. Se extirpó el hígado del animal, este a su vez se fraccionó en pequeños pedazos que se colocaron en cajas estériles con medio de cultivo que contenía: tripticaseína, levadura, hierro y suero ensayo 33 (TYI-S-33) con antibiótico a 37 °C durante tres días, haciendo un cambio de medio de cultivo con antibiótico por día, esto se realizó para asegurar que el cultivo de amibas se mantuviera de forma axénica y se retiró el suplemento de antibióticos; a partir de la axenización el cultivo se expandió cada 72 horas, ya que es en este periodo en el que se alcanza la fase estacionaria del cultivo amebiano.

Los cultivos con expansión de 72 horas de trofozoitos fueron utilizados para realizar lisado el total de amebas, cocultivos y ensayos *in vitro*.

---

<sup>†</sup> Soluciones y materiales ver Anexo II, cálculos ver Anexo III.

- Lisado Total Amebiano

Para determinar la presencia de la lectina Gal/GalNAc en los trofozoitos se llevó a cabo un análisis de Western blot a partir de un cultivo amebiano con 72 horas de expansión.

Se realizó un conteo celular de amibas contenidas en el medio de cultivo por el método de Neubauer, obteniendo  $10 \times 10^6$  células. Posteriormente, se centrifugaron las células amebianas a 1,500 r.p.m. durante 5 minutos para después realizar dos lavados con PBS-A, finalmente el botón celular obtenido se resuspendió en PBS-A suplementado con inhibidores de proteasas (50 mM de Iodoacetamida y 10 mM de EDTA), contenido en un volumen final de 500 uL. La suspensión obtenida, fue sometida tres veces a un choque de térmico a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para provocar la lisis celular, se realizó la cuantificación de proteínas para llevar a cabo el análisis del contenido mediante la técnica de Western blot.

## Cultivo de la línea celular HepG2

El cultivo celular de HepG2 proveniente de la ATCC, se efectuó en medio DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , realizando pases cada que se alcanzara la confluencia celular óptima (70%) y poder así mantener la integridad del cultivo. Las células obtenidas fueron utilizadas para realizar: lisado total de células, co-cultivos y ensayos *in vitro*.

- Lisado Total de células HepG2

Una vez alcanzada la cantidad de células óptima del cultivo celular necesaria para realizar un lisado total ( $3 \times 10^6$  células en una caja petri 100mm x

20mm), se le retiró el medio DMEM para posteriormente realizar dos lavados con PBS, después se levantaron las células adheridas de manera mecánica con ayuda de un gendarme y finalmente se lisaron con Buffer de Lisis (1 mL) y choque térmico, dicha suspensión se empleó para realizar cuantificación de proteínas y el análisis mediante la técnica de Western blot, para determinar la expresión del receptor c-Met.

## Identificación cruzada de la lectina Gal/GalNAc y el Factor de Crecimiento Hepático (HGF)

Debido a la homología identificada entre la lectina Gal/GalNAc y el HGF [69], se realizó un análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-lectina y anti-HGF en muestras de lisado total amebiano y HGF recombinante de humano (SIGMA, Cat. #H9661) para realizar una identificación cruzada entre los epítopes que pueden reconocer sus respectivos anticuerpos.

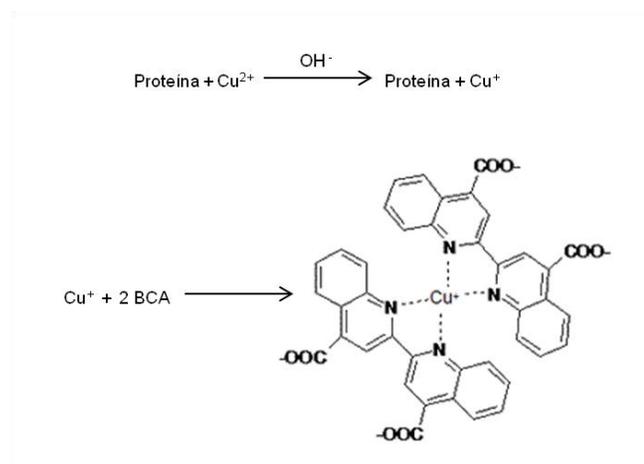
## Co-cultivos parásito:célula blanco

Se realizaron co-cultivos *in vitro* entre células de origen hepático (HepG2) y los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS en relación 1:2 respectivamente. Para dichos co-cultivos se sembraron en cajas petri (100mm x 20mm) células HepG2 ( $3 \times 10^6$ ), se retiró el medio DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino, se realizó un lavado con PBS y posteriormente se agregaron  $6 \times 10^6$  trofozoitos amebianos contenidos en un volumen de 3.3 mL de medio TYI sin suero dejando la coincubación a 37 °C durante 20 minutos.

Transcurrido el tiempo, con ayuda de un gendarme se recuperaron las células para después ser tratadas con Buffer de Lisis (suplementado con EDTA 10 mM y Iodoacetamida 50 mM), y se realizó la cuantificación de proteínas para llevar a cabo la inmunoprecipitación así como el análisis mediante la técnica de Western blot.

## Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales provenientes de los lisados celulares y los co-cultivos (parásito:célula blanco), se llevó a cabo mediante el método de ácido bicinconínico (Micro BCA™ Protein Assay Kit, de Pierce No. de Cat. 23235). Dicho método se basa en la unión de dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA) con una de ión cuproso ( $\text{Cu}^+$ ), el cual se obtiene a partir de la reducción del ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) debido a la interacción con las proteínas y un medio alcalino, dando como resultado un producto color púrpura que posee una absorbancia a 562 nm comportándose de forma lineal al incrementar la concentración de proteínas (Figura 10)



**Figura 10.** Se esboza la reacción que se lleva a cabo en la cuantificación de proteínas, la cual se desarrolla en dos etapas: la reducción del ión cúprico y la formación del complejo colorido mediante la quelación del ácido bicinconínico y el ión cuproso.

La solución de trabajo empleada, está compuesta por 50% de solución A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ), 48% de solución B (ácido bicinconínico) y finalmente 2% de solución C ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

Se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA), desde 0 ug/mL hasta 40 ug/mL partiendo de un stock de 200 ug/mL (Tabla 1). La relación de reactivo de trabajo y BSA es 1:1 (teniendo un volumen final de 2 mL); así también, se manejó la misma relación con muestras experimentales empleando una dilución 1:10.

**Tabla 1. Preparación de diluciones a partir del stock de BSA**

Tubo	Volumen de stock de BSA 200 ug/mL (uL)	Volumen de agua (uL)	Concentración de BSA (ug)
1	0	1,000	0
2	5	995	1
3	25	975	5
4	50	950	10
5	200	800	40

## Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es una técnica que consiste en precipitar el antígeno de una proteína presente en una solución utilizando un anticuerpo que se une específicamente a esa proteína en particular. Este proceso se puede utilizar para aislar y concentrar una proteína en particular de una muestra que contiene diferentes proteínas [113].

Para la inmunoprecipitación, se utilizó como muestra el co-cultivo parásito:célula HepG2. Para cada ensayo, se tomaron 1,000 ug de proteína y se llevaron a un volumen final de 500 uL añadiendo buffer de lisis suplementado.

- Preaclarado de la muestra

Previo a poner en contacto la muestra con el respectivo anticuerpo precipitante, esta recibe un tratamiento para eliminar impurezas con 60 uL de Agarosa Proteína-G (APG) durante 2 horas a 4°C en agitación constante.

Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12 r.p.m. por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

- Tratamiento de la muestra

La muestra preaclarada, se incubó durante 2 horas a 4 °C en agitación constante con 10 uL de anticuerpo anti-c-Met o 10 uL de anticuerpo anti-Lectina.

- Preaclarado de perlas de Agarosa Proteína-G

Por otra parte, a 60 uL de APG se le agregaron 14 uL de BSA 10% (concentración final 2%) para retirar las impurezas presentes incubando durante 2 horas a 4 °C en agitación constante.

La mezcla obtenida, se centrifugó a 3,000 r.p.m. por 3 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante, conservando las perlas de APG.

Posteriormente, la muestra tratada así como las perlas preaclaradas, se mezclaron y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación constante.

Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12,000 r.p.m. durante un minuto a 4 °C, para descartar el sobrenadante y agregar 200 uL de Buffer de Lavado, este proceso se repitió 6 veces más y se centrifugó una última vez a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. El producto final (en la mayoría de los casos 40 uL) se utilizó para realizar un análisis mediante la técnica de Western blot.

## Electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE)

Este método es muy empleado para la purificación, análisis y caracterización de proteínas, ya que se basa en el tamaño y carga de dichas macromoléculas.

Se fundamenta en la formación de una matriz (gel) proveniente de la polimerización de dos componentes: poliacrilamida/bis-acrilamida, dando como resultado así una base inerte que es estable en un amplio rango de pH, temperatura, fuerza iónica y actúa como un tamiz molecular retardando el movimiento de moléculas grandes mientras que las moléculas de menor peso se pueden mover con mayor facilidad.

Se empleó un gel separador con una concentración de 7.5% poliacrilamida/bis-acrilamida con un volumen aproximado de 8 ml y un gel concentrador que está al 5% poliacrilamida/bis-acrilamida, utilizando 2 ml de esta solución, es en este gel que se formaron los pozos que sirven de receptáculos para las muestras, esto se hace entre 2 placas de vidrio teniendo un espacio entre ellas de 1.0 mm de grosor para los lisados totales obtenidos y el HGF; sin

embargo, se utilizó 1.5 mm de grosor para las muestras provenientes de la inmunoprecipitación.

Tanto a los lisados totales provenientes del cultivo amebiano como a los derivados del cultivo de células HepG2 (50 ug de cada cultivo por separado contenidos en 12 uL) se les añadieron 12 uL de Buffer de Carga 2x, por otra parte, 50 ng de HGF puro recombinante se mezclaron con 10 uL de Buffer de Carga 2x y a los productos obtenidos de la inmunoprecipitación se les adicionaron 30 uL de Buffer de Carga 4x. Dicho buffer, entre otros compuestos, contenía SDS que actúa como nuestro agente desnaturalizante que ayuda a romper interacciones hidrofóbicas y carga a las proteínas de forma negativa para facilitar su movimiento desde el cátodo hacia el ánodo, haciendo que las proteínas existentes en la muestra adopten una estructura simple y con carga negativa, además este buffer contenía azul de bromofenol que nos ayudó a visualizar el frente de avance de las moléculas a través de nuestro gel. Las muestras se calentaron por 5 minutos en baño María para asegurar que las proteínas pierdan su estructura secundaria. Posteriormente fueron depositadas en los pozos del gel concentrador.

La electroforesis se llevó a cabo en todos los casos con una potencia constante de 10 watts en el cuarto frío a una temperatura aproximada de 8 °C. La corrida se detuvo justo cuando el colorante de azul de bromofenol, en el frente de avance, llegaba al borde inferior del gel. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIO-RAD, Cat. #161-0374.

## Tinción de Plata

Una gran variedad de métodos se ha desarrollado para teñir con sales de plata los polipéptidos provenientes de una separación mediante electroforesis

SDS-PAGE. Son procedimientos que se basan en la reducción de iones de plata que se unen a los extremos de las cadenas de aminoácidos. Dichos métodos se pueden dividir en dos clases: aquellos que usan soluciones de amoniacal y los que usan nitrato de plata. Aunque ambas técnicas para teñir son aproximadamente de 100 a 1000 veces más sensibles que la tinción con azul de Coomassie brillante R250 y son capaces de detectar en una sola banda pequeñas cantidades que van desde 0.1 a 1.0 ng de polipéptidos; las soluciones de nitrato de plata son más fáciles de preparar y, en contraste con las sales de plata amoniacaes, no generan productos con potencial explosivo. El método utilizado en esta tesis es una modificación del procedimiento de tinción original ideado por Sammons et al. (1981) [114], al cual se le han hecho mejoras (Schoenle et al. 1984) [115] [116].

Después de haber separado las proteínas mediante la electroforesis en una dimensión SDS-PAGE, se fijaron las proteínas, incubando el gel de 4 a 12 horas a temperatura ambiente en agitación suave con al menos 5 veces el volumen del gel de una solución etanol:ácido acético glacial:agua (30:10:60).

Transcurrido el tiempo, se descartó la solución fijadora y se agregaron al menos 5 veces el volumen del gel una solución con etanol al 30%. El gel se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se repitió este paso una vez más.

La solución de etanol se descartó y se agregaron 10 veces el volumen del gel de agua desionizada, dejando incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Este paso se repitió dos veces más.

Se descartó el agua remanente de los lavados y se añadieron 5 veces el volumen del gel de una solución de  $\text{AgNO}_3$  al 0.1% (solución preparada al momento proveniente de un stock de  $\text{AgNO}_3$  al 20%, conservada a temperatura ambiente en frasco ámbar) El gel se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

La solución de  $\text{AgNO}_3$  se descartó y se lavó el gel con agua desionizada. Posteriormente, se agregaron 5 veces el volumen del gel de una solución preparada en el momento de 2.5% de carbonato de sodio con 0.02% de formaldehído. El gel se incubó a temperatura ambiente con agitación suave. Es en este paso en el que, en cuestión de minutos, se empezó a percibir la tinción de las bandas de proteínas presentes en el gel. La reacción se detuvo con una solución al 1% de ácido acético hasta obtener el contraste deseado, y pasados diez minutos, el gel se lavó tres veces durante 10 minutos con agua desionizada.

## Inmunotransferencia (Western blot)

Se empleó la técnica de Western blot para determinar la lectina presente en la superficie amebiana, el receptor c-Met presente en la superficie de las células hepáticas HepG2, la identificación cruzada de la lectina y el HGF, así como para la identificación de la lectina y el receptor c-Met en los productos de inmunoprecipitación.

Una vez obtenido el gel de SDS-PAGE se dejó equilibrar en buffer de transferencia durante 15 minutos para eliminar las sales del buffer de corrida; de acuerdo a la Tabla 2, en el caso de haberse utilizado membrana de polifluoruro de vinilideno (Immobilon-P, Millipore, Cat. #IPVH 000 10) esta se activó en metanol durante 5 minutos para posteriormente también equilibrarla en buffer de transferencia por 10 minutos; sin embargo, si se utilizó membrana de nitrocelulosa (Membrana de nitrocelulosa 0.45  $\mu\text{m}$ , BIO-RAD, Cat. #162-0115) sólo se equilibró con buffer de transferencia; por otra parte, para asegurar la unión, ya que una humectación brusca puede generar burbujas de aire evitando la transferencia de las moléculas hacia la membrana; transcurrido el tiempo necesario, se arma un "sándwich" donde las bases son constituidas por papel filtro humedecido en buffer de transferencia, sobre uno de ellos se colocó la membrana y sobre esta el gel de

poliacrilamida, por último otro papel filtro húmedo, realizando un poco de presión para eliminar burbujas de aire, este “sándwich” se colocó en el aparato de transferencia semi-húmeda (Trans-blot® SD, BIO-RAD), de tal forma que el papel que soporta la membrana quede hacia el ánodo y el gel hacia el cátodo, con el mismo principio de generar un campo eléctrico para empezar la migración de las moléculas contenidas en el gel hacia nuestra membrana, se ajustó la fuente de poder a 20 volts y se transfirió durante 50 minutos.

Una vez concluido el tiempo, la membrana se tiñó con colorante Ponceau (Ponceau S, SIGMA, P-7170) con la finalidad de cerciorarse que las proteínas se transfirieron, con la ventaja de que este colorante no interfiere en el posterior tratamiento con los anticuerpos, la membrana se enjuagó con TBS-T (Tris Buffer Salino Tween 20) para retirar el colorante; enseguida se bloqueó con solución bloqueadora (TBS-T al 5% de leche BIO-RAD, Cat. #170-6404) durante una hora. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agitación fuerte, de 10 minutos cada uno con TBS-T. Al terminar los lavados, se dividió la membrana (con sus respectivos marcadores de peso molecular) dependiendo del tratamiento posterior: la fracción que contiene el lisado total amebiano (A), la fracción del lisado total de HepG2 (H), los pares lisado total amebiano/HGF (A - HGF) y los pares de inmunoprecipitación (IP C - IP L).

Cada una de las fracciones se incubó por separado durante una noche con el respectivo anticuerpo primario para identificar a la lectina en la superficie amebiana, al receptor c-Met en la superficie de las células HepG2, al HGF, y finalmente a la lectina y al receptor c-Met en los productos de inmunoprecipitación como se muestra en la Tabla 2 en una solución de TBS-T con 5% de leche.

**Tabla 2. Concentraciones de anticuerpos primarios utilizados en distintas transferencias**

Tipo de membrana	Fracción de membrana	Anticuerpo*	Concentración
Immobilon-P	H	anti-c-Met	1:150
	A	anti-Lectina	0.4 ug/mL
	A - HGF	anti-HGF	0.2 ug/mL
Nitrocelulosa	IP C - IP L	anti-c-Met	1:150

\* Especificaciones detalladas incluidas en el ANEXO I - Equipos, Materiales, Reactivos y Soluciones.

Al día siguiente, se realizaron seis lavados con agitación fuerte de 10 minutos cada uno con TBS-T. Después, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente en TBS-T al 1% de leche durante una hora, como se indica en la Tabla 3. Finalizada la incubación, se realizaron seis lavados más de 10 minutos cada uno con TBS-T.

**Tabla 3. Concentraciones de anticuerpos secundarios utilizados en distintas inmunotransferencias.**

Tipo de membrana	Fracción de membrana	Anticuerpo*	Concentración
Immobilon-P	H	Cabra anti-ratón	1:10,000
	A	Cabra anti-conejo	1:60,000
	A - HGF	Bovino anti-cabra	1:10,000
Nitrocelulosa	IP C - IP L	Cabra anti-ratón	1:10,000

\* Especificaciones detalladas incluidas en el ANEXO I - Equipos, Material, Reactivos y Soluciones.

Finalmente, una placa radiográfica se colocó sobre la membrana previamente tratada con peróxido y luminol (Millipore, Cat. #WBKL S01 00); en condiciones de obscuridad la placa se reveló y se fijó.

## Co-cultivos parásito:célula blanco y tratamiento con HGF

Asimismo, se realizó otro co-cultivo *in vitro* modificando las condiciones de co-incubación al agregar un posible inhibidor de la adherencia y citotoxicidad entre la lectina Gal/GalNAc y el receptor c-Met, ya que previamente se demostró que al agregar galactosa este par de efectos se inhibían por completo [48], [49].

En este caso, se realizaron ocho ensayos, en los cuales se contaban con alrededor de  $1.6 \times 10^5$  células HepG2 cada uno, dichas células estaban sembradas en cubreobjetos depositados dentro de distintos pozos en una multicámara. Se manejaron 4 grupos por duplicado, 1) grupo control, 2) HepG2 + trofozoitos, 3) HepG2 + HGF + trofozoitos y 4) HepG2 + trofozoitos + Galactosa. El procedimiento realizado, se describe a continuación:

1) Grupo control:

Células HepG2 sin ninguna alteración.

2) HepG2 + trofozoitos:

A estas células HepG2 se les retiró el medio DMEM, posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS y co-incubadas durante 15 min. con trofozoitos en una relación 1:3 (HepG2:trofozoito) contenidos en 1 mL de medio TYI-SS-33 sin suero.

3) HepG2 + HGF + trofozoitos:

Se les retiró el medio DMEM a estas células HepG2, se lavaron con PBS y fueron preincubadas con 200 ng/mL de HGF en un volumen de 1.5 mL de medio TYI-SS-33 sin suero durante una hora, esto es para

asegurar la interacción y adherencia entre el ligando y el receptor sin obtener una respuesta celular [117], después de transcurrido el tiempo, se lavaron las células con PBS y posteriormente fueron co-incubadas durante 15 min. con trofozoitos en una relación 1:3 (HepG2:trofozoito) contenidos en 1 mL de medio TYI-SS-33 sin suero.

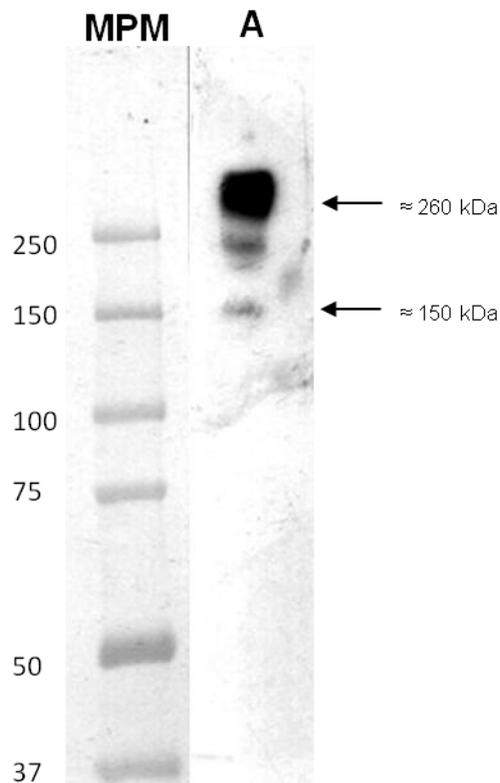
4) HepG2 + trofozoitos + Galactosa:

A estas células HepG2 se les retiró el medio DMEM, posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS y co-incubadas durante 15 min. con trofozoitos en una relación 1:3 (HepG2:trofozoito) contenidos en 1 mL de medio TYI-SS-33 sin suero. Sin embargo, estos trofozoitos fueron previamente incubados con Galactosa 180 mM durante una hora.

Después de finalizados los distintos tratamientos, se lavaron una vez los cubreobjetos con PBS, se fijaron durante 30 minutos en PFA 4% y una posfijación en PFA al 0.4% en PBS. Finalmente, se realizó una tinción de hematoxilina y eosina.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS expresan la lectina Gal/GalNAc.



**Figura 11. Western blot de un lisado total de un botón de trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS detectado con anticuerpo anti-Lectina.** El lisado total de trofozoitos de *E. histolytica* se obtuvo a partir de un cultivo de 72 hrs. inhibido con iodoacetamida 50 mM y EDTA 10 mM. 50 ug de proteína fueron separados mediante SDS-PAGE en un gel de 1.0 mm de espesor al 7.5% de acrilamida y transferido a una membrana de immobilon-P. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpo policlonal conejo anti-Lectina y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo peroxidado y se reveló con luminol. **MPM:** Marcador de Peso Molecular, **A:** Lisado total amebiano.

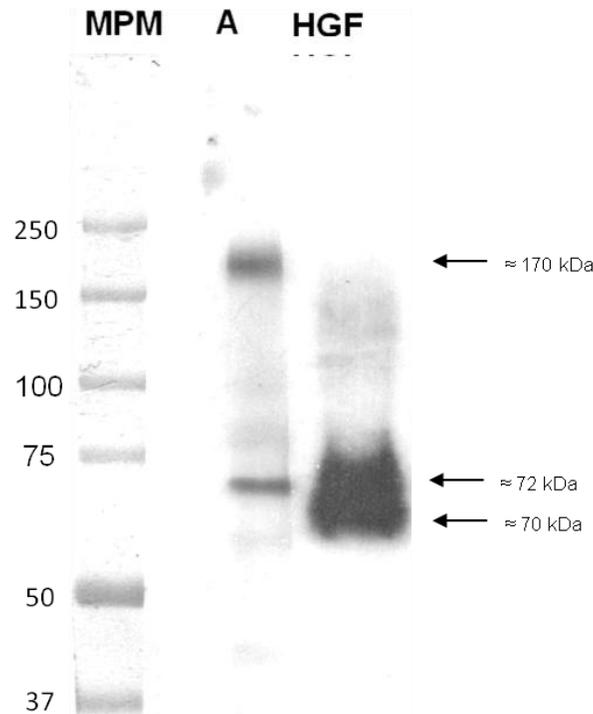
En la Figura 11, se observa que de todos los péptidos presentes en el lisado sólo tres bandas prominentes fueron reconocidas por el anticuerpo conejo anti-

Lectina con pesos aproximados de 260 kDa, que coincide con el peso referido por Petri W. A. *et al.* (1989) para el heterodímero de la lectina; y de 150 kDa que coincide con la subunidad intermedia como lo reporta Cheng *et al.* (1998). Aunque los anticuerpos de conejo anti-Lectina se generaron utilizando como inmunógeno una fracción pura constituida por las subunidades pesada y ligera [42], es muy probable que en esta muestra hubiesen trazas de la cadena intermedia de 150 kDa; que a pesar de no estar unida covalentemente al heterodímero se ha referido que copurifica con el mismo [5] en numerosas ocasiones en lisados amebianos una banda con este peso ha sido detectada con este anticuerpo.

Por otra parte, la banda detectada de aproximadamente 190 kDa no coincide con ningún peso molecular reportado para algún componente de la lectina Gal/GalNAc por lo que es probable que se trate de productos de la degradación del heterodímero.

Este experimento nos permitió confirmar que los trofozoitos de *E. histolytica* cultivados en las condiciones que se emplearon a lo largo de esta tesis, expresan la lectina Gal/GalNAc.

## Immunodetección de la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc con un anticuerpo comercial anti-HGF de humano



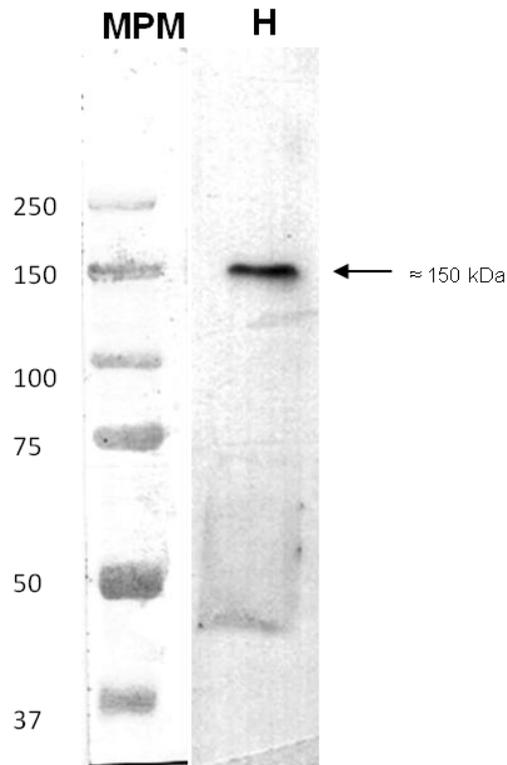
**Figura 12. Western blot de un lisado total amebiano y HGF recombinante humano detectado con anticuerpo anti-HGF de humano.** El lisado total de trofozoitos de *E. histolytica* se obtuvo a partir de un cultivo de 72 hrs. 50 ug de este lisado (**A**), así como 50 ng de HGF recombinante de humano (**HGF**), fueron separados mediante SDS-PAGE en un gel de 1.0 mm de espesor al 7.5% de acrilamida y transferidos a una membrana de inmobilon-P. La inmunodetección se realizó con anticuerpo comercial anti-HGF de humano. Se empleó un anticuerpo secundario bovino anti-cabra peroxidado y se reveló con luminol. **MPM**: Marcador de Peso Molecular. **A**: Lisado amebiano. **HGF**: HGF recombinante de humano.

En la Figura 12, el anticuerpo anti-HGF reconoció de todos los componentes del lisado amebiano una banda con un peso de 170 kDa, ésta muy probablemente corresponde a la subunidad pesada de la lectina ya que el peso coincide. Dodson *et al.* (1999) encontraron mediante un ensayo en placa de microtitulación que el CRD recombinante de la lectina inhibió de manera competitiva la unión del HGF

recombinante a una proteína de fusión constituida por IgG y el receptor c-Met, lo que los condujo a la búsqueda y hallazgo del dominio de identidad del CRD con la secuencia del HGF que interactúa con su receptor c-Met [69]. Sin embargo, nuestro resultado corrobora esa identidad mediante la inmunodetección con el anticuerpo policlonal anti-HGF.

La molécula de 72 kDa detectada por el anticuerpo, no corresponde ni al heterodímero ni a la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc, probablemente esta banda corresponda a un péptido de degradación de la cadena pesada que contiene la región de homología.

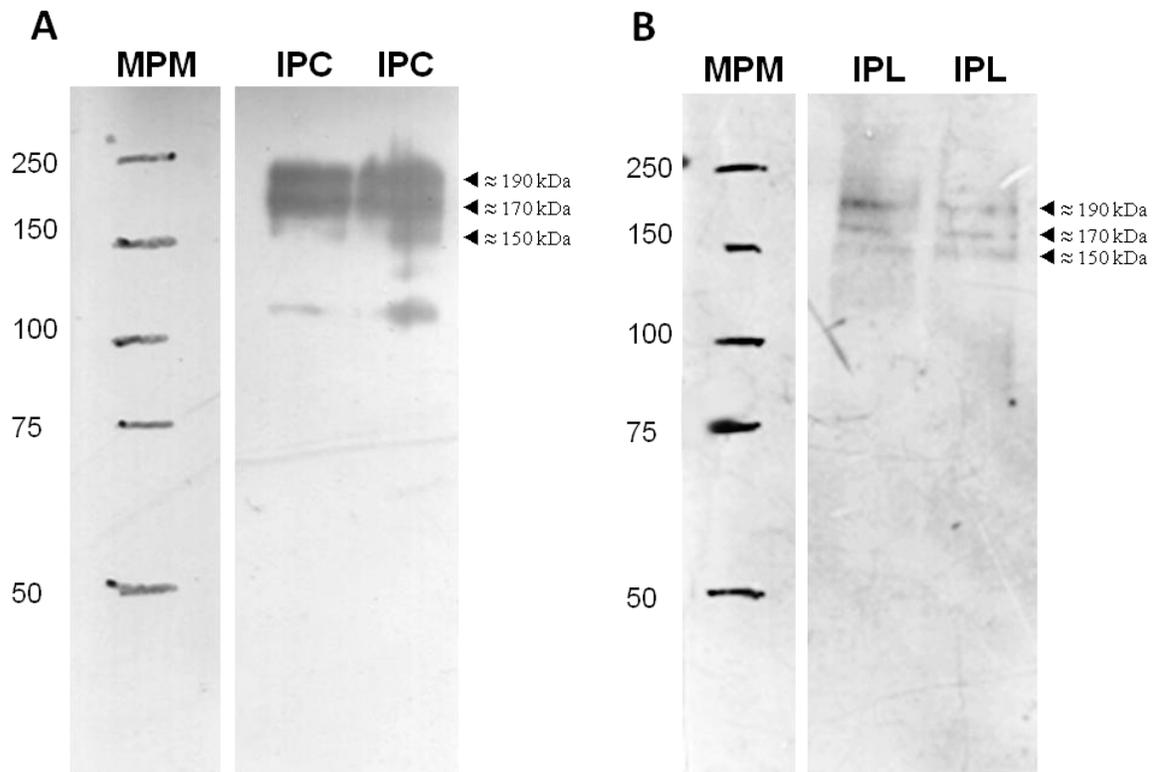
## Expresión de c-Met en células HepG2 utilizadas en los cocultivos



**Figura 13. Inmunodetección de c-Met mediante Western blot un lisado total de células HepG2.** El lisado total de células HepG2 se obtuvo a partir de  $3 \times 10^6$  células, 50  $\mu$ g de este lisado fueron separados mediante SDS-PAGE en un gel de 1.0 mm de espesor al 7.5% de acrilamida y transferido a una membrana de immobilon-P. La inmunodetección se llevó a cabo con un anticuerpo comercial ratón anti-c-Met. Se empleó un anticuerpo secundario cabra anti-ratón peroxidado y se reveló con luminol. **MPM:** Marcador de Peso Molecular, **H:** Lisado Total de células HepG2

En la Figura 13, se observa que sólo una banda con un peso molecular de 150 kDa fue inmunodetectada por el anticuerpo, peso reportado para la subunidad  $\beta$  del receptor c-Met, como lo describen Giordano *et al.* (1989), de todos los componentes proteicos presentes en un lisado total de células de origen hepático (aunque no se muestran en la figura, se observaron numerosas bandas en la membrana teñidas con Ponceau), demostrando así la expresión de c-Met en las células HepG2 utilizadas en esta tesis.

Análisis de Western blot de la muestra proveniente de un cocultivo trofozoitos:células HepG2 inmunoprecipitada con anticuerpo anti-Lectina o con anticuerpo anti-c-Met reveladas con anticuerpo anti-c-Met

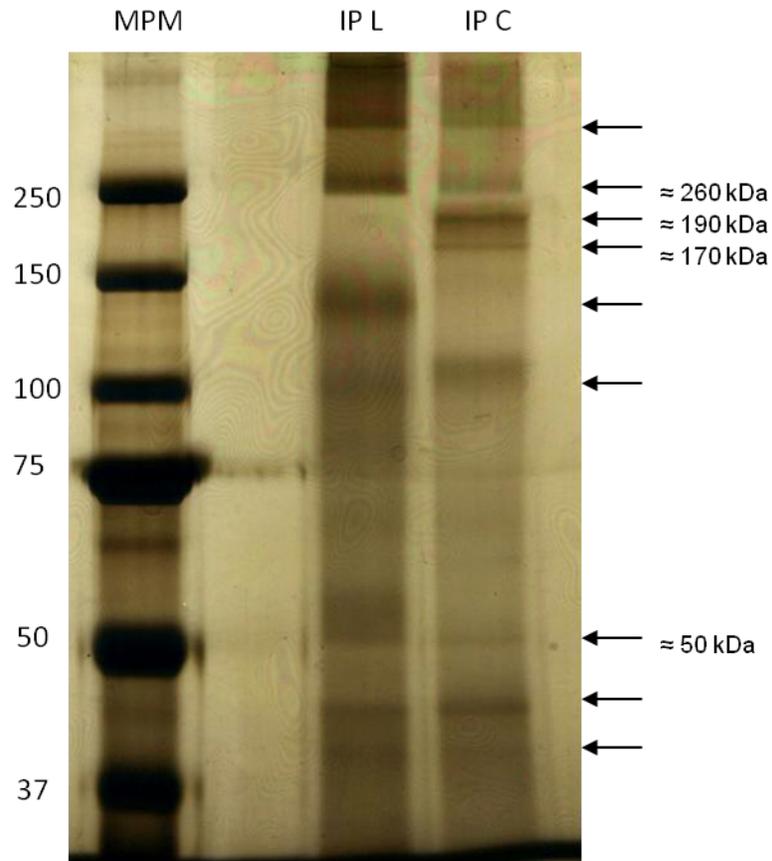


**Figura 14. Western blot del inmunoprecipitado proveniente de un cocultivo de trofozoitos:células HepG2 con anticuerpo anti-c-Met o anti-Lectina.** Los trofozoitos amebianos y las células HepG2 fueron co-incubados durante 20 min. en una relación 2:1. La muestra a inmunoprecipitar fue de 1 mg de proteína del lisado obtenido del cocultivo. Los anticuerpos inmunoprecipitantes fueron **A)** anticuerpo anti-c-Met (10 uL) y **B)** anticuerpo anti-Lectina (10 uL). Ambas muestras inmunoprecipitadas fueron separadas por medio SDS-PAGE en un gel de 1.5 mm de espesor al 7.5% de acrilamida y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpo comercial anti-c-Met (mismo utilizado en la inmunoprecipitación). Se empleó un anticuerpo secundario cabra anti-ratón peroxidado y se reveló con luminol  
**MPM:** Marcador de Peso Molecular, **IPC:** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-c-Met **IPL:** Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Lectina amebiana Gal/GalNAc.

Como podemos observar en la Figura 14-A, al inmunoprecipitar el lisado derivado del cocultivo con anticuerpo anti-c-Met y revelar con el mismo anticuerpo, la inmunodetección nos muestra las bandas correspondientes al receptor c-Met, pro-c-Met y a la subunidad  $\beta$  del receptor (190, 170 y 150 kDa respectivamente), lo que nos indica que la inmunoprecipitación utilizando dicho anticuerpo fue eficiente. Por otra parte, en la Figura 14-B, se destacan las mismas bandas de 190, 170 y 150 kDa cuando se utilizó el anticuerpo anti-Lectina como anticuerpo inmunoprecipitante, este resultado indica que la lectina que fue inmunoprecipitada con su anticuerpo específico estaba unida a estos péptidos derivados de c-Met.

Dicha unión se puede deber a diversos factores. Una posibilidad, es la unión entre la lectina y un residuo de galactosa presente en el receptor c-Met; sin embargo, como dieron a conocer Dodson *et al.* (1999) la existencia de una región de homología entre el CRD de la lectina, justamente con el dominio de interacción del HGF con su receptor c-Met, y siendo esta la hipótesis y el objetivo del presente trabajo, sugerimos que la unión se debe precisamente al reconocimiento de la lectina Gal/GalNAc por parte del receptor c-Met en la región homóloga con el HGF, el cual es ligando exclusivo de este receptor.

Análisis electroforético de las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-Lectina o con anticuerpo anti-c-Met, provenientes de un cocultivo trofozoitos:células HepG2 mediante tinción de plata



**Figura 15. Gel de poliacrilamida teñido con plata de muestras inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-Lectina o anti-c-Met derivadas de un cocultivo trofozoitos:células HepG2.** Los trofozoitos amebianos y las células HepG2 fueron co-incubados durante 20 min. en una relación 2:1. La inmunoprecipitación se realizó con 1 mg de proteína del lisado obtenido del cocultivo y los anticuerpos inmunoprecipitantes fueron anticuerpo anti-Lectina Gal/GalNAc (**IP L**) (10 uL), o bien, anticuerpo anti-c-Met (**IP C**) (10 uL). Ambas muestras inmunoprecipitadas fueron separadas por medio de SDS-PAGE en un gel de 1.5 mm de espesor al 7.5% de acrilamida y teñido con plata. **MPM**: Marcador de Peso Molecular **IP L**: Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Lectina amebiana Gal/GalNAc, **IP C**: Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-c-Met.

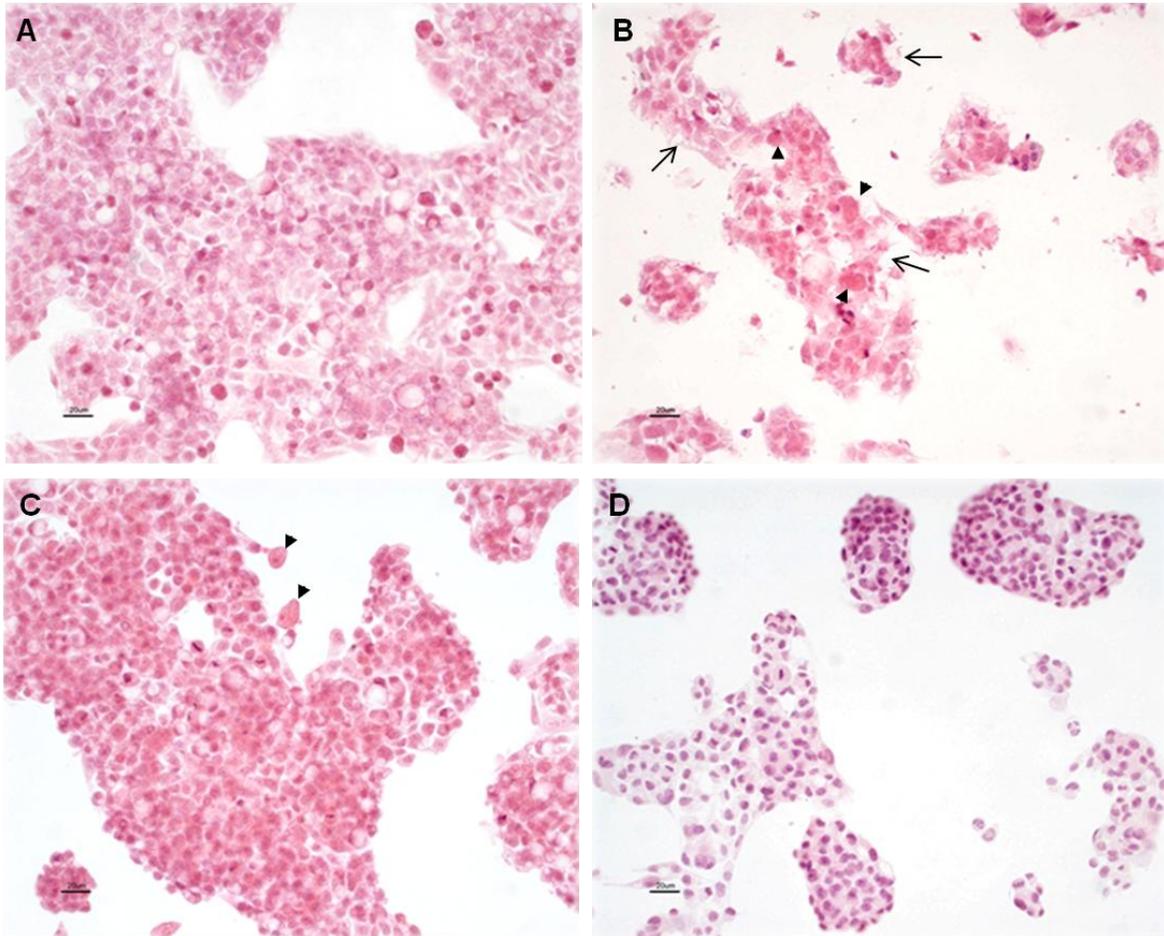
En la Figura 15 se puede observar que en la muestra inmunoprecipitada con anticuerpo anti-Lectina hay bandas con pesos moleculares de 50, 100, 140, 190 y 260 kDa, así como bandas con un peso superior a 300 kDa o con pesos aproximados de entre 40 y 45 kDa. Por otra parte, en la muestra inmunoprecipitada con anticuerpo anti-c-Met, se pueden observar bandas con pesos moleculares de 50, 100, 170, 190 y 260 kDa, además de observar una banda con un peso superior a 300 kDa y bandas entre los 40 y 45 kDa. Podemos hacer notar que los dos inmunoprecipitados muestran péptidos con los mismos pesos moleculares, como es el caso de las bandas de 300 kDa, 50, 190 y 260 kDa, así como las de menor peso molecular entre 40 y 45 kDa.

Los pesos moleculares de 50, 190 y 260 kDa coinciden respectivamente, con el de la subunidad  $\alpha$  del receptor c-Met, así como con el receptor c-Met y el heterodímero de la lectina Gal/GalNAc. Este resultado sugiere que al llevarse a cabo la inmunoprecipitación, ya sea con el anticuerpo anti-Lectina o con el anticuerpo anti-c-Met, la molécula reconocida por el anticuerpo trae consigo, mediante una unión específica, al ligando propuesto: al receptor o a la lectina respectivamente.

Asimismo, como se mencionó anteriormente, se pueden observar otras bandas, entre las que destaca la banda presente en la muestra inmunoprecipitada con anticuerpo anti-c-Met, con un peso molecular de 170 kDa, la cual coincide con pro-c-Met tal como lo refieren Naldini *et al.* (1991), así como bandas repetidas de entre 40 y 45 kDa en las dos inmunoprecipitaciones, éstas pueden pertenecer a otras moléculas presentes en la muestra y que pudieron sufrir degradación durante el proceso del análisis electroforético; así también la banda de mayor peso molecular, la cual podría ser el complejo formado por la unión entre la lectina Gal/GalNAc y el receptor c-Met. También, se observan bandas de 100 o 140 kDa, éstas corresponden a las cadenas peptídicas de los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación (aunque no se muestra, se hizo un análisis electroforético de los anticuerpos inmunoprecipitantes). Sin embargo, cabe destacar que en las dos

muestras se observan bandas con idénticos pesos moleculares, es decir, en ambas muestras son evidentes algunos componentes idénticos a pesar de haber utilizado diferentes anticuerpos inmunoprecipitantes, lo cual se comprende si se trata de un par ligando-receptor.

## Análisis microscópico de cocultivos entre *E. histolytica* y células HepG2



**Figura 16. Micrografías de cocultivos trofozoitos:células HepG2 bajo distintas condiciones.** Los trofozoitos amebianos y las células HepG2 fueron co-incubadas durante 15 min. en una relación 3:1, posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con hematoxilina y eosina. **(A)** células HepG2, **(B)** células HepG2 + *E. histolytica*, **(C)** células HepG2 pretratadas con HGF 200ng/mL (1hr.) + *E. histolytica*, **(D)** células HepG2 + *E. histolytica* pretratadas con Galactosa 180mM (30 min.). Daño citotóxico (flechas), Trofozoitos amebianos (punta de flecha).

En la Figura 16 podemos observar el aspecto microscópico de los cocultivos celulares de las células HepG2 con las amebas en diferentes condiciones; células HepG2 (A), células HepG2 cocultivadas con trofozoitos de *E. histolytica* durante 15 minutos (B) en donde se señalan varias amebas (punta de flecha) adheridas y un severo daño citotóxico en células HepG2 (flechas) por parte del parásito.

Por otro lado, en las preparaciones de células HepG2 pretratadas con HGF (200 ng/mL) durante una hora y posteriormente coincubadas con trofozoitos amebianos (C), es notable que a pesar de observarse amebas adheridas, no se detecta daño en las células de origen hepático.

Este fenómeno podría deberse al bloqueo del sitio de unión de la lectina Gal/GalNAc al receptor c-Met. Dodson *et al.* (1999), reportaron una inhibición competitiva entre el HGF y la lectina pura o un CRD recombinante por la unión con el receptor, independientemente de su función para reconocer residuos glicosilados, ya que el exceso de galactosa no disminuye la interacción entre el CRD y el receptor c-Met.

Entre los efectos adjudicados al HGF en células blanco, está la estimulación para inducir y activar proteasas capaces de degradar la matriz extracelular [82][84], teniendo en cuenta esto y retomando la idea propuesta por Petri *et al.* (2002) en donde menciona que la lectina mediante el CRD, el cual tiene homología con el HGF, puede facilitar que el parásito genere un efecto similar al factor de crecimiento, degradando los componentes de la matriz extracelular propiciando un microambiente óptimo para la invasión y lisis celular por parte de *E. histolytica*, fenómeno que se previene con el pretratamiento con HGF. Razón por la cual podemos inferir que al preincubar con HGF, éste impide la unión del CRD al receptor probablemente por un impedimento estérico, o bien, por un cambio conformacional en el receptor impidiendo la interacción de la lectina con el sitio de unión del receptor c-Met.

Cabe resaltar que el pretratamiento con HGF no impide la adherencia amebiana dado que la lectina podría estar reconociendo algún residuo glicosilado en la superficie membranal de la célula blanco o en el mismo receptor c-Met.

Se ha reportado que la interacción del c-Met con su ligando induce su internalización vía endocitosis [118], fenómeno que podría estar ocurriendo en

nuestro modelo lo que reafirma el hecho de necesitar la presencia del receptor en superficie para generar un efecto citotóxico.

Por otra parte, como lo reportaron Tacchini *et al.* (2004), se ha demostrado que el HGF tiene un efecto anti-apoptótico sobre células blanco, dicha acción se ve reflejada al pretratar líneas celulares provenientes de carcinoma, como HepG2, con HGF provocando la activación de factores y vías de señalización que generan resistencia a la apoptosis y promueven la proliferación celular. Conociendo este efecto producido por el HGF y lo anteriormente mencionado sobre los mecanismos por los cuales *E. histolytica* genera daño celular al inducir células apoptóticas y posterior fagocitosis, es probable que en este experimento las células pretratadas con HGF sean resistentes a la apoptosis y por consiguiente no es posible apreciar el efecto citotóxico generado por el parásito.

Finalmente, en las células HepG2 coincubadas con trofozoitos de *E. histolytica* pretratados con galactosa (180 mM) no se observa ni adherencia ni muerte celular (Figura 16-D) tal como lo describen López-Vancell *et al.* (2000).

# CONCLUSIONES

- 1) **LOS TROFOZOITOS DE *E. HISTOLYTICA* EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO EXPRESAN LA LECTINA GAL/GALNAC.**

Esta conclusión se basa en el resultado obtenido del análisis de Western blot de un lisado total amebiano de *E. histolytica*.

- 2) **LAS CÉLULAS HEPG2 EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO EXPRESAN EL RECEPTOR C-MET.**

Esta conclusión se basa en el resultado obtenido del análisis de Western blot de un lisado total de células HepG2.

- 3) **DEBIDO A UNA REGIÓN DE HOMOLOGÍA ENTRE LA SUBUNIDAD PESADA DE LA LECTINA GAL/GALNAC Y EL HGF RECOMBINANTE EMPLEADO EN ESTA TESIS, EL ANTICUERPO ANTI-HGF RECONOCE A ESTAS DOS MOLÉCULAS.**

Esta conclusión se basa en el resultado obtenido del análisis de Western blot de un lisado total de trofozoitos amebianos y HGF recombinante.

- 4) **LA LECTINA SE UNE AL RECEPTOR C-MET.**

Esto lo podemos concluir a partir de los resultados obtenidos en las inmunoprecipitaciones.

- 5) **LA UNIÓN ENTRE LA LECTINA GAL/GALNAC Y EL RECEPTOR C-MET ES INDISPENSABLE PARA QUE *E. HISTOLYTICA* GENERE DAÑO CELULAR.**

**6) EL HGF PROVEE UN EFECTO PROTECTOR CONTRA *E. HISTOLYTICA* EN CÉLULAS DE ORIGEN HEPÁTICO DEBIDO AL IMPEDIMENTO DE LA UNIÓN ENTRE LA LECTINA GAL/GALNAC CON EL RECEPTOR C-MET.**

Estas conclusiones se basan en la observación de los cocultivos entre trofozoitos de *E. histolytica* y células HepG2, en especial aquel en el que las células de origen hepático fueron pretratadas con HGF.

# ANEXO I

## ESTADÍSTICAS DE LAS 20 PRINCIPALES CAUSAS DE ENFERMEDAD A NIVEL NACIONAL REPORTADAS EN 2016 POR GRUPOS DE EDAD.

Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad  
Estados Unidos Mexicanos 2016  
Población General

Número	Padecimiento	Código de la lista detallada CIE10a. Revisión	Grupos de edad											Total	
			< 1	1 - 4	5 - 9	10 - 14	15 - 19	20 - 24	25 - 44	45 - 49	50 - 59	60 - 64	65 y +		Ign.
1	Infecciones respiratorias agudas	J00-J06, J20, J21 excepto J02.0 y J03.0	1 780 293	4 511 468	3 203 864	1 953 975	1 274 555	1 326 451	4 162 165	1 214 833	1 797 400	808 942	1 402 064	9 712	23 445 722
2	Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	A04, A08-A09 excepto A08.0	265 968	786 471	451 211	317 430	246 662	331 296	984 665	252 243	358 123	155 914	323 421	2 637	4 476 041
3	Infección de vías urinarias	N30, N34, N39.0	20 300	132 864	179 291	147 335	297 831	431 013	1 259 538	344 611	528 004	240 559	522 604	2 916	4 106 966
4	Úlceras, gastritis y dispepsias	K21-K29	426	1 750	13 666	70 532	105 791	139 361	423 448	147 232	191 620	91 565	150 942	1 229	1 337 562
5	Gingivitis y enfermedades periodontales	K05	652	11 890	46 341	64 136	98 348	130 797	348 656	96 593	139 708	66 378	101 872	752	1 106 123
6	Conjuntivitis	H10	57 825	105 286	80 595	53 885	42 002	61 920	219 691	60 698	94 936	43 350	88 250	668	909 106
7	Otitis media aguda	H65.0-H65.1	16 051	80 804	90 113	59 102	44 556	44 665	114 292	37 470	43 060	18 670	24 455	784	574 022
8	Obesidad	E66	3 856	7 341	17 649	27 474	25 039	38 767	215 460	65 128	87 263	29 755	34 579	201	552 512
9	Vulvovaginitis aguda	N76.0	77	1 207	2 811	7 575	48 265	85 942	230 010	50 146	40 937	12 170	10 593	563	490 296
10	Hipertensión arterial	I10-I15	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1 177	6 327	92 211	57 659	109 619	57 027	112 184	1 235	437 439
11	Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	E11-E14	N.A.	N.A.	N.A.	230	647	3 828	78 422	53 892	105 301	49 926	75 174	649	368 069
12	Intoxicación por picadura de abejas	T63.2, X22	1 871	19 667	25 383	28 840	31 953	29 853	79 635	16 135	22 660	9 291	17 886	579	283 753
13	Síndrome febril	R50	10 060	33 266	26 215	20 600	17 419	24 722	79 136	15 320	20 072	6 789	12 602	59	266 260
14	Ansia y estado ansioso	F45, F46	7 136	48 877	49 051	28 392	14 063	12 992	41 324	14 184	20 088	9 086	14 195	143	259 531
15	Amoebiasis intestinal	A06.0-A06.3, A06.9	8 081	39 009	32 855	22 958	15 134	14 575	39 032	11 906	15 753	7 400	13 136	366	220 205
16	Insuficiencia venosa periférica	I87.2	3	16	63	184	811	3 641	44 843	23 519	44 901	21 723	43 230	473	183 407
17	Candidiasis urogenital	B37.3-B37.4	N.A.	N.A.	N.A.	2 091	15 605	33 007	85 802	16 671	14 410	5 706	4 537	156	179 985
18	Neumonías y broncoasneumonías	J12-J18 excepto J18.2, J13 y J14	17 323	25 223	8 093	4 033	3 094	4 280	20 470	7 511	16 467	9 954	49 930	381	166 759
19	Otras helmintiasis	B65-B67, B70-B76, B78, B79, B81-B83	1 716	27 711	29 277	18 260	8 839	8 739	30 016	7 565	12 697	5 999	11 876	31	162 726
20	Varicela	B01	9 671	47 816	50 196	16 832	7 674	8 500	14 448	1 008	846	260	572	19	157 862
Total 20 principales causas			2 201 309	5 880 766	4 306 674	2 843 884	2 299 465	2 740 676	8 563 264	2 496 324	3 663 865	1 650 464	3 014 102	23 553	39 684 346
Otras causas			55 335	162 719	141 354	125 131	154 870	195 943	587 427	139 062	205 644	97 597	221 089	2 978	2 089 149
TOTAL GLOBAL			2 256 644	6 043 485	4 448 028	2 969 015	2 454 335	2 936 619	9 150 691	2 635 386	3 869 509	1 748 061	3 235 191	26 531	41 773 495

FUENTE: SEIVE/OIE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos 2016  
N.A.= No aplica para este grupo de edad

# ANEXO II

## MATERIAL, EQUIPO, REACTIVOS Y SOLUCIONES

- MATERIAL

Membranas para inmunotransferencia (Western blot)

- Immobilon-P, Millipore, Cat. #IPVH 000 10.
- Membrana de nitrocelulosa 0.45 um, BIO-RAD, Cat. #162-0115

- EQUIPO

Beckman φ50 pH Meter.

Precision AI Stainless Steel Water Bath Model 180

Perkin EIMER LAMBDA Bio UV/VIS Spectrometer

Aparato de electroforesis Mini PROTEAN® 3Cell, BIO-RAD.

- REACTIVOS

Ácido acético glacial, Tecsiquim, Cat. #AT002

Ácido ascórbico, SIGMA, Cat. #A-750G

Ácido clorhídrico (HCl), Tecsiquim, Cat. #CT042

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) - ( $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4 \cdot 2 H_2O$ )

- SIGMA Cat. #ED4SS
- Thermo Scientific, Cat. #1858567 (0.5 M)

Acrilamida, BIO-RAD, Cat. #161-0101

Agarosa Proteína G recombinante (APG), Invitrogen, Cat. #15920-010

Albúmina sérica bovina (BSA):

- 1) Biowest, Cat. #P6154-10GR.
- 2) SIGMA, Cat. A-7030

Anticuerpos primarios

- Anti-c-Met, Met (B-2) (hecho en ratón), Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat. #sc-8057
- Anti-HGF (hecho en cabra), SIGMA, Cat. #H7157
- Anti-Lectina (hecho en conejo).

Anticuerpos secundarios

- Cabra anti-conejo HRP, Cell signaling, Cat. #7074.
- Cabra anti-ratón, Millipore, Cat. #AP124P.
- Bovino anti-cabra HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc., Cat #sc-2350.

Azul de bromofenol, Sigma, Cat. # B5525-5G

Azul Tripan, SIGMA, Cat. #T8154-100ML

Biosate, BIOXON, Cat. #230500

Bloqueador para Western blot (Leche descremada), BIO-RAD, Cat. #170-6404

Buffer de fosfatos Salino (PBS), GIBCO, Cat. #21300-025

Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Emsure, Cat. #011-005-00-2

Citrato de amonio férrico (FaC), SIGMA, Cat. #F-5879

Cloruro de Sodio, (NaCl), J. T. Baker, Cat. #3624-01

Cocktail Inhibidor de Fosfatasas Halt <sup>TM</sup>, Thermo Scientific, Cat. #78420

Cocktail Inhibidor de Proteasas Halt <sup>TM</sup>, Thermo Scientific, Cat. #78430

D-(+)-Galactosa, SIGMA, Cat. #G-0625

D-(+)-Glucosa, SIGMS, Cat. #8270-10KG

Dodecil sulfato de sodio (SDS), SIGMA, Cat. #L4509

Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH), J. T. Baker, 9014-03

Factor de crecimiento de hepatocitos recombinante de humano (HGF),

- Preprotech, Cat. #100-39 Lote #0510S201-2 (5 ng/uL).
- SIGMA, Cat. #H9661.

Fluoruro de Sodio (NaF), Reasol.

Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), J. T. Baker, Cat. #3252-01

Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Monterrey, Cat. #3586

Fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), J. T. BAKER, Cat #3828-01

Fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O), J. T. Baker, Cat. #3818-10

Glicerol, J. T. Baker, Cat. # 2136-01

Glicina, BIORAD, Cat. #161-0718

IGEPAL, SIGMA, Cat. #I-3021

Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Cat. #WBKL S0100

Iodoacetamida (IA), SIGMA, Cat. #I-6125.

L-Cisteína HCl Monohidratada, SIGMA, Cat. #C7880-500G

Marcadores de peso molecular: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIO-RAD, Cat. #161-0374

Metanol (CH<sub>3</sub>OH), J. T. Baker, 9070-03

N,N'-metilenbisacrilamida (bis-acrilamida) (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), BIO-RAD, Cat. #161-0201

Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>), J. T. Baker, Cat. #3426-04

Nonidet P40 (NP40) Substitute, Fluka BioChemika, Cat. #78385

Paraformaldehido, SIGMA, Cat. #P-6148

Persulfato de amonio (APS), BIO-RAD, Cat. #161-0700

Ponceau S, SIGMA, P-7170

Suero Bovino, Biowest, Cat. #S0250-500

Suplemento de vitaminas Diamond

TEMED (tetrametiletilendiamina), BIO-RAD, Cat. #161-0801

Tris, Trizma base, SIGMA, Cat. #T-1503

Tween 20, SIGMA, Cat. #P5927-100ML

○ SOLUCIONES

**Buffer de lisis amebiano (1 mL)**

Este buffer se prepara a partir de soluciones stock de IA y EDTA, dependiendo el volumen que ocupa el botón celular de trofozoitos, se calcula el volumen necesario de estos inhibidores para llegar a la concentración deseada en un volumen final de 1 mL.

Reactivo	Concentración inicial (mM)	Concentración final (mM)
EDTA	1000	10
IA	1000	100
PBS-A c.b.p.		

**Buffer de Lisis (1 mL)**

Este buffer de lisis, se prepara a partir de soluciones stock previamente preparadas como se indica en la siguiente tabla.

Reactivo	Conc. Inicial	Volumen (uL)	Conc. final
Tris pH 7	1000 mM	10	10 mM
NaCl	1000 mM	150	150 mM
Cocktail Inhibidor de Fosfatasas Halt™	100 x	10	1 x

<b>Cocktail Inhibidor de Proteasas Halt™</b>	100 x	10	1 x
<b>NaF</b>	100 mM	100	10 mM
<b>NP40</b>	100 x	10	1 x
<b>EDTA</b>	50 mM	20	1 mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	c.b.p. 1000 uL		

### Buffer de Lisis Suplementado (1 mL)

Este buffer de lisis, se prepara a partir de soluciones stock previamente preparadas como se indica en la siguiente tabla

Reactivo	Conc. Inicial	Volumen (uL)	Conc. final
<b>Tris pH 7</b>	1000 mM	10	10 mM
<b>NaCl</b>	1000 mM	150	150 mM
<b>Cocktail Inhibidor de Fosfatasas Halt™</b>	100 x	10	1 x
<b>Cocktail Inhibidor de Proteasas Halt™</b>	100 x	10	1 x
<b>NaF</b>	100 mM	100	10 mM
<b>NP40</b>	100 x	10	1 x
<b>EDTA</b>	500 mM	20	10 mM
<b>IA</b>	1000 mM	50	50 mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	c.b.p. 1000 uL		

### Buffer de lavado (5 mL)

Este buffer de lavado, se prepara a partir de soluciones stock previamente preparadas como se indica en la siguiente tabla

Reactivo	Conc. Inicial (M)	Volumen (uL)	Conc. final (M)
<b>Tris</b>	1	250	0.05
<b>NaCl</b>	1	750	0.15

EDTA	0.050	1000	0.010
NP40	N/A	50	1%
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 1000 uL		

### Buffer cocktail

Reactivo	Volumen (mL)	Conc. final
H <sub>2</sub> O	4.8	N/A
Tris 0.5 M pH 6.8	1.2	0.06 M
SDS 10 %	2.0	2 %
Glicerol	1.0	10 %
Azul de Bromofenol 1%	0.5	0.025 %

Tomar 950 uL de esta solución y agregar 50 uL de H<sub>2</sub>O para condiciones no reductoras o 50 uL de β-mercaptoetanol para condiciones reductoras.

### Geles de poliacrilamida/bis-acrilamida

Grosor del gel	Gel concentrador 5%		Gel Separador 7.5 %	
	1 o 1.5 mm		1 mm	1.5 mm
Reactivo	Volumen (mL)			
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8)	1.66	3.75	5	
H <sub>2</sub> O	5.7	5.7	7.6	
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5			
Tris 1.5 M pH 8.8		3.75	5	
Glicerol		1.6	2.13	
SDS 10%	0.100	0.150	0.200	
APS 10%	0.0335	0.050	0.066	
TEMED	0.015	0.015	0.020	

### Buffer de corrida (1L)

Reactivo	Concentración
Tris (Trizma base)	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1 % (v/v)

### Buffer de transferencia (1L)

Reactivo	Concentración
Tris (Trizma base)	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20 % (v/v)

### Azul de bromofenol 0.1 %

- 1) Disolver 5 mg en 5 mL de H<sub>2</sub>O.
- 2) Filtrar la solución.

### Nitrato de plata 20% (solución stock)

Disolver 10 g de AgNO<sub>3</sub> en agua desionizada y llevar a un volumen final de 50 mL.

### Nitrato de plata 0.1%

Disolver 250 uL de la solución stock de AgNO<sub>3</sub> (20%) en 50 mL de agua desionizada.

### Persulfato de Amonio (APS) 10%

Disolver 100 mg de APS en un volumen final de 1 mL de agua desionizada.

## TBS

Reactivo	Concentración (M)
Tris pH 7.2	0.01
NaCl	0.15

## TBS - T

Reactivo	Concentración (M)
Tris pH 7.2	0.01
NaCl	0.15
Tween-20	0.125 % (v/v)

### Stock de Tris 1.0 M pH 7.2

- Disolver 60.05 g de Trizma base en 500 mL de H<sub>2</sub>O
- Llevar a pH 7.2 con ayuda de HCl.

### Stock de Tris 1.5 M pH 8.8

- Disolver 18.17 g de Trizma base en 100 mL de H<sub>2</sub>O.
- Llevar a pH con ayuda de HCl.

### Stock de Tris 0.5 M pH 6.8

- Disolver 18.17 g de Trizma base en 100 mL de H<sub>2</sub>O.
- Llevar a pH con ayuda de HCl.

### Cloruro de Sodio (NaCl) 1M

- Disolver 29.22 g de NaCl en 500 mL de H<sub>2</sub>O.

### Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 M

- Disolver 1.486 g de EDTA en H<sub>2</sub>O.y llevar a un volumen final de 3 mL.

### Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 mM

- Disolver 1.040 g de EDTA en H<sub>2</sub>O.y llevar a un volumen final de 50 mL.

### Iodoacetamida (IA) 1 M

- Disolver 184.9 mg de IA en H<sub>2</sub>O.y llevar a un volumen final de 1000 uL.

### Buffer de fosfatos amebiano (PBS-A):

Solución A: Fosfato de sodio monobásico (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Na) 0.15 M 250 mL

Solución B: Fosfato de sodio dibásico (HPO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>) 0.15 M 500 mL

Se titula la solución B con A hasta obtener un pH de 7.2 (Buffer de fosfatos)

Después se mezclan 100 mL de este buffer de fosfatos con 500 mL de Na Cl 0.18 M, aforándose a 1,000 mL.

### Medio TYI (1 L)

Disolver en 500 mL de agua bidestilada:

Reactivo	Cantidad (g)
Biosate	30
D-(+)-Glucosa	10

Por otra parte, disolver en 100 mL de agua bidestilada:

Reactivo	Cantidad (g)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
NaCl	2.9
L-Cisteína	2.9
Ácido ascórbico	0.2

Mezclar las dos soluciones preparadas anteriormente y agregar 22.5 mg de citrato de amonio férrico (FaC)

Esterilizar la solución obtenida a 121 °C durante 20 min.

Agregar 3% (v/v) de suplemento de vitaminas de Diamond y de requerirse, agregar 10% (v/v) de suero bovino.

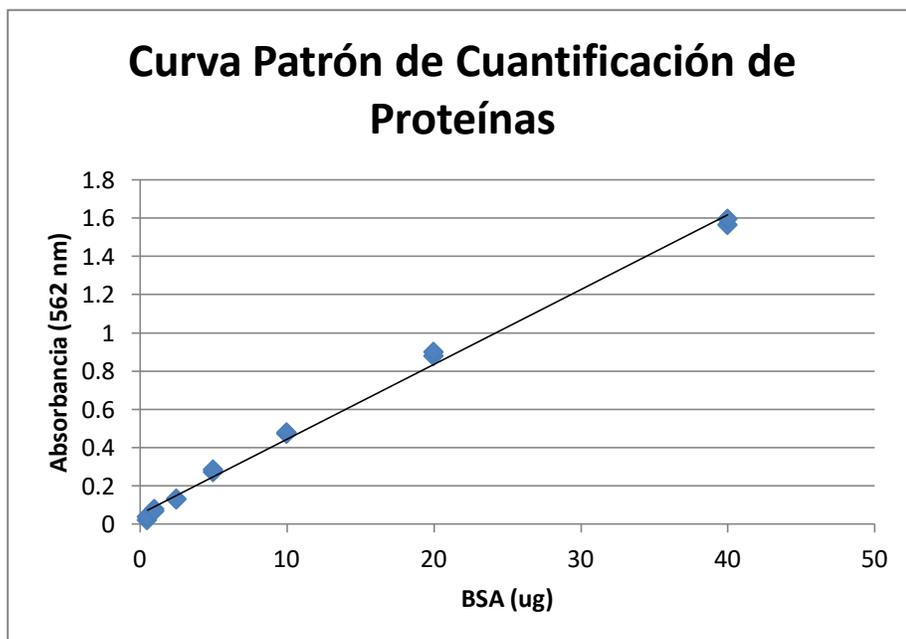
# ANEXO III

## CÁLCULOS

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 1) Cuantificación de proteínas de lisado total amebiano

10 - julio - 2015	
BSA (ug)	Abs
0.5	0.023
0.5	0.04
1	0.08
1	0.07
2.5	0.134
2.5	0.131
5	0.274
5	0.286
10	0.474
10	0.48
20	0.88
20	0.901
40	1.565
40	1.596
Pendiente	0.0391
Ordenada	0.0542
r <sup>2</sup>	0.9951
r	0.9976



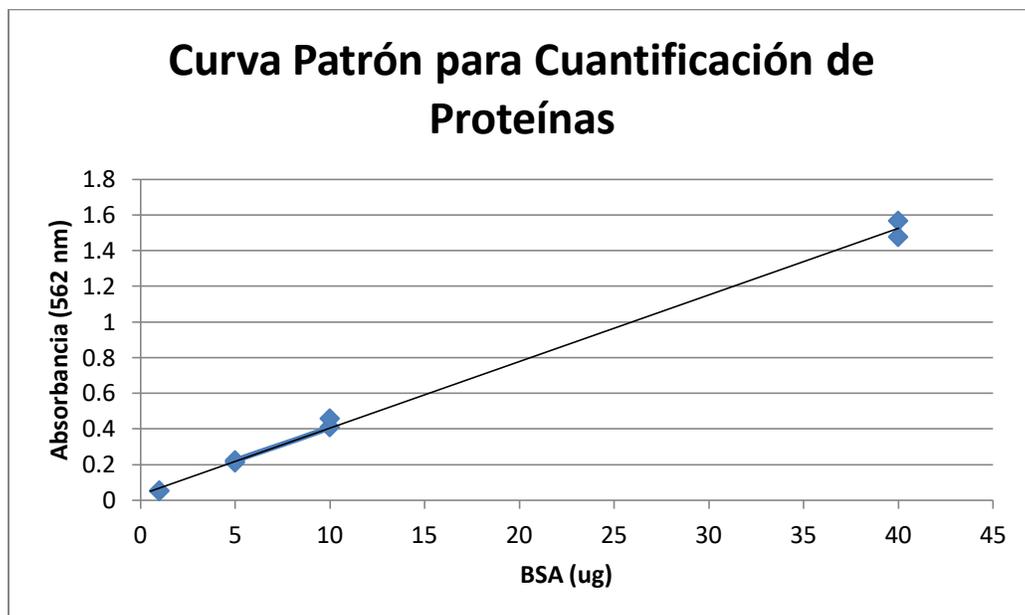
Muestras	Absorbancia (562 nm)	Cantidad proteína (ug)	Volumen de mta. (uL)	Concentración (ug/uL)
LT Amebiano (1)	1.327	32.57	25	13.03
LT Amebiano (2)	2.167	54.06	50	10.81
			<u>Promedio</u>	<u>11.92</u>

Se cargaron en los pozos correspondientes del gel de poliacrilamida:  
4.5 uL de lisado total ( $\approx$  50 ug), junto con 4.5 uL de Buffer cocktail 2x.

## 2) Cuantificación de proteínas de lisado total de HepG2

14 - marzo - 16		
BSA (ug)	Absorbancia (562 nm)	
1	0.05	
1	0.053	
5	0.211	
5	0.222	
10	0.409	
10	0.457	
40	1.476	
40	1.566	
Pendiente	0.0374	
Ordenada	0.0324	
r <sup>2</sup>	0.9972	
r	0.9986	
Muestras	Absorbancia (562 nm)	Concentración (ug/uL)
HepG2 (1)	2.416	6.38
HepG2 (2)	2.111	5.56
<u>Promedio</u>		<u>5.97</u>

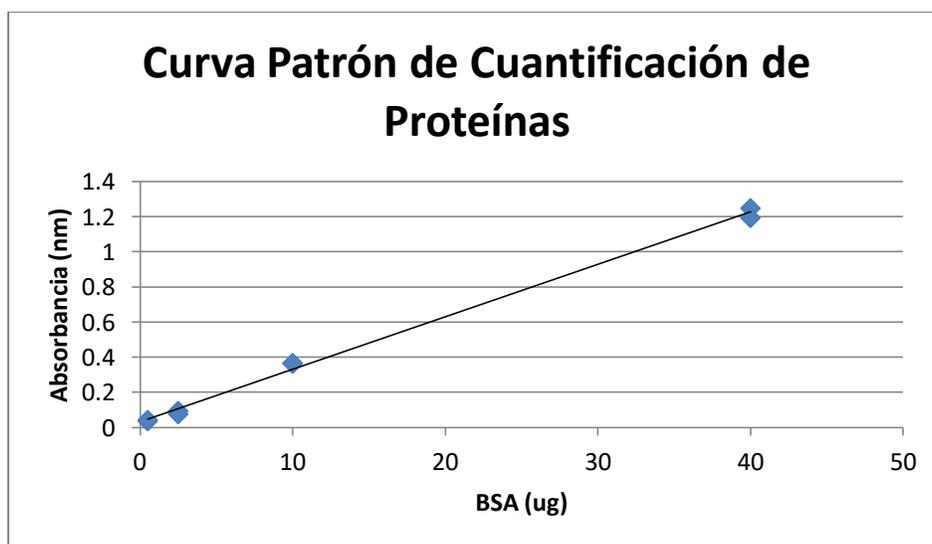
Se cargaron en los pozos correspondientes del gel de poliacrilamida:  
12 uL de lisado total ( $\approx$  71 ug), junto con 12 uL de Buffer cocktail 2x.



3) Cuantificación de proteínas de lisado total proveniente de cocultivo HepG2:Trofozoitos, posterior inmunoprecipitación y tinción de plata.

19 - mayo - 16		
BSA (ug)	Absorbancia (562 nm)	
0.5	0.037	
0.5	0.043	
2.5	0.094	
2.5	0.077	
10	0.365	
10	0.366	
40	1.248	
40	1.194	
Pendiente	0.0299	
Ordenada	0.0316	
r <sup>2</sup>	0.9972	
r	0.9986	
Muestras	Absorbancia (562 nm)	Concentración (ug/uL)
Cocultivo (1)	2.812	9.29
Cocultivo (2)	2.893	9.56
	<u>Promedio</u>	<u>9.43</u>

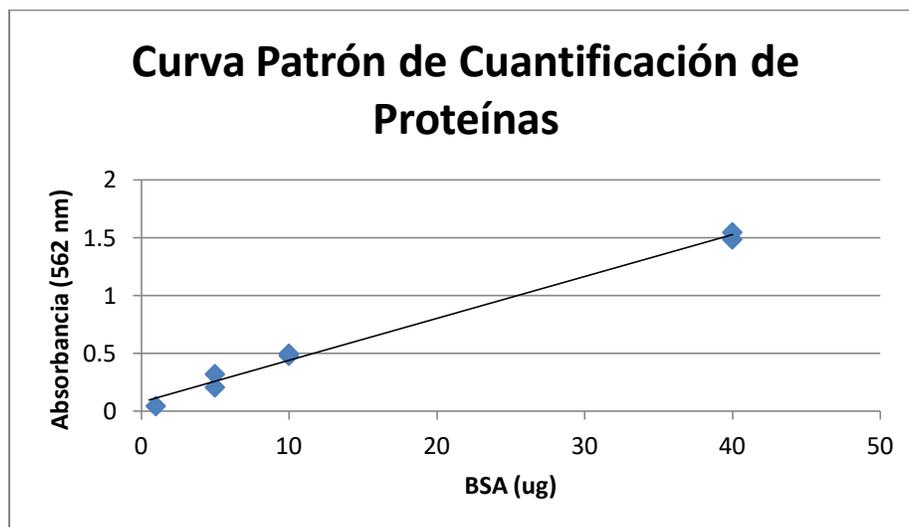
Para realizar la inmunoprecipitación correspondiente, se tomaron 110 uL de lisado total de cocultivo ( $\approx$  1000 ug).



- 4) Cuantificación de proteínas de lisado total proveniente de cocultivo HepG2:Trofozoitos, posterior inmunoprecipitación y análisis de Western blot.

30 - mayo -17		
BSA (ug)	Absorbancia (562 nm)	
1	0.043	
5	0.205	
5	0.319	
10	0.478	
10	0.496	
40	1.484	
40	1.545	
Pendiente	0.0361	
Ordenada	0.0799	
r <sup>2</sup>	0.9918	
r	0.9959	
Muestras	Absorbancia (562 nm)	Concentración (ug/uL)
Cocultivo (1)	0.765	18.96
Cocultivo (2)	0.628	15.17
	<u>Promedio</u>	<u>17.06</u>

Para realizar la inmunoprecipitación correspondiente, se tomaron 59 uL de lisado total de cocultivo ( $\approx$  1000 ug).



## DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES

Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con las de proteínas de PM conocido. Esto se puede utilizar en geles teñidos con Coomassie, plata o bien en membranas de transferencia.

Para realizar esta determinación, se compara el Rf de la proteína cuyo PM es desconocido con el de las proteínas de referencia con PM conocido.

El Rf es el parámetro experimental asociado a esta técnica, y se define como:

$$Rf = \frac{\textit{Distancia recorrida por la proteína}}{\textit{Distancia recorrida por el frente de avance}}$$

El frente de avance se determina, en un gel, por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima como el colorante azul de bromofenol; así como el borde de la membrana de transferencia, según corresponda el caso.

Se mide la distancia recorrida por el frente de avance (Df) y de cada proteína (Dp).

$$Rf = \frac{Dp}{Df}$$

El Rf es inversamente proporcional al logaritmo del PM conocido. Se realiza una gráfica (x = Rf, y = log PM) obteniendo la ecuación de la recta para posteriormente interpolar el valor de Rf de la proteína de interés y así obtener el PM correspondiente.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. S. Ralston and W. Petri, "The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death?," *Essays Biochem.*, vol. 51, pp. 193–210, 2011.
- [2] B. S. Pritt and C. G. Clark, "Amebiasis," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 83, no. 10, pp. 1154–1160, 2008.
- [3] "Anuario de Morbilidad - Dirección General de Epidemiología," <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> .
- [4] W. A. Petri, "Therapy of intestinal protozoa," *Trends Parasitol.*, vol. 19, no. 11, pp. 523–526, 2003.
- [5] W. A. Petri, R. Haque, and B. J. Mann, "The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, pp. 39–64, 2002.
- [6] A. L. Thorburn, "Fritz Richard Schaudinn , 1871-1906," *Berlin Med.*, pp. 1901–1903, 1971.
- [7] J. I. Ravdin, N. Sperelakis, and R. L. Guerrant, "Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*," *J. Infect. Dis.*, vol. 146, no. 3, pp. 335–340, 1982.
- [8] J. I. Ravdin, C. F. Murphy, R. L. Guerrant, and S. A. Long-Krug, "Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*," *J. Infect. Dis.*, vol. 152, no. 3, pp. 542–549, 1985.
- [9] J. E. Teixeira and B. J. Mann, "*Entamoeba histolytica* -Induced dephosphorylation in host cells," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 4, pp. 1816–1823, 2002.
- [10] C. D. Huston, E. R. Houpt, B. J. Mann, C. S. Hahn, and W. A. Petri, "Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*," *Cell. Microbiol.*, vol. 2, no. 6, pp. 617–625, 2000.

- [11] K. B. Seydel and J. Stanley S.L., “*Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis,” *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 6, pp. 2980–2983, 1998.
- [12] L. Yan and S. L. Stanley Jr, “Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease,” *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 12, p. 7911, 2001.
- [13] S. M. Becker *et al.*, “Epithelial cell apoptosis facilitates *Entamoeba histolytica* infection in the gut.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 176, no. 3, pp. 1316–22, 2010.
- [14] D. M. Davis, “Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, p. 238, Feb. 2007.
- [15] E. Joly and D. Hudrisier, “What is trogocytosis and what is its purpose?,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, p. 815, Sep. 2003.
- [16] K. S. Ralston, M. D. Solga, N. M. Mackey-Lawrence, Somlata, A. Bhattacharya, and W. A. Petri, “Trogocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion,” *Nature*, vol. 508, no. 7497, pp. 526–530, 2014.
- [17] N. Guillén, “Nibbled to death,” *Nature*, vol. 508, p. 462, Apr. 2014.
- [18] S. Begum, J. Quach, and K. Chadee, “Immune evasion mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to disease,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. DEC, pp. 1–8, 2015.
- [19] J. E. Teixeira, B. T. Heron, and C. D. Huston, “C1q- and collectin-dependent phagocytosis of apoptotic host cells by the intestinal protozoan *Entamoeba histolytica*,” *J. Infect. Dis.*, vol. 198, no. 7, pp. 1062–1070, 2008.
- [20] J. Savill and V. Fadok, “Corpse clearance defines the meaning of cell death,” *Nature*, vol. 407, no. 6805, p. 784–8., 2000.
- [21] V. A. Fadok, D. L. Bratton, and P. M. Henson, “Phagocyte receptors for apoptotic cells: Recognition, uptake, and consequences,” *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 7, pp. 957–962, 2001.

- [22] C. D. Huston, D. R. Boettner, V. Miller-sims, and W. a Petri, "Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica* Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*," vol. 71, no. 2, pp. 964–972, 2003.
- [23] D. R. Boettner *et al.*, "*Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 1, pp. 0122–0133, 2008.
- [24] J. Andrä, R. Herbst, and M. Leippe, "Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 27, no. 4, pp. 291–304, 2003.
- [25] R. S. Munford, P. O. Sheppard, and P. J. O'Hara, "Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure.," *J. Lipid Res.*, vol. 36, no. 8, pp. 1653–1663, 1995.
- [26] H. Bruhn and M. Leippe, "Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1514, no. 1, pp. 14–20, 2001.
- [27] J. Winkelmann, M. Leippe, and H. Bruhn, "A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 147, no. 1, pp. 85–94, 2006.
- [28] E. Li, W. G. Yang, T. Zhang, and S. L. Stanley, "Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis," *Infect. Immun.*, vol. 63, no. 10, pp. 4150–4153, 1995.
- [29] M. E. Lidell, D. M. Moncada, K. Chadee, and G. C. Hansson, "*Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 24, pp. 9298–9303, 2006.
- [30] A. Hellberg, R. Nickel, H. Lotter, E. Tannich, and I. Bruchhaus, "Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro

- but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils,” *Cell. Microbiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 13–20, 2001.
- [31] B. N. Mitra, Y. Saito-Nakano, K. Nakada-Tsukui, D. Sato, and T. Nozaki, “Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*,” *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 9, pp. 2112–2125, 2007.
- [32] M. Tillack *et al.*, “Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 149, no. 1, pp. 58–64, 2006.
- [33] A. Sen, N. S. Chatterjee, M. Ali Akbar, N. Nandi, and P. Das, “The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress,” *Eukaryot. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 664–673, 2007.
- [34] R. C. MacFarlane and U. Singh, “Identification of an *Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity,” *Eukaryot. Cell*, vol. 6, no. 11, pp. 2139–2146, 2007.
- [35] S. Shrimal, S. Bhattacharya, and A. Bhattacharya, “Serum-dependent selective expression of EhTMKB1-9, a member of *Entamoeba histolytica* B1 family of transmembrane kinases,” *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 6, 2010.
- [36] J. Santi-Rocca, C. Weber, G. Guigon, O. Sismeiro, J. Y. Coppée, and N. Guillén, “The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis,” *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 1, pp. 202–217, 2008.
- [37] M. Seigneur, J. Mounier, M. C. Prevost, and N. Guillén, “A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes,” *Cell. Microbiol.*, vol. 7, no. 4, pp. 569–579, 2005.
- [38] J. I. Ravdin, P. H. Schlesinger, C. F. Murphy, I. Y. Gluzman, and D. J. Krigstad, “Acid intracellular vesicles and the cytolysis of mammalian target cells by *Entamoeba histolytica* trophozoites,” *J. Protozool.*, vol. 33, no. 4, pp.

478–486, 1986.

- [39] J. I. Ravdin, W. A. Petri, C. F. Murphy, and R. D. Smith, “Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites,” *Infect. Immun.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–5, 1986.
- [40] W. A. Petri, M. D. Chapman, T. Snodgrass, B. J. Mann, J. Broman, and J. I. Ravdin, “Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin in *Entamoeba histolytica*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 5, pp. 3007–3012, 1989.
- [41] X.-J. Cheng, H. Tsukamoto, T. Kaneda, and H. Tachibana, “Identification of the 150-kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose- and N-acetyl- D -galactosamine-inhibitable lectin,” *J. pa*, vol. 84, pp. 632–639, 1998.
- [42] R. López-Vancell *et al.*, “*Entamoeba histolytica*: Expression and localization of Gal/GalNAc lectin in virulent and non-virulent variants from HM1:IMSS strain,” *Exp. Parasitol.*, vol. 125, no. 3, pp. 244–250, 2010.
- [43] E. Tannich, F. Ebert, and R. D. Horstmann, “Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 5, pp. 1849–53, 1991.
- [44] B. J. Mann, B. E. Torian, T. S. Vedvick, and W. a Petri, “Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 8, pp. 3248–3252, 1991.
- [45] G. Ramakrishnan, B. D. Ragland, J. E. Purdy, and B. J. Mann, “Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*,” *Mol Microbiol*, vol. 19, no. 1, pp. 91–100, 1996.
- [46] J. J. McCoy, B. J. Mann, T. S. Vedvick, Y. Pak, D. B. Heimark, and W. A. Petri, “Structural analysis of the light subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adherence lectin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 32, pp. 24223–24231, 1993.
- [47] E. Tannich, F. Ebert, and R. D. Horstmann, “Molecular cloning of cDNA and

- genomic sequences coding for the 35-kilodalton subunit of the galactose-inhibitable lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 55, no. 1–2, pp. 225–227, 1992.
- [48] J. I. Ravdin and R. L. Guerrant, “Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes,” *J. Clin. Invest.*, vol. 68, no. 5, pp. 1305–1313, 1981.
- [49] R. Lopez-Vancell, I. Montfort, and R. Perez-Tamayo, “Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*,” *Parasitol Res*, vol. 86, no. 3, pp. 226–231, 2000.
- [50] J. I. Ravdin, P. Stanley, C. F. Murphy, and W. A. Petri, “Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin,” *Infect. Immun.*, vol. 57, no. 7, pp. 2179–2186, 1989.
- [51] J. I. Ravdin, B. Y. Croft, and R. L. Guerrant, “Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*,” *J. Exp. Med.*, vol. 152, no. 2, pp. 377–90, 1980.
- [52] L. D. Saffer and W. A. Petri, “Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells,” *Infect. Immun.*, vol. 59, no. 12, pp. 4681–4683, 1991.
- [53] A. M. Goldston, R. R. Powell, A. B. Koushik, and L. A. Temesvari, “Exposure to host ligands correlates with colocalization of Gal/GalNAc lectin subunits in lipid rafts and phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate signaling in *Entamoeba histolytica*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 11, no. 6, pp. 743–751, 2012.
- [54] K. Chadee, W. A. Petri, D. J. Innes, and J. I. Ravdin, “Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*,” *J. Clin. Invest.*, vol. 80, no. 5, pp. 1245–1254, 1987.
- [55] K. Kato, Y. Takegawa, K. S. Ralston, C. A. Gilchrist, S. Hamano, and W. A. Petri Jr, “Sialic acid-dependent attachment of mucins from three mouse strains to *Entamoeba histolytica*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 436, no. 2, pp. 252–258, 2014.
- [56] R. Séguin, B. J. Mann, K. Keller, and K. Chadee, “Identification of the

- galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor-alpha production by macrophages.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 26, pp. 12175–9, 1995.
- [57] R. Séguin, B. J. Mann, K. Keller, and K. Chadee, “The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide.,” *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 7, pp. 2522–7, 1997.
- [58] S. J. Kammanadiminti, B. J. Mann, L. Dutil, and K. Chadee, “Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*,” *FASEB J.*, vol. 8, no. 1, pp. 155–157, 2003.
- [59] S. Blazquez, M. C. Rigother, M. Huerre, and N. Guillén, “Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 37, no. 3–4, pp. 425–433, 2007.
- [60] L. Mortimer, F. Moreau, S. Cornick, and K. Chadee, “Gal-lectin-dependent contact activates the inflammasome by invasive *Entamoeba histolytica*.,” *Mucosal Immunol.*, vol. 7, no. 4, pp. 1–13, 2013.
- [61] D. C. Schain, R. A. Salata, and J. I. Ravdin, “Human T-lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactose-inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*,” *Infect. Immun.*, vol. 60, no. 5, pp. 2143–2146, 1992.
- [62] C. P. A. Ivory and K. Chadee, “Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 2, pp. 385–394, 2007.
- [63] J. M. Galván-Moroyoqui, M. del Carmen Domínguez-Robles, and I. Meza, “Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin Carbohydrate Recognition Domain of *Entamoeba histolytica*,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 41, no. 10, pp. 1101–1112, 2011.

- [64] L. Gutierrez-Kobeh, N. Cabrera, and R. Perez-Montfort, "A mechanism of acquired resistance to complement-mediated lysis by *Entamoeba histolytica*," *J Parasitol*, vol. 83, no. 2, pp. 234–241, 1997.
- [65] J. Ventura-Juárez *et al.*, "Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon," *Parasitol. Res.*, vol. 104, no. 4, pp. 821–826, 2009.
- [66] R. Haque *et al.*, "Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children.," *J. Infect. Dis.*, vol. 186, no. 4, pp. 547–552, 2002.
- [67] J. I. Ravdin, M. D. Abd-Alla, S. L. Welles, S. Reddy, and T. F. H. G. Jackson, "Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess," *Infect. Immun.*, vol. 71, no. 12, pp. 6899–6905, 2003.
- [68] H. Lotter, T. Zhang, K. B. Seydel, S. L. Stanley, and E. Tannich, "Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis.," *J. Exp. Med.*, vol. 185, no. 10, pp. 1793–801, 1997.
- [69] J. M. Dodson *et al.*, "Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin.," *J. Infect. Dis.*, vol. 179, no. 2, pp. 460–6, 1999.
- [70] M. Dean *et al.*, "The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes," *Nature*, vol. 318, no. 6044, pp. 385–388, 1985.
- [71] C. S. Cooper *et al.*, "Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line.," *Nature*, vol. 311, no. 5981, pp. 29–33, 1984.
- [72] M. Park, M. Dean, K. Kaul, M. J. Braun, M. A. Gonda, and G. F. Vande Woude, "Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 18, pp. 6379–6383, 1987.
- [73] M. Gonzatti-Haces, A. Seth, M. Park, T. Copeland, S. Oroszlan, and G. F. Vande Woude, "Characterization of the TPR-MET oncogene p65 and the

- MET protooncogene p140 protein-tyrosine kinases," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, no. 1, pp. 21–25, 1988.
- [74] P. M. Comoglio, S. Giordano, and L. Trusolino, "Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 6, pp. 504–516, 2008.
- [75] S. Giordano, C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper, and P. M. Comoglio, "Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein," *Nature*, vol. 339, no. 6220, pp. 155–156, May 1989.
- [76] L. Naldini *et al.*, "Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor.," *EMBO J.*, vol. 10, no. 10, pp. 2867–78, 1991.
- [77] S. Giordano, M. F. Di Renzo, R. P. Narsimhan, C. S. Cooper, C. Rosa, and P. M. Comoglio, "Biosynthesis of the protein encoded by the c-met protooncogene.," *Oncogene*, vol. 4, no. 11, pp. 1383–1388, 1989.
- [78] S. Giordano, M. F. Di Renzo, R. Ferracini, L. Chiado-piat, and P. M. Comoglio, "p145, a Protein with Associated Tyrosine Kinase Activity in Human Gastric Carcinoma Cell Line," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 3510–3517, 1988.
- [79] P. R. Tempest, C. S. Cooper, and G. N. Major, "The activated human met gene encodes a protein tyrosine kinase.," *FEBS Lett.*, vol. 209, no. 2, pp. 357–361, 1986.
- [80] R. Ferracini, P. Longati, L. Naldini, E. Vigna, and P. M. Comoglio, "Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 29, pp. 19558–64, 1991.
- [81] M. Palestino-domínguez, D. Clavijo-cornejo, M. Concepción, and G. Luis, "El Factor de Crecimiento de Hepatocitos y su Receptor cMet en la Protección contra el Daño Hepático Inducido por el Alcohol\*," *Rev. Educ. Bioquímica*, vol. 31, no. 4, pp. 118–126, 2012.
- [82] M. Stoker, E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray, "Scatter factor is a

- fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility,” *Nature*, vol. 327, no. 6119, pp. 239–242, May 1987.
- [83] E. M. Rosen, L. Meromsky, E. Setter, D. W. Vinter, and I. D. Goldberg, “Smooth muscle-derived factor stimulates mobility of human tumor cells.,” *Invasion Metastasis*, vol. 10, no. 1, pp. 49–64, 1990.
- [84] K. M. Weidner *et al.*, “Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor (motility factor/tumor cell invasion/chromosomal localization/c-met tyrosine kinase receptor/lung fibroblast-derived mitogen),” *Cell Biol.*, vol. 88, no. 16, pp. 7001–7005, 1991.
- [85] T. Nakamura *et al.*, “Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor,” *Nature*, vol. 342, no. 6248, pp. 440–443, Nov. 1989.
- [86] T. Konishi, T. Takehara, T. Tsuji, K. Ohsato, K. Matsumoto, and T. Nakamura, “Scatter factor from human embryonic lung fibroblasts is probably identical to hepatocyte growth factor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 180, no. 2, pp. 765–773, 1991.
- [87] R. A. Furlong, T. Takehara, W. G. Taylor, T. Nakamura, and J. S. Rubin, “Comparison of biological and immunological properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable,” *J. Cell Sci.*, vol. 100, pp. 173–177, 1991.
- [88] S. A. A. Donald P. Bottaro, Jeffrey S. Rubin, Donna L. Faletto, Andrew M.-L. Chan, Thomas E. Kmiecik, George F. Vande Woude, “Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the c-met Proto-Oncogene Product,” *Science (80- )*, vol. 251, pp. 802–804, 1991.
- [89] K. Miyazawa *et al.*, “Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 163, no. 2, pp. 967–973, Sep. 1989.
- [90] K. Tashiro *et al.*, “Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 8, pp. 3200–3204, 1990.
- [91] L. Naldini *et al.*, “Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required

- for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor.," *EMBO J.*, vol. 11, no. 13, pp. 4825–4833, 1992.
- [92] T. Nakamura, K. Nawa, A. Ichihara, N. Kaise, and T. Nishino, "Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets," *FEBS Lett*, vol. 224, no. 2, pp. 311–316, 1987.
- [93] E. Gohda *et al.*, "Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure.," *J. Clin. Invest.*, vol. 81, no. 2, pp. 414–419, Feb. 1988.
- [94] C. Basilico, A. Arnesano, M. Galluzzo, P. M. Comoglio, and P. Michieli, "A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of met," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 30, pp. 21267–21277, 2008.
- [95] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude, "Met, metastasis, motility and more," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, pp. 915–925, Dec. 2003.
- [96] L. Trusolino and P. M. Comoglio, "Scatter-Factor and Semaphorin Receptors: Cell Signalling for Invasive Growth," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 289–300, 2002.
- [97] T. Ueki *et al.*, "Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats.," *Nat. Med.*, vol. 5, no. 2, pp. 226–230, 1999.
- [98] M. Watanabe *et al.*, "Hepatocyte growth factor gene transfer to alveolar septa for effective suppression of lung fibrosis," *Mol. Ther.*, vol. 12, no. 1, pp. 58–67, 2005.
- [99] Y. Liu and J. Yang, "Hepatocyte growth factor: New arsenal in the fights against renal fibrosis?," *Kidney Int.*, vol. 70, no. 2, pp. 238–240, 2006.
- [100] H. Okada and R. Kalluri, "Cellular and Molecular Pathways that Lead to Progression and Regression of Renal Fibrogenesis," *Current Molecular Medicine*, vol. 5, no. 5, pp. 467–474, 2005.
- [101] G. A. Rodrigues and M. Park, "Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase.," *Oncogene*, vol. 9, no. 7, pp. 2019–2027, Jul. 1994.

- [102] E. D. Fixman, T. M. Fournier, D. M. Kamikura, M. A. Naujokas, and M. Park, "Pathways Downstream of Shc and Grb2 Are Required for Cell Transformation by the Tpr-Met Oncoprotein Pathways Downstream of Shc and Grb2 Are Required for Cell Transformation by the Tpr-Met Oncoprotein \*," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 22, pp. 13116–13122, 1996.
- [103] G. Pelicci *et al.*, "The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein.," *Oncogene*, vol. 10, no. 8, pp. 1631–1638, Apr. 1995.
- [104] C. Ponzetto *et al.*, "A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family," *Cell*, vol. 77, no. 2, pp. 261–271, 1994.
- [105] A. Koch, A. Mancini, O. El Bounkari, and T. Tamura, "The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-2 binds to c-Met directly via tyrosine residue 1356 and involves hepatocyte growth factor (HGF)-induced lamellipodium formation, cell scattering and cell spreading," *Oncogene*, vol. 24, no. 21, pp. 3436–3447, 2005.
- [106] Y.-W. Zhang, L.-M. Wang, R. Jove, and G. F. Vande Woude, "Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis.," *Oncogene*, vol. 21, no. 2, pp. 217–26, 2002.
- [107] C. Boccaccio *et al.*, "Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway," *Nature*, vol. 391, no. 6664, pp. 285–288, Jan. 1998.
- [108] T. Kinoshita, S. Hirao, K. Matsumoto, and T. Nakamura, "Possible endocrine control by Hepatocyte Growth Factor of liver regeneration after partial hepatectomy," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 177, no. 1, pp. 330–335, 1991.
- [109] C.-G. Huh, V. M. Factor, A. Sanchez, K. Uchida, E. A. Conner, and S. S. Thorgeirsson, "Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 13, pp. 4477–4482, 2004.

- [110] P. Peschard *et al.*, "Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein," *Mol. Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 995–1004, 2001.
- [111] A. Petrelli, G. F. Gilestro, S. Lanzardo, P. M. Comoglio, N. Migone, and S. Giordano, "The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met," *Nature*, vol. 416, no. 6877, pp. 187–190, Mar. 2002.
- [112] V. Tsutsumi, R. Mena-Lopez, F. Anaya-Velazquez, and a Martinez-Palomo, "Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation.," *Am. J. Pathol.*, vol. 117, no. 1, pp. 81–91, 1984.
- [113] E. Harlow and D. Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, no. v. 286. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [114] D. W. Sammons, L. D. Adams, and E. E. Nishizawa, "Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels," *Electrophoresis*, vol. 2, no. 3, pp. 135–141, 1981.
- [115] E. J. Schoenle, L. D. Adams, and D. W. Sammons, "Insulin-induced rapid decreases of a major protein in fat cell plasma membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 19, pp. 12112–12116, 1984.
- [116] D. L. Spector, R. D. Goldman, and L. A. Leinwand, *Cells: a laboratory manual*, no. v. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [117] L. Tacchini, C. De Ponti, E. Matteucci, R. Follis, and M. A. Desiderio, "Hepatocyte growth factor-activated NF- $\kappa$ B regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines," *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 11, pp. 2089–2100, 2004.
- [118] C. R. Maroun and T. Rowlands, "The Met receptor tyrosine kinase: A key player in oncogenesis and drug resistance," *Pharmacol. Ther.*, vol. 142, no. 3, pp. 316–338, 2014.