



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Estudio proteómico comparativo de fases de diferenciación del parásito  
*Entamoeba histolytica*”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. MILKA AZUCENA LUNA NÁCAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTORAL:

DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIERREZ /INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA/ INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

Ciudad de México, OCTUBRE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

PDCB/grad/045/Jur/2016

**C.P. AGUSTÍN MERCADO**  
DIRECTOR DE CERTIFICACIÓN Y CONTROL  
DOCUMENTAL ESCOLAR, UNAM  
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 391 del 27 de julio del 2016, designó el siguiente jurado para examen de grado **DOCTORA EN CIENCIAS** de **MILKA AZUCENA LUNA NÁCAR**, con número de cuenta **302237997**, con la tesis titulada: **"ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO DE FASES DE DIFERENCIACIÓN DEL PARÁSITO *Entamoeba histolytica*"**, dirigida por el Dr. Julio César Carrero Sánchez.

Presidente: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde  
Secretario: Dr. Julio César Carrero Sánchez  
Vocal: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González  
Vocal: Dr. Gonzalo Castillo Rojas  
Vocal: Dra. Ana Flisser Steinbruch

Atentamente  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de julio del 2016

**DRA. AUREA OROZCO RIVAS**  
COORDINADORA

**DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA**  
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p: Expediente alumna

AOR/CRL/aap

Unidad de Posgrado Coordinación del Posgrado en Ciencias Biomédicas Edificio B, 1er. Piso Circuito de Posgrados Cd. Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel: 5623 0222 Ext. 37001  
<http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: [pdcb@unam.mx](mailto:pdcb@unam.mx)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme culminar una meta académica.

A CONACYT por la beca otorgada para realizar mi doctorado No. 389536/255914

Al Dr. Julio César Carrero Sánchez por su apoyo y confianza durante todo el desarrollo de mí doctorado

A las Dras. Emma Saavedra y Bertha Espinoza por ser parte de mi comité tutorial y estar siempre dispuestas a otorgarme tiempo

Al Dr. Juan Pedro Laclette por ser un jefe de grupo comprometido con todos los estudiantes y por brindarme su apoyo

A los Laboratorios CARPERMOR y Mario Nequiz por proporcionarme el material biológico para la realización de mi proyecto de doctorado

Al Dr. Raúl Bobes y a la M en C. Patricia de la Torre por su apoyo durante mi doctorado



## DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada en primer lugar a mi familia, padres y hermanos, por apoyarme en cada paso de mi vida académica.

A mis padres, por enseñarme que la herencia más grande que me podrían dar sería la educación. Por inculcarme valores que hasta ahora me han permitido cumplir cada sueño.

A mis hermanos, por ser una alegría en mi vida, por ser mis amigos, por sus consejos y ante todo por tenderme siempre la mano.

A Oliver, por ser parte de este sueño mucho antes de que entrara al doctorado, por siempre apoyarme en los momentos de desilusión e infortunio y porque ahora no sólo compartiremos un logro más sino que también emprenderemos una aventura nueva al lado de nuestra Regina.

A Regina, porque aunque aún no naces has venido a revolucionar mi vida, has estado conmigo en la última parte de este sueño y eres la cereza de este pastel.

A todos mis amigos y compañeros de Laboratorio, ya que de cada uno me llevo una anécdota y un buen consejo.

## Índice

	<b>Pág.</b>
I.- Resumen	8
Abstract	10
Abreviaturas	12
II.- Introducción	13
1.- Amibiasis	13
2.- Antecedentes históricos	13
3.- Epidemiología	16
4.- Tipos de amibiasis	18
4.1.- Amibiasis intestinal	18
4.2.- Amibiasis extraintestinal	19
5.- Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	20
6.- Características de las fases de <i>E. histolytica</i> : Trofozoito y quiste	20
6.1.- Trofozoito	20
6.2.- Quiste	21
7.- Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	22
8.- Estudio de la diferenciación (Enquistamiento)	24
8.1.- En parásitos protozoarios intestinales	24
8.2.- Estudio de la diferenciación en <i>E. histolytica</i>	25
9.- Técnicas ómicas y tecnologías nuevas para el estudio de los parásitos protozoarios	28
10.- Estudios transcriptómicos y proteómicos en <i>E. histolytica</i>	29

10.1.- Estudios transcriptómicos	29
10.2.- Estudios proteómicos	30
III.- Planteamiento del problema	33
IV.- Hipótesis	34
V.- Objetivos	34
VI.- Materiales y Métodos	35
1.- Cultivo de <i>E. histolytica</i>	35
2.- Inducción de Estructuras Tipo Quiste (ETQ)	35
3.-Muestras de heces humanas	35
4.- Purificación de DNA a partir de muestras humanas	36
5.- Detección diferencial de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> por PCR	36
6.- Aislamiento de quistes de <i>E. histolytica</i>	37
7.- Preparación de extractos de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes de <i>E. histolytica</i>	38
8.- Preparación de muestras para análisis por LC- MS/MS	38
9.- Desnaturalización de las proteínas y digestión	39
10.- Desalado de péptidos	39
11.- Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS)	40
12.- Procesamiento de datos y búsqueda de librerías	40
13.- Análisis Bioinformáticos	41
14.- Purificación de RNA de trofozoítos, ETQ y quistes de <i>E. histolytica</i>	41
15.- Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa PCR (RT-PCR)	42
16.- Western Blot contra la proteína Jacob	42
17.- Inmunofluorescencia contra la proteína Jacob	43

VII.- Resultados	45
1.- Optimización de la obtención de las ETQ	46
2.- Identificación de muestras humanas positivas para <i>E. histolytica</i> por PCR	47
3.- Obtención de quistes semipurificados de <i>E. histolytica</i> por Gradientes de sacarosa	48
4.- Integridad de los extractos proteicos de trofozoítos, quistes y ETQ	49
5.- Validación de las proteínas identificadas con el Software DB Parser	50
6.- Comparación de datos proteómicos de trofozoítos, quistes y ETQ	52
7.- Identificación de proteínas estadio-específicas con mayor abundancia relativa	57
8.- Clasificación funcional de las proteínas identificadas en trofozoítos, quistes y ETQ	60
9.- Validación de proteínas identificadas en el estudio proteómico por RT-PCR	62
10.- Identificación de RNAm de proteínas que forman la pared del quiste en ETQ	63
11.- Identificación de la proteína Jacob en ETQ	64
12.- Análisis comparativo con el proteoma publicado de quistes	66
13.- Análisis proteómico comparativo de la inducción de ETQ (1, 2, 4 y 6 h)	69
14.- Validación de resultados proteómicos por RT-PCR de los tiempos de inducción de las ETQ (1,2,4 y 6h)	75
14.1.- Proteínas asociadas a estrés oxidativo	77
14.2.- Proteínas asociadas a metabolismo	79
14.3.- Proteínas asociadas a la vía de síntesis de la quitina	81
14.4.- Determinación de la expresión del RNAm de proteínas estadio-específicas de quistes	83

VIII.- Discusión	85
IX.- Conclusiones	95
X.- Perspectivas	96
XI.- Referencias	97
XII.- Anexos	111
Anexo 1	111
Anexo 2	127

## Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1.- Daño tisular en amibiasis intestinal	18
Figura 2.- Daño tisular en amibiasis extraintestinal	19
Figura 3.- Trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
Figura 4.- Quiste de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
Figura 5.- Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	23
Figura 6.- Transformación de trofozoítos de <i>E. invadens</i> y <i>G. lamblia</i> a quistes <i>in vitro</i>	25
Figura 7.- Microscopia electrónica de Barrido mostrando el tamaño de las ETQ, la morfología redonda y la formación de la pared de quitina	26
Figura 8.- Esquema general del flujo de trabajo para el proyecto	45
Figura 9.- Obtención de ETQ a partir de trofozoítos inducidos con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46
Figura 10.- Muestras positivas para <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> o ambas	48
Figura 11.- Proceso de semipurificación de quistes utilizando gradientes de sacarosa	49
Figura 12.- Integridad de extractos de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes	50
Figura 13.- Comparación de proteínas identificadas en trofozoítos, ETQ y quistes	52
Figura 14.- Comparación de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes de <i>E. histolytica</i>	53
Figura 15.- Clasificación funcional de las proteínas identificadas en trofozoítos, ETQ y quistes de <i>E. histolytica</i>	60
Figura 16.- Comparación de las categorías funcionales de trofozoítos, ETQ y quistes de <i>E. histolytica</i>	61

Figura 17.- Expresión de los RNAm de 5 proteínas seleccionadas para su validación por RT-PCR	63
Figura 18.- Transcritos de RT-PCR que codifican para proteínas de la pared del quiste en trofozoítos y ETQ	64
Figura 19.- Identificación de la proteína Jacob en ETQ y quistes	65
Figura 20.- Comparación de proteínas entre los 4 tiempos de inducción de las ETQ	69
Figura 21.- Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h)	78
Figura 22.- Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h)	80
Figura 23.- Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h)	82
Figura 24.- Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h)	84



## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR de proteínas de la pared del quiste de <i>Entamoeba histolytica</i>	44
Tabla 2.- Clasificación molecular de las muestras humanas a la presencia de <i>Entamoeba</i>	47
Tabla 3.- Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo al Tipo de Parsimonia	51
Tabla 4. - Proteínas compartidas entre trofozoítos, ETQ y quistes identificadas por LC MS/MS	54
Tabla 5. - Proteínas únicas identificadas con los péptido-hits más altos en trofozoítos, ETQ y quistes	58
Tabla 6.- Proteínas identificadas como compartidas en ambos estudios	67
Tabla 7.- Posibles funciones biológicas y moleculares de proteínas hipotéticas identificadas con Argot 2	68
Tabla 8.- Las 15 proteínas más abundantes de cada tiempo	71
Tabla 9.- Oligonucleótidos utilizados en la validación de 19 genes en el estudio de Inducción de las ETQ	76

## I.- Resumen

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario causante de la amibiasis. En México la amibiasis se encuentra dentro de las 20 principales causas de enfermedad por lo que se considera un problema de salud pública. *E. histolytica* tiene 2 fases: el trofozoíto y el quiste. El estudio de la fase de quiste ha sido limitado debido a la dificultad para inducir enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*. En el 2010, nuestro grupo de trabajo publicó un método de inducción de Estructuras Tipo-Quiste (ETQ) que consiste en realizar un tratamiento a los trofozoítos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM más cationes metálicos durante 4h. Las ETQ presentan características morfológicas compartidas con los quistes naturales como: una pared tipo-quitina, forma esférica, multinucleación, cuerpos cromatoides, además de presentar resistencia a detergentes; sin embargo, la composición proteica de estas estructuras y su naturaleza real no ha sido estudiada.

En el presente trabajo, realizamos por primera vez un estudio proteómico comparativo de trofozoítos, quistes y ETQ mediante Espectrometría de masas (LC-MS-MS) con la intención de determinar la composición proteica de las ETQ y definir su relación con un quiste real.

El análisis proteómico permitió la identificación de 1029, 550 y 411 proteínas en trofozoítos, ETQ y quistes, respectivamente, de las cuales, 74 proteínas se identificaron compartidas entre las 3 muestras. Sorpresivamente, los quistes y las ETQ, solo compartieron 7 proteínas, mientras que las ETQ y los trofozoítos compartieron 385 proteínas. Además, se identificaron 539, 84 y 299 proteínas únicas en trofozoítos, ETQ y quistes, respectivamente. Las diferencias no sólo se encontraron en presencia y ausencia de proteínas, sino también en la abundancia de las mismas. El análisis funcional del proteoma de trofozoíto mostró a un estadio muy activo, con presencia de proteínas asociadas a metabolismo, traducción de proteínas y señalización celular. El proteoma de

ETQ mostró muchas proteínas asociadas a estrés oxidativo y el proteoma de quistes mostró que más de la mitad de sus proteínas fueron hipotéticas.

Por otra parte, el análisis de los cambios graduales en el proteoma de ETQ inducidas a 1, 2, 4 y 6 h, además de apoyar los resultados descritos arriba, mostró que proteínas de metabolismo, proteínas estadio-específicas de quiste y otras asociadas a la vía de síntesis de la quitina y al estrés oxidativo, fluctúan durante la transformación de trofozoítos a ETQ. Los resultados anteriores fueron validados con RT-PCR.

En general, los resultados demuestran que aunque las ETQ comparten algunas características morfológicas con los quistes como las mencionadas arriba además de una cubierta tipo-quitina que le confiere resistencia a detergentes, a nivel proteómico se parece mucho más a un trofozoíto con respuesta a estrés oxidativo que a un quiste maduro. Esto podría indicar que las ETQ son en realidad una nueva forma del parásito previamente no descrita, el pseudoquiste, el cual ha sido recientemente descrito en *Acanthamoeba castellani*, una amiba de vida libre. Los pseudoquistes, se forman rápidamente cuando los trofozoítos son estresados con soluciones oftálmicas o con glicerol y presentan una composición de la pared parcialmente similar a la de los quistes naturales, careciendo de algunas de sus proteínas, como nosotros encontramos aquí en las ETQ.

Estudios futuros podrían permitir aclarar la verdadera naturaleza de las ETQ y su importancia en el ciclo de vida o sobrevivencia de *E. histolytica*.

## Abstract

*Entamoeba histolytica* is the protozoan parasite that causes amebiasis. Amebiasis in Mexico is among the 20 leading causes of disease which is considered a public health problem. *E. histolytica* has 2 phases: the trophozoite and the cyst. The study of cyst stage has been limited due to the difficulty to induce encystment *in vitro* of *E. histolytica*. In 2010, our working group published a method to induction cyst-like structures (CLS) which involves treating trophozoites with 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> more metal cations for 4 h. The CLS shared morphological characteristics with natural cysts as: type-chitin wall, spherical shape, multinucleation, chromatoid bodies, resistance to detergents; however, the protein composition of these structures and their real nature has not been studied.

In this study we performed for first time a comparative proteomic study of trophozoites, cysts and CLS by mass spectrometry (LC-MS-MS) in order to determine the protein composition of CLS and define their relationship with a real cyst.

Proteomic analysis allowed the identification of 1029, 550 and 411 proteins in trophozoites, CLS and cysts, respectively, of which, 74 proteins among were identified shared between the three samples. Surprisingly, cysts and CLS only shared 7 proteins while CLS and trophozoites shared 385 proteins. Moreover, 539, 84 and 299 unique proteins were identified in trophozoites, CLS and cysts, respectively. Differences were found both in the presence and absence of proteins, but also the abundance of the same. The proteome functional analysis showed trophozoite as a stage very active, with the presence of proteins associated with signal transduction, cell signaling and translation. CLS proteome showed increased in many proteins associated to oxidative stress and cyst proteome showed that more than half of their proteins were hypothetical.

Moreover, analysis of gradual changes in the proteome of CLS induced 1, 2, 4 and 6 h, in addition to supporting the results described above, showed that metabolism proteins, specific-stage proteins of cyst and others proteins associated with the synthesis pathway chitin and oxidative stress, fluctuate during the transformation of trophozoites to CLS. The above results were validated by RT-PCR.

Overall, the results show that although CLS shared some morphological characteristics with cysts such as those mentioned above also of like-chitin wall, that confers resistance to detergents, a proteomic level is more closer to trophozoite with response to oxidative stress than a mature cyst. This could indicate that the CLS are actually a new form of the parasite previously undescribed, the pseudocyst, which has recently been described in *Acanthamoeba castellanii*, an amoeba-free life. The pseudocysts, quickly they formed when trophozoites are stressed with ophthalmic solutions or glycerol and the pseudocysts have a partial wall composition similar to that of natural cysts, lacking some of its proteins, as we find in CLS.

Future studies could allow clarifying the true nature of CLS and its importance in the life cycle or survival of *E. histolytica*.

## Abreviaturas

*A. castellani*= *Acanthamoeba castellani*

AHA= Absceso Hepático Amibiano

AKS= Alkil sulfatasa

ARF= Factor de Ribosilación dependiente de ATP

*E. dispar*= *Entamoeba dispar*

*E. invadens* = *Entamoeba invadens*

*E. histolytica*= *Entamoeba histolytica*

ETQ= Estructuras Tipo Quiste

FGK=Fosfoglicerato cinasa

F1-6BA= Fructosa 1,6-Bisfosfato aldolasa

*G. lamblia*= *Giardia lamblia*

GADPH = Gliceraldehido 3 fosfato-deshidrogenasa

Gal/Gal Nac=Fragmento de LC3 de la lectina Gal/Gal Nac

G6Pi= Glucosamina 6 fosfato isomerasa

G6PNA= Glucosamina 6-fosfato N-acetil Transferasa

*G. lamblia*= *Giardia lamblia*

HP1= Proteína hipotética 1

HP2= Proteína hipotética 2

HP3= Proteína hipotética 3

HP4= Proteína hipotética 4

HSP70= Proteína de choque térmico de 70kD

HSP90= Proteína de choque térmico de 90kD

LC-MS/MS= cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas- masas

NFT= Factor de transcripción nuclear

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

PMS1= Proteína de reparación mismatch

PRX= Peroxiredoxina

RT-PCR= Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa

UDPNAGP= N- acetil glucosamina pirofosforilasa

## II.- Introducción

### 1.-Amibiasis

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud como la infección causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas (WHO, 1986). La enfermedad presenta una distribución mundial, aunque afecta principalmente a países en vías de desarrollo y es considerada la segunda causa de muerte debida a parásitos intestinales (Stanley SL Jr., 2003; Ali IK, 2015).

### 2.-Antecedentes históricos de la amibiasis

En la literatura existe mucha evidencia de observaciones asociadas a posibles casos de amibiasis mucho antes de que se definiera como enfermedad. Desde tiempos de Hipócrates (460-377 AC), él reconoció pacientes con disentería y fiebre, junto con Celso lo denominó “Flujo de vientre”. Más adelante, tanto el antiguo testamento como la medicina interna clásica de Huang Ti (140-87 AC) denominaron a éste padecimiento “la disentería”. (Tanyukselm y cols., 2003). El término disentería viene del griego dys: alteración y enteron: intestino. A mediados del siglo XIX en Lambal, Praga se identificó la primera posible asociación de un parásito como causa de la disentería en un niño, en cuya materia fecal encontró a un protozoo que presentaba seudópodos. Sin embargo, fue hasta 1875 que el médico ruso Feder Lösch, encontró amibas en las heces de un agricultor que presentaba un cuadro de disentería crónica, aunque en un principio no consideró que éstas fueron la causa de la disentería si realizó una descripción microscópica de este microorganismo, (Reyes L y cols., 2002; Tanyukselm M y cols., 2003).



Años más tarde, Koch y Kartulis, llevaron a cabo estudios simultáneos, uno realizó un estudio en Egipto, donde en casos de disentería encontró amibas en úlceras de la submucosa intestinal y demostró la presencia del parásito en lesiones hepáticas, el otro realizó en el Cairo 150 autopsias de pacientes que fallecieron por disentería y observó presencia de úlceras colónicas, como las descritas por Lösch y Koch. Posteriormente, Councilman y Lafleur demostraron mediante pruebas clínicas y patológicas que las amibas eran el agente causal de un tipo de disentería y de Absceso Hepático (AH) y también publicaron una monografía acerca de la patología de la amibiasis en la que utilizaron los términos disentería amebiana y absceso hepático amebiano por primera vez. En el año de 1893, Quincke y Roos, describieron la forma de quiste del parásito (Fonte L y cols., 2000; Reyes L y cols., 2002; Pinilla E y cols., 2008).

Desde las primeras observaciones de Lösch en el siglo XIX, hasta mediados del siglo XX, la amiba se ha nombrado de diversas formas, de acuerdo a características morfológicas y fisiológicas, no obstante, en 1903 el zoólogo alemán Schaudinn le dio el nombre de *Entamoeba histolytica*, debido a que la amiba causa daño y lisis de tejidos (Ximénez y cols., 2007; Pinilla y cols., 2008). En 1925 el parasitólogo francés Emilie Brumpt, determinó que existían dos tipos de amibas; una comensal que podía provocar una infección asintomática en algunas personas y otra amiba que producía signos y síntomas característicos de la enfermedad, como la amibiasis intestinal y extraintestinal. Brumpt llegó a estas conclusiones basado en observaciones clínicas y epidemiológicas y estudios experimentales en gatos, desafortunadamente esta hipótesis fue rechazada inicialmente por la comunidad científica internacional en esa época (Marín E y cols., 2000; Reyes L y cols., 2002, Ximénez y cols., 2007). El ciclo de vida de *E. histolytica* fue descrito por 1928 por el zoólogo inglés Clifford Dobell.

Después de la segunda mitad del siglo XXI, se comenzó a acumular evidencia experimental que apoyaba la hipótesis de Brumpt. En 1961, Louis Diamond desarrolló el medio de cultivo axénico para crecer *in vitro* a *E. histolytica* lo que permitió realizar estudios *in vivo*

e *in vitro* (Diamond L y cols., 1961). En 1968, Reeves y Bischoff diferenciaron las especies patógena y no patógena de *Entamoeba*, mediante perfiles isoenzimáticos; diez años después Sargeant y Williams, lograron diferenciar por medio de la movilidad electroforética de ciertas enzimas; cepas de *E. histolytica*, que provenían de pacientes con manifestaciones clínicas y de portadores asintomáticos (Reeves RE y cols., 1968; Sargeant PG y cols., 1978).

Por otro lado, Petri en 1987, demostró que la proteína con mayor antigenicidad en sueros inmunes era la Lectina Gal/Gal. Después de diversos estudios utilizando anticuerpos monoclonales se demostró que existía diferencia entre los antígenos de superficie entre las dos especies (Haque R y cols., 1993; Tannich E y cols., 1989; Petri WA y cols., 1990).

Con toda ésta evidencia, Clark y Diamond en 1993, asociaron todos estos hallazgos, desde las observaciones que diferenciaban a las amibas obtenidas de pacientes con sintomatología de las amibas de personas sanas por su capacidad de aglutinación con ciertas lectinas, las diferencias en los patrones isoenzimáticos, las diferencias antigénicas y las diferencias en el ADN, todo esto con base a evidencia bioquímica, inmunológica y genética (Diamond LS y Clark CG, 1993). Por consiguiente, en 1997 la Organización Mundial de la Salud en su reunión en la Ciudad de México un comité de expertos aceptó la propuesta de la existencia de dos especies de *Entamoeba* morfológicamente indistinguibles: *Entamoeba histolytica*, la patógena y *Entamoeba dispar*, la comensal (Ayeh-Kumi y cols., 2001; Ximénez y cols., 2007; Pinilla y cols., 2008).

A partir de la separación de *Entamoeba* en dos especies indistinguibles bajo observación al microscopio se ha establecido que si se observan quistes de *Entamoeba* en un análisis coproparasitológico se debe reportar como *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y se recomendó el uso de medicamento sólo en caso de presentarse manifestaciones clínicas o en caso de poblaciones en riesgo como: enfermos de VIH, homosexuales,

embarazadas y áreas endémicas (Reporte de Who/Paho/Unesco, 1997; Pinilla E y cols., 2008).

Por otra parte, se han desarrollado diversas técnicas de diagnóstico para detectar antígenos del parásito en heces o en suero de pacientes. También se comenzaron a emplear técnicas de diferenciación molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En la literatura podemos encontrar un considerable número de estudios en muchos países utilizando ésta técnica para identificar pacientes positivos para *E. histolytica* con resultados efectivos, no obstante el costo y el equipo tecnológico y humano especializado para llevar a cabo esta técnica son muy elevados comparados con un ensayo de ELISA o coagulación. Aunque el diagnóstico de laboratorio sigue siendo por excelencia la observación al microscopio de quistes en muestras de heces de pacientes, aún se buscan métodos más rápidos económicos y precisos para el diagnóstico adecuado de *E. histolytica*.

### **3.- Epidemiología**

Desde que la OMS aceptó la existencia de dos especies de amibas indistinguibles morfológicamente, *E. histolytica* y *E. dispar*, la epidemiología del parásito se vio drásticamente cambiada, debido a que se estima que de los 480 millones de individuos infectados a nivel mundial con la amiba, sólo el 10% se debe a la infección por *E. histolytica* y de ese 10% sólo el 1% desarrolla absceso hepático amebiano (AHA) (Ali IK y cols., 2008). Las técnicas moleculares han permitido conocer y reafirmar estas observaciones. Aunque la amibiasis tiene una distribución mundial, países en desarrollo son los que presentan mayor número de casos, particularmente Tailandia, Japón, México Colombia, África y Bangladesh (Ximénez C y cols, 2009). Junto con estas observaciones también se ha sumado la identificación una tercera especie de amiba que es morfológicamente igual, *Entamoeba moshkovskii*, ésta especie ya se ha asociado a infección en países asiáticos (Ali IK, 2015). El estudio global de factores de riesgo, daños y

brote de enfermedades del 2010 estimó 55,500 muertes por amibiasis a nivel mundial (Lozano R y cols., 2010).

En México la epidemiología de la amibiasis se ha realizado utilizando ensayos de ELISA y PCR. En 1994 se realizó un estudio a nivel nacional para determinar la seroprevalencia de la amiba. Los resultados mostraron que el 8.41% de la población (casi 70,000 muestras) resultó positivo por ensayo de hemaglutinación indirecto (Caballero Salcedo y cols., 1994).

También se han realizado estudios utilizando PCR. En 1993 se reportó un estudio de 201 individuos de los cuales el 12% fue positiva por observación al microscopio, es decir 25 muestras, de las cuales 24 fueron positivas a *E. histolytica* por PCR. Por otro lado, de las 176 muestras negativas al microscopio, 3 resultaron positivas por PCR. Las 25 muestras fueron divididas en 3 grupos de acuerdo a los resultados, el 51.85% tuvo presencia de ambas amibas, el 33.3% sólo estaba infectado con *E. histolytica*, mientras que el 3.7% sólo fue positivo para *E. dispar* (Acuña-Soto R y cols., 1993). En el 2000 se realizó un estudio de prevalencia de *E. histolytica* en la comunidad de Coahuixtla en el estado de Morelos. En el estudio 19.4% de la población analizada fue positiva para *E. histolytica*/*E. dispar*. De este porcentaje el 43.7% fueron positivas para *E. histolytica*, 12.5% positivas para *E. dispar* y 28% fueron co-infecciones (Ramos F y cols., 2000).

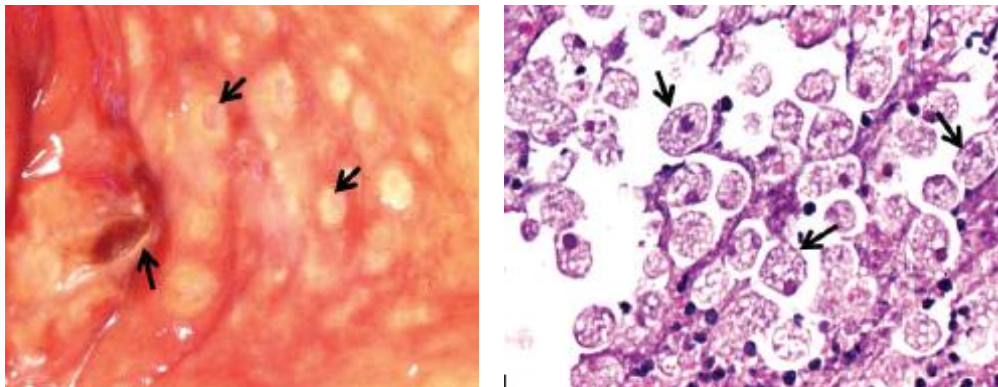
Otro estudio realizado en 2005, también en el estado de Morelos, mostró que *E. histolytica* fue identificada en el 11.4% de la población, *E. dispar* se identificó en el 7.2% y sólo el 2.4% resultaron muestras con ambas (Ramos F y cols., 2005). Aunque se ha observado que la amibiasis ha ido a la baja a nivel nacional, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica mostró que la amibiasis se encuentra dentro de las 10 principales causas de morbilidad y que entre el periodo de 2003-2008 pasó del quinto al sexto lugar en incidencia. Los estados con mayor incidencia fueron Tabasco, Oaxaca y Guerrero, mientras que los estados con menor incidencia fueron Nuevo León, Sonora y Baja California Norte. Además, dentro de las 20 principales causas de mortalidad las

enfermedades infecciosas intestinales ocupan el 19° y 18° lugar en estudios realizados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en su reporte de 2014 y el Sistema Nacional de información en Salud (SINAIS) en la base de defunciones de 1979-2012, respectivamente. Por lo tanto, la amibiasis sigue siendo un problema de salud pública y los estudios epidemiológicos contribuyen a conocer la distribución del parásito.

#### 4.- Tipos de amibiasis

##### 4.-1.- Amibiasis intestinal

La historia natural de la amibiasis intestinal invasiva es un evento de infección aguda, que está caracterizado por la presencia de diarrea, la cual se puede presentar días o semanas después de la exposición al parásito (entre 4 ó 5 semanas). La amibiasis intestinal es una infección aguda caracterizada por los siguientes síntomas: dolor abdominal, presencia de diarrea con moco o sangre y un síndrome disentérico. No es muy frecuente pero también puede producirse fiebre. A nivel macroscópico el daño al intestino es observado en forma de úlceras y a nivel microscópico se pueden observar la presencia de trofozoítos invadiendo el tejido (Figura 1) (Hira PR y cols., 2001; Stanley Jr., 2003; Ximénez C cols., 2011).

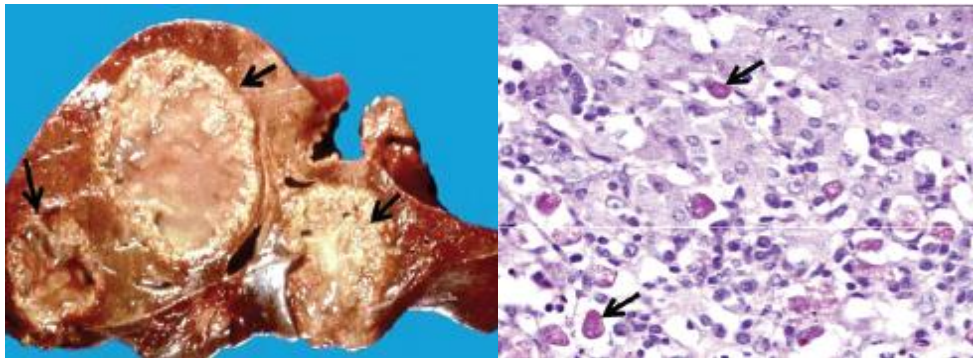


**Figura 1.-** Daño tisular en amibiasis intestinal. Del lado izquierdo se puede observar las úlceras producidas por el parásito. Del lado derecho se observan los trofozoítos invadiendo el tejido intestinal (Imágenes tomadas y modificadas de Ximénez C y cols., 2011).

#### 4.2.- Amibiasis extraintestinal

La amibiasis extraintestinal es poco frecuente comparado con la prevalencia de la amibiasis intestinal. La forma más común de invasión extraintestinal es la que se produce en el hígado, aunque también se han presentado casos en los pulmones y cerebro. Es una enfermedad que puede afectar a individuos de todas las edades. Los hombres están más propensos a desarrollar absceso hepático amebiano. Los síntomas más comunes de AHA son fiebre de 38° C, anorexia y dolor abdominal, escalofríos, diaforesis (sudoración excesiva), náuseas y raramente diarrea (Pritt BS y Clark CG, 2008; Ximénez y cols, 2010; Ximénez C y cols, 2011).

El diagnóstico de la amibiasis extraintestinal mediante el ultrasonido es la técnica estándar para el diagnóstico de AHA, por el costo que es mucho menos que la tomografía computarizada de contraste. Frecuentemente se observan múltiples abscesos que se observan como necrosis del tejido (Figura 2) (Ximénez C y cols, 2011).



**Figura 2.-** Daño tisular en amibiasis extraintestinal. Del lado izquierdo se puede observar múltiples abscesos hepáticos u daño tisular. Del lado derecho se observan los trofozoítos, hepatocitos y células inflamatorias (Imágenes tomadas y modificadas de Ximénez C y cols., 2011).

## 5.- Clasificación taxonómica de *E. histolytica*

**Dominio** Eukaryota

**Reino** Protozoa

**Subreino** Sarcomastigota

**Filo** Amebozoa

**Clase** Lobosea

**Orden** Amoebida

**Familia** Entamoebidae

**Género** *Entamoeba*

**Especie** *E. histolytica* (Ximénez C y cols., 2007)

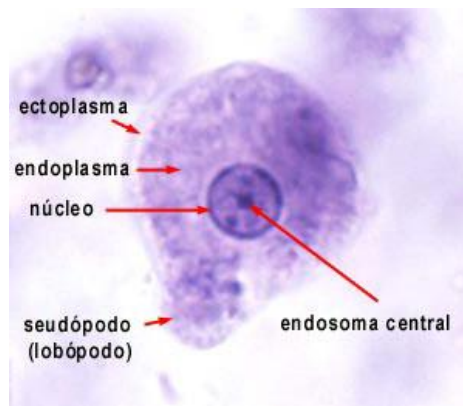
## 6.- Características de las fases de *E. histolytica*: Trofozoíto y quiste

### 6.1.- Trofozoíto

El trofozoíto es la fase móvil, asociada a la sintomatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad, es pleiomórfico, se multiplica por fisión binaria y es muy sensible a los jugos gástricos y a los agentes externos. Coloniza el intestino y su hábitat abarca la luz y la pared del colon, particularmente el ciego y el recto (Pumarola, 1991), aunque también puede atravesar la mucosa intestinal e invadir otros órganos como el hígado. Su tamaño oscila entre los 10 y 60  $\mu\text{m}$  (Figura 3).

El trofozoíto se divide en dos regiones distinguibles: endoplasma y ectoplasma. La locomoción del trofozoíto se debe a su ectoplasma (seudópodo), donde se encuentran proteínas de actina y miosina que le confieren movilidad (Becerril y Romero, 2004). El trofozoíto se nutre por fagocitosis, a partir de los tejidos disueltos.

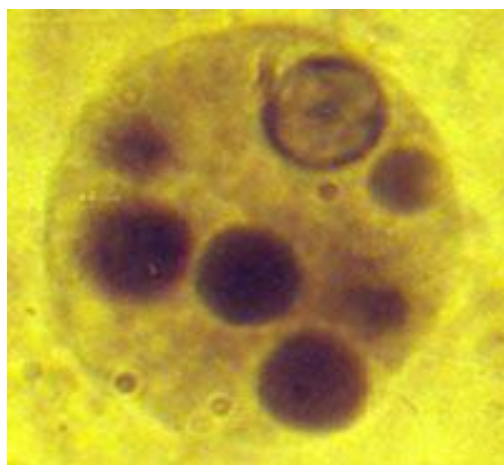




**Figura 3.-** Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* tomado de la Universidad S.J.Upton, Kansas

## 6.2.- Quiste

El quiste es la fase infectiva y de resistencia del parásito, es una fase no móvil. El quiste tiene una forma redonda y mide entre 10-15  $\mu\text{m}$  de diámetro, tiene cuerpos cromatoides, 4 núcleos, característica de un quiste maduro, además de una pared de quitina (polímeros de N-acetil-glucosamina). La resistencia que tiene el quiste es gracias a ésta pared, que lo protege fuera del hospedero y que además le permite al momento de infectar atravesar el tracto digestivo sin problemas para desenquistarse en el íleon (Figura 4). Los quistes pueden sobrevivir durante semanas en el suelo o en el agua, que son las principales fuentes de infección (Ximénez y cols., 2007; Aguilar-Díaz H y cols., 2011).

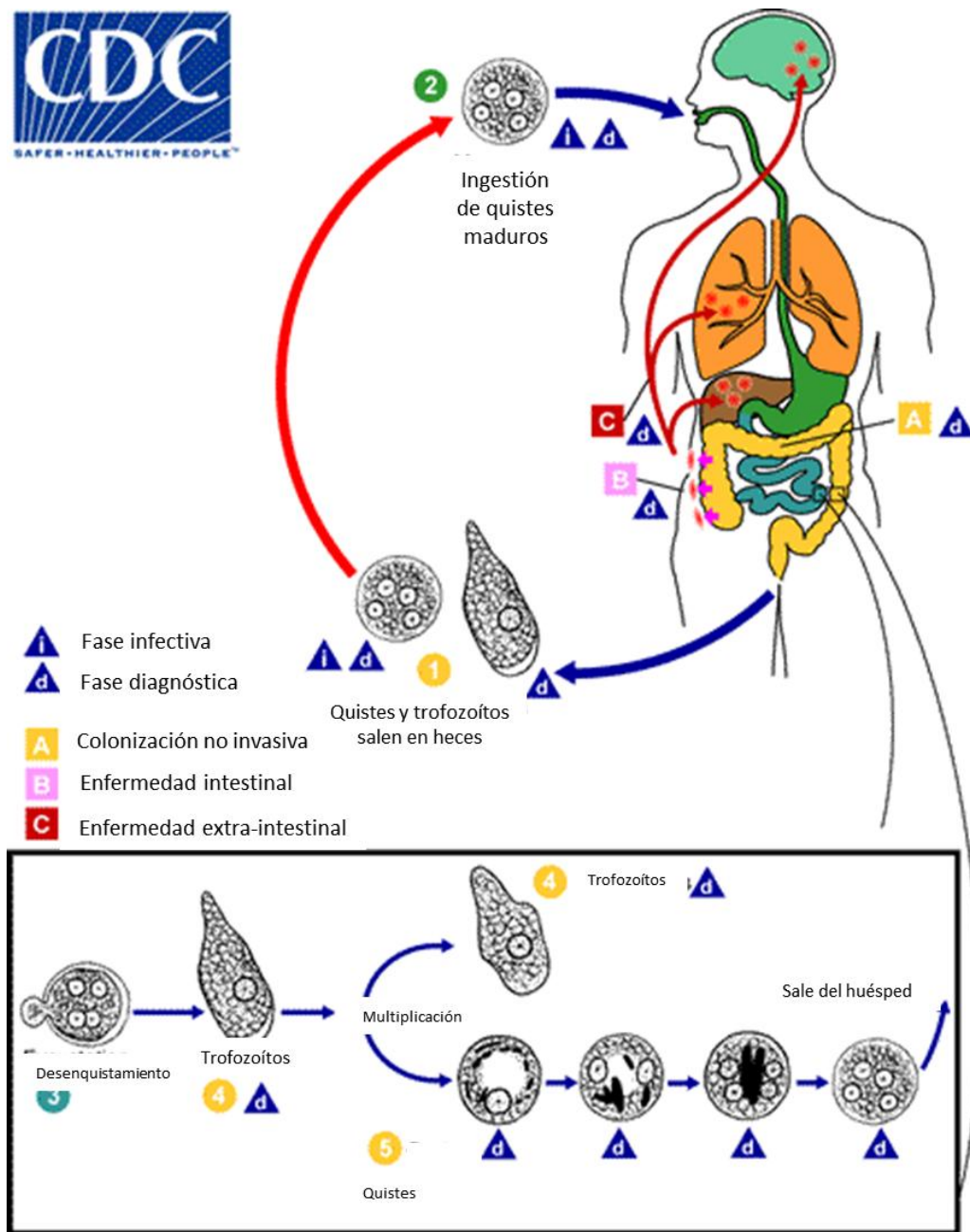


**Figura 4.-** Quiste de *Entamoeba histolytica*. Se observan los núcleos Imagen (donada por: Biól. J. Tay Zavala, Facultad de Medicina, UNAM y tomada de <http://www.facmed.unam.mx/>)

## **7.- Ciclo de vida de *E. histolytica***

El ciclo de vida de *E. histolytica* tiene dos estadios: el trofozoíto y el quiste. Los quistes son ingeridos por el humano en alimentos y agua contaminada. Una vez dentro del organismo pasan a través del tracto digestivo y en el estómago se considera que debido a la acción de proteasas se adelgaza la capa del quiste y comienza a degradarse, una vez que los quistes alcanzan la porción del íleon los quistes desenquistan, liberando 4 amébulas que rápidamente se dividen y en total se forman 8, éstas crecen lo que da lugar a que de cada quiste salen 8 trofozoítos (Figura 5).

Los trofozoítos pueden permanecer colonizando de manera comensal el intestino; sin embargo, por razones que aún se desconocen probablemente asociadas al parásito y al hospedero, cuando logran atravesar la pared intestinal se desplazan al hígado donde producen la complicación extraintestinal más frecuente: el absceso hepático amebiano. Los trofozoítos que continúan colonizando el intestino son desplazados al colon descendente donde sufren el proceso de enquistamiento por mecanismos y factores aún no conocidos (Figura 3). Finalmente, los quistes son expulsados en las heces para continuar con su ciclo vital, aunque también se ha observado que los trofozoítos pueden ser expulsados en las heces (Ximénez C y cols. 2011).



**Figura 5.-** Ciclo biológico de *E. histolytica*. Modificado de <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>

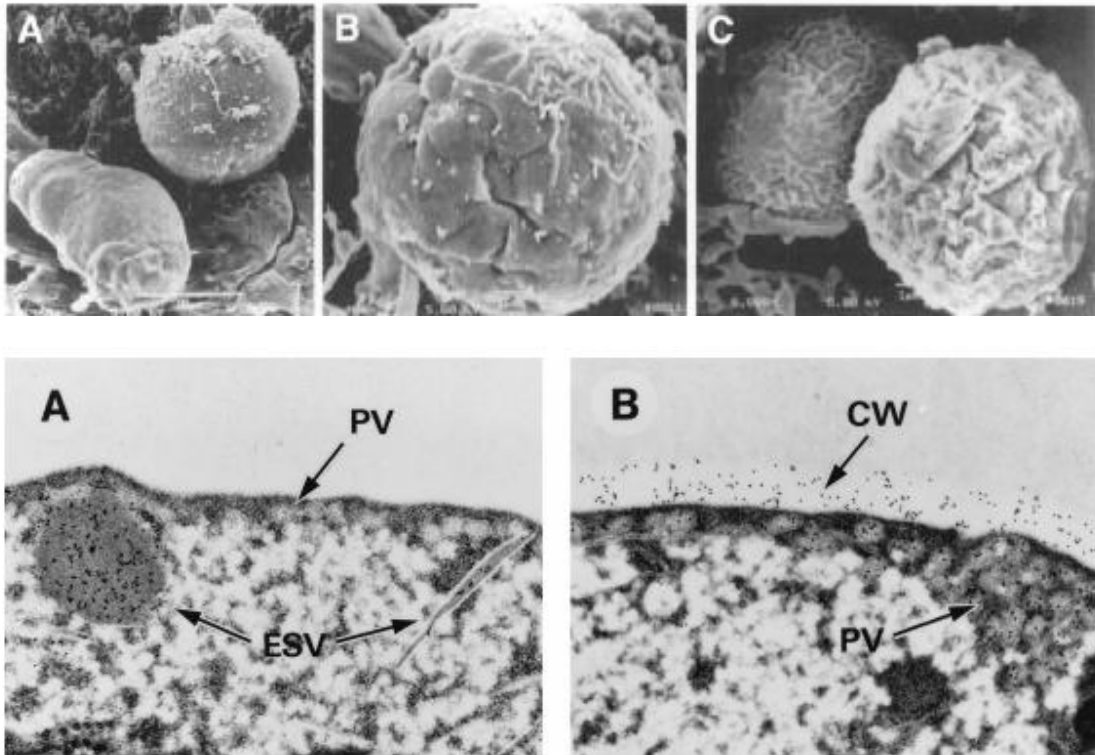
## 8.- Estudio de la diferenciación (Enquistamiento)

### 8.1.- En parásitos protozoarios intestinales

Aunque sabemos que el quiste es imprescindible para la consecución del ciclo de vida del parásito, se conoce muy poco acerca de los estímulos asociados al proceso de diferenciación y los cambios en el perfil proteico durante el mismo, particularmente en *E. histolytica*. Esto se debe en parte, a la ausencia de un sistema de enquistamiento *in vitro* reproducible y de alta eficiencia para su estudio.

En la literatura se pueden encontrar publicaciones donde se han evaluado diversos estímulos para enquistar otros parásitos protozoarios, como *Entamoeba invadens*, parásito de reptiles y *Giardia lamblia*, parásito de humanos (revisado en Aguilar-Díaz H y cols., 2011). En el caso de *E. invadens*, se han obtenido quistes maduros *in vitro*, mediante la exposición de cultivos de trofozoítos a la privación de glucosa, choque osmótico o su combinación (Vázquez L y cols., 1984; Bailey GB y Rengypian S, 1980).

Por otro lado, en el caso de *Giardia lamblia*, se ha logrado obtener quistes *in vitro* por incubación de los trofozoítos con bilis humana, porcina y bovina, así como con la privación de colesterol y nutrientes ( Gillen FD y cols., 1987; Luján HD y cols., 1997). Estos protocolos de inducción requieren de 24 hasta 72 h para la formación de las estructuras, además estos estudios han permitido realizar decenas de proyectos de investigación ya que se facilita la obtención de los organismos (Figura 6).



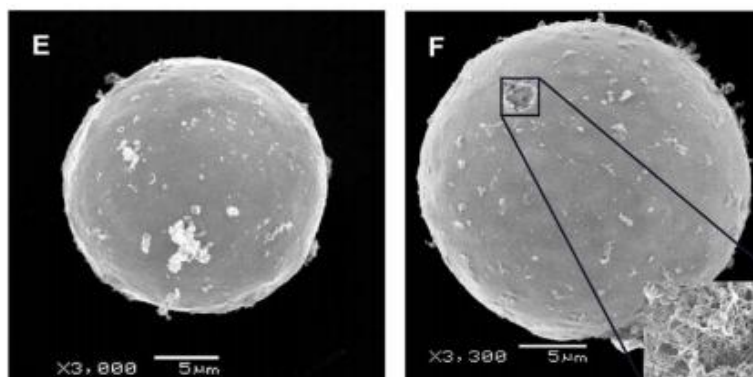
**Figura 6.-** Transformación de trofozoítos de *E. invadens* y *G. lamblia* a quistes *in vitro*. Arriba, Se puede observar en A: Un trofozoíto y un quiste en transformación de *E. invadens*. En B y C: quistes formados. Abajo, En A: Se observa una imagen ultra estructural de trofozoítos de *G. lamblia* después de 24 horas de tratamiento se observan vesículas específicas de enquistamiento (ESV) y vacuolas periféricas (PV). En B: Se observa la ultra estructura de un quiste maduro de *G. lamblia*, se aprecian proteínas formadoras de la pared del quiste (CW) y también vacuolas periféricas (PV) (Tomado de Eicheiger D, 1997).

## 8.2 Estudio de la diferenciación en *E. histolytica*

En el caso de *E. histolytica*, no se han obtenido quistes *in vitro*, pero si la obtención de Estructuras Tipo Quiste (ETQ), estructuras que presentan características morfológicas parecidas a quistes pero sin demostrarse su infectividad. Estos estudios han consistido en la incubación de trofozoítos con una mezcla de iones  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  y también incubación con enterobacterias y una alta tensión de  $CO_2$  en presencia de histamina (Campos-Góngora E y cols., 2000; Said-Fernández S y cols., 2001; Barrón-González MP y

cols., 2008). Todas las ETQ obtenidas en estos estudios presentaron resistencia a detergentes y presencia de material tipo quitina.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo logró inducir la diferenciación de cultivos de trofozoítos de la cepa HM1:IMSS mediante tratamiento durante 4 h, con peróxido de hidrógeno 4 mM y en combinación de cationes metálicos la obtención de células redondas con reducción de tamaño que son resistentes a detergentes que presentan algunas características de quistes inmaduros, como la presencia de cuerpos cromatoides, 2 a 3 núcleos y una pared de quitina, por lo que se denominaron Estructuras Tipo Quiste (ETQ), (Figura 7). Además, una pequeña proporción de las ETQ (menos del 1%) presentaron tetranucleación, sugiriendo que el tratamiento activa el proceso de diferenciación de *E. histolytica* de trofozoíto hacia el quiste. Ya que la mayoría de las ETQ obtenidas son bi- y tri-nucleadas, tienen cuerpos cromatoides, ambas características de quistes inmaduros, se ha propuesto que las ETQ podrían ser un estadio intermedio de diferenciación de trofozoíto a quiste (Aguilar-Díaz H y cols., 2010). En un estudio posterior, se bloqueó la obtención de ETQ a través de la inhibición con RNA de interferencia de la enzima glucosamina 6-fosfato isomerasa, enzima limitante en la vía de síntesis de la quitina (Aguilar-Díaz H y cols., 2013). A diferencia de los protocolos para obtener quistes *in vitro* en los protozoarios mencionados arriba, en los estudios de obtención de ETQ para *E. histolytica* estos protocolos de obtención requieren sólo horas.



**Figura 7.-** Microscopia electrónica de Barrido mostrando el tamaño de las ETQ, la morfología redonda y la formación de la pared de quitina (Tomado y modificado de Aguilar-Días H y cols., 2010)

Debido a que no se ha comprobado la infectividad de éstas ETQ, ya que no existe un modelo animal reproducible para los ensayos de infección, por lo que, ha sido difícil conocer la naturaleza proteica de las ETQ. Sin embargo, en otros organismos han surgido recientes estudios sobre la diferenciación *in vitro*. Es el caso de *Acanthamoeba castellanii*, una amiba de vida libre que puede ser un parásito oportunista y causar keratitis y encefalitis en humanos. En este parásito se ha observado la formación *in vitro* de ETQ o pseudoquistes a partir de trofozoítos tratados con compuestos orgánicos como metanol o acetona (Kliescikova J y cols. 2011).

En estudios posteriores, los pseudoquistes se han considerado como un posible mecanismo de protección bajo ciertas condiciones de estrés. Además, ha surgido experiencia experimental de que estas estructuras se pueden formar en soluciones de lavado para lentes de contacto (Imayasu M y cols., 2013; Lloyd D, 2014).

Notablemente, las ETQ que se han obtenido comparten algunas características con los pseudoquistes para su obtención, como lo es el tiempo corto de obtención, ambos se forman en lapsos de tiempo de 2-4 h, además ambos se producen bajo condiciones de estrés y también que al parecer ambas pueden regresar a trofozoítos en medio de cultivo.

En el caso de *E. histolytica* aún está en curso los estudios de reversión. También ambas estructuras carecen de ciertas proteínas presentes en las paredes de los quistes. Todo ello sugiere que las ETQ de *E. histolytica* podrían ser en realidad pseudoquistes y no un estadio intermedio de diferenciación a quiste, lo que sería un hallazgo muy importante en la biología de este parásito. Hasta donde la literatura nos ha permitido conocer, no se han descrito formación de pseudoquistes en *E. histolytica*.



## 9.- Técnicas ómicas y tecnologías nuevas para el estudio de los parásitos protozoarios

La secuenciación de genomas, así como el desarrollo de tecnologías ómicas han representado una oportunidad para estudiar diferentes organismos a nivel genómico y proteómico. Los primeros estudios se enfocaron en análisis transcriptómicos, que si bien ofrecieron mucha información en un solo experimento, existía la duda de que si todos los cambios de expresión en el RNAm (sub-expresados y sobre-expresados) eran traducidos a proteína. Por lo que, esta técnica presentó una limitante ya que los resultados obtenidos no podían determinarse como contundentes (Wang X y Zhang B, 2014).

Para nuestra fortuna se desarrollaron técnicas proteómicas que resolvieron la limitante mencionada arriba. En los últimos 20 años, estas técnicas se han optimizado y mejorado, siendo la electroforesis en geles bidimensionales (2-DE) la técnica más empleada (O'Farrell PH, 1975). Además, se han acoplado a cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) para la identificación de las proteínas. También, se han planteado técnicas de proteómica cuantitativa que han permitido determinar la abundancia total de las proteínas identificadas. Todos estos avances permiten en la actualidad, obtener numerosa información similar a la que se obtiene en un microarreglo (Haider S y Pal R, 2013; Nie L y Wu G, 2007).

Sin embargo, esta información también representa un reto: interpretar correctamente los datos obtenidos para explicar adecuadamente los resultados. Es por eso, que tanto la transcriptómica como la proteómica se conjuntan para validar los resultados. Además, se apoyan en otras técnicas más convencionales o clásicas.

Los estudios proteómicos comenzaron a realizarse para determinar perfiles de proteína de estadios de organismos. Después comenzaron a realizarse comparaciones entre una condición control y una condición experimental (respuesta a un compuesto, respuesta a

un tipo de estrés, etc.). Recientemente, su uso se ha extendido en todas las áreas de estudio.

Los estudios proteómicos en parásitos se han enfocado principalmente en: Identificar candidatos para vacunas, conocer la relación huésped-parásito, conocer la biología del parásito, así como identificar proteínas importantes durante las diferentes fases del ciclo de vida del parásito.

## **10.- Estudios transcriptómicos y proteómicos en *E. histolytica***

### **10.1.- Estudios transcriptómicos**

Con el surgimiento de las tecnologías ómicas, se ha generado una rápida obtención de datos de la expresión de genes en diversas condiciones. En el caso de la amiba, la secuenciación del genoma permitió los primeros estudios transcriptómicos usando microarreglos (Loftus B, 2005). Aproximadamente, se han analizado 2,000 genes. En estos estudios, se han comparado diferentes cepas y especies de *Entamoeba* y se ha comparado la expresión de genes bajo condiciones de cultivo y bajo diferentes condiciones de estrés.

Se ha encontrado que el 17% de los genes expresados por trofozoítos en cultivo se sobre expresan bajo condiciones de estrés y que las diferencias en la expresión de genes asociados a respuesta a estrés y patogenicidad dependen de la especie de amiba o cepa (Mac Farlane RC y cols., 2005, 2006). Sin embargo, sólo un estudio del estadio de quiste se ha realizado (Ehrenkauf G y cols., 2007), en el cual se comparó el transcriptoma de los quistes con los de trofozoítos. En éste estudio, se identificaron 672 genes enriquecidos en quistes que pertenecen a proteinasas de cisteína y proteínas cinasas transmembranales, mientras que en trofozoítos se identificaron 767 genes que pertenecen a proteínas asociados a invasión y a transducción de señales (Ehrenkauf G y cols., 2007).

## 10.2.- Estudios proteómicos

Debido a que no ha sido posible reproducir el ciclo de vida *in vitro*, particularmente la obtención de quistes, prácticamente todo los estudios proteómicos reportados se ha realizado en el estadio de trofozoíto. Por lo que, la biología del trofozoíto se conoce más que la del quiste.

Diversos estudios proteómicos se han realizado para determinar la expresión de proteínas en diferentes organelos celulares y bajo diferentes condiciones. Los primeros estudios de proteómica en el parásito se realizaron utilizando la técnica de geles bidimensionales donde se analizaron extractos solubles e insolubles y se detectaron entre 400 y 1,500 puntos (spots), de los cuales 100 puntos se identificaron por espectrometría de masas (MS), obteniendo 63 proteínas agrupadas en 7 categorías (Glicólisis, metabolismo de RNA/DNA, sistema proteasoma, tráfico vesicular, citoesqueleto, superficie y transducción de señales (Leitsch D y cols., 2005; Tolstrup J y cols., 2007). También se han identificado 10 proteínas propias y características de trofozoítos, principalmente proteínas de metabolismo (Leitsch D y cols., 2006).

En otros estudios proteómicos se han analizado los urópodos de trofozoítos de *E. histolytica*, donde se han identificaron proteasas de cisteína y una proteasa de serina específicas cuya función no es clara, además algunas proteínas de superficie identificadas que podrían ser reconocidas por el sistema inmune durante la infección (Marquay-Markiewicz J, 2011).

Otros estudios proteómicos han sido hechos para analizar los fagosomas y el proceso de fagocitosis de la amiba. Uno de estos estudios encontró proteínas de unión a GTP, que son importantes para la maduración del fagosoma (Okada M y cols., 2005). Otro estudio, identificó proteínas residentes en el Retículo endoplásmico, como la calreticulina, miosina y proteínas accesorias de actina (Marion S y cols., 2006).

Diversos estudios han identificado proteínas de la amiba asociadas a señalización, endocitosis, rearrreglos del citoesqueleto, tráfico vesicular y procesos de reconocimiento de superficie, así como también, se ha identificado un miembro transmembranal de la familia de las cinasas (PATMK), identificada en proteínas fagosomales tempranas (Okada M y cols., 2005, 2006; Boettner DR y cols. 2008; Buss SN y cols., 2010). La variedad en los resultados obtenidos en estos estudios proteómicos del fagosoma y fagocitosis pueden ser debido al tipo de técnica proteómica empleada, a las obtención de la muestra y hasta a los parámetros para identificar a las proteínas.

Además, ha determinado el proteoma de la superficie del trofozoíto el cual es importante, porque las moléculas de superficie participan en las interacciones parásito-hospedero. De manera notable alrededor del 50% de las proteínas identificadas no presentan las características convencionales asociadas a la localización en la membrana. También, se identificaron 12 familias de proteínas en la superficie de la amiba que se confirmaron por western blot o ensayos de inmunofluorescencia (Biller L y cols., 2014).

Otros estudios proteómicos más específicos, han estudiado los complejos de procesamiento del pre-RNA<sub>m</sub>, donde se han identificado 36 proteínas y otras 50 proteínas que posiblemente están involucradas en procesos co-transcripcionales. A su vez, se han realizado ensayos de pull-down para identificar las interacciones con dos endoribonucleasas que interactúan con la deanilasa EhCAF1. En estudios más recientes, se han determinado los componentes del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico (RE). Aproximadamente 1,500 proteínas se identificaron en ambos compartimentos (Valdéz J y cols., 2014; Perdomo D y cols., 2015).

Por otro lado existen 4 estudios proteómicos comparativos entre cepas de amibas. Los estudios están enfocados en comparar entre cepas de *E. histolytica* y entre *E. histolytica* y *E. dispar*. En el que se compararon cepas de *E. histolytica* (HM-1:IMSS y Rahman) por geles 2D PAGE. Identificaron dos proteínas antioxidantes (peroxiredoxina y superóxido

dismutasa) y tres proteínas de función desconocida; Grainina 1, Grainina 2 y una proteína con un dominio LIM (Davis PH y cols., 2006).

Existe otro estudio proteómico comparativo entre aislados diferentes de la cepa HM-1:IMSS (A y B), la comparación proteómica se hizo con 2D DIGE. Identificaron 21 proteínas con elevada abundancia en el aislado A y 10 proteínas con elevada abundancia en el aislado B (Biller L y cols. 2009). Otro estudio realizado entre perfiles proteómicos de *E. histolytica* y *E. dispar* reveló que sus proteomas son tan dispares que no fue posible realizar la comparación proteómica por 2D-PAGE. En otro estudio proteómico compararon cepas diferentes HM1:IMSS y utilizaron 2D-DIGE. Identificaron diferencias en la proteína alcohol deshidrogenasa 3 que podría estar involucrada en virulencia (Davis PH y cols 2009).

Por otro lado y de manera contrastante, sólo hay un estudio proteómico de quiste de *E. histolytica*. Este estudio se realizó con quistes obtenidos de pacientes y aunque no se realizó el proteoma de trofozoítos al mismo tiempo, los resultados fueron comparados con los estudios de trofozoítos previos. Identificaron 417 proteínas, incluidas 195 proteínas estadio-específicos, son consideradas como candidatos a fármacos o vacunas, sin embargo, la mayoría son proteínas hipotéticas. Algunas de las proteínas identificadas fueron proteínas cinasas, GTPasas pequeñas, proteínas de reparación del DNA, reguladores epigenéticos y proteínas asociadas a superficie (Ali IK y cols, 2012).

A pesar de la importancia que ha representado el uso de la proteómica para la identificación de las proteínas en los estadios, en el caso de *E. histolytica* aún no existen estudios proteómicos donde se comparen estadios del parásito. Es de vital importancia conocer esas diferencias para proponer nuevas estrategias en la prevención de la amibiasis.

### III.- Planteamiento del problema

*Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario causante de la amibiasis, el cual presenta dos formas: el trofozoíto y el quiste. El quiste presenta una pared de quitina que le brinda resistencia fuera del hospedero y por lo tanto representa un candidato terapéutico. El objetivo de obtener un modelo *in vitro* para enquistarlo no ha sido una tarea sencilla y por lo tanto, el estudio en los procesos que están involucrados en la conversión de un estadio a otro no se conocen. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo ha logrado inducir Estructuras Tipo Quiste (ETQ) con un tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM, con 200 ppm de varios dicaciones metálicos durante 4h. Las ETQ presentan algunas características de un quiste como: multinucleación, pared de quitina y resistencia a detergentes.

A pesar de que no se ha logrado comprobar la infectividad de las ETQ, nosotros hemos sugerido que pueden ser empleadas como un modelo para entender el proceso de enquistamiento de la amiba, sobre todo porque por sus características proponemos que podría ser un estado de transición entre el trofozoíto y un quiste maduro. Otra posibilidad es que las ETQ correspondan a un pseudoquiste, estructura de resistencia que se forma rápidamente ante un estrés y que no está relacionada con el proceso de enquistamiento. Para poder definirlo, consideramos que es importante conocer su naturaleza proteómica.

En el presente proyecto llevamos a cabo un estudio comparativo del perfil proteico de las fases del parásito: trofozoíto, quiste y ETQ, que nos permitirá determinar la verdadera naturaleza de las ETQ, lo que podría aportar a los cambios asociados al proceso de enquistamiento o a la descripción de una nueva estructura, el pseudoquiste, en ambos casos incluida la formación de una pared tipo quitina. Aunque no es el objetivo a corto plazo los resultados podrían permitir en un futuro proponer nuevos blancos terapéuticos que podrían llegar a erradicar la enfermedad al inhibir la formación de una fase de resistencia de la amiba y con ello, la transmisión del parásito.

## IV.- Hipótesis

Las ETQ obtenidas *in vitro* tienen características de resistencia debido a una cubierta tipo-quitina, por lo que se trata de una fase intermedia de enquistamiento o un pseudoquiste de *E. histolytica*.

## V.- Objetivos

### Objetivo General

Realizar una comparación proteómica global de trofozoítos, quistes y ETQ de *Entamoeba histolytica*, para determinar la naturaleza proteómica de las ETQ y su asociación al proceso de diferenciación de la amiba.

### Objetivos particulares

- Obtener Estructuras Tipo Quiste (ETQ) *in vitro* y purificar quistes maduros de *E. histolytica*, a partir de materia fecal de pacientes infectados.
- Determinar el perfil de expresión proteico global en extractos íntegros de trofozoítos, quistes y ETQ por LC-MS/MS y realizar la comparación entre los proteomas.
- Determinar los cambios en el proteoma de ETQ durante su inducción.

## **VI.- Materiales y Métodos**

### **1.- Cultivo de *Entamoeba histolytica***

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1:IMSS se mantuvieron en botellas de 50 ml en medio TYIS: 33 (Diamond y cols., 1961, 1978), suplementado con suero bovino fetal al 15% (Microlab), vitaminas al 3% (SAFC, Biosciences) y antibiótico 100x al 1% (Gibco). Los trofozoítos se mantuvieron a 37° C en condiciones axénicas por 72 h.

### **2.- Inducción de Estructuras Tipo Quiste (ETQ)**

Las Estructuras Tipo Quiste (ETQ) se obtuvieron de acuerdo al protocolo establecido en nuestro grupo de trabajo (Aguilar H y cols., 2010). Brevemente, una vez que los trofozoítos alcanzaron 72 h de cultivo fueron tratados con 4 mM de peróxido de hidrógeno comercial 30% adicionado con trazas de Co 0.02 ppm, Cd 0.02 ppm, Cu 0.02 ppm, Fe 0.1 ppm, Ni 0.02 ppm, Zn 0.02 ppm (MERCK), durante 1, 2, 4 y 6 h. Una vez terminado el tratamiento el contenido de las botellas se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 150 x g por 5 min. Después los paquetes se lavaron 6 veces con solución reguladora de Fosfatos Salino (PBS 1X) a 4°C, se centrifugaron a 150 x g por 5 min cada uno. Para seleccionar las ETQ totalmente transformadas de los trofozoítos se realizaron 2 lavados más uno con agua destilada y otro con sarkosil 0.1%, durante 20 min y finalmente se centrifugaron a 150 x g durante 5 min. Los paquetes se procesaron para obtener los extractos proteicos como se describe posteriormente.

### **3.- Muestras de heces humanas**

Las muestras de materia fecal humana fueron proporcionadas por los laboratorios CARPERMOR (Ciudad de México) de acuerdo a los protocolos éticos, incluida la firma del paciente para la donación de la muestra. En total 100 muestras nos fueron donadas, los



criterios de inclusión para analizar la muestra eran que al microscopio se observó el complejo de *E. histolytica*/*E. dispar*. Todas las muestras se procesaron en fresco y el aislamiento del DNA se realizó bajo las medidas de bioseguridad para muestras nivel 2 como se describe a continuación.

#### **4.- Purificación de DNA a partir de muestras humanas**

Para purificar el DNA de muestras humanas se utilizó el mini kit QIAamp (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Aproximadamente, 200 mg de cada muestra se colocó en un tubo de 2 ml donde se adicionaron 1.4 ml de buffer ASL. La mezcla se calentó a 70°C por 5 min y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min (todas las centrifugaciones se realizaron bajo las mismas condiciones). El sobrenadante se colocó en otro tubo y se le agregó una tableta de Inhibitex (QIAGEN) hasta que se disolvió. Nuevamente, los tubos se centrifugaron y 200 µl de sobrenadante se colocó en un tubo con 15 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer AL. La solución se incubó 70°C por 10 min. Después de la incubación, se agregaron 200 µl de etanol absoluto a la mezcla y ésta se colocó en una columna de afinidad. La columna se centrifugó y lavó dos veces con Buffer AW1 y AW2. Para la elución del DNA, las columnas se colocaron en tubos de 1.5 ml y a cada columna se le agregó 200 µl de Buffer AE, se incubó durante 1 min y finalmente se centrifugó. El DNA se almacenó a -70° C hasta su uso.

#### **5.- Detección diferencial de *E. histolytica* y *E. dispar* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Desde que se hiciera la separación en dos especies de *Entamoeba* en: *E. histolytica* y *E. dispar*, ha sido necesario el uso de herramientas de biología molecular para diferenciarlas ya que morfológicamente son idénticas. Por esta razón, una vez que se obtuvo el DNA se realizó un ensayo de PCR para identificar las muestras positivas sólo para *E. histolytica*. Un oligonucleótido común Forward EntaF5'-ATGCACGAGAGCGAAAGCAT-3', y dos

oligonucleótidos específico-especie Reverse EhR5'-GAT CTAGAAACAATGCTTCTCT-3' y EdR5'-CACCACTTACTATCCCTACC-3' (Hamzah Z, 2006). Las reacciones de PCR se prepararon con 100 ng de DNA purificado arriba usando un Kit Master Mix Hot Star (QIAGEN), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se corrieron como sigue: 7 min a 94°C; 35 ciclos de 90 s a 94°C, alineamiento por 1 min (temperatura de alineamiento para *E. histolytica*: 56°C y para *E. dispar*: 58°C) y 1 min a 72°C. Además de una incubación final de 7 min a 72°C. Los amplificadores se separaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV para identificar las muestras que positivas sólo para *E. histolytica*. El tamaño de los amplificadores esperados para *E. histolytica* y para *E. dispar* fue de 100 pb y 600 pb respectivamente.

#### **6.- Aislamiento de quistes de *E. histolytica***

Una vez identificadas las muestras positivas al parásito, los quistes de 22 muestras se separaron parcialmente empleando la técnica de gradientes de sacarosa (Walderich B y cols., 1997). Aproximadamente 7 g de cada muestra se homogenizó con 40 ml de PBS. Las partículas grandes se removieron filtrando la mezcla a través de una doble capa de gasa. Los filtrados fueron centrifugados a 150 x g por 7 min a 4°C, los sobrenadantes se decantaron y los pellets se lavaron extensivamente con PBS hasta que el sobrenadante se observó claro. Los pellets se resuspendieron en 5 ml de agua destilada. Después, las suspensiones se colocaron cuidadosamente en la parte superior de tubos con 40 ml de sacarosa 1.5 M y centrifugados a 500 x g durante 10 min a 4°C. La interface obtenida se colocó en un tubo nuevo y se resuspendió en 20 ml de agua destilada y se centrifugó a 150 x g durante 5 min a 4°C. Los pellets se resuspendieron nuevamente en 5 ml de agua destilada y se colocaron en la parte superior de tubos con 15 ml de sacarosa 0.75 M y se centrifugaron a 500 x g durante 15 min a 4°C. Los pellets que se obtuvieron de ésta última centrifugación contenían los quistes de *E. histolytica* y se almacenaron a 4°C in PBS con ázida de sodio 0.5% para los experimentos posteriores.

## **7.- Preparación de extractos de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes de *E. histolytica***

Para la obtención de extractos totales de trofozoítos, los cultivos de trofozoítos de 72 h se colocaron en hielo durante 5 min y las células se cosecharon por centrifugación a 150 x g durante 5 min. Después los trofozoítos se transfirieron a tubos Falcon para realizar 5 lavados con PBS a 150 x g durante 5 min. Los pellets de trofozoítos y ETQ mencionados arriba (Inducción de Estructuras Tipo Quiste (ETQ)) se colocaron en una solución de PBS con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Coctail, Sigma-Aldrich) en hielo por 15 min. Después se sometieron a 10 ciclos de congelamiento-calentamiento con nitrógeno líquido/baño maría a 37° C y finalmente se centrifugaron a 16,000 x g durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes que contenían el extracto total se transfirieron a tubos limpios para cuantificar la proteína utilizando el método de Bradford (Bradford MM, 1976). Los extractos se alicuotaron y almacenaron a -70°C hasta su uso. Los extractos de proteínas de quistes se prepararon de una mezcla de 10 muestras positivas para *E. histolytica* (aproximadamente  $2 \times 10^5$  quistes). Se colocaron en 500 µl de PBS con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Coctail, Sigma-Aldrich) en hielo durante 15 min. La muestra se sometió a 10 ciclos de congelamiento-calentamiento con nitrógeno líquido/baño maría a 37°C y sonicación durante 30 min (15s pulso/15s reposo). Finalmente, la mezcla se centrifugó a 16,000 x g durante 30 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadante y también se cuantificó la proteína. Los extractos de proteínas se almacenaron a -70°C para uso posterior.

## **8.- Preparación de muestra para análisis de LC- MS/MS**

Alrededor de 40 µg de extracto de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes se concentraron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, la corrida del gel se detuvo justo después de que las muestras ingresaron al gel concentrador y antes de que entraran al gel separador. Cada muestra se cortó bajo condiciones de esterilidad como una única banda para

trofozoítos, ETQ y quistes. Las bandas se enviaron a los laboratorios Bioproximity (Chantilly, VA) para el análisis por LC-MS/MS.

## **9.- Desnaturalización de las proteínas y digestión**

Las bandas se recibieron en los Laboratorios Bioproximity y se procesaron como se describe a continuación. Primero, las muestras se prepararon para la digestión utilizando el método de Preparación de la muestra asistida por filtro (FASP) (Wisniewski J y cols., 2009). El método consistió en resuspender las muestras en una solución de 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.6 y 3 mM DTT y sonicadas brevemente e incubadas a 40°C por 20 min. Después, las muestras se clarificaron por centrifugación y los sobrenadantes se transfirieron dentro de columnas Amicon 30-kDa MWCO (Millipore). Las columnas se centrifugaron a 13,00 x g durante 30 min y se resuspendieron en 8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 7.6. Las proteínas en la muestra se alquilaron con 15 mM de iodacetamida. Después se diluyeron en 2 M Urea y finalmente se digirieron toda la noche con tripsina y una enzima sustrato en una proporción de 1:40 a 37°C en constante agitación. Los péptidos se recuperaron por centrifugación.

## **10.- Desalado de péptidos**

Aproximadamente 20 µg de los péptidos digeridos se desalaron utilizando puntas C18 STAGE (stop-and-go-extraction). Una punta C18 STAGE se activó con metanol por cada muestra, después fue acondicionada con acetonitrilo 60%: ácido acético 0.5%, seguido de acetonitrilo 2%/ácido acético 0.55. Las muestras se separaron dentro de las puntas y desaladas con ácido acético 0.5%. Los péptidos se excluyeron con acetonitrilo 60%: ácido acético 0.5% y liofilizados en un Speed Vac (Thermo Savant), para dejar casi secas las muestras.

## **11.- Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS)**

Los péptidos se analizaron por LC-MS/MS. La LC se realizó en un equipo Easy-nLC 1000 UHPLC (Thermo Scientific, Waltman, MA). La fase móvil A se realizó con 97.5% agua mili-Q, 2% de acetonitrilo y 0.5% de ácido acético. La fase móvil B, se realizó con 99.5% de acetonitrilo y 0.5% de ácido acético. El gradiente de LC corrió de 0%B a 35% B cerca de 210 min, después de 80% B por 30 min más. Las muestras se separaron directamente en una columna C18 de 50 cm x 75  $\mu\text{m}$  (Thermo Easy Spray PepMap). La LC fue interconectada a un espectrómetro de masas cuadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Fisher) por ionización nano-electrospray usando una fuente con un calentador de columna integrado (Thermo Easy Spray). La columna se calentó a 50°C. Se aplicó un voltaje de electrospray de 2.2 kV. El espectrómetro de masas se programó para la adquisición de datos-dependiente, los espectros de masas en tándem a partir de los 20 principales iones en el análisis completo de 400-1000 m/z. La dinámica de exclusión se estableció en 15 s, los iones con carga simple se excluyeron, el ancho de aislamiento se estableció en 1.6 Da. La resolución completa de MS se estableció a 70,000 y la de MS/MS en 17,500. La energía de colisión normalizada se estableció en 25, el control automático de ganancia al máximo 2E5 el llenado MS de 20 ms máximo llenar MS/MS los 60 ms y la relación de relleno inferior al 0,1 %.

## **12.- Procesamiento de datos y búsqueda de librerías**

Los archivos RAW de espectrometría de masas se convirtieron al formato mz5 utilizando el convertidor de ms (Chambers M y cols., 2012). Todas las búsquedas requirieron un precursor de tolerancia de masa de 10 ppm, tolerancia del fragmento de masa de 0.02Da, escisión triptica estricta, escisiones perdidas 0 ó 1, modificación fija de alquilación de cisteínas, modificación variable de oxidación de metioninas y valores esperados de 0.01 o menos. Se requirió que las proteínas presentaran 1 o más péptidos únicos a través de las muestras analizadas con un valor-E de 0.01 o menos.

### **13.- Análisis Bioinformáticos**

Las proteínas que se identificaron en trofozoítos, quistes y ETQ en extractos totales se analizaron con el programa BioVenn para la construcción de diagramas de Venn (Hulsen T y cols., 2008), se empleó el programa STATISTICA 12 para los análisis de correlación y los recursos bioinformáticos DAVID 6.7 para la clasificación funcional (Huang Da W y cols., 2009). Las proteínas identificadas se mapearon con Gene Ontology usando Panther DB (Mi H y cols., 2013), el test de sobrerrepresentación se realizó usando un valor de P de 0.05. Aquellas proteínas que no pudieron ser anotadas utilizando Panther se anotaron con Argot2 con score total >200 (Fontana P y cols., 2009; Falda M y cols., 2012; Radivojac P y cols., 2013). Por otro lado, la localización sub-celular de algunas proteínas se predijo usando CELLO v2.5 (Yu CS y cols., 2004; Yu CS y cols., 2006), la antigenicidad se predijo utilizando la escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar AS y cols., 1990).

### **14.- Purificación de RNA de trofozoítos, ETQ y quistes de *E. histolytica***

El RNA de trofozoítos, ETQ y quistes se purificó con el kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA). Aproximadamente a  $10^6$  trofozoítos o ETQ se les agregó 1 ml de Trizol y se homogenizó mediante un vortex. Posteriormente, se le agregó 1 ml de etanol y la solución se mezcló, después la solución se colocó en una columna Zymo-Spin II y se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. A continuación, la columna se trató con 400  $\mu$ l de buffer prelavado y se lavó con 700  $\mu$ l de buffer de lavado, entonces la columna se centrifugó por 1 min a máxima velocidad. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo Eppendorf y el RNA se eluyó con 50  $\mu$ l de agua libre de RNAsas. El RNA se cuantificó en un nanodrop 2000 (Thermo scientific) y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El RNA de quistes se purificó a partir de 0.25g de muestra de materia fecal humana, previamente positiva por PCR diferencial mencionado arriba con el kit de aislamiento Power Microbiome RNA (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) siguiendo las condiciones del

proveedor. Brevemente, la muestra se coloca en un tubo de 1 ml con 650  $\mu$ l de solución PM1, el tubo se vortexó durante 10 min y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. El sobrenadante se transfirió en un tubo nuevo y se le agregó 150  $\mu$ l de solución PM2, la mezcla se centrifugó por 1 min. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se le agregaron 650  $\mu$ l de las soluciones PM3 y PM4. Una vez que se mezcló la solución 650  $\mu$ l del sobrenadante se colocaron dentro de una columna (spin filter) y se centrifugaron por un min. Después 650  $\mu$ l de solución 5 se agregó a la columna y se centrifugó por un min. Entonces, 50  $\mu$ l de Solución de DNasa I y 400  $\mu$ l de solución PM7 se agregaron a la columna y se centrifugó durante 1 min. La columna se lavó con las soluciones PM4 y PM5 y se centrifugaron por 1 min después de cada lavado. Finalmente, el RNA se eluyó con 50  $\mu$ l de agua libre de RNasas. El RNA se cuantificó en un nanodrop 2000 (Thermo scientific) y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **15.- Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR)**

La RT-PCR se realizó usando el kit Súper Script One-Step RT-PCR con la Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las especificaciones del proveedor. Las reacciones se prepararon usando 200 ng de RNA de cada muestra. Las muestras se amplificaron como se describe a continuación:  $55^{\circ}\text{C}$  durante 30 min;  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min; 40 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 15 s; alineamiento por 30 s;  $70^{\circ}\text{C}$  por un min; y una incubación final a  $68^{\circ}\text{C}$  por 10 min. La temperatura de alineamiento y las oligonucleótidos usados se describen en la Tabla 1. Una vez terminado el RT-PCR las reacciones se separaron en geles de agarosa al 1%, para su visualización los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron bajo luz UV.

#### **16.- Western Blot contra la proteína Jacob**

Un western blot se realizó con el objetivo de identificar la proteína Jacob en ETQ y quistes. 15  $\mu$ g de cada muestra se resolvieron en un gel de acrilamida al 12% y se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con leche 10% por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . El anticuerpo

primario anti-Jacob 1:1000 se incubó toda la noche a 4°C (donado por el doctor W. A. Petri Jr.). El anticuerpo secundario anti-conejo 1:50,000 conjugado con HRP hecho en cabra (62-6120 ZYMED, San Francisco, CA) se incubó por 2 h a 37°C. El complejo inmune en la membrana se reveló utilizando el kit Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific). El extracto de trofozoítos se utilizó como control negativo.

### **17.- Inmunofluorescencia contra la proteína Jacob**

Para realizar la inmunofluorescencia ETQ y quistes se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con tritón al 1% durante 1 h a 50°C. Las muestras se bloquearon con BSA al 1% por 1 h y se trataron con anticuerpo primario anti-Jacob 1:200 incubando toda la noche a 4°C. Después se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo 1:200 acoplado a FITC hecho en cabra y se incubó por 2 h a 37°C (F1262, Sigma ST. Louis, MO). Las muestras fueron inmediatamente visualizadas bajo el microscopio de fluorescencia. Se procesaron trofozoítos de igual manera y se usaron como control negativo.



**Tabla 1.-** Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR de proteínas de la pared del quiste de *Entamoeba histolytica*.

No de acceso a la secuencia	Nombre de la proteína	Oligonucleótidos F/R 5' -3'	Tamaño	T ° de alineamiento
XM_001913371.1	Enzima málica, putativa	ACTCGGATCCATGGCACAATAAAAGCAG ATTCCTCGAGTTTTCCAGTGACTTTGTTAA	1464	52
XM_645281.2	fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa	ACTCGGATCCATGGCTGCTAAGACTGTAAAC ATTCCTCGAGATACCATGATTTTCTGCTGAG	990	61
XM_645264.2	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, putativa	ACTCGGATCCATGTCAATTAAGGTCGGTATTA ATTCCTCGAGATGAACTTTAGAAATGATTTGGA	1000	58
XM_001914290.1	Gal/GalNAc (Fragmento de LC3)	TAGAAAGCTTATGTTCTAGTTTAAACATGTCCA TTTTTCTAGATTAACATGTTTTCTTTGTGTAAATAG	1028	59
XM_001914339.1	Peroxiredoxina	ACTCGGATCCATGTCTTGCAATCAACAAAAAG ATTCCTCGAGCTTGTGTTTAAATGTTGTAA	711	58
AF401986	Proteína Jessie 1	AAGTGGATCCATGACACTAATTATTTTCT TACCAAGCTTTTATTATAATTTTCATAAA	273	63
AF401987	Proteína Jessie 2	AAGTGGATCCATGATGATATTAATCATT TACCAAGCTTTTAAACAATAATCATCATT	294	65
AF401988	Proteína Jessie 3	AAGTGAATTCATGAAATTAGCTGTTTTAA TACCAAGCTTTTATTTTGAATAATGAACT	1800	65
AF401984.1	Lectina Jacob	AAGTGGATCCATGAAAGCATTACTTGTTA TCCCAAGCTTTTAAATAACATGGATTGTTA	456	66
XM_652120.2	Quitin sintasa 2, putativa	AAGTGGATCCATGTCAGTGAGTTTCCTTA TCCCAAGCTTTTACTCTGAATGAGAAAGG	2841	68
AF082517	Factor de ribosilación dependiente de ADP (ARF)	GTAGGACTTGATGC GTGAAGAATTAATGA	259	51

## VII.- Resultados

En el siguiente esquema se muestra de manera general la estrategia experimental que se realizó para el proyecto (Figura 8).

### Estrategia Experimental

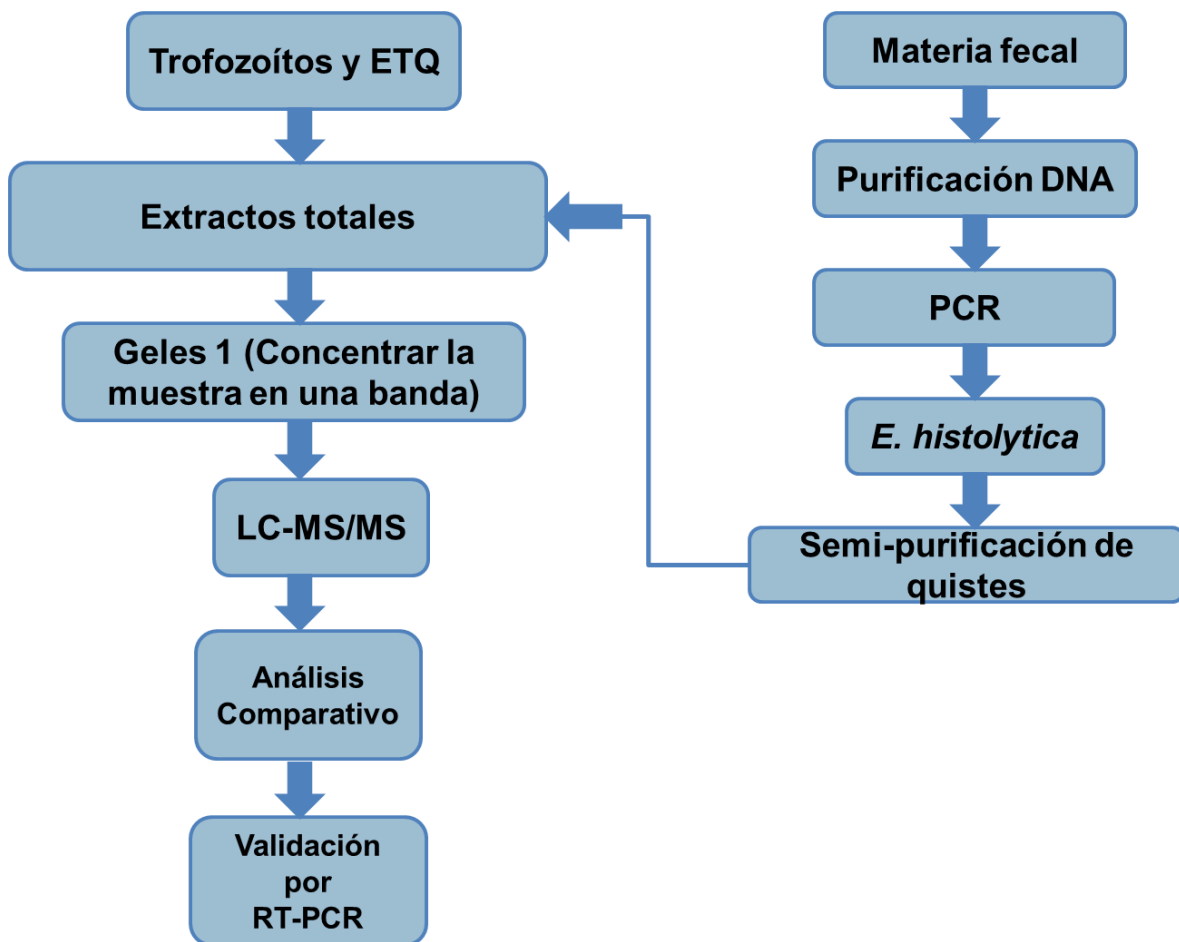
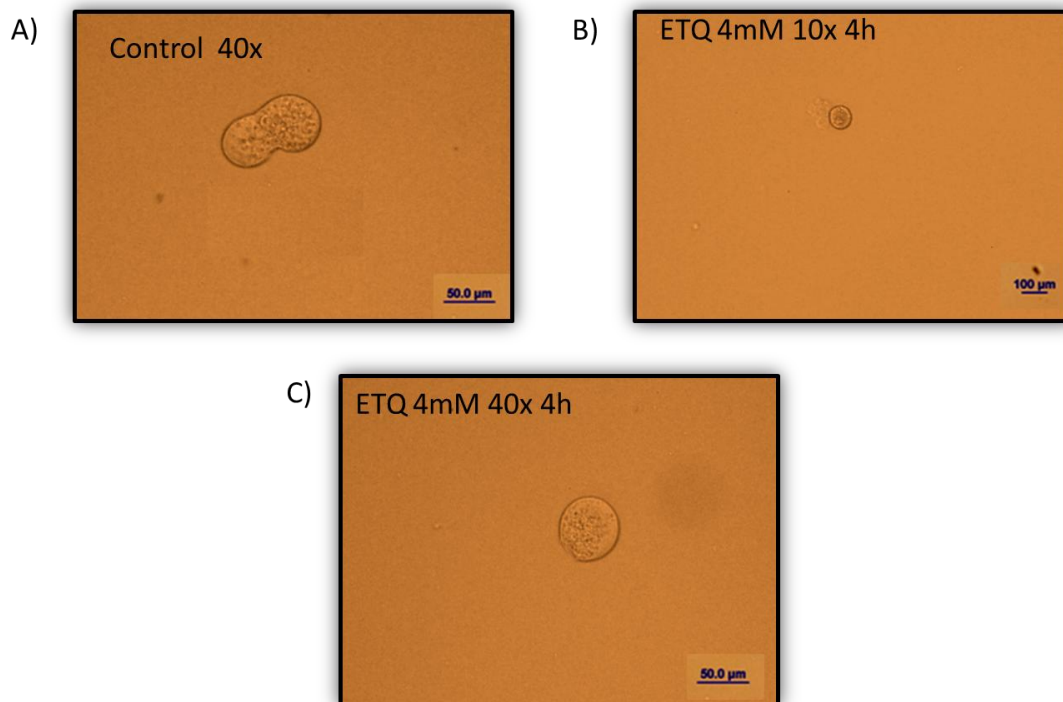


Figura 8.- Esquema general del flujo de trabajo que se planeó para realizar el proyecto

## Objetivo 1.- Obtener las muestras de ETQ y quistes de *Entamoeba histolytica*

### 1.- Optimización de la obtención de las ETQ

Aunque la obtención de ETQ fue publicada anteriormente en nuestro grupo de trabajo (Aguilar-Díaz H y cols., 2010), se realizaron los ensayos a 1, 2, 4 y 6 h para obtener el tiempo en el cual se obtenía un número mayor de ETQ resistentes al detergente sarkosil. El tiempo óptimo de inducción que se obtuvo fue a las 4h (Figura 9).



**Figura 9.-** Obtención de ETQ a partir de trofozoítos inducidos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En a) Se observa un trofozoíto en cultivo sin inducir. En b) y c) Se observan ETQ después de 4h de inducción que han disminuido su tamaño y se han redondeado.

Aunque el tiempo de inducción de las ETQ de 4 h fue el que utilizó para la comparación proteómica con los estadios de trofozoítos y quistes, los otros tiempos de 1, 2 y 6 h también se utilizaron para el estudio proteómico de los cambios proteómicos durante la inducción de las ETQ.

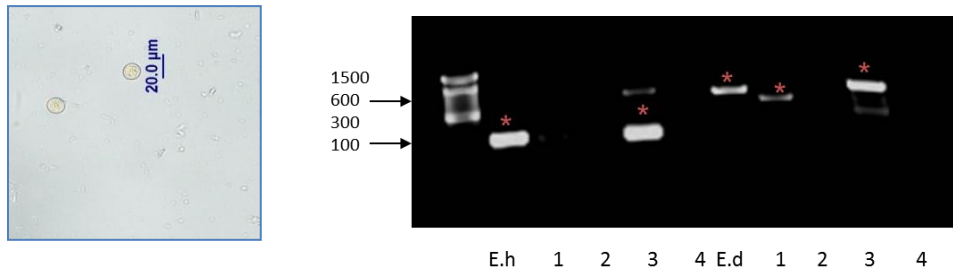
## 2.- Identificación de muestras humanas positivas para *E. histolytica* utilizando PCR

En total los laboratorios Carpermor nos donaron 100 muestras que por observación al microscopio eran positivas para el complejo *E. histolytica/E. dispar*. Para confirmar la presencia del parásito y diferenciar de las muestras que tenía *E. dispar* se realizaron ensayos de PCR usando oligonucleótidos específicos. En la siguiente tabla se resumen los resultados de este análisis. Cada PCR se realizó 3 o hasta cuatro veces si había alguna duda en la identificación de la especie de *Entamoeba*.

**Tabla 2.-** Clasificación molecular de las muestras humanas a la presencia de *Entamoeba*

<b>Clasificación</b>	<b>Número de muestras</b>
Muestras positivas para <i>E. histolytica</i>	22
Muestras positivas para <i>E. dispar</i>	20
Muestras positivas para ambas amibas	12
Muestras negativas	46

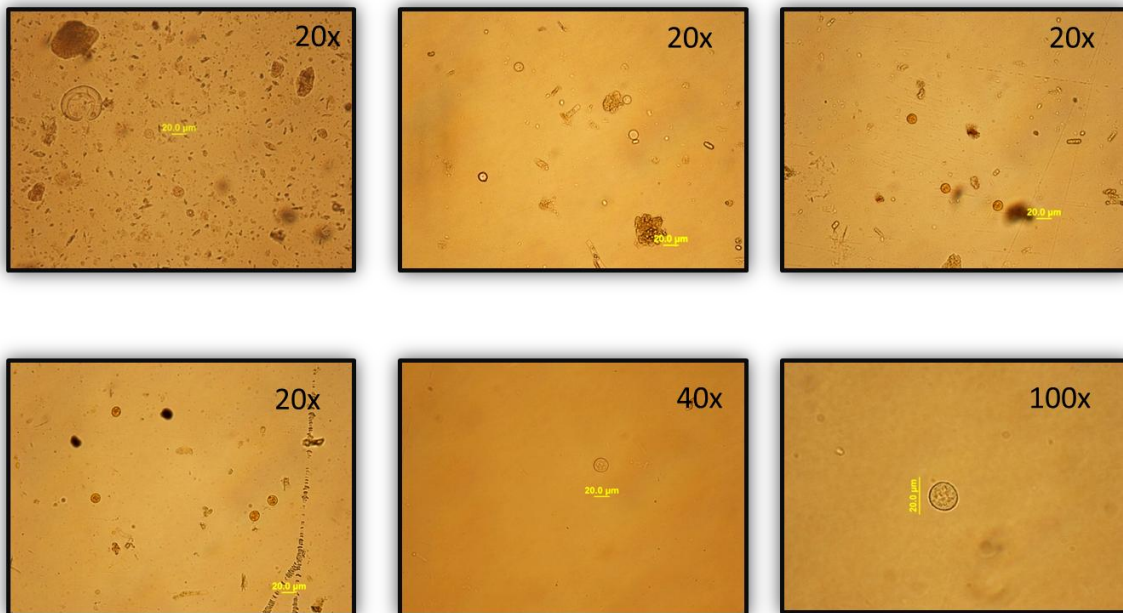
A continuación, se muestra de manera representativa la observación al microscopio de quistes de *E. histolytica* bajo el microscopio y un gel de agarosa representativo para exponer el resultado de un PCR diferencial donde se observan 4 muestras a las que se les realizó el PCR para *E. histolytica* y *E. dispar*. En el gel se ve que la muestra 3 fue positiva para *E. histolytica* y *E. dispar* mientras que la muestra 1 fue positiva únicamente para *E. dispar*, las muestras 2 y 4 no amplificaron para ninguna amiba de las analizadas (Figura 10).



**Figura 10.-** Muestras positivas para *E. histolytica*, *E. dispar* o ambas. Del lado izquierdo se observa una muestra de quistes vista al microscopio. Del lado derecho se muestra un gel de agarosa 1% representativo con 4 muestras a las que se les realizó PCR para ambas amibas. Con asterisco rojo se muestran las bandas amplificadas.

### 3.- Quistes semipurificados de *E. histolytica* usando gradientes de sacarosa

Una vez que se identificaron 22 muestras positivas para *E. histolytica*, se llevó a cabo la semipurificación de los quistes utilizando gradientes de sacarosa (Walderich B y cols., 1997). La técnica permite limpiar parcialmente la muestra, de tal forma que si se hace adecuadamente y con los lavados que se requieran las muestras pueden quedar bastantes limpias de bacterias, células humanas y partículas grandes de materia fecal (Figura 11).

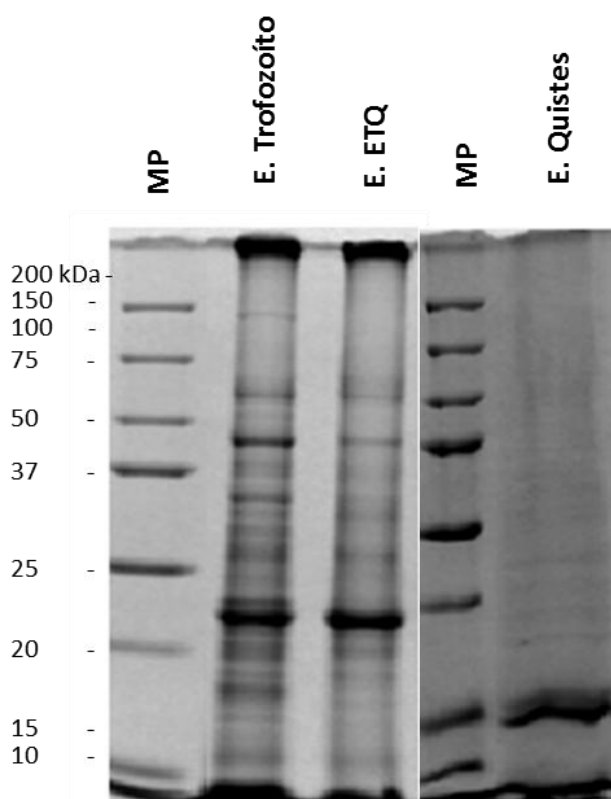


**Figura 11.-** Proceso de semipurificación de quistes utilizando gradientes de sacarosa. En las imágenes arriba: de izquierda a derecha y abajo: de izquierda a derecha. Se va siguiendo la secuencia durante las diferentes fases del proceso de purificación. En las imágenes se observa la disminución de partículas grandes y la progresiva desaparición de bacterias y diversos contaminantes.

#### 4.- Integridad de los extractos proteicos de trofozoítos quistes y ETQ

Una vez que las ETQ, los quistes y los trofozoítos fueron obtenidos se realizaron los extractos de proteínas para enviarlos a analizar por LC MS/MS. Antes de que se enviaran los extractos de proteína éstos fueron separados en geles de acrilamida para observar y determinar la integridad. En la Figura 12, se pueden observar la integridad de los extractos de proteínas totales.

En el caso de los extractos de trofozoítos y ETQ se observan claramente diferencias en bandas aún en un gel de 1D. En los trofozoítos se muestran 20 bandas aproximadamente a lo largo de todo el gel, en las ETQ se observan 20 bandas también pero en diferente peso y con menor intensidad que en los trofozoítos. En el caso del extracto de quistes, se ven 12-15 bandas aproximadamente, la mayoría muy tenues, aunque se ven pocas bandas, muchas de estas están en los pesos moleculares bajos además que probablemente muchas no se ven por la composición hidrofóbica de muchas proteínas del quiste. Las muestras de trofozoítos, quistes y ETQ fueron enviadas como una única banda a los laboratorios Bioproximity (<http://www.bioproximity.com/>) para su análisis por LC MS/MS.



**Figura 12.-** Integridad de extractos de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes. Se pueden apreciar las bandas en las 3 muestras. En quistes las bandas son mucho más tenues pero se encuentran en todos los pesos moleculares, aunque en pesos moleculares pequeños se observan más proteínas.

**Objetivo 2.- Análisis proteómico comparativo de trofozoítos, ETQ y quistes de *E. histolytica***

**5.- Validación de las proteínas identificadas con el Software DB Parser**

El análisis de LC MS/MS identificó 1,900 proteínas diferentes entre las muestras de trofozoítos, ETQ y quistes. Para validar la identificación de las proteínas se realizó una validación con DB Parser. Este algoritmo te permite clasificar a las proteínas identificadas en 4 categorías o tipos de Parsimonia: Distinta, Diferenciable, Equivalente y Supergrupo. Estos tipos de parsimonia corresponden al tipo de péptidos que identificaron a la proteína. Aquellas proteínas que se identificaron con péptidos únicos (Distinta), aquellas proteínas que además de péptidos únicos, algunos son péptidos compartidos con otra proteína (Diferenciable), aquellas proteínas que se identificaron con péptidos únicos y con péptidos compartidos por dos o más proteínas, y finalmente las proteínas que se identificaron con péptidos únicos y con péptidos compartidos por varias proteínas.

En la Tabla 3, se pueden observar los resultados de este análisis para las 1,900 proteínas. El 70% de las proteínas presentan una parsimonia distinta, es decir, que fueron identificados únicamente con péptidos únicos y exclusivos de la proteína a la que identificaron.

---

**Tabla 3.-** Clasificación de las proteínas identificadas de acuerdo al Tipo de Parsimonia

---

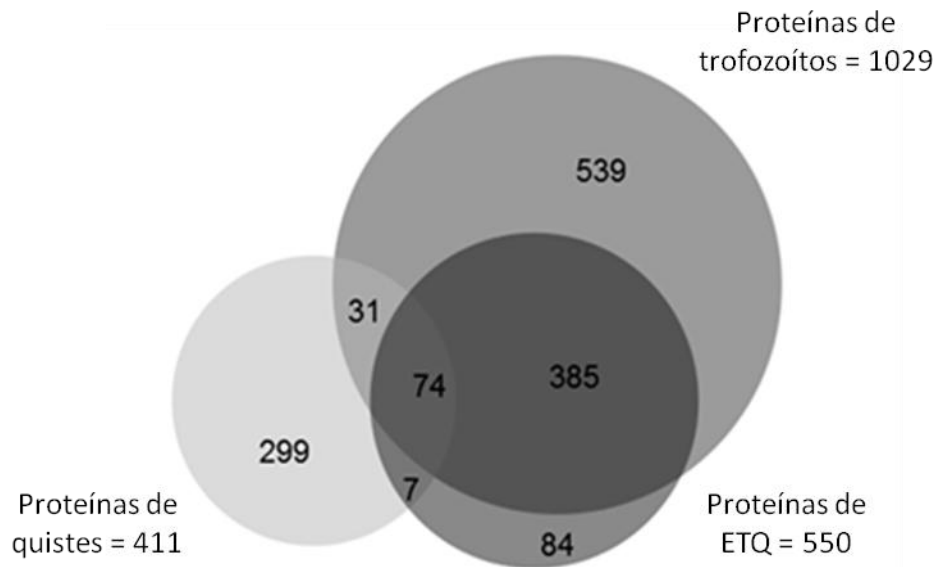
<b>Tipo de Parsimonia</b>	<b>No. de Proteínas</b>	<b>Porcentaje %</b>
Distinta	1330	70
Diferenciable	323	17
Equivalente	152	8
Supergrupo	95	5
Suma	1900	100

---



## 6.- Comparación de datos proteómicos de trofozoítos, quistes y ETQ

Una vez que las proteínas se identificaron y además se validó su identificación se realizó la comparación proteómica entre las 3 muestras. En total 1,990 proteínas se identificaron. De esas 1,990 proteínas 1,029 se identificaron en trofozoítos, 550 en ETQ y 411 en quistes. Se realizó un diagrama de Venn para comparar los de conjuntos de proteínas. Se identificaron 74 proteínas compartidas entre las 3 muestras. Además entre ETQ y trofozoítos se compartieron 385 proteínas. Como un resultado interesante entre quistes y ETQ sólo se compartieron 7 proteínas, mientras que entre quistes y trofozoítos se compartieron 31 proteínas (Figura 13). También los trofozoítos, ETQ y quistes tuvieron proteínas estadio-específicas (539, 84 y 299, respectivamente).

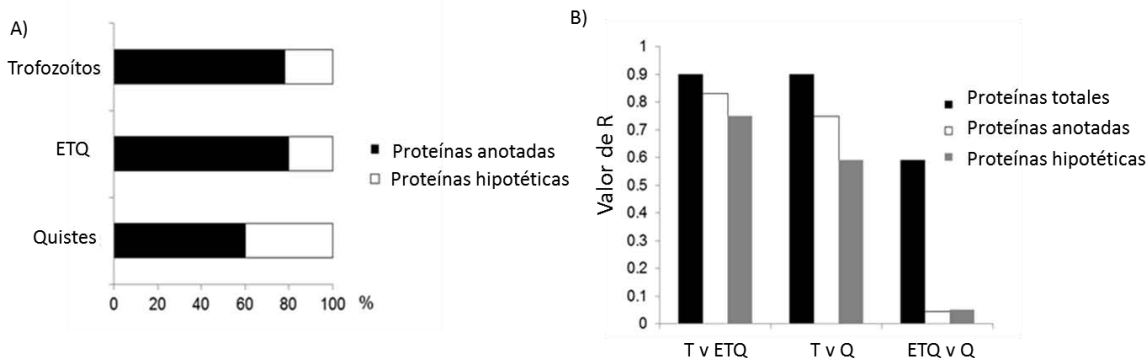


**Figura 13.-** Comparación de proteínas identificadas en trofozoítos, ETQ y quistes. La comparación se representa como diagrama de Venn. El tamaño de los círculos, y el solapamiento de los círculos son proporcionales al tamaño de conjunto, y al número de proteínas que comparten, respectivamente.

De las 1,990 proteínas identificadas sólo hay 1,419 diferentes. Esto equivale al 14% de las proteínas teóricas de *E. histolytica* basado en los 9,938 genes predichos en el genoma del parásito (Loftus B y cols., 2005, Lorenzi HA y cols. 2010).

Como siguiente análisis se determinó el número de proteínas anotadas e hipotéticas de las muestras. Para los trofozoítos se identificaron 789 proteínas anotadas y 240 hipotéticas, para las ETQ 443 anotadas y 107 hipotéticas y para los quistes 250 proteínas anotadas y 161 hipotéticas (Figura 14). También se realizó un análisis de correlación para determinar que muestras eran más parecidas y que muestras eran más distintas entre sí. El valor de correlación va de 0 a 1. Entre más cercano a 1 sea el valor obtenido mayor correlación habrá, es decir las muestras comparadas se parecen más y mientras el valor sea más cercano a 0, la correlación entre las comparaciones es menor.

Los resultados muestran que las ETQ y los trofozoítos están más correlacionados entre ellos que los ETQ con los quistes ( $R= 0.9$  vs.  $0.7$ ). Además cuando se repitió el análisis de correlación pero separando a las proteínas hipotéticas con las anotadas los valores de asociación son todavía menores entre las proteínas hipotéticas de quistes con respecto a las de trofozoítos y ETQ ( $0.03$  y  $0.05$ ) (Figura 14).



**Figura 14.-** Comparación de proteínas de trofozoítos, ETQ y quistes de *E. histolytica*. En A: Se realizó un análisis para determinar la naturaleza de las proteínas, si eran hipotéticas o anotadas para las 3 muestras. En B: se observan los resultados del análisis de correlación. T= Trofozoítos, ETQ= Estructura Tipo-Quiste, Q=Quiste

Como se mencionó arriba, se identificaron 74 proteínas compartidas entre las 3 muestras. Aunque el número de péptidos hits (abundancia relativa) fue diferente entre las 3 muestras (Tabla 4).

**Tabla 4.** – Proteínas compartidas entre trofozoítos, ETQ y quistes identificadas por LC MS/MS

ID de acceso		No. de péptidos emparejados/Conteo de péptidos-hits		
Uniprot	Nombre	Trofozoítos	Quistes	ETQ
S0AUW6	Actina	97/645	10/68	46/373
S0AWJ4	Actina, putativa	100/645	10/68	45/358
S0AWF4	Actina	96/640	10/68	45/363
S0AWZ1	Actina	100/639	10/68	46363
S0AWJ9	Actin, putativa	94/635	10/68	45/363
S0AUT4	Actin, putativa	97/626	10/68	44/361
S0AUS7	Actin, putativa	95/616	9/64	43/354
S0AVA7	Actin, putativa	94/608	9/66	44/361
S0AWA2	Actin, putativa	91/605	10/68	40/331
S0AXB5	Actin, putativa	83/596	11/70	40/331
<b>Q24801</b>	<b>Piruvato fosfato dikinasa</b>	<b>113/587</b>	<b>2/4</b>	<b>64/285</b>
S0AV75	Actina, putativa	92/586	10/68	45/346
Q9TYD6	Actina	96/583	10/68	43/342
S0AUR6	Actin, putativa	90/583	9/64	40/332
S0AV23	Actin, putativa	87/579	8/51	43/324
S0AVQ9	Actin, putativa	90/568	10/68	46/337
S0AWT4	Actin, putativa	74/536	8/63	34/396
B1N621	Actin, putativa	79/487	9/66	38/282
S0AW09	Actin, putativa	86/478	8/35	40/285
S0AV15	Actin, putativa	75/444	8/38	38/280
S0AVT2	Actin, putativa	66/421	7/50	35/251
<b>C4LVR9</b>	<b>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</b>	<b>71/333</b>	<b>1/2</b>	<b>30/105</b>
<b>S0AX11</b>	<b>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</b>	<b>69/330</b>	<b>1/2</b>	<b>30/105</b>
S0AYM0	Actina, putativa	80/316	3/19	32/148
S0B0T0	Actina, putativa	73/282	2/15	30/133
S0B1Y3	Actina	73/276	2/15	29/116
C4LU72	Cadena pesada de miosina	100/226	1/1	37/73

Q07569	Cadena pesada de miosina	83/197	1/1	31/65
B1N306	Factor de elongación 2	69/195	1/1	12/28
<b>B1N2J0</b>	<b>Enzima málica putativa</b>	<b>52/185</b>	<b>2/5</b>	<b>20/51</b>
C4LY85	Ubiquitina, putativa	11/176	1/1	4/16
<b>G5EKL5</b>	<b>Enzima málica putativa</b>	<b>48/174</b>	<b>2/5</b>	<b>18/45</b>
<b>S0AW44</b>	<b>Enzima málica putativa</b>	<b>46/172</b>	<b>2/5</b>	<b>18/48</b>
<b>S0AZU7</b>	<b>Fosfoglicerato cinasa</b>	<b>33/156</b>	<b>1/1</b>	<b>15/45</b>
S0AWG4	Factor de elongación 1- $\alpha$	38/150	1/3	21/86
<b>C4M3S5</b>	<b>Proteína de choque térmico de 70, putativa</b>	<b>45/150</b>	<b>2/5</b>	<b>19/54</b>
O15593	Actina	23/136	1/2	5/60
<b>C4LXD7</b>	<b>Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa</b>	<b>45/133</b>	<b>2/3</b>	<b>16/36</b>
S0B0R7	Factor de elongación 1- $\alpha$	33/117	1/3	18/72
<b>C4M3Q0</b>	<b>Peroxiredoxina</b>	<b>31/98</b>	<b>1/4</b>	<b>27/124</b>
<b>C4MB38</b>	<b>Proteína disulfido isomerasa, putativa</b>	<b>29/93</b>	<b>1/1</b>	<b>35/180</b>
<b>Q24835</b>	<b>Subunidad de Adhesina específica de Galactosa-de 170kD subunit</b>	<b>35/91</b>	<b>1/1</b>	<b>54/160</b>
<b>B1N3C7</b>	<b>Subunidad de la Lectina inhibible de galactosa de 170 kDa, putativa</b>	<b>33/90</b>	<b>1/1</b>	<b>55/166</b>
<b>B1N5A8</b>	<b>Peroxiredoxina</b>	<b>26/90</b>	<b>1/4</b>	<b>23/116</b>
O15729	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	16/89	1/1	5/13
<b>C4LTM0</b>	<b>Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc</b>	<b>29/81</b>	<b>1/1</b>	<b>50/153</b>
<b>B1N486</b>	<b>Proteína de choque térmico de 70, putativa</b>	<b>29/69</b>	<b>2/5</b>	<b>9/28</b>
C4LYJ7	Galactokinasa, putativa	21/61	1/2	10/30
<b>C4M770</b>	<b>Proteína de choque térmico de 70, putativa</b>	<b>24/59</b>	<b>2/2</b>	<b>43/177</b>
O15601	Factor de Elongación 1 $\alpha$	12/55	1/3	8/26
<b>O77164</b>	<b>70 kDa Proteína de choque térmico</b>	<b>21/50</b>	<b>2/2</b>	<b>37/142</b>

<b>Hsp70-Bip</b>				
C4M0F4	Proteína 14-3-3 3	18/47	1/4	5/11
C4LVD3	Sulfato adenililtransferasa, putativa	20/43	2/2	6/11
C4M6Y2	Proteína de unión al Poliadenilato, putativa	16/28	1/1	3/5
B1N336	Proteína ribosomal 40S S4, putativa	11/27	1/1	1/2
B1N368	Proteína no- caracterizada Putativa	14/26	1/1	2/4
C4M711	Proteína no- caracterizada Putativa	9/26	1/1	2/2
C4M9P2	Filopodina, putativa	11/21	1/1	6/9
<b>C4MBE2</b>	<b>Proteína con dominio de unión a dedos de calcio EF</b>	<b>6/17</b>	<b>1/4</b>	<b>8/72</b>
Q9BLE4	GTPasa pequeña Rab11B	9/17	1/1	6/7
Q24834	Disulfido oxidoreductasa GTPasa pequeña	6/16	1/1	3/4
Q9BLE8	Rab7A	4/14	2/2	2/4
C4M6S2	Proteína ribosomal 60S L14, putativa	5/13	1/2	2/3
C4M8Z5	Proteína no- caracterizada Putativa	6/12	1/1	1/1
Q6AW60	Proteína EhRab11A	6/11	1/1	5/6
C4M846	Subunidad reguladora de proteasa 26s	6/10	1/1	2/2
C4LYV2	Proteína ribosomal 60S L7, putativa	6/9	1/1	1/2
C4LXG1	Purina nucleósido fosforilasa, putativa	3/7	1/1	1/2
C4M7T9	Enzima activadora de Ubiquitina, putativa	4/6	1/3	2/4
B1N384	Proteína ribosomal 60S L4, putativa	2/5	1/1	1/2
C4M3X0	ATPasa transportadora de calcio	3/5	2/3	2/3
Q27642	ATPasa transportadora de calcio	2/4	1/1	2/3
C4LYN0	Proteína no- caracterizada Putativa	2/2	1/1	4/9
C4M0V2	Proteína de resistencia a multidroga , putativa	1/1	1/1	1/3

**Las proteínas marcadas en negrita, se discuten en el texto.**

Las 74 proteínas compartidas se compararon en el número de los péptidos-hits (abundancia relativa). Lo primero que se observó fue que los quistes fue la muestra que en general presentó menos péptidos-hits en todas sus proteínas. En el caso de los trofozoítos el número de péptidos-hits fue del doble en proteínas asociadas a metabolismo celular como la Piruvato fosfato dikinasa, la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la enzima málica, la Fosfoglicerato cinasa, la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa y la Galactokinasa que en ETQ y quistes (Tabla 4).

En cambio, en las ETQ las proteínas con péptidos-hits, dos o 3 veces más que en trofozoítos o en quistes fueron enzimas asociadas a estrés oxidativo como la peroxiredoxina y dos HSP70 (Bip y otra putativa). También las proteínas disulfido isomerasa y las proteínas que contienen un dominio de unión a dedos de calcio EF. Interesantemente, la subunidad pesada de la lectina inhibible de galactosa de 170K Da también se identificó con un número de péptidos mayor que en los trofozoítos, en particular ésta enzima se ha asociada a la formación del quiste en *E. invadens* ver tabla 4 (Eicheinger D y cols., 2001).

## **7.- Identificación de proteínas estadio-específicas con mayor abundancia relativa**

Una vez que identificamos las proteínas compartidas entre las 3 muestras, decidimos identificar dentro de aquellas proteínas estadio-específicas cuales tenían los 15 péptidos-hits más altos. En trofozoítos las proteínas estadio-específicas identificadas están asociadas a unión a DNA, traducción, biogénesis ribosomal y polimerización de la actina. En las ETQ, las proteínas únicas identificadas fueron proteínas asociadas a proteínas de unión a calcio, Grainina, transporte de protones, proteólisis y homeostasis redox. Mientras que en quistes de las quince proteínas identificadas con los péptidos-hits más altos, la mitad de estas tiene función desconocida. Sin embargo, también se identificaron un factor nuclear de transcripción, una fosfotransferasa aminoglicósida 3' y una alquil sulfatasa (Tabla 5).

**Tabla 5.** – Proteínas únicas identificadas con los péptido-hits más altos en trofozoítos, ETQ y quistes

Número de acceso	Nombre de la proteína	No. de péptidos emparejados/Conteo de péptidos	Función
<b>Trofozoítos</b>			
C4LV11	Proteína no-caracterizada Putativa	17/35	<b>Función desconocida</b>
C4LWJ6	Proteína con dominio de dedos de zinc LIM zinc	9/32	<i>Unión al ion de Zinc</i>
C4LV07	Malato deshidrogenasa, putativa	7/30	<i>Actividad oxidoreductasa</i>
C4LT49	Proteína ribosomal 40S S24, putativa	11/29	<b>Traducción</b>
B1N3R9	Proteína ribosomal 60S L7a, putativa	10/27	<b>Biogénesis del ribosoma</b>
C4M0A8	Proteína no-caracterizada Putativa	16/26	<b>Función desconocida</b>
C4M0Q2	Proteína ribosomal 40S S8	12/24	<b>Traducción</b>
C4M727	Proteína ribosomal 60S L27, putativa	11/24	<b>Traducción</b>
C4LUC7	Miosina No-convencional IB	11/23	<i>Unión a ATP</i>
C4LW30	Enzimas de modificación del RNA de la familia, MiaB-	12/23	<b>Modificación del RNA</b>
C4LZB0	Proteína ribosomal 40S S6	8/23	<b>Traducción</b>
C4M7H1	Actobindina, putativa	10/23	<b>Unión de monómeros de actina</b>
C4LZ12	Tirosil-tRNA sintetasa, putativa	9/22	<b>tRNA aminoacilación para la traducción de proteínas</b>
B1N2Z3	Proteína ribosomal ácida 60S P0, putativa	10/21	<b>Biogénesis del ribosoma</b>
C4LSV0	Subunidad del complejo ARP2/3 de 20 kDa, putativa	10/21	<b>Polimerización de filamentos de actina</b>
<b>ETQ</b>			
B1N4A1	Grainina, putativa	9/22	<i>Unión al ion calcio</i>
C4M784	Proteína no-caracterizada Putativa	10/18	<i>Actividad catalítica</i>
C4LTM6	Proteína rica en Serina-treonina-isoleucina, putativa	8/15	<b>Componente integral de membrana</b>
C4LU65	Subunidad H ATP sintasa vacuolar, putativa	6/14	<b>Hidrólisis de ATP acoplada a transporte de protones</b>
B1N330	Proteína rica en Serina-treonina-isoleucina, putativa	6/11	<b>Componente integral de membrana</b>
C4LU31	Tioredoxina, putativa	4/8	<b>Homeostasis celular redox</b>
C4LUQ2	Glucosidasa, putativa	3/6	<b>Procesos metabólicos de carbohidratos</b>
C4LTT0	Proteinasa de cisteína,	3/6	<i>Actividad peptidasa tipo-</i>

C4LTV9	putativa Proteína no-caracterizada	3/5	<i>cisteína</i> <b>Función desconocida</b>
C4LV34	Putativa Proteína no-caracterizada	2/5	<b>Función desconocida</b>
C4LT65	Putativa Proteína de choque térmico de 70, putativa	1/4	<b>Respuesta a estrés</b>
C4M916	Copina, putativa	2/4	<i>Proteína de unión a membrana dependiente de calcio</i>
C4LX23	Proteína con dominio de Rho GAP	2/4	<b>Transducción de señales</b>
C4M6M0	Proteína no-caracterizada	1/4	<b>Transducción mediada por señal de GTPasa pequeña</b>
C4M741	Putativa Cortexillina, putativa	2/4	<b>Citocinesis</b>
<b>Quistes</b>			
C4M4Q8	Factor de transcripción nuclear, putativa	1/29	<i>Unión a DNA secuencia-específica</i>
C4M6B9	Proteína no-caracterizada	1/23	<i>Unión a RNA</i>
B1N624	Putativa Fosfotransferasa Aminoglicosida 3'- , putativa	4/16	<b>Respuesta a antibiótico</b>
C4M8Z0	Alkil sulfatasa, putativa	1/15	<i>Actividad de alkil sulfatasa</i>
C4MBE9	Proteína no-caracterizada	2/12	<b>Función desconocida</b>
C4M1F3	Putativa Proteína no-caracterizada	1/11	<b>Función desconocida</b>
C4M977	Putativa Proteína no-caracterizada	1/11	<b>Procesamiento de RNAr</b>
C4LW71	Proteína de reparación DNA mismatch PMS1, putativa	1/7	<b>Reparación mismatch</b>
C4LX70	Putativa Proteína no-caracterizada	1/5	<b>Vía de reparación de rompimiento de doble cadena</b>
C4M4W5	Putativa Proteína no-caracterizada	1/5	<b>Función desconocida</b>
C4LYB9	Putativa Proteína no-caracterizada	1/4	<b>Función desconocida</b>
C4M2G7	Putativa Proteína no-caracterizada	1/4	<i>Actividad de hidrolasa fosfórica éster</i>
B1N3D1	Proteína Tirosina-cinasa 2, putativa	1/3	<i>Unión a ATP</i>
B9U2P3	Polimerasa Organelar DNA de 1	2/3	<b>Replicación del DNA</b>
C4LV85	Proteína Centromérica E, putativa	2/3	<b>Proteína motor tipo-kinesina</b>

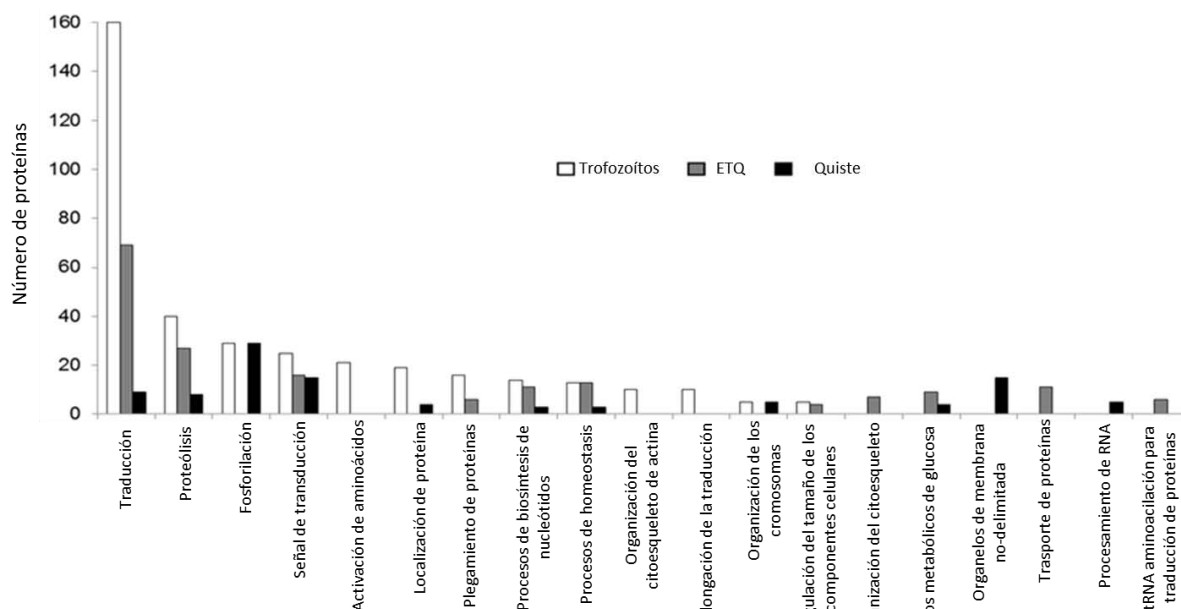
Función molecular mostrada en letra cursiva  
 Función biológica mostrada en letras resaltadas  
 Función desconocida: Función desconocida en *E. histolytica*



## 8.- Clasificación funcional de las proteínas identificadas en trofozoítos, quistes y ETQ

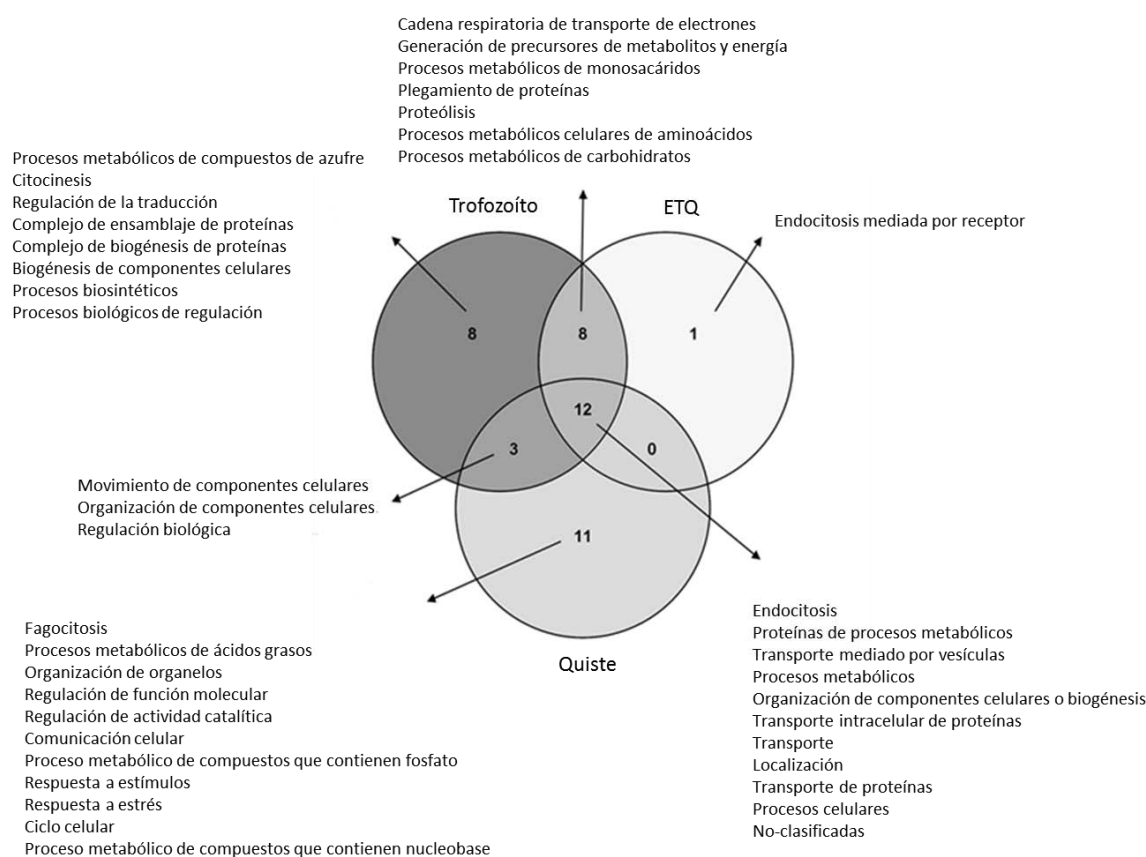
Para realizar la clasificación funcional de las proteínas identificadas en el estudio se utilizó el software DAVID. Todas las proteínas fueron agrupadas en una clasificación funcional, sin embargo, aquí se muestran las 20 clasificaciones con más proteínas agrupadas (Figura 15). Las proteínas de trofozoítos fueron clasificadas principalmente en los grupos de traducción (40%), Proteólisis (15%), Fosforilación (12%) y Transducción de señales y procesos de activación de aminoácidos (10%) (Figura 15, barras blancas).

Las proteínas de ETQ mostraron una distribución en la clasificación de sus proteínas similar a la de trofozoítos con los grupos de traducción, proteólisis y señal de transducción que agrupó cerca del 50% de las proteínas con porcentajes similares observados en los trofozoítos (Figura 15, barras grises). Finalmente, el 60% de las proteínas de los quistes se clasificaron en los grupos de Fosforilación, transducción de señales y organelos de membrana no delimitada (Figura 15, barras negras).



**Figura 15.-** Clasificación funcional de las proteínas identificadas en trofozoítos, ETQ y quistes de *Entamoeba histolytica*. La clasificación se realizó con el software DAVID. De todas las clasificaciones se seleccionaron las 20 con mayor número de proteínas agrupadas.

Se realizó un diagrama de Venn para comparar las proteínas identificadas en las 3 muestras. También se realizó un diagrama de Venn para comparar las categorías funcionales de las proteínas. En total 12 categorías funcionales se compartieron en las 3 muestras, incluidas el metabolismo, transporte y procesos de localización. Los trofozoítos y los quistes compartieron 3 categorías funcionales, mientras que los trofozoítos y las ETQ compartieron 8 categorías funcionales. Es importante mencionar que los ETQ y los quistes no compartieron ninguna categoría funcional. Además los trofozoítos, las ETQ y los quistes tuvieron 8, 1 y 11 categorías únicas, respectivamente (Figura 16).

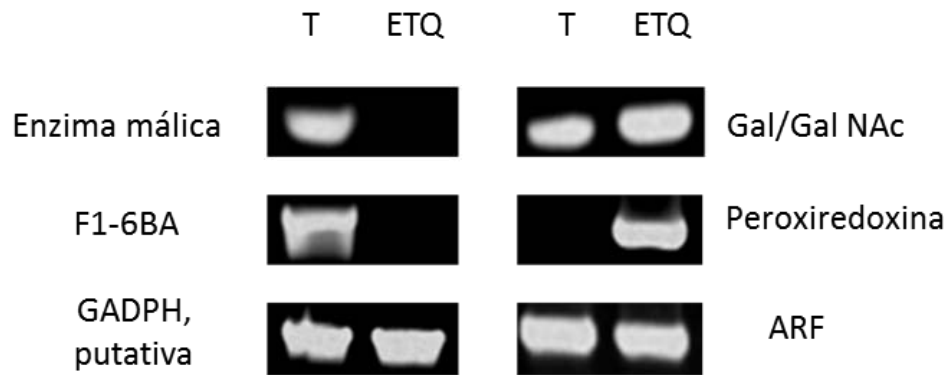


**Figura 16.-** Comparación de las categorías funcionales de trofozoítos, ETQ y quistes de *E. histolytica*. Se realizó un diagrama de Venn para comparar las categorías funcionales identificadas en cada muestra.

## 9.- Validación de proteínas identificadas en el estudio proteómico por RT-PCR

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos por espectrometría de masas, se seleccionaron 5 proteínas. Tres de éstas identificadas con menos abundancia en ETQ con respecto a trofozoítos (enzima málica, Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)) y dos proteínas identificadas más abundantes en ETQ que en trofozoítos (Peroxiredoxina, asociada a estrés oxidativo, y la lectina Gal/GalNac, asociada a enquistamiento). En concordancia con los datos proteómicos obtenidos, el RT-PCR mostró que en las ETQ no se observó el RNAm de la enzima málica y la Fructosa 1, 6-bisfosfato aldolasa, mientras que en trofozoítos ambas fueron claramente detectadas. Por otro lado, la GAPDH no mostró diferencias de expresión entre trofozoítos y ETQ (Figura 17).

Por otro lado, la expresión de la Peroxiredoxina se observó en ETQ pero no en trofozoítos, mientras que la Lectina Gal/GalNac se identificó la expresión en ambas, pero en ETQ se observó incrementada al doble de trofozoítos. De acuerdo a estudios previos, el factor de ribosilación dependiente de ADP, usado como control interno en los RT-PCR, se expresó de manera consistente en ambas muestras (Figura 17). Desafortunadamente, no logramos amplificar el RNA de quistes de ninguna de las 5 que se eligieron ni del control interno. Sin embargo, si logramos amplificar los genes ribosomales en la muestra, por lo que suponemos que el RNA estaba intacto y no se degradó. Aunque la verdadera razón por la cual el RNA de quiste no amplificó es desconocida. Consideramos que la baja cantidad de RNAm y la baja actividad metabólica del estadio de quiste no permitieron que se detectaran estos mensajeros.

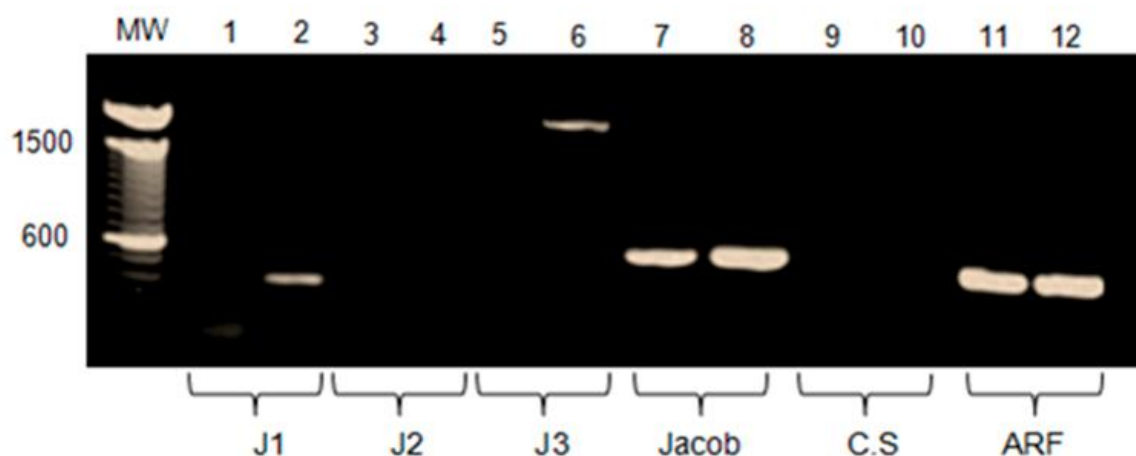


**Figura 17.-** Expresión de los RNA m de 5 proteínas seleccionadas para su validación por RT-PCR. Se realizaron RT-PCR para validar 5 proteínas seleccionadas del estudio proteómico. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos y se realizaron RT-PCR (ver materiales y métodos). F1-6BA= Fructosa 1,6-Bisfosfato aldolasa, GADPH = Gliceraldehído 3 fosfato-deshidrogenasa y ARF= Factor de ribosilación dependiente de ATP.

## 10.- Identificación de RNAm de proteínas que forman la pared del quiste en ETQ

Debido a que por LC MS/MS no logramos identificar proteínas que forman la pared del quiste. Decidimos buscar a los mensajeros de éstas para conocer su expresión. La razón principal para realizarlo fue que en primer lugar las ETQ obtenidas en nuestro laboratorio comparten características morfológicas con los quistes, incluida la forma redonda la multinucleación, pero también comparten la presencia de una pared de quitina y la sobreexpresión de la glucosamina 6-fosfato isomerasa, primera enzima en la vía de síntesis de la quitina. Aunque la subunidad de la lectina de 170 kDa si fue identificada en nuestro estudio, otras proteínas como las proteínas Jessie 1, 2 y 3; la proteína Jacob y la Chitin sintasa no fueron encontradas. Estas 5 fueron seleccionadas para su búsqueda a nivel de mensajero por RT-PCR. El gen de ARF fue utilizado como control de carga y los

trofozoítos como control negativo. Desafortunadamente por las razones mencionadas arriba los quistes no pudieron utilizarse como control positivo (Figura 18).

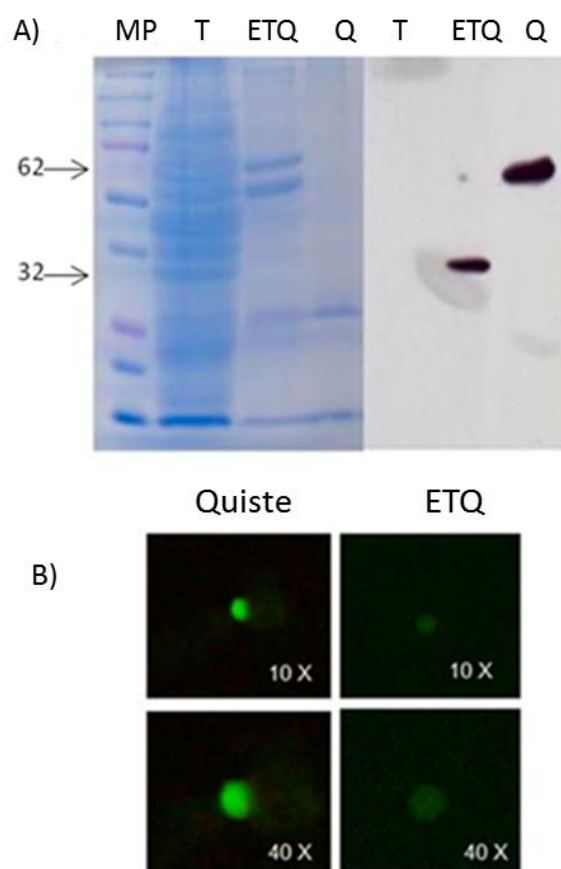


**Figura 18.-** Transcritos de RT-PCR que codifican para proteínas de la pared del quiste en trofozoítos y ETQ. El RNA fue aislado de trofozoítos y ETQ de 4h. Jessie 1 (J1), Jessie 2 (J2), Jessie 3 (J3), Proteína Jacob, Chitin sintasa (CS), ARF, Factor de ribosilación dependiente de ADP. Los números impares son muestras de trofozoítos, los números pares son muestras de ETQ

## 11.- Identificación de la proteína Jacob en ETQ

La proteína Jacob ha sido previamente reportada en quiste de *E. histolytica* (Ali IK y cols. 2015). Como se mencionó ésta proteína no fue identificada en el estudio proteómico que realizamos por lo que decidimos realizar ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia. El resultado del Western Blot mostró una única banda de aproximadamente 32 kDa en ETQ, mientras que una única banda en extractos de quistes de aproximadamente 62kDa. En el extracto de trofozoítos no se detectó ninguna banda (Figura 19).

La diferencia entre las bandas puede ser debida isoformas de la proteína Jacob, la cual ha sido reportada como altamente polimórfica entre cultivos de amibas y aislados clínicos, también se ha observado que presenta múltiples modificaciones pos-traduccionales (Van Dellen KL y cols 2006; Ghosh SK y cols. 2010). Por otro lado, la proteína Jacob también fue detectado tanto en quistes como en ETQ por inmunofluorescencia, aunque en ETQ se observó con menor intensidad que en quistes. Esto sugiere que Jacob se expresa como una isoforma diferente entre quistes y ETQ (Figura 19).



**Figura 19.-** Identificación de la proteína Jacob en ETQ y quistes. La identificación se realizó por Western Blot e inmunofluorescencia. A) 15 µg de proteína se resolvió en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirió a una membrana de PVDF. El anticuerpo primario se usó 1:1000 y el secundario acoplado a HRP se usó 1:50,000. Se observan bandas únicas a 32 y 62 kDa. En ETQ y quistes, respectivamente. T= Trofozoíto, ETQ= Estructura Tipo-Quiste y Q= Quistes. B) Se observa por inmunofluorescencia la presencia de la proteína Jacob en quistes y ETQ. El anticuerpo secundario se encontraba acoplado a FITC. Los anticuerpos se utilizaron a 1:200.

## 12.- Análisis comparativo con el proteoma publicado de quistes

En 2012, Ali IK y cols, publicaron el primer proteoma de quistes de pacientes de la India. Debido a que no existen trabajos de este estadio decidimos comparar los resultados que se obtuvieron en ese estudio con los obtenidos en nuestro análisis. En cuanto al número de proteínas identificadas los números son similares 417 proteínas que ellos identificaron contra 411 proteínas que nosotros identificamos. Sin embargo, al comparar ambos conjuntos de proteínas fue interesante descubrir que sólo compartieron 16 proteínas (Tabla 4).

Para estas 16 proteínas se investigó su localización subcelular *in silico*, utilizando el programa CELLO v2.5 (Yu CS y cols., 2004, 2006). También se identificó su porcentaje de antigenicidad de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de cada proteína empleando la escala de antigenicidad (Kolaskar As y Tongaonkar PC, 1990).

Los resultados obtenidos indican que 9 proteínas presentaron localización nuclear, 3 proteínas localizadas en citoplasma, 2 proteínas en membrana plasmática y dos con localización tanto nuclear como en membrana plasmática. Interesantemente, 3 de las 4 proteínas que presentaron localización en membrana plasmática mostraron un valor de antigenicidad de >60% y dos de estas tienen regiones transmembranales. Estas proteínas pueden considerarse con importancia para el diagnóstico que podría comprobarse con estudios posteriores (Tabla 5).

**Tabla 6.-** Proteínas identificadas como compartidas en ambos estudios

Nombre del gen	ID de Uniprot	Nombre	Localización Suclular	% Antigenicidad
EH_113570	C4M9W2	Proteína tipo-kinesina	Nuclear	43.17
<b>EH_056650</b>	<b>C4M9T0</b>	<b>Protein fosfatasa Serina/treonina-</b>	<b>Membrana Plasmática</b>	<b>57.17</b>
EH_103530	C4LVJ7	DNA primasa	Nuclear	56.31
EH_110170	C4LU71	Proteína Ubiquitina que tiene dominio de hidrolasa carboxilo-terminal	Nuclear	53.38
<b>EH_086140</b>	<b>C4M369</b>	<b>Factor de intercambio de nucleótido Ras guanina, putativa</b>	<b>Membrana Plasmática</b>	<b>63.52</b>
EH_094140	C4LYK1	Proteína activadora de GTPase Rab, putativa	Nuclear	63.29
EH_004750	C4M071	Proteína de reconocimiento de señal de partículas SRP54, putativa	Citoplasma	42.0
<b>EH_134750</b>	<b>C4M024</b>	<b>Proteína con dominio de protein tirosina</b>	<b>Membrana Plasmática y Nuclear</b>	<b>61.6</b>
EH_152390	C4LSS6	Proteína con dominio de proteína cinasa	Nuclear	63.68
EH_164910	C4M1Y4	Proteína cinasa Serina/treonina, putativa	Nuclear	50.34
EH_010740	C4LYW1	Proteína no-caracterizada Putativa	Nuclear	56.91
EH_031640	C4MBA2	Proteína no-caracterizada Putativa	Citoplasma	54.2
EH_123250	C4MAL5	Proteína no-caracterizada Putativa	Nuclear	33.7
<b>EH_146970</b>	<b>C4M8S8</b>	<b>Proteína no-caracterizada Putativa</b>	<b>Membrana Plasmática y Nuclear</b>	<b>63.58</b>
EH_148300	C4LT00	Proteína no-caracterizada Putativa	Nuclear	48.65
EH_193490	C4M4V1	Proteína Haloácida con dominio tipo-dehalogenasa	Citoplasma	56.19

**Las proteínas resaltadas en negrita tienen el mayor % de antigenicidad**

Además de los análisis que se realizaron con las proteínas anotadas, un 40% de las proteínas fueron clasificadas como hipotéticas. Con la intención de buscar las posibles



funciones biológicas o moleculares de estas proteínas realizamos un estudio *in silico* utilizando la prueba bioinformática Argot 2 (Fontana P y cols., 2009; Falda M y cols., 2012; Radivojac P y cols., 2013). Aunque se obtuvieron muchas posibles funciones para las proteínas hipotéticas, en la Tabla 7, se resumen las funciones biológicas y moleculares que agruparon 3 o más proteínas.

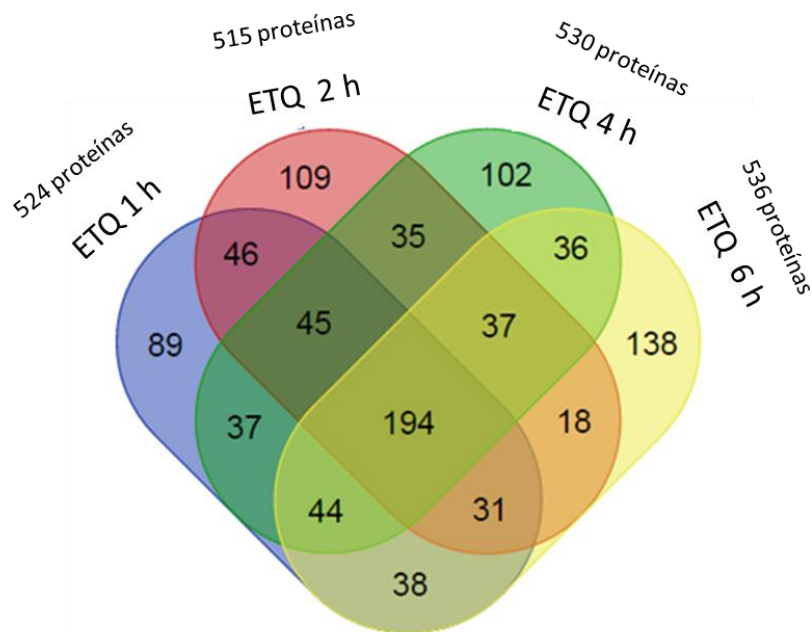
**Tabla 7.-** Posibles funciones biológicas y moleculares de proteínas hipotéticas identificadas con Argot 2

<b>Procesos Biológicos para proteínas hipotéticas</b>	<b>Procesos Moleculares para proteínas hipotéticas</b>
Procesos Metabólicos	Actividad de hidrolasa
Regulación positive de actividad de GTPasa	Unión a ATP
Señal de transducción mediada por GTPasa pequeña	Unión a DNA
Fosforilación	Actividad de factor de intercambio de nucleótido Guanil
Ensamblaje del nucleosoma	Unión al ion Zinc
Fosforilación de proteínas	Unión a los iones metálicos
Señal de transducción	Actividad de Transferasa , transfiriendo grupos fósforo
Reparación de rompimiento de doble cadena	Actividad de cinasa
Procesamiento de RNAr	Unión a ácidos nucleicos
	Unión a nucleótidos
	Proteína con actividad de serina/treonina
	Unión a RNA
	Actividad de Transferasa

### Objetivo 3.- Comparación proteómica de ETQ obtenidas a distintos tiempos de inducción

#### 13.- Análisis proteómico comparativo de la inducción de ETQ (1, 2, 4 y 6 h)

Con la finalidad de observar los cambios proteómicos durante el tiempo de inducción de los trofozoítos a ETQ, se realizó un estudio comparativo de las proteínas en los tiempos 1, 2, 4 y 6 h. Las bandas con los extractos totales de cada proteína se enviaron a los laboratorios proteómicos de la universidad de Yale, New Heaven (<https://medicine.yale.edu/keck/proteomics/>). Se identificaron 524 proteínas, 515 proteínas, 530 proteínas y 536 proteínas, en los tiempos 1, 2, 4 y 6 h, respectivamente. Aunque el número de proteínas fue constante entre los tiempos, si se observaron diferencias respecto a las proteínas compartidas y las proteínas únicas entre los tiempos (Figura 20).



**Figura 20.-** Comparación de proteínas entre los 4 tiempos de inducción de las ETQ. Se realizó un estudio proteómico comparativo entre los tiempos 1,2 4 y 6 horas. En la figura se observan los sobrelapamientos que representan a las proteínas compartidas entre los diferentes tiempos analizados. ETQ= Estructuras Tipo Quiste.

Para realizar la comparación de proteínas de los 4 conjuntos de proteínas, se utilizó el software Bioinformatics and Evolutionary Genomics, para generar un diagrama de Venn. Un total de 194 proteínas se compartieron entre los 4 tiempos, 35 de estas proteínas son hipotéticas. Dentro de las proteínas compartidas se encuentran proteínas de metabolismo, de síntesis de proteínas, señalización celular, transducción de señales y proteínas asociadas a respuesta a estrés oxidativo (Figura 20). La lista completa de las 194 se encuentra en el anexo 1.

El número de proteínas diferentes en los 4 tiempos fue de 999. Las proteínas únicas en cada tiempo (1, 2, 4 y 6 horas) fueron 89, 109, 102 y 138, respectivamente. Es interesante observar como el número de proteínas únicas va aumentando del tiempo 1 h al de las 6 horas (Ver anexo 1).

Se compararon las 15 proteínas más abundantes de cada tiempo, para determinar el cambio en la abundancia relativa de proteínas, es decir cuáles proteínas aumentaban su abundancia y cuales disminuían. Las principales diferencias se observaron en proteínas de metabolismo y asociadas a estrés oxidativo (Tabla 8). La abundancia relativa de las proteínas se determinó con el software MASCOT, el cual es mostrado como el valor Empai.

**Tabla 8.-** Las 15 proteínas más abundantes de cada tiempo

Proteínas más abundantes de ETQ a 1h

ID Proteína	Nombre de la proteína	PM	% Cobertura	Empai
M2R6E8	Actina 2, putativa	7081	64.7	135.78
S0AXW0	Actina	41931	72.1	30.45
S0AV15	Actina, putativa	41962	62.8	16.7
<b>C4LVR9</b>	<b>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, putativa</b>	<b>35991</b>	<b>63.8</b>	<b>8.9</b>
<b>Q24801</b>	<b>Piruvato fosfato dikinasa</b>	<b>97836</b>	<b>54.6</b>	<b>6.6</b>
S0AYY0	Factor de elongación alfa 1	48490	46.4	4.93
Q7JN53	Ubiquitina	7845	64.3	4.09
<b>C4M213</b>	<b>Malato deshidrogenasa, putativa</b>	<b>40418</b>	<b>37.5</b>	<b>4.05</b>
P31018	Factor de elongación alfa 1	47234	46.7	3.63
C4LUM3	Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH	39190	57.1	3.45
<b>Q8MTW2</b>	<b>Fructosa 1,6 Bisfosfato aldolasa, putativa</b>	<b>35806</b>	<b>49.4</b>	<b>3.21</b>
C4M230	Alcohol deshidrogenasa, putativa	95511	51.6	3.14
<b>C4M192</b>	<b>Fosfoglicerato cinasa, putativa</b>	<b>44837</b>	<b>40.2</b>	<b>2.99</b>
C4LUQ9	Calmodulina, putativa	17400	54.9	2.86
<b>O02611</b>	<b>Triosa fosfato isomerasa</b>	<b>27952</b>	<b>49.4</b>	<b>2.83</b>

Proteínas más abundantes de ETQ a 2h

ID Proteína	Nombre de la Proteína	PM	% Cobertura	Empai
M2R6E8	Actina2,putativa	7081	64.7	54.93
A0A060N6N9	Actina, putativa	42045	72.9	16.57
S0AV75	Actina ,putativa	42022	66	12.74
M2S7R7	Alkil hidroperóxido reductasa putativa	9050	54.3	11.11
S0AV15	Actina, putativa	41962	62.2	9.82
<b>A0A060N580</b>	<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa putativa</b>	<b>36019</b>	<b>61.7</b>	<b>8</b>
<b>Q24801</b>	<b>Piruvato fosfato dikinasa</b>	<b>97836</b>	<b>57.9</b>	<b>6.6</b>
S0AVT2	Actina, putativa	42255	62.2	6.07
C4MAC9	Factor de elongación alfa 1	48391	40	4.16
P31018	Factor de elongación alfa 1	47234	43.7	3.63
C4M230	Alcohol deshidrogenasa, putativa	95511	57.1	3.45
O15729	Ciclofilina	18127	38.3	3.43
<b>S0AW06</b>	<b>Enolasa putativa</b>	<b>47357</b>	<b>52.1</b>	<b>2.99</b>
C4LZ42	Proteína ribosomal 40Sr18,putativa	17651	41.9	2.8
<b>S0AUQ3</b>	<b>Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa</b>	<b>36151</b>	<b>51.2</b>	<b>2.78</b>

Proteínas más abundantes de ETQ a 4h

ID Proteína	Nombre de la proteína	PM	% Cobertura	Empai
M2R6E8	Actina 2,putativa	7081	64.7	135.78
S0AUT4	Actina ,putativa	42031	63.3	27.72
S0AV15	Actina, putativa	41962	54	15.31
C4LYM3	Proteína hipotética	15150	37.8	10.42
<b>A0A060N580</b>	<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa putativa</b>	<b>36019</b>	<b>61.7</b>	<b>5.75</b>
<b>Q24801</b>	<b>Piruvato fosfato dikinasa</b>	<b>97836</b>	<b>53.2</b>	<b>5.59</b>
O15729	Ciclofilina	18127	46.7	5.43
<b>Q8MTW2</b>	<b>Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa</b>	<b>35806</b>	<b>58.6</b>	<b>4.61</b>
S0AXT3	Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH	39164	55.5	4.3
<b>C4M6Z7</b>	<b>Triosa fosfato isomerasa</b>	<b>28081</b>	<b>59.4</b>	<b>3.86</b>
C4M230	Alcohol deshidrogenasa, putativa	95511	53.6	3.79
<b>A0A060N6J4</b>	<b>Fosfoglicerato cinasa, putativa</b>	<b>44721</b>	<b>46.7</b>	<b>3.67</b>
P49230	Profilina	13228	20.8	3.52
C4M7N8	Proteína ribosomal 40Sr 17,putativa	13596	53	3.36
C4MAC9	Factor de elongación alfa 1	48391	40	3.17

Proteínas más abundantes de ETQ a 6h

ID Proteína	Nombre de la proteína	PM	% Cobertura	Empai
M2R6E8	Actina 2, putativa	7081	64.7	54.93
S0AXW0	Actina	41931	65.4	30.45
S0AV15	Actina, putativa	41962	61.7	21.65
	<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</b>			
<b>A0A060N580</b>	<b>putativa</b>	<b>36019</b>	<b>66.2</b>	<b>9.89</b>
<b>Q24801</b>	<b>Piruvato fosfato dikinasa</b>	<b>97836</b>	<b>54.2</b>	<b>7.45</b>
Q24841	Antígeno M 30,000	24437	44	7.09
<b>S0AW06</b>	<b>Enolasa, putativa</b>	<b>47357</b>	<b>58.9</b>	<b>6.68</b>
<b>P42650</b>	<b>Proteína 14-3-3-3, parcial</b>	<b>27038</b>	<b>55.1</b>	<b>4.84</b>
P19476	Proteína periférica de membrana	31148	36.6	4.79
<b>Q8MTW2</b>	<b>fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa</b>	<b>35806</b>	<b>46.6</b>	<b>4.61</b>
C4LVG4	Actoporina, putativa	15692	39.9	4.54
<b>O02611</b>	<b>Triosa fosfato isomerasa</b>	<b>27952</b>	<b>55.2</b>	<b>4.53</b>
O15729	Ciclofilina	18127	50.9	4.34
C4MAC9	Factor de elongación alfa 1	48391	62.2	4.16
M7WPS1	Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH	95539	54.1	3.78

**Proteínas resaltadas en negro son discutidas en el texto.**

Para proteínas de metabolismo como la Gliceraldehído 3-Fosfato deshidrogenasa, putativa (A0A060N580) y la malato deshidrogenasa (C4M213), la abundancia relativa disminuye al aumentar el tiempo de inducción. La proteína Enolasa (S0AW06) tiene una abundancia relativa mayor en los tiempos de 2h y 6h, aunque a 4h también está presente no se encuentra dentro de las 15 proteínas más abundantes. En el caso de la enzima Piruvato fosfato dikinasa (Q24801) la abundancia relativa de la proteína fluctuó durante los 4 tiempos de inducción, en el tiempo 1 y 2 h se mantuvo igual en el tiempo de 4h disminuyó y en el tiempo de 6 h aumentó su abundancia. La actina (S0AXW0) disminuyó su expresión

del tiempo de 1h hasta las 4h y después aumentó. De manera interesante la proteína 14-3-3-3 (P42650), que se ha asociado a diferenciación apareció dentro de las 15 más abundantes en el tiempo de 6h.

En general, observamos que muchas proteínas fluctúan a lo largo de los tiempos de inducción de diferente forma. Mientras algunas disminuyen, otras aumentan su abundancia relativa durante esos tiempos, suponiendo la posibilidad de que participen activamente en el proceso de diferenciación del parásito a ETQ. Estos resultados complementan toda la evidencia que se ha encontrado con los estudios proteómicos mostrados.

#### **14.- Validación de resultados proteómicos por RT-PCR de los tiempos de inducción de las ETQ (1, 2, 4 y 6h)**

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos en el estudio proteómico de la inducción de las ETQ en 4 tiempos, se seleccionaron 19 genes cuya expresión se evaluó por RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se encuentran en la tabla 9. Se seleccionaron 3 proteínas asociadas a estrés oxidativo, 6 proteínas asociadas a metabolismo, 3 enzimas de la vía de quitina (la vía en teoría tiene 5 pero un gen no se encontró en el genoma de en la amiba) y las 7 proteínas estadio-específicas en quistes identificadas en el estudio anterior (objetivo 2).



**Tabla 9.-** Oligonucleótidos utilizados en la validación de 19 genes en el estudio de Inducción de las ETQ.

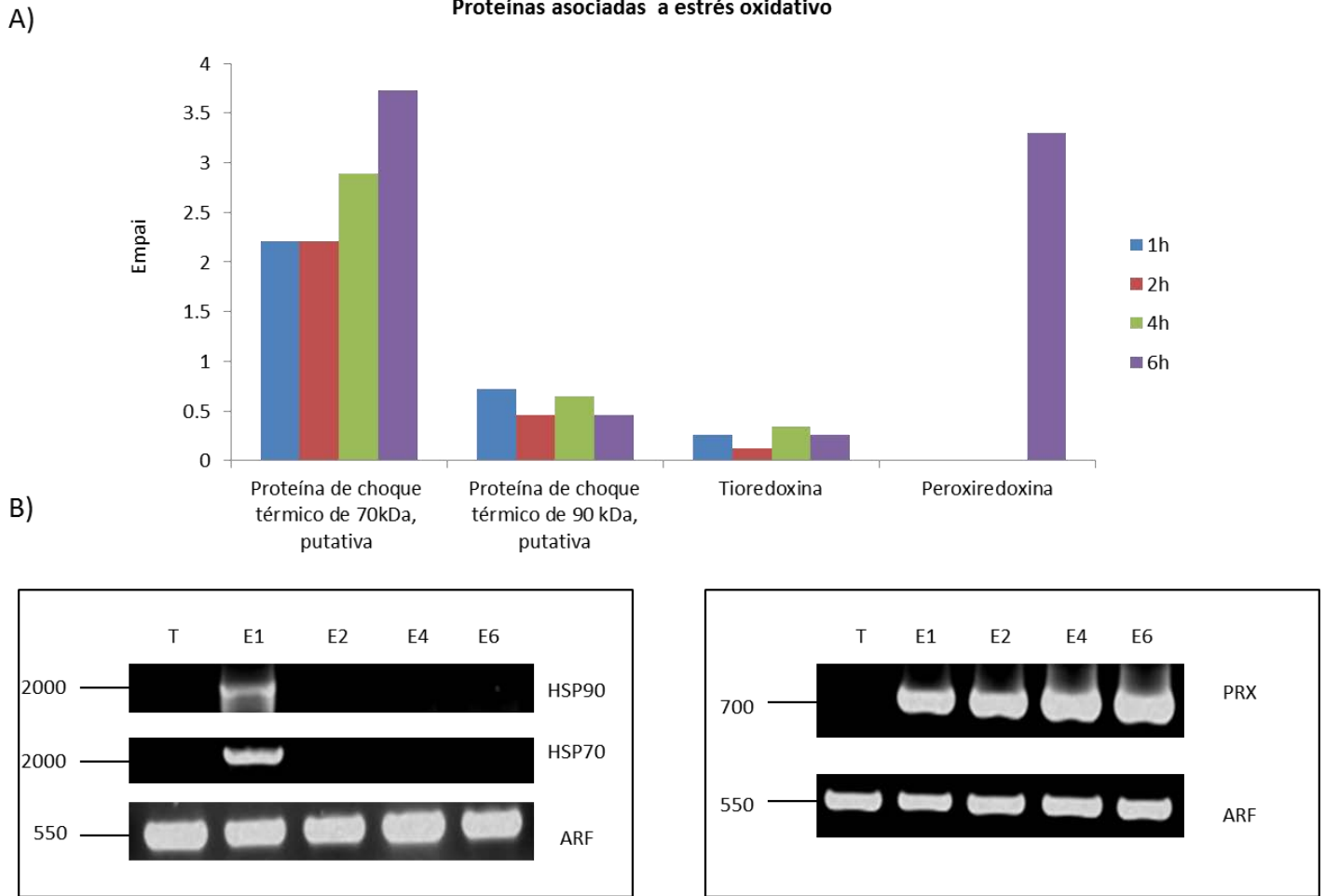
<b>Proteína</b>	<b>Oligonucleótido Forward/ Oligonucleótido Reverse</b>	<b>T° M (°C)</b>	<b>Tamaño del amplificado (pb)</b>
gi 183231176 Enolasa, putativa	5' ATGTCAATTCAAAAGTTCATGC 3' 5' AGCAGTTGAATTTCTCCAGTTC 3'	62	400
gi 183232198 Fosfoglicerato cinasa, putativa	5' ATGGGATTTACTAAAAAGAGTC 3' 5' TTCAGCATCATCAAGGTTAGC 3'	59	1,200
gi 183231505 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, putativa	5' ATGTCAATTAAGGTTCGGTATTA 3' 5' ATGAACTTTAGAAATGATTTGGA 3'	58	1,000
gi 67469316 DNA mismatch repair protein PMS1, putative	5' ATGACTACAATTCATATTATGG 3' 5' CTTTGTTCCTTTGCAATTCA 3'	56	300
gi 67474796 Proteína de choque térmico de 90 kDa, putativa	5' ATGGGAAATAGAAAAGATCAATC 3' 5' ATCAACTTCTCCATCTTTGAAT 3'	60	2,000
gi 183236093 Peroxiredoxina	5' ATGTCTTGCAATCAACAAAAAG 3' 5' TCTTGTGGTTTAAATGTTGTAA 3'	58	700
gi 183231170 Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, putativa	5' ATGGCTGCTAAGACTGTAAAC 3' 5' ATACCATGATTTCTCTGCTGAG 3'	61	1,000
gi 67477033 Proteína de choque térmico de 70, putativa	5' ATGAGTTTACAAGAATTAAG 3' 5' TTCAGAATTTTGTATGTAAGG 3'	54	2,000
gi 67465032 Glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa, putativa	5' ATGACCAGTATTTGTTCTGT 3' 5' TTTATTAAGTAAATAGCCATAC 3'	55	470
gi 67479968 UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, putativa	5' ATGACTTATCAACCAGTTGA 3' 5' CTGAAGAATAAAAGGAAGTTG 3'	55	1,200
gi 183233197 Factor de transcripción nuclear, putativa	5' ATGTTTAGTGCTTCTGACAC 3' 5' ACATGGAGGTTGAGGTGG 3'	56	450
gi 67466584 Proteína hipotética 1, conservada	5' ATGACAAACAACCCATCAGTA 3' 5' ATTTAAAACCTTTGGTTTTTC 3'	60	1,400
gi 67477700 Proteína hipotética 2	5' ATGAGCGAACAAGAAGTTTTG 3' 5' CATTAATGCATCAACAGATGAA 3'	58	1,900
gi 67475221 glucosamina-6-fosfato isomerasa, putativa	5' ATGTCATCCACAAACGAAAATA 3' 5' AATAGACATGGATTTATCATATC 3'	58	700
gi 67470373 alkil sulfatasa, putativa	5' ATGGCAAGTCAATTTACTTG 3' 5' GTTATTTGGTTCTATAAGAGT 3'	54	800
gi 183235967 protein hipotética 3	5' ATGAATATTGTATTACTTCTATT 3' 5' GAGAATTATCATCATTATTCC 3'	54	900
gi 67464744 Proteína hipotética 4	5' ATGACTACAATCAAAGAAATG 3' 5' ACACCATTGCACTGCTATT 3'	54	900

gi 183230162 Enzima málica	5' ATGGCACAATTAAGCAG 3' 5' TTTCCAGTGACTTTGTAA 3'	52	1500
gi 67481663 Subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc	5' ATGAAATTATTATTAAATATC 3' 5' TCCATTGTAAGTAGCTGC 3'	52	700

#### 14.1.- Proteínas asociadas a estrés oxidativo

En total fueron seleccionadas 3 proteínas asociadas a estrés oxidativo, las proteínas de choque térmico de 70 y 90 kDa y la peroxiredoxina (gi|67477033, gi|67474796, gi|183236093). Se comparó la presencia de las proteínas entre los 4 tiempos y la expresión del RNAm.

Se identificó un aumento en la expresión del mensajero de las proteínas de choque térmico 70 y 90 a la hora, comparado con el control, consistente con el aumento en la presencia de la proteína en ese tiempo. En los otros tiempos no se observa expresión del mensajero y a nivel de proteína se observa un aumento de la HSP70 y una disminución de la HS90, lo que sugiere que esas proteínas se expresan rápidamente como consecuencia del estrés por el peróxido de hidrógeno, manteniéndose la HSP70. En el caso de la peroxiredoxina se observa un aumento en la expresión del mensajero tiempo-dependiente que se manifiesta a nivel de proteína sólo claramente a las 6h comparado con los otros tiempos. Al contrario de las HSPs y de la peroxiredoxina, la tioredoxina no mostró cambios en abundancia de proteína durante los 4 tiempos analizados. Aunque esta enzima no se analizó a nivel de mensajero (Figura 21).

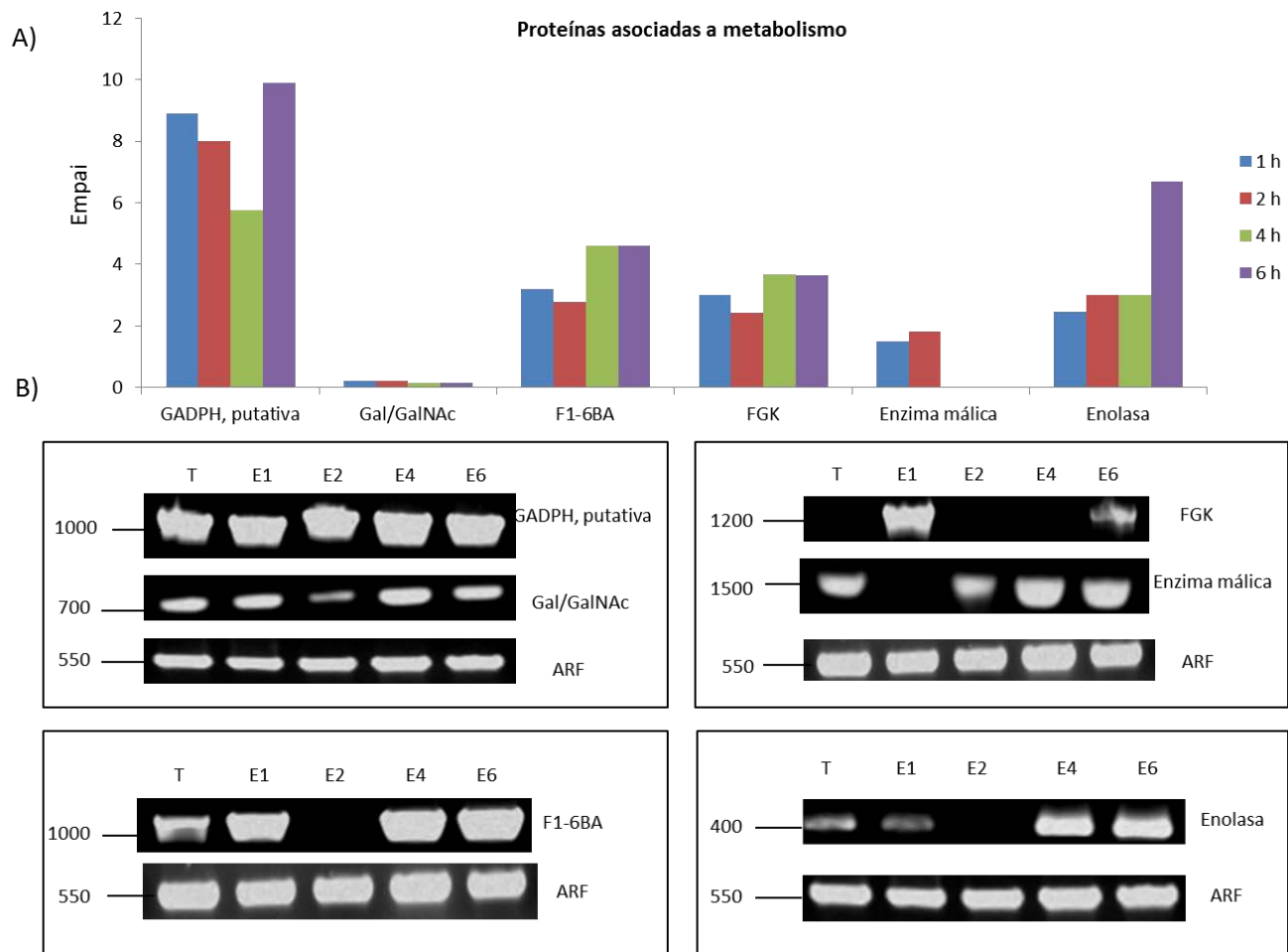


## 14.2.- Proteínas asociadas a metabolismo

De las proteínas de metabolismo identificadas en el estudio, 6 fueron seleccionadas para realizar los ensayos de validación por RT-PCR. Las proteínas seleccionadas fueron la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, el fragmento de LC-3 de la lectina Gal /Gal NAC, la fructosa 1,6-Bisfosfato aldolasa, la Fosfoglicerato cinasa, la enzima málica y la Enolasa (gi|67481663, gi|183231170, gi|183232198, gi|183230162, gi|183231176, respectivamente).

En cuanto a la proteína Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa disminuyó su abundancia relativa del tiempo de 1 h hasta 4 h y a las 6 h aumentó más que el tiempo de 1 h. El fragmento de la Gal/Gal NAc no mostró diferencias entre los tiempos pero si una tendencia a disminuir su abundancia al paso del tiempo. Las proteínas Fructosa 1,6 bisfosfato aldolasa y la Fosfoglicerato cinasa mostraron una tendencia a incrementar con el paso del tiempo, a pesar de una leve disminución al tiempo de 2h y luego un aumento en los tiempos de 4 y 6h. Los datos de GADPH, Gal/Gal NAc y F1,6BA correlacionan con los resultados de los RT-PCR (Figura 22). Sin embargo, en el caso de la Fosfoglicerato cinasa se observó un claro aumento del mensajero a la hora y luego cayó totalmente para volver a expresarse moderadamente a las 6 h, a diferencia de la proteína que mostró aumento en la abundancia a las 4 h (Figura 22).

Por otro lado, la enzima málica aumentó a las 2h y ya no fue detectada a las 4 y 6 h, mientras que el mensajero disminuyó a 1 y 2 h con respecto a los trofozoítos, para luego aumentar por encima de éstos a las 4 y 6 h. De manera interesante la Enolasa presentó un aumento tiempo-dependiente en la abundancia de la proteína que correlaciona sólo con el aumento en la expresión del mensajero evidente a las 4 y 6h de inducción de las ETQ. Estos resultados suman evidencia a todo lo ya descrito (Figura 22).



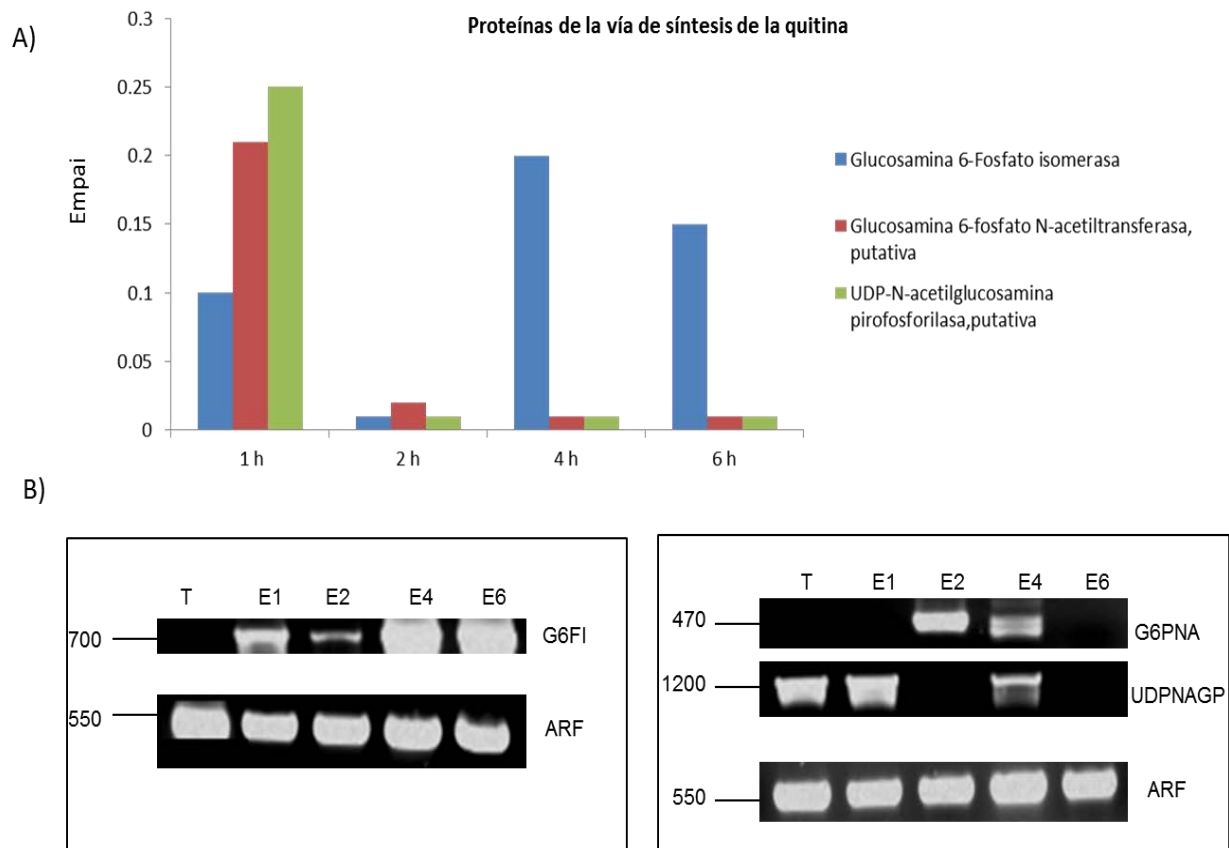
**Figura 22.-** Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h). A) Se observa la comparación en la abundancia relativa de las proteínas durante el tiempo de inducción. B) Se observa la expresión del RNAm durante la inducción de las ETQ. El RNA de trofozoítos y ETQ fue extraído con el kit Direct-zol RNA Miniprep. Se utilizaron 300ng para reacciones de 25 $\mu$ l. T= Trofozoítos, E1: ETQ 1hora, E2: ETQ 2horas, E4: ETQ 4horas, E6: ETQ 6 horas., GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, Gal/GalNac: Fragmento LC3 de la lectina Gal/Gal Nac, F1-6BA: Fructosa- 1,6 Bisfosfato aldolasa, FGK: Fosfoglicerato cinasa, ARF: Factor de Ribosilación.

### 14.3.- Proteínas asociadas a la vía de síntesis de la quitina

En el caso de las proteínas asociadas a la vía de síntesis de la quitina se eligieron 3 de las 5 de la vía. De las 2 que no se seleccionaron una no se encuentra en el genoma de *E. histolytica*. Las enzimas seleccionadas fueron la glucosamina 6 fosfato isomerasa, la glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa y la UDP N-acetil glucosamina pirofosforilasa (gi|67475221, gi|67465032, gi|67479968, respectivamente).

La glucosamina 6 fosfato isomerasa tiene una abundancia y expresión de mensajero dosis dependiente y que correlacionan claramente. Aunque parece que a las 2 horas disminuye su abundancia y expresión, ésta aumenta el doble en los tiempos de 4 y 6 h comparado con el de 1 h (Figura 23, barras azules). Este resultado correlaciona con el aumento en la expresión de esta enzima previamente reportado para ETQ de 4h (Aguilar-Díaz y cols., 2010). Por otro lado, la enzima glucosamina 6 fosfato N acetil Transferasa presenta una abundancia relativa mayor en la primera hora y después ésta disminuye considerablemente. En el caso de su mensajero parece que se expresa a las 2 h y disminuye un poco a las 4h. No se detectó mensajero de G6PNA a 1 y 6 h (Figura 23, barras rojas).

Finalmente, para la enzima UDP N-acetil glucosamina pirofosforilasa parece que tanto la abundancia de la proteína, como la expresión del mensajero disminuyen a lo largo de los tiempos de inducción de las ETQ (Figura 23).



**Figura 23.-** Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h). A) Se observa la comparación en la abundancia relativa de las proteínas durante el tiempo de inducción. B) Se observa la expresión del RNAm durante la inducción de las ETQ. El RNA de trofozoítos y ETQ fue extraído con el kit Direct-zol RNA Miniprep. Se utilizaron 300ng para reacciones de 25µl. T= Trofozoítos, E1: ETQ 1hora, E2: ETQ 2horas, E4: ETQ 4horas, E6: ETQ 6 horas. G6Pi: Glucosamina 6 fosfato isomerasa, G6PNA: Glucosamina 6-fosfato N-acetil Transferasa, UDPNAGP: N- acetil glucosamina pirofosforilasa, ARF: Factor de Ribosilación.

#### **14.4.- Determinación de la expresión del RNAm de proteínas estadio-específicas de quistes**

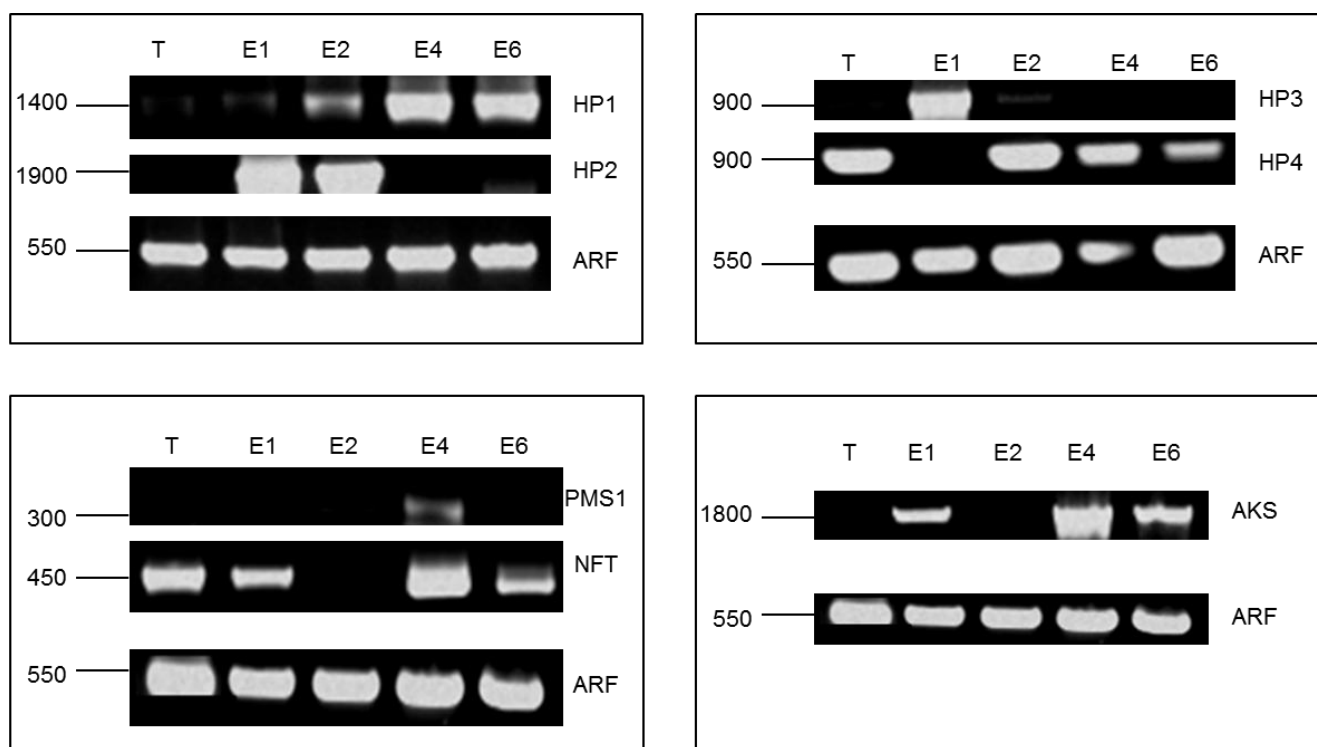
Previamente identificamos proteínas estadio-específicas en quistes que, además mostraron la abundancia relativa más alta. Nuestro objetivo fue identificar la expresión de los mensajeros durante los tiempos de inducción de las ETQ. En total se seleccionaron 7 proteínas de quiste 4 con estatus de proteínas hipotéticas y 3 anotadas: la proteína de reparación mismatch, el Factor nuclear de transcripción y la alkil sulfatasa (gi|67466584, gi|67477700, gi|183235967, gi|67464744, gi|67469316, gi|183233197, gi|67470373, respectivamente).

De las 4 proteínas hipotéticas exclusivas de quiste de acuerdo al análisis proteómico previo, 3 no amplificaron en trofozoítos, lo que era de esperarse. Sin embargo, la proteína hipotética 4 sí se encontró expresada en trofozoíto y la razón de esta incongruencia se desconoce. Los resultados mostraron que el aumento en la expresión de la proteína hipotética 1 resultó tiempo dependiente. Para la proteína hipotética 2, la expresión sólo se observó a los tiempos de 1 y 2 h. La proteína hipotética 3 se expresó intensamente a la hora de inducción de las ETQ, disminuyó hasta ser casi imperceptible a las 2 h y no se vio expresión a las 4 y 6 h. Por su parte, la proteína hipotética 4 que se expresa basalmente en trofozoítos, dejó de expresarse a las 2 h de inducción de las ETQ para luego regresar a los niveles basales a las 2 h y después disminuir de nuevo su expresión a las 4 y 6 h (Figura 24).

Por otro lado, el mensajero de la proteína de reparación mismatch (gi|67469316) sólo se expresó a las 4h (Figura 24), el tiempo en el que se ha reportado que se obtiene el mayor número de ETQ después del tratamiento con peróxido de hidrógeno. En el caso del Factor de transcripción nuclear, éste fue claramente detectado en trofozoítos, lo que no correlaciona con la exclusiva identificación de la proteína de quiste. En ETQ, NFT no se expresó a las 2h de inducción, mientras que a las 4 h aumentó mucho su expresión y disminuyó a las 6 h a un nivel comparable con el tiempo de 1h de inducción. Finalmente,



la alquil sulfatasa mostró un comportamiento similar en la expresión de su mensajero a la del Factor de transcripción nuclear, aunque a diferencia del NTF, éste no se expresó en trofozoítos (Figura 24).



**Figura 24.-** Comparación a nivel de proteína de expresión de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la inducción de ETQ (1h, 2h, 4h, 6h). A) Se observa la comparación en la abundancia relativa de las proteínas durante el tiempo de inducción. B) Se observa la expresión del RNAm durante la inducción de las ETQ. El RNA de trofozoítos y ETQ fue extraído con el kit Direct-zol RNA Miniprep. Se utilizaron 300ng para reacciones de 25µl. T= Trofozoítos, E1: ETQ 1hora, E2: ETQ 2horas, E4: ETQ 4horas, E6: ETQ 6 horas. HP1: Proteína hipotética 1 HP2: Proteína hipotética 2, HP3: Proteína hipotética 3, Proteína hipotética 4, PMS1: Proteína de reparación mismatch, NFT: Factor de transcripción nuclear, AKS: Alkil sulfatasa, ARF: Factor de Ribosilación.

## VIII.- Discusión

La diferenciación es un proceso indispensable en el ciclo de vida de muchos parásitos, por lo que, el mantenimiento de cultivos *in vitro* de las diferentes fases es indispensable para realizar estudios de la biología básica de los parásitos. En el caso de *E. histolytica*, el proceso de enquistamiento no ha sido estudiado a detalle debido, en gran medida, a la dificultad para tener un modelo de obtención y/o mantenimiento *in vitro* de los quistes. Sólo los trofozoítos han sido mantenidos en cultivo en el laboratorio, razón por la cual la mayoría de los trabajos ómicos llevados a cabo en este parásito se han realizado en el estadio de trofozoíto.

Este es el primer trabajo en el que se reporta un análisis proteómico de una fase de resistencia de *E. histolytica* obtenida *in vitro* (Estructuras Tipo Quiste o ETQ) y previamente reportada en nuestro grupo (Aguilar-Díaz H y cols., 2010). Ya que no existe un método reproducible para lograr el enquistamiento de *E. histolytica in vitro*, hasta ahora sólo se ha usado el parásito de reptiles *Entamoeba invadens* como un modelo para inferir lo que ocurre en *E. histolytica*. Sin embargo, nosotros creemos que existen diferencias no sólo en los estímulos, sino también en cómo se puede llevar a cabo la diferenciación de estos dos parásitos, diferencias que como ya se mencionaron arriba también podrían involucrar al huésped, por lo que el estudio de las ETQ de *E. histolytica* podrían arrojar información en el proceso de enquistamiento de la amiba humana. En el presente trabajo, llevamos a cabo por primera vez un estudio ómico que incluyó una comparación de los perfiles de proteínas entre trofozoítos, quistes y ETQ de *E. histolytica* utilizando LC-MS/MS, con la finalidad de determinar la verdadera naturaleza de las ETQ (fase intermedia de enquistamiento o pseudoquiste). También se realizó el estudio del perfil de proteínas de la inducción de las ETQ a los tiempos de 1,2, 4 y 6 horas.

Cuando se compararon los 3 proteomas obtenidos en general se observó que en los trofozoítos se identificaron más del doble de proteínas que en quistes y en ETQ. Estos resultados son consistentes con lo que ya se sabe del trofozoíto acerca de que es un estadio metabólicamente activo, a diferencia del quiste que es un estadio de latencia con un metabolismo disminuido (Figura 13) (Ali IK y cols., 2012). El número de proteínas compartidas entre las tres fases sólo fue de 74, algo de esperarse al comparar estadios tan diferentes como lo es el de trofozoíto y quiste. Sin embargo, fue interesante identificar muchas más proteínas compartidas entre los trofozoítos y las ETQ, que entre las ETQ y los quistes (Figura 13). Así, el estudio de correlación de todos los péptidos identificados en cada muestra mostró que las fases que más correlación tienen son los trofozoítos con las ETQ, mientras que ambas están poco relacionadas con los quistes (Figura 14). En un principio este resultado nos pareció sorprendente, sin embargo, fue consistente con el número de proteínas identificadas como compartidas entre las 3 muestras. De entrada, estos resultados sugieren que las ETQ, a pesar de ser una estructura de resistencia, comparten la mayoría de sus proteínas con los trofozoítos y dista mucho de parecerse a un quiste en su composición proteica.

El análisis detallado del proteoma de cada muestra demostró, sin embargo, que cada estadio tiene sus particularidades. Así, en los trofozoítos identificamos 1,029 proteínas, lo que equivale al 12% de los marcos de lectura abiertos (ORF) predichos en el genoma disponible del parásito (MacFarlane RC y cols., 2005, 2006; Loftus B y cols., 2005; Lorenzi HA y cols., 2010). De ese total, aproximadamente el 40% son proteínas asociadas a traducción. También las proteínas asociadas a proteólisis, fosforilación y transducción de señales fueron identificadas dentro de las más representativas. Dentro de las enzimas asociadas a metabolismo se encontraron: la fructosa- 1,6-bisfosfato aldolasa, alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP-1, y la fosfoglicerato cinasa. Previamente, éstas enzimas habían sido descritas como los spots más prominentes en separación de proteínas de trofozoítos por 2-D (Leitsch D y cols., 2005y 2006).

La actina fue identificada como una proteína compartida entre las tres muestras y con el mayor número de péptidos-hits, aunque en diferente abundancia; particularmente se encontró disminuida en quistes y ETQ al compararla con los trofozoítos (Ver tablas 4 y 8). De hecho se identificaron 24 diferentes proteínas de actina que están como proteínas anotadas, dieciocho de ellas como actinas putativas. Las 24 entradas para actina corresponden a secuencias diferentes entre ellas en al menos 1 aminoácido. Este hallazgo coincide con el realizado en un estudio del proteoma del trofozoíto por 2-D, en donde el spot de la actina resultó el más prominente (Leitsch D y cols., 2005).

La actina junto con otras proteínas de citoesqueleto permite la motilidad del trofozoíto, y procesos de fagocitosis, pero también podría estar involucrada en procesos de rearrreglos del citoesqueleto y transporte de materiales hacia el exterior, lo que hablaría de su participación en procesos de diferenciación, incluido el enquistamiento o la entrada a una fase provisional de resistencia (Manning-Cela R y cols., 1994; Mansuri MS y cols., 2014).

Estudios transcriptómicos han mostrado que los trofozoítos en condiciones de cultivo expresan genes asociados a virulencia y a patogenicidad, así como, proteínas asociadas a transducción de señales (Ehrenkauf G y cols., 2007); además estudios proteómicos de trofozoítos han identificaron proteínas asociadas a citoesqueleto, glicólisis, metabolismo de glicógeno y proteínas asociadas a superficie. De igual forma, en nuestro estudio identificamos proteínas de citoesqueleto (principalmente a la actina) y una variedad de proteínas de metabolismo, incluidas las proteínas que participan en la vía de glicólisis (Biller L y cols., 2014; Buss SN y cols., 2010; Tolstrup y cols., .2006,). Todos estos datos han confirmado que el trofozoíto es un estadio metabólicamente activo. Interesantemente, en cepas de *E. histolytica* se reportaron diferencias de expresión en proteínas asociadas a virulencia y patogenicidad como: la peroxiredoxina y la alcohol deshidrogenasa 3 (Davis y cols., 2006 y 2009). En nuestro estudio, se identificaron a ambas proteínas presentes con una abundancia diferente tanto en el estudio comparativo entre trofozoítos, quistes y ETQ, como en el estudio proteómico de los tiempos de inducción de las ETQ. Esto podría

deberse, en el caso de la proteína peroxiredoxina, a que ésta proteína además de estar involucrada en procesos de virulencia y patogenicidad, también está asociada a la respuesta a estrés oxidativo. Por tal razón, es indispensable que cambie su expresión durante los tiempos de inducción de ETQ y posiblemente en la diferenciación del parásito. En el caso del alcohol deshidrogenasa, no se ha evaluado su participación en el proceso de diferenciación y sólo se ha encontrado asociada a virulencia y patogenicidad por aumento en su expresión en cepas virulentas.

En el caso de los estudios proteómicos del quiste, existe sólo uno (Ali IK y cols., 2012), además de la publicación que se desprendió del trabajo de ésta tesis doctoral. Como se describió en ese trabajo, cerca del 90% de las proteínas identificadas en extractos de quiste semipurificados de materia fecal humana, son proteínas provenientes de otros organismos (bacterias y células humanas principalmente; Ali IK y cols., 2012). En nuestro estudio, obtuvimos cerca de 4,500 proteínas totales de la muestra de quiste, de las cuales un poco menos del 10% fueron proteínas de quiste (datos no mostrados), lo que equivale al mismo porcentaje identificado en el estudio previo (Luna-Nácar M y cols., 2016). Así, los resultados mostraron un número similar de proteínas identificadas 411 en nuestro estudio contra las 417 que ellos reportaron. Sin embargo, muy interesantemente, sólo 16 proteínas fueron compartidas entre ambos estudios, de las cuales, 4 mostraron un porcentaje de antigenicidad mayor al 55%, por lo que podrían ser utilizadas como una herramienta diagnóstica basada en los quistes. Aunque fue inesperado que se compartieran pocas proteínas, hay que tener en cuenta que sólo representan una mínima parte del proteoma total del quiste y que también esta diferencia puede deberse a un factor muy importante que es el origen de la muestra. Los quistes vinieron de pacientes de diferentes regiones geográficas del mundo (India y México), lo cual habla de posible polimorfismo de las muestras y de la importancia que el huésped podría tener en la expresión de proteínas en esta fase. Puesto que diferencias a nivel de RNAm se han observado en trofozoítos de diferentes pacientes, consideramos que éste fenómeno también sucede a nivel de proteínas con los quistes (MacFarlane RC y cols, 2005;

MacFarlane RC y Singh U, 2006). A diferencia del estudio de Ali K y cols., 2012 en el que, las comparaciones del proteoma del quiste con proteínas de trofozoítos fueron hechas contra proteomas de trofozoítos previamente reportados, nuestra comparación fue realizada con el proteoma de trofozoítos analizados en paralelo utilizando la misma técnica y equipo. Además nosotros incluimos el estudio proteómico de las ETQ, previamente reportadas por nuestro grupo de trabajo (Aguilar-Díaz H y cols. 2010).

Es de relevancia mencionar que previamente se habían reportado 195 proteínas específicas del quiste, mientras que en este trabajo nosotros encontramos 299 proteínas no compartidas con los trofozoítos ni con las ETQ, es decir son proteínas estadio-específicas (Ali IK y cols., 2012; Luna-Nácar M y cols., 2016). También aquí se reportaron por primera vez al menos 7 proteínas anotadas y 7 proteínas hipotéticas con la mayor abundancia relativa (péptidos-hits) en quistes que podrían considerarse como blancos terapéuticos (Tabla 5). El proteoma de quistes reportado aquí muestra que más de la mitad de las proteínas son hipotéticas lo que nos indica que el conocimiento en la biología del quiste de *E. histolytica* aún es incipiente. Dentro del proteoma del quiste de manera general disminuyó el número de proteínas en todos los grupos funcionales (Figure 15). Además del número de proteínas, el número de péptidos-hits que identificaron a las proteínas, también disminuyó. Este resultado es consistente con la disminución en el metabolismo general del organismo al entrar en un estadio de latencia, principalmente en proteínas asociadas a metabolismo general y particularmente glicolítico y a proteínas de citoesqueleto, como la actina (Ali IK y cols., 2012).

De manera interesante, nuestro estudio como los estudios mencionados arriba, identificó un número importante de proteínas hipotéticas de las cuales aún no se ha determinado su posible función en el quiste o fases intermedias del parásito. El estudio de las proteínas hipotéticas podría representar una estrategia importante para descubrir proteínas estadio-específicas que contribuyan a ampliar el conocimiento de las fases de los organismos. En el presente estudio, un número importante de proteínas hipotéticas

fueron identificadas en el estadio de quiste y alguna de ellas además estadio-específicas, éstas proteínas representan una oportunidad de estudio para entender la biología de esta fase, así como un blanco molecular sobre el cual desarrollar moléculas anti-amibianas basadas en el control del quiste, matando al parásito en este estadio o inhibiendo el proceso de enquistamiento/desenquistamiento. Podemos resumir que el quiste es un estadio con una disminución general de la expresión de proteínas, sobre todo en proteínas asociadas al metabolismo, así como también de la abundancia de las mismas, lo que concuerda con lo reportado en las fases latentes o no móviles de los organismos. Además, es un estadio aún enigmático, en el sentido de que se desconoce la función de casi la mitad de todas las proteínas que expresa, ya que son aún clasificadas como hipotéticas.

En la literatura existen reportes de estudios comparativos entre fases de organismos bifásicos, como el realizado en el también parásito protozoario *Giardia lamblia* empleando geles 2D. En total 20 proteínas se identificaron como sobre-reguladas en extractos de quistes y categorizadas como proteínas de citoesqueleto, enzimas metabólicas, cinasas específicas del ciclo celular, proteínas de resistencia a estrés y proteína involucradas en traducción (Kim y cols., 2009). Interesantemente, nosotros identificamos en las ETQ algunas de estas proteínas (Ver tabla 4).

Con respecto al proteoma de las ETQ todo lo que aquí reportamos es original, pues este es el primer trabajo en el que se analiza el proteoma de esta fase de resistencia de la amiba obtenida *in vitro*. Los resultados muestran que las ETQ comparten el 70% (385 proteínas) con el proteoma de los trofozoítos e interesantemente sólo comparte 7 proteínas con el de quiste, revelando que desde el punto de vista proteico se parecen más a los trofozoítos que al quiste. Como se mencionó arriba, los resultados previos de nuestro laboratorio mostraron la presencia de una pared tipo-quitina en las ETQ (Aguilar-Díaz y cols., 2010). Desafortunadamente, nosotros no identificamos quitina o proteínas asociadas a la pared de quitina en las ETQ, pero tampoco fueron identificadas en el proteoma de los quistes.

Consideramos que esto se debió a que estas proteínas, al formar parte de una cubierta dura, podrían ser altamente insolubles, por lo que difícilmente podrían estar libres en los extractos totales y no realizamos una extracción específica de proteínas insolubles. Ya que dichas proteínas no identificadas son sumamente importantes pues forman parte esencial de la pared del quiste, nosotros evaluamos entonces la expresión de mensajeros de dichas proteínas por RT-PCR. Se seleccionaron las secuencias de los genes Jessie 1, 2 y 3, así como el gen de la Jacob, que codifican para proteínas asociadas a la pared del quiste, además el gen de la última enzima de la vía de síntesis de quitina, la quitina sintasa. En nuestros resultados identificamos que las ETQ expresan el mensajero para Jessie 1, Jessie 3 y Jacob y los trofozoítos expresan de forma basal a Jacob, pero su expresión es menor que en las ETQ.

También la proteína Jacob fue identificada en ETQ por Western blot e inmunofluorescencia. La expresión de Jessie 2 no fue encontrada en ninguna de las muestras. Estos resultados sugieren que se están expresando la mayoría de las proteínas formadoras de la pared en las ETQ, y que por lo tanto, estas estructuras comparten una pared tipo-quitina con los quistes, lo que concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio al respecto de la resistencia de las ETQ a detergentes (Aguilar-Díaz y cols 2010). Estos resultados también muestran que las proteínas de la pared expresadas en los ETQ no son necesariamente las mismas que se expresan en quistes, pues ETQ no expresa Jessie 2. Por lo tanto, ésta es otra evidencia que considera que podrían existir diferencias entre los quistes obtenidos de manera natural e *in vitro* en la expresión de proteínas asociadas a la pared (Chatterjee A y cols., 2009; Ghosh SK y cols., 2010).

Otra posibilidad muy interesante, es que a pesar de que las ETQ tienen características morfológicas compartidas con los quistes (como forma esférica, multinucleación, resistencia a detergentes proporcionada por una pared de tipo- quitina; Aguilar-Díaz y cols., 2010), éstas son una fase de resistencia de la amiba diferente al estadio de quistes. En este sentido, recientemente algunos estudios han reportado un estadio de resistencia



en otro protozoario, que no forma parte del ciclo de vida y que son similares a las ETQ, al cual se le ha denominado pseudoquiste y no ha sido descrito en *E. histolytica*. Estos estudios se han realizado en el protozoario *Acantamoeba castellani*, una amiba de vida libre, la cual puede llegar a ser parásito facultativo en los humanos. En ésta amiba se ha identificado la inducción de pseudoquistes a partir de trofozoítos que se someten a estrés en presencia de compuestos orgánicos como el metanol o la acetona (Kliescikova D. y cols., 2010). La composición ultra estructural de las paredes de quistes y de pseudoquistes fue diferente y se demostró que los pseudoquistes no pudieron llegar a formar quistes maduros pero si pudieron regresar a la fase de trofozoíto, lo que indica que en ciertas condiciones de estrés el estímulo induce la transformación de *A. castellani* a un estado temporal de resistencia para sobrevivir, lo cual no implica que se vaya a transformar quiste, ya que para que eso suceda tienen que ocurrir otros estímulos. Esto sólo sucedería a partir de las 2 horas de inducción y antes de las 18 h que es cuando empiezan a morir las ETQ, probablemente debido a que no se han recibido los estímulos adecuados para continuar la conversión a quiste o para que regresen a la fase de trofozoíto. Desafortunadamente, nosotros no realizamos estudios ultra estructurales para determinar las diferencias que pueden tener quistes y ETQ de *E. histolytica*. Sin embargo, el hecho de que ETQ son estructuras de resistencia que comparten características morfológicas y una pared tipo-quitina con los quistes, ya que a nivel proteómico sólo comparten 7 proteínas, es posible que las ETQ en realidad son un estadio de resistencia temporal que no tiene el estímulo adecuado para enquistar, es decir un pseudoquiste, pero que es suficiente para proteger a la amiba de la agresión repentina del medio ambiente, mientras el estímulo agresivo desaparece y la amiba consigue las condiciones adecuadas para regresar al estadio de trofozoíto. Otra posibilidad es que las ETQ comienzan el proceso de enquistamiento con el estímulo con el que las inducimos, pero les faltan otros estímulos para terminar la transformación completa. Una posibilidad más podría indicarnos que si existen grandes diferencias entre proteínas de quistes naturales, quizá también existan diferencias de proteínas entre quistes inducidos *in vitro* y los obtenidos de pacientes.

A favor de la hipótesis de que las ETQ son en realidad pseudoquistes, como los descritos en *A. castellani* (Kliescikova D y cols., 2010), tenemos evidencia experimental de que las ETQ en presencia de medio TYI-S33 pueden regresar a trofozoítos (datos no publicados, pero sólo cuando llevan máximo 2 h de inducción. Por lo que consideramos que las ETQ pueden ser una fase de resistencia transitoria que es capaz de activar la formación de una pared tipo-quitina rápidamente, aunque metabólicamente sigue siendo un trofozoíto.

Para determinar los cambios tempranos en el trofozoíto que conllevan a la formación de una ETQ, decidimos realizar un estudio del proteoma de trofozoítos inducidos a ETQ a tiempos de 1, 2, 4 y 6 horas. El estudio mostró un número de proteínas similar entre los 4 tiempos y corroboró el primer estudio realizado a las 4 h. Del total de proteínas identificadas, 194 se compartieron entre los 4 tiempos y cada uno presentó proteínas únicas. De manera consistente con los resultados obtenidos previamente, identificamos que las proteínas asociadas a metabolismo disminuían su abundancia relativa del tiempo de 1 a 2 h, pero luego aumentaban su abundancia relativa a las 4 y 6 h. En el caso de las proteínas asociadas a estrés oxidativo, la abundancia relativa de éstas aumentó a la hora de inducción, luego disminuyó a las 2 h, y a las 4 h nuevamente aumentó su abundancia relativa. Las enzimas que participan en la vía de síntesis de la quitina también se identificaron aumentadas a 1 h de inducción, después a las 2 horas bajó la expresión y nuevamente entre las 4 y 6 h, dependiendo la enzima, ésta aumentó nuevamente. Las proteínas asociadas a metabolismo mostraron una disminución a 1 h de inducción y después un aumento a las 2 y 4 h, para después disminuir nuevamente a las 6h. Lo que sugiere que aunque de manera global baja el metabolismo de las ETQ cuando se están transformando, debido al estímulo con un estrés oxidativo, hay proteínas de metabolismo indispensables para el proceso de diferenciación que fluctúan durante la inducción de estas. Estos resultados sugieren que desde 1 h de inducción de las ETQ se observan cambios claros que se pueden asociar a los procesos de enquistamiento (Kim y cols., 2009) o formación de pseudoquistes (Kliescikova D. y cols., 2010). Sin embargo, parece que a las

2 h se pierde ese estímulo y a las 4 y 6 h nuevamente se expresan las vías que conllevan a los cambios morfológicos y de composición.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que en el ciclo de vida del parásito *E. histolytica* la expresión de proteínas va cambiando de acuerdo a las necesidades del organismo. Así en el proteoma de trofozoíto se expresan proteínas asociadas a metabolismo, transducción de señales y traducción de proteínas; en el proteoma de quiste identificamos más de la mitad de proteínas hipotéticas y una disminución de proteínas asociadas a metabolismo. Finalmente, en el proteoma de ETQ identificamos proteínas asociadas a estrés oxidativo y aunque identificamos 385 proteínas compartidas con los trofozoítos, describimos por primera vez una fase de resistencia diferente al estadio de quiste.

Por último, consideramos que es necesario que se lleven a cabo otros estudios de caracterización estructural, funcional, bioquímica en ETQ y quistes de *E. histolytica*, para determinar la naturaleza real de los primeros y para determinar el papel de las proteínas altamente expresadas, pero aún no caracterizadas, del quiste. En conclusión, nuestros resultados nos llevan a sugerir que el enquistamiento y la formación de ETQ podrían ser distintas respuestas al estrés.

## IX.- Conclusiones

- El proteoma de las ETQ de *E. histolytica* fue más parecido al de trofozoítos que al de quistes.
- En el proteoma de trofozoítos se identificaron proteínas asociadas a metabolismo, mientras que en ETQ se identificaron proteínas asociadas a estrés oxidativo. Por otro lado, en quistes más de la mitad de las proteínas identificadas fueron proteínas hipotéticas.
- Las ETQ presentaron expresión del RNAm de varias proteínas asociada a la pared del quiste (con excepción de Jessie 2), así como también se demostró la expresión de una de dichas proteínas, la proteína Jacob, por Western Blot e inmunofluorescencia.
- Los resultados muestran que las ETQ se parecen proteínicamente más al trofozoíto, a pesar de que morfológicamente y en la composición de una pared tipo quitina se parecen más al quiste. Lo anterior deja abierta la posibilidad que las ETQ sean un estadio de resistencia tipo pseudoquiste, como ya se ha descrito en *A. castellani* y que hasta el momento no ha sido descrito para *E. histolytica*.

## **X.- Perspectivas**

- Aislar y evaluar la pared de ETQ para determinar su composición proteica y compararla con la pared de los quistes.
- Determinar si las ETQ se pueden generar en animales bajo condiciones de estrés y si existen de manera natural.
- Realizar estudios con las proteínas estadio-específicas de quiste para probar su capacidad diagnóstica.
- Determinar la posible función de las proteínas hipotéticas en quistes.

## XI.- Referencias

- Acuña-Soto R, Samuelson J, Girolami P, Zarate L, Millan- Velasco F, Schoolnick G, Wirth D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48:58-70.
- Aguilar-Díaz H, Díaz-Gallardo M, Laclette JP, Carrero JC. In vitro induction of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures from Trophozoites. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(2):1-9.
- Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García Raúl, Laclette JP, Morales-Montor J. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies?. Cell Press. 2011; 27(10): 450-458.
- Aguilar-Díaz H, Laclette JP, Carrero JC. Silencing of *Entamoeba histolytica* glucosamine 6-phosphate isomerase by RNA interference inhibits the formation of cyst-like structures. Biomed Res Int. 2013; 2013:758341. 1-8.
- Ali IK. Intestinal Amebae. Clin Lab Med. 2015; 35(2):393-422.
- Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. Molecular epidemiology of Amebiasis. Infect Genet Evol. 2008. 8(5):698-707.
- Ali IK, Haque R, Siddique A, Kabir M, Sherman NE, Gray SA, et al. Proteomic analysis of the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(5): e1643. 1-14.

- Ayeh-Kumi PF, Ali M, Lockhart LA, Glichrist CA, Petri WA Jr, Haque R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Exp Parasitol*. 2001 99(2):80-88.
- Bailey GB, Rengypian S. Osmotic stress as a factor controlling encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch Invest Med (Mex)*. 1980; 11(1 Suppl):11-16.
- Barrón-González MP, Villareal-Treviño L, Reséndez-Pérez D, Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. *Entamoeba histolytica*: Cyst-like structures in vitro induction. *Exp Parasitol*. 2008; 118(4):600-603.
- Becerril M, Romero R. *Parasitología Médica: de las moléculas a la enfermedad*. México: McGraw Hill Interamericana. 2004. Capítulo 7. 34-40.
- Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, et al. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics*. 2014; 13 (1): 132-144.
- Boettner DR; Huston CD, Linford AS, Buss SN, Houpt E, Sherman NE, et al. *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog*. 2008. 4 (1): e8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.

- Buss SN, Hamano S, Vidrich A, Evans C, Zhang Y, Crasta OR, et al. Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. *Int J Parasitol.* 2010; 40 (7): 833-843.
- Cabellero-Salcedo A, Viveron-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepúlveda-Amor J, Gutierrez G, Ortíz-Ortíz L. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 412-419.
- Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Galindo JM, Said-Fernández S. Mg, Mn and Co Ions Enhance the Formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate. *Arch Med Res.* 2000; 31(2):162-168.
- Chambers M, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman D, Neumann S. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology.* 2012; 30:918-920.
- Chatterjee A, Ghosh SK, Jang K, Bullitt E, Moore L, Robbins PW, Samuelson J. Evidence for a "wattle and daub" model of the cyst wall of *Entamoeba*. *PLoS Pathog.* 2009, 5(7):e1000498.
- Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL Jr. Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol.* 2006; 61 (6): 1523-1532.
- David PH, Chen M, Zhang X, Clark CG, Townsend RR, Stanley SL Jr. Proteomic comparison of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and the role of *E.*



*histolytica* alcohol dehydrogenase 3 in virulence. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3 (4): e 415.

- Diamond LS. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science. 1961 4; 134 (3475): 336-337.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 1993; 40: 340-344.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC, A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72(4):431-432.
- Eichinger D. Encystation of *Entamoeba* parasites. Bioessays. 1997. 19(7):633-639.
- Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. J Eukaryot Microbiol. 2001; 48(1): 17-21.
- Ehrenkauf G, Haque R, Hackney J, Eichinger D, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. Cell Microbiol 2007. 9(6).
- Falda M., Toppo S., Pescarolo A., Lavezzo E., Di Camillo B., Facchinetti A., et al. Argot2: a large scale function prediction tool relying on semantic similarity of weighted Gene Ontology terms. BMC bioinformatics. 2012; 13(Suppl 4):S14 1-9.

- Fontana P, Cestaro A, Velasco R, Formentin E, Toppo S. Rapid annotation of anonymous sequences from genome projects using semantic similarities and a weighting scheme in gene ontology. PLoS One. 2009; 4 (2):e4619.
- Fonte L. Amebas y amebiasis: aspectos conceptuales e históricos. En: Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. La Habana: 2000; pp. 15-24.
- Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A, Sauch JF. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. Science. 1987. 27; 235(4792):1040-1043.
- Ghosh SK, Van Dellen KL, Chatterjee A, Dey T, Haque R, Robbins PW, et al. The Jacob2 lectin of the *Entamoeba histolytica* cyst wall binds chitin and is polymorphic. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 20; 4(7):e750.
- Haider S, Pal R. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. Curr Genomics. 2013. 14(2):91-110.
- Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. J Clin Microbiol. 2006; 44(9):3196-3200.
- Haque R, Kress K, Wood S, Jackson RF, Lyerly D, Wilkins, et al. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the Galactose-specific adhesin. J Infect Dis 1993; 167: 247-249.

- Hira PR, Iqbal J, Al-Ali F, Philip R, Grover S, D'Almeida E, Al-Eneizi AA. Invasive amebiasis: challenges in diagnosis in a non-endemic country (Kuwait). *Am J Trop Med Hyg.* 2001. 65(4):341-345.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009; 4(1): 44-57.
- Hulsen T, Vlieg J, Alkema W. BioVenn- a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 2008; 9:488. 1-6.
- DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Amebiasis (*Entamoeba histolytica*). En línea: <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>.
- Imayasu M, Tchedre KT, Cavanagh HD. Effects of multipurpose solutions on the viability and encystment of *Acanthamoeba* determined by flow cytometry. *Eye Contact Lens.* 2013 May; 39 (3):228-233.
- Kim J, Bae SS, Sung MH, Lee KH, Park SJ. Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res.* 2009 Jan;104(2):475-479.
- Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E. Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. *Exp Parasitol.* 2011; 127(1):326-328.

- Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E. Stress-induced pseudocyst formation-a newly identified mechanism of protection against organic solvents in *Acanthamoebae* of the T4 genotype. *Protist*. 2011; 162(1):58-69.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990; 10; 276(1-2): 172-174.
- Leitsch D, Wilson IB, Paschinger K, Duchene M. Comparison of the proteome profiles of *Entamoeba histolytica* and its close but non-pathogenic relative *Entamoeba dispar*. *Wien Klin Wochenschr*. 2006.118(19-20 Suppl 3):37.
- Leitsch D, Radauer C, Paschinger K, Wilson I, Breiteneder H, Scheiner O, et al. *Entamoeba histolytica*: Analysis of the trophozoite proteome by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Exp Parasitol*. 2005; 110 (3): 191-195.
- Lloyd D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: a review. *Exp Parasitol*. 2014 Nov; 145 Suppl: S20-7.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 2005; 24; 433(7028):865-868.
- Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, et al. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 15:4(6): e716.

- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859):2095-2128.
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997. 61(3):294-304.
- Luna-Nácar M, Navarrete-Perea J, Moguel B, Bobes RJ, Laclette JP, Carrero JC. Proteomic Study of *Entamoeba histolytica* Trophozoites, Cysts, and Cyst-Like Structures. *PLoS One.* 2016; 11(5):e0156018. 1-24.
- MacFarlane RC, Bhattacharya D, Singh U. Genomic DNA microarrays for *Entamoeba histolytica*: applications for use in expression profiling and strain genotyping. *Exp Parasitol.* 2005. 110 (3): 196-202.
- MacFarlane RC, Singh U. Identification of differentially expressed genes in virulent and non-virulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infect Immun.* 2006. 74 (1): 340-351.
- MacFarlane RC, Shah PH, Singh U. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Int J Parasitol* 2005. 35 (5): 533-542.
- Manning-Cela R, Meraz MA, Hernandez JM, Meza I. Actin mRNA levels and actin synthesis during the encystation of *Entamoeba invadens*. *J Eukaryot Microbiol.* 1994; 41(4):360-365.

- Mansuri MS, Bhattacharya S, Bhattacharya A. A novel alpha kinase EhAK1 phosphorylates actin and regulates phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. PLoS Pathog. 2014, 10(10):e1004411.
- Marín E, Pinilla AE, López MC. Absceso hepático amebiano. Revisión de 100 años de esta patología en Colombia. Acta Med Colomb 2000; 25: 218-226.
- Marion S, Laurent C, Guillen M. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. Cell Microbiol. 2005. 7 (10): 1504-18. PMID: 16153248.
- Marquay Markiewicz J, Syan S, Hon CC, Weber C, Faust D, Guillen N. A proteomic and cellular analysis of uropods in the pathogen *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl Trop Dis. 2011. 5; 5(4):e1002.
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. Nat Protoc. 2013; 8:1551-66. doi: 10-1038/nprot.2013-092. PMID: 23868073.
- Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. Phanter in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. Nucleic Acids Res. 2013; 4: 377-386.
- Nie L, Wu G, Culley DE, Scholten JC, Zhang W. Integrative analysis of transcriptomic and proteomic data: challenges, solutions and applications. Crit Rev Biotechnol. 2007. 27(2):63-75.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 1975. 25; 250(10):4007-4021.

- Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA Jr, Kita K, et al. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol.* 2006. 145 (2): 171-183.
- Okada M, Huston CD, Mann BJ, Petri WA Jr, Kita K, Nozaki T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 2005. 4(4): 827-831.
- Perdomo D, Ait-Ammar N, Syan S, Sachse, Jhingan GD, Guillen N. Cellular and proteomics analysis of the endomembrane system from the unicellular *Entamoeba histolytica*. *J Proteomics.* 2015; 112:125-140 .
- Petri WA JR, Jackson TF, Gathiram V, Kress K, Saffer LD, Snodgrass TL, et al,. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the Galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun* 1990; 58: 1802-1806.
- Pinilla E, López C, Viasus D. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Rev Méd Chile* 2008; 136: 118-124.
- Pritt BS, Clark CG. Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* 2008. 83(10):1154-1159.
- Pumarola A. *Microbiología y parasitología médica.* Salvat. 1991.
- Radivojac P, Clark WT, Oron TR, Schnoes AM, Wittkop T, Sokolov A, et al. A large scale evaluation of computational protein function prediction. *Nat Methods.* 2013; 10(3):221-227.

- Ramos F, Valdez E, Morán P, González E, Padilla G, Gómez A, et al. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population Arch Med Res. 2000. 31(4 Suppl):S34-5.
- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, et al. High prevalence rate of *E. histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. Am J Trop Med Hyg 2005. 73(1):89-91.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nature Protocols. 2007; 2(8):1896-1906.
- Reeves RE, Bischoff JM. Classification of *Entamoeba* species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. J Parasitol 1968; 54: 594-600.
- Rengpien S, Bailey GB. Differentiaton of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. J Parasitol. 1975; 61(1):24-30.
- Reyes L, León R. Diferenciación de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. Rev Costarric Cien Med; 2002; 23: 161-173.
- Said-Fernández S, Campos-Góngora E, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez HG, Vargas-Villareal J, Viader-Salvadó JM. Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup> Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material. J Parasitol. 2001; 87(4):919-923. PMID: 11534662.



- Sargeaunt PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72: 519-521.
- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003; 361(9362):1025-1034.
- Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5118-5122.
- Tanyukselm M, Petri WA Jr. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 713-729.
- Tolstrup J, Krause E, Tannich E, Bruchhaus I. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*. 2007; 134(Pt 2): 289-298.
- Valdéz J, Nozaki T, Sato E, Chiba Y, Nakada-Tsukui K, Villegas-Sepúlveda N, et al. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J Proteomics*. 2014; 111: 30-45.
- Van Dellen KL, Chatterjee A, Ratner DM, Magnelli PE, Cipollo JF, Steffen M, et al. Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryot Cell*. 2006; 5(5):836-848.
- Vázquezdelara-Cisneros LG, Arroyo-Begovich A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol*. 1984; 70 (5): 629-633.

- Walderich B, Müller L, Bracha R, Knobloch J, Burchard GD. A new method for isolation and differentiation of native *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts from fecal samples. Parasitol Res. 1997; 83(7):719-721.
- Wang X, Zhang B. Integrating genomic, transcriptomic, and interactome data to improve Peptide and protein identification in shotgun proteomics. J Proteome Res. 2014. 6; 13(6):2715-2723.
- Wisniewski J, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nature Methods 2009; 6. 359-362.
- World Health Organization. Amoebiasis. Wkly Epidemiol Rec 1997; 72. 97-100.
- Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. Med Int Mex 2007; 23(5):398-407.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. Infect Genet Evol. 2009; 9(6):1023-1032.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, et al. Human amebiasis: breaking the paradigm?. Int J Environ Res Public Health. 2010. 7(3):1105-1120.
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A, Ramiro M, et al. Novelties on Amoebiasis: a neglected tropical disease. J Glob Infect Dis. 2011. 3(2):166-174.

- Yu CS, Lin CJ, Hwang JK. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* 2004; 13 (5):1402-1406.
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*. 2006; 15; 64(3):643-651.

## XII. – Anexo 1

### Lista de proteínas compartidas entre los 4 tiempos (1, 2, 4 y 6 horas)

---

gb|EAL43285.1|phosphoglucomutase/phosphomannomutasefamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAB40670.1|smallGTPaseRabC1[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48544.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44147.1|vesicle-associatedmembraneprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50210.1|aminoacyl-histidinedipeptidase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51784.1|beta-tubulin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAC15759.1|19ScapproteasomeS2subunit[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45338.1|20kDaantigen,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44584.1|90kDaheatshockprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAD22096.1|ribosomalproteinL23A[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL44754.2|60SacidicribosomalproteinP2,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44505.1|peptidase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAF20264.1|AF059278\_1dipeptidyl-peptidase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL49645.1|alpha-NACprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44546.2|leucine-richrepeatcontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42583.1|copine,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48153.2|hypotheticalproteinEHI\_031640[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAS10184.1|mitogen-activatedproteinkinase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL51292.1|glycyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50536.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43657.1|ARP2/3complex41kDasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAB49653.1|pyruvate:ferredoxinoxidoreductase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL46406.1|proteinkinasedomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46966.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAU45393.1|proteindisulfideisomerase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48917.2|filopodin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43520.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46745.1|rubrerythrin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49028.1|hypotheticalproteinEHI\_083600[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46102.1|leucine-richrepeatcontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44225.2|NAD(FAD)-dependentdehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45192.1|60SacidicribosomalproteinP1,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH74603.1|LIMzincfingerdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL45753.1|Skp1protein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50735.1|40SribosomalproteinS13,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48884.1|PCTP-likeprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48235.1|14-3-3protein2[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

---

gb|EMD44708.1|invaporeX,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|EAL51058.1|actin-bindingprotein,cofilin/tropomyosinfamily[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45462.1|phenylalanyl-tRNAsynthetasebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46912.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47603.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43688.1|ubiquitin-conjugatingenzymefamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47333.1|hypotheticalproteinEHI\_048560[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46089.1|eukaryotictranslationelongationfactor1gamma,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47130.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47459.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48775.1|hypotheticalproteinEHI\_068510[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51892.1|hypotheticalproteinEHI\_094010[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42779.1|snoRNAbindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52102.1|aspartate--ammonialigase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46283.1|S-phasekinase-associatedprotein1A,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47477.1|F-actincappingproteinbetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48725.1|fibrillarlin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA21531.1|putativevacuolarproton-transportingATPasecatalyticsubunit[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45160.1|glutaminyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44826.1|tyrosyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49805.2|polyadenylate-bindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48447.1|26Sproteaseregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43752.1|hypotheticalproteinEHI\_173480[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44076.1|ubiquitin-like,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43321.1|proteasomealphasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52093.1|4-alpha-glucanotransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44958.1|UDP-glucose4-epimerase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49617.1|nucleosidediphosphatekinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42786.1|40SribosomalproteinS6,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44220.1|hypotheticalproteinEHI\_161070[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45514.1|polyadenylate-bindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAC31934.1|actinbindingprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47955.1|ARP2/3complex21kDasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50934.2|dihydropyrimidinedehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42895.1|peptidyl-prolylcis-transisomerase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39528.1|hexokinase1[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45623.2|elongationfactor2[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46302.1|actophorin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50546.1|calciumbindingfamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

---

gb | EAL44507.1 | aspartyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL46248.1 | dynamin-likeprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL47570.1 | LIMzincfingerdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL43716.1 | enhancerbindingprotein-2,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL49351.1 | 70kDaheatshockprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | AAA80187.1 | 14-3-3protein,partial[Entamoebahistolytica]  
gb | EAL44126.1 | RAD23protein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL51645.1 | myosinheavychain[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL50893.1 | sulfateadenyltransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL44974.1 | 40SribosomalproteinS15a,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL50633.2 | SH3domainprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL50259.1 | TPRrepeatprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
emb | CAA62418.1 | profilin[Entamoebahistolytica]  
gb | EAL48615.1 | 60SribosomalproteinL10a,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
emb | CAA74796.1 | phosphoglucomutase[Entamoebahistolytica]  
pdb | 4FID | AChainA,CrystalStructureOfAHeterotrimericG-  
proteinSubunitFromEntamoebaHistolytica,Ehg-alpha-1  
gb | EAL46749.1 | NADsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EDS89617.1 | cortexillin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL49988.1 | RNARECognitionmotifdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL46335.1 | adenosylhomocysteinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL44134.1 | hypotheticalproteinEHI\_080260[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL43981.1 | 60SribosomalproteinL9,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL50904.1 | acetyl-CoAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL46173.1 | 40SribosomalproteinS21,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL51030.1 | hypotheticalproteinEHI\_016130[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL51901.1 | DEAD/DEAHboxhelicase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL43565.1 | HEATrepeatdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL48927.1 | L-myo-inositol-1-phosphatesynthetase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL45293.1 | seryl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EDS89607.1 | ras-1,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | AAQ18492.1 | iron-sulphurclusterassemblyprotein[Entamoebahistolytica]  
gb | EAL45499.1 | hypotheticalproteinEHI\_069510[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL51230.1 | hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL48794.1 | 2,3-bisphosphoglycerate-  
independentphosphoglyceratemutase),putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
emb | CAD10500.3 | hexosaminidasebetachain[Entamoebahistolytica]  
gb | EDS89207.1 | grainin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL42983.1 | actinin-likeprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL45494.1 | hypotheticalproteinEHI\_069560[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | EAL47267.1 | hypotheticalproteinEHI\_029090[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb | AAA21446.1 | rashomologue1[Entamoebahistolytica]

---

---

gb|EAL45016.1|40SribosomalproteinS5,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50237.1|calmodulin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45476.1|hypotheticalproteinEHI\_030750[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42997.1|aldosereductase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAB86601.1|cyclophilin[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47352.1|purinenucleosidephosphorylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45540.1|actin-bindingprotein,cofilin/tropomyosinfamily[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAA22014.1|elongationfactor1beta[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL50012.1|purinenucleosidephosphorylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAA22015.1|ribosomalproteinS29[Entamoebahistolytica]  
emb|CAA55733.1|antigen[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL49855.1|calreticulin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47897.1|calponinhomologydomainprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45214.2|hypotheticalproteinEHI\_047810[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51051.1|actin-bindingprotein,cofilin/tropomyosinfamily[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52122.1|p21-activatedkinase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46941.1|hypotheticalproteinEHI\_189930[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAL66296.1|AF458334\_1hybrid-clusterprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL46077.1|60SribosomalproteinL11,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44677.1|hypotheticalproteinEHI\_010570[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EDS89591.1|hypotheticalproteinEHI\_065490[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43479.1|GTP-bindingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47201.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47979.1|threonyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH74842.1|ATPsynthase(E/31kDa)subunit,putative,partial[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL50656.2|WDrepeatprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48669.1|40SribosomalproteinS5,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51634.2|thioredoxin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50797.1|Gal/GalNAclectinheavysubunit[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA18944.1|pyruvatephosphatedikinase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48173.1|40SribosomalproteinS14,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49644.2|T-complexprotein1subuniteta,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48812.1|hypotheticalproteinEHI\_140740[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52153.1|proteasomebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45971.1|endoribonucleaseL-PSP,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47364.2|UDP-glucosepyrophosphorylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39288.1|enolase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL43337.1|hypotheticalproteinEHI\_177300[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EGB08321.1|hypotheticalproteinAURANDRAFT\_16046,partial[Aureococcusanophagefferens]  
gb|EAL43181.1|ARP2/3complex20kDasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49338.1|LIMzincfingerdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

---

gb|EAL49114.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49854.2|adenylylcyase-associatedprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMD44848.1|actin2,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|AAD00546.1|adenylatekinase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48736.1|hypotheticalproteinEHI\_118750[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50440.2|aspartateammonia-lyase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAV34290.1|vacuolarATPasesubunitB[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL51726.1|26Sproteaseregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45367.1|hypotheticalproteinEHI\_021410[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48843.1|nucleolarproteinNop56,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38775.1|actin,putative[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN38071.1|rabfamilyGTPase[Entamoebahistolytica]  
gb|AAA29110.1|peripheralmembraneprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45068.1|heatshockprotein70,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51699.1|Xaa-Prodiptidase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAB40678.1|smallGTPaseRab11B[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL51880.1|celldivisioncycleprotein48,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39726.1|hypotheticalprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL50399.1|glutamyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47746.1|heatshockprotein90,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAC37177.1|20kDaantigen[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL49027.1|coronin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52137.1|RanfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43683.1|alcoholdehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45848.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47513.1|hypotheticalproteinEHI\_059830[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49030.1|hypotheticalproteinEHI\_083620[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44491.1|hypotheticalproteinEHI\_001100[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAK85709.1|iron-sulfurclusterNifU-likeprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL51888.1|filamin2,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42484.1|Actin-relatedprotein3,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49379.1|hypotheticalproteinEHI\_166920[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46397.1|enhancerbindingprotein-1[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45686.1|60SribosomalproteinL35a,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46757.1|hypotheticalprotein,conserveddomaincontaining[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46152.2|methionineaminopeptidase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAF14855.2|AF082530\_1Grainin2[Entamoebahistolytica]

---



## Lista de proteínas únicas identificadas en ETQ 1h

---

gb|EAL51679.1|calcineurincatalyticsubunitA,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43952.1|60SacidicribosomalproteinP0,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50189.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48563.1|geranylgeranylpyrophosphatesynthase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47050.1|T-complexprotein1betasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47785.1|MTA/SAHnucleosidase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49178.2|vesiculartransportproteinYip1,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45851.1|hypotheticalproteinEHI\_017000[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45053.1|RasfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMD49496.1|actinfamilyprotein[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|AAS67877.1|guaninenucleotideexchangefactor[Entamoebadispar]  
dbj|BAN40139.1|elongationfactor1-alpha1[Entamoebahistolytica] gb|AAW63029.1|N-ethylmaleimide-sensitivefactor[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL46421.1|phosphoglyceratemutasefamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44811.1|LIMzincfingerdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44559.1|guaninenucleotide-bindingproteinsubunitbeta2-like1,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49138.2|hypotheticalproteinEHI\_147550[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46980.1|60SribosomalproteinL39,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38609.1|hypotheticalprotein[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN39056.1|60SribosomalproteinL7a,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47771.1|40SribosomalproteinS10,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA16054.1|galactoselectin35kDa(light)subunit,partial[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48497.1|alcoholdehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48692.2|Serine/threonine-proteinphosphatase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51366.1|copine,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL43318.1|glucosamine6-phosphateN-acetyltransferase.putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48943.1|hypotheticalproteinEHI\_183470[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45992.2|galactose-inhibitiblelectin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43777.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47011.1|40SribosomalproteinS3a,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47592.1|actin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39567.1|malatedehydrogenase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EDS88889.1|predictedprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44979.1|glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] dbj|BAA22004.1|Ras-relatedproteinRAB7[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL46377.1|hypotheticalproteinEHI\_114140[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH73696.1|ribosomalproteinS3,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL47965.1|proteasomeregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA21447.1|rashomologue2[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN40057.1|leucinerichrepeatprotein,BspAfamily[Entamoebahistolytica]  
gb|EDS89287.1|Adapter-relatedproteincomplex3(AP-3)subunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44176.1|hypotheticalproteinEHI\_086380[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

gb|EMH78310.1|STARTdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL50410.2|hypotheticalproteinEHI\_150120[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48655.1|ADP-ribosylationfactor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50389.1|Elongationfactor2,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39712.1|sulfateadenyltransferase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EMS12948.1|hypotheticalproteinKM1\_167200[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL50119.1|purinenucleosidephosphorylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44227.1|40SribosomalproteinS16,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38383.1|guaninenucleotide-bindingprotein subunit beta2-like1,putative[Entamoebahistolytica] gb|EAL44340.1|60SribosomalproteinL16-B,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39673.1|proteinkinasedomaincontainingprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EMS15726.1|nucleasedomaincontainingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
dbj|BAF31853.1|serine-richprotein[Entamoebahistolytica] gb|EAL47468.1|S-adenosylmethioninesynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAA21980.1|ribosomalproteinSA(P40)/lamininreceptor[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL49134.1|coatmerbetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49858.1|Ser/Thrproteinphosphatase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EDS89405.1|hypotheticalproteinEHI\_189300[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EDS89146.1|26Sproteaseregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51348.1|deoxycytidinetriphosphatedeaminase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EDS88609.1|AIG1familyprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50549.1|isoleucyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50537.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46013.1|dolicholmonophosphatemannosesynthase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL44561.1|60SribosomalproteinL44,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47263.1|long-chain-fatty-acid--CoAligase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49585.1|histoneH2B,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44097.1|glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|AAA21444.1|raphomologue1[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAA22144.1|cysteinesynthasetypeII[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL44544.1|proteinkinasedomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS13900.1|ephrintype-areceptor4a,putative,partial[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EMS16147.1|ENTHdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL50724.1|acetyltransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
emb|CAC34299.1|ribosomalproteinlargesubunit27a-3[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN39582.1|alpha-amylasefamilyprotein[Entamoebahistolytica] gb|AAA29089.1|calcium-bindingprotein1[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN37562.1|cysteineproteinase1,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45909.2|hypotheticalproteinEHI\_189410[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44285.2|aminoacidtransporter,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47341.1|actin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45654.1|60SribosomalproteinL40,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMD44272.1|leukocyteendothelialcelladhesionmolecule3,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
] gb|EAL49096.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49398.1|60SribosomalproteinL34,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL43958.1|Sec23protein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49136.1|RhoGDPexchangeinhibitor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

### Lista de proteínas únicas identificadas en ETQ 2h

---

gb|EAL48078.2|hypotheticalproteinEHI\_072010[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39497.1|60SribosomalproteinL15,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EMS13561.1|60SribosomalproteinL31,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL47230.1|acyl-coAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38317.1|actin,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EMH75669.1|hypotheticalproteinEHI8A\_190710[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL46126.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL43566.1|dolichyl-di-phosphooligosaccharide-proteinglycotransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43244.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
emb|CAA38847.1|immuno-dominantvariablesurfaceantigen[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN38120.1|alcoholdehydrogenase3,putative[Entamoebahistolytica]  
pdb|1Y9A|AChainA,AlcoholDehydrogenaseFromEntamoebaHistoloticalnComplexWithCacodylate  
gb|EAL49849.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48894.1|unconventionalmyosinIB[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44023.1|hypotheticalproteinEHI\_095950[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51139.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43888.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47082.1|histoneH2A,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|AAA18632.1|pore-formingpeptide[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL50665.1|hypotheticalproteinEHI\_118070[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43771.1|leucyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50783.1|long-chain-fatty-acid--CoAligase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH72280.1|ribosomalproteins24edomaincontainingprotein,partial[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B] gb|EAL45265.1|valyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL42847.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS16343.1|hypotheticalproteinKM1\_049310[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL47787.1|pyrophosphate-dependentphosphofructokinase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL50177.1|proteasomealphasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48820.1|putativetranscriptionenhancerprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47236.1|InitiationfactoreIF-2Bdeltasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38483.1|Fe-hydrogenase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EMH75663.1|proteinkinasedomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
dbj|BAN37670.1|guaninenucleotide-bindingproteinsubunitbeta2-like1,putative[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN37668.1|60SribosomalproteinL3,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45911.1|60SribosomalproteinL23,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39040.1|iron-containing-superoxidedismutase[Entamoebahistolytica]  
gb|EMD45795.1|neutralalphaglucosidaseprecursor,putative[EntamoebahistolyticaKU27]

---

dbj|BAA22027.1|ribosomalproteinS19[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL51572.1|60SribosomalproteinL26,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51011.1|proteasomealphasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44988.2|nucleosidetransporter,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA21449.1|P-glycoprotein6[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45261.1|hypotheticalproteinEHI\_140610[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS11594.1|tubulinalphachain,partial[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
dbj|BAN39554.1|cysteineproteinase,putative[Entamoebahistolytica] dbj|BAN38493.1|fructose-1,6-bisphosphatealdolase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EDS88751.1|hypotheticalproteinEHI\_193940[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52152.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMD45370.1|vacuolarproteinorting-associatedprotein,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|EMS17580.1|MIF4Gdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL49023.2|Rasguaninenucleotideexchange factor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49704.1|4-alpha-glucanotransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH78122.1|proteinkinasedomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL46684.1|60SribosomalproteinL17,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA92671.1|Ppi-dependentphosphofructo-1-kinase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL50004.1|hypotheticalproteinEHI\_114330[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49310.1|SNF7familyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAG01041.1|AF293981\_1chaperonin-containingTCP-1,zetasubunit[Entamoebahistolytica]  
gb|AAP33064.1|vacuolarsortingprotein26-like[Entamoebahistolytica]  
gb|EMS14290.1|hypotheticalproteinKM1\_068450[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
dbj|BAN38814.1|actin,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL51611.1|glutamatesynthasebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43679.1|60SribosomalproteinL26,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45766.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMD47007.1|alkylhydroperoxidoreductase,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
dbj|BAA22019.1|ribosomalproteinL36[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47970.1|proteinkinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAB40673.1|smallGTPaseRab5[Entamoebahistolytica]  
gb|EDS89325.1|bifunctionalshortchainisoprenyldiphosphatesynthase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL49184.1|hypotheticalproteinEHI\_092200[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN37676.1|40SribosomalproteinS3,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48382.1|Rhoguaninenucleotideexchange factor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMD44559.1|AP1complexsubunitgamma-1,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
dbj|BAN39482.1|purinenucleosidephosphorylase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47777.2|hypotheticalproteinEHI\_001830[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51597.1|serinepalmitoyltransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47095.1|pyridoxalkinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47922.1|RhofamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN37908.1|hypotheticalprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EMD44651.1|grainin1,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|EAL50049.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48222.1|glycogendebranchingenzyme,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45522.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

dbj|BAN38519.1|actin,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EMS13152.1|villinheadpiecedomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL45305.1|proteinphosphatase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47959.1|proteasomebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EDS89712.1|galactose-inhibitablelectinssmallsubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL45113.1|vacuolarATPsynthasesubunitH,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46976.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52050.1|DnaJfamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS11416.1|ikappabkinasecomplex-associatedprotein[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EDS89599.1|hypotheticalproteinEHI\_174380[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH72078.1|RNAmethylasefamilyUPF0020protein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL46272.1|hypotheticalproteinEHI\_135090[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAC47299.1|p21racD,partial[Entamoebahistolytica]  
gb|EMD43098.1|phosphofruktokinase,putative,partial[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|EAL43349.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50856.1|70kDapeptidyl-prolylisomerase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50215.1|malatedehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51511.1|choline/ethanolaminekinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EDS89346.1|calcium-dependentproteinkinase2,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51221.1|hypotheticalproteinEHI\_050520[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAK92361.1|AF337950\_1Gal/GalNAclectinIgl1[Entamoebahistolytica]  
gb|EMD44479.1|sulfotransferase,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
gb|EAL50285.1|glycogenphosphorylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMH77139.1|vacuolarsortingprotein29,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
gb|EAL47650.1|hypotheticalproteinEHI\_178470[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44876.1|serineproteaseinhibitor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

#### Lista de proteínas únicas identificadas en ETQ 4h

---

dbj|BAB40671.1|smallGTPaseRabD1[Entamoebahistolytica]  
dbj|BAN40152.1|60SribosomalproteinL4,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EMS11024.1|hypotheticalproteinKM1\_285810[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL44008.2|hypotheticalproteinEHI\_141330[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA29111.1|pore-formingpeptide[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47424.2|hypotheticalproteinEHI\_177380[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47361.2|guaninenucleotide-bindingproteinsubunitbeta,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
pdb|3TL6|AChainA,CrystalStructureOfPurineNucleosidePhosphorylaseFromEntamoebaHistolytica  
emb|CAC34300.1|ribosomalprotein27a-4[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL47429.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44258.1|Rasguaninenucleotideexchangefactor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS12198.1|hypotheticalproteinKM1\_188030[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]

---

gb|EAL45019.1|threoninedehydratase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44184.1|proteasomealphasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL46530.1|WDrepeatprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL48551.1|Receptormediatedendocytosisprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL43678.1|tryptophanase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL45879.1|Rhoguaninenucleotideexchange factor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMD48185.1|developmentallyregulatedGTP-bindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaKU27] gb|EAL48850.2|13kDaribonucleoprotein-associatedprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44279.1|60SribosomalproteinL13,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL51113.1|40SribosomalproteinS9,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL46942.1|60SribosomalproteinL34,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN39037.1|pleckstrinhomology(PH)domaincontainingprotein[Entamoebahistolytica]  
 gb|EMD48458.1|alcoholdehydrogenase,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EAL43689.2|ribonuclease,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EDS88742.1|dynamin-1-likeprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMS17038.1|sulfotransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EMS16452.1|calcium-dependentprotein kinase2,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EDS89308.1|glycoproteinFP21precursor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|AAC64063.1|ADP-ribosylationfactor,partial[Entamoebahistolytica]  
 gb|AAA29114.1|Gprotein[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL48933.1|hypotheticalproteinEHI\_183570[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL50356.1|chaperonincontainingTCP-1epsilon subunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 pdb|3OJ7|AChainA,CrystalStructureOfAHistidineTriadFamilyProteinFromEntamoebaHistolytica,BoundToSulfate gb|EAL49973.1|UDP-N-acetylglucosaminepyrophosphorylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMS13507.1|hypotheticalproteinKM1\_126310[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EAL43284.1|RanGTPase-activatingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMD46426.1|fumaratehydrataseclassIanaerobic,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EAL48500.1|RhofamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMH72492.1|ribosomalproteinS19,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
 dbj|BAN38560.1|actin,putative[Entamoebahistolytica] gb|EMH72799.1|elongationfactorTuC-terminaldomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-B]  
 gb|EAL43255.1|hypotheticalproteinEHI\_095180[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAD34972.1|EhRab7Eprotein[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL42694.1|syntaxinbindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMD45767.1|nicotinamidenucleotidetranshydrogenase,putative,partial[EntamoebahistolyticaKU27] gb|EAL51760.2|hypotheticalproteinEHI\_049680[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL43648.1|60SribosomalproteinL7,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44851.1|hypotheticalproteinEHI\_063040[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN38336.1|ribosomalproteinS4,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EMD45533.1|RNAmodificationenzymesMiaBfamilyprotein[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EAL46124.1|proliferatingcellnuclearantigen,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL45665.1|muT/nudixfamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL45339.1|triosephosphateisomerase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL43341.1|leucinerichrepeatprotein,BspAfamily[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL48839.1|DNA-directedRNAPolymerasesubunitN,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL46919.1|60SribosomalproteinL17,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL50263.1|nicotinatephosphoribosyltransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMD43051.1|HypotheticalproteinEHI5A\_073810[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EDS88858.1|hypotheticalproteinEHI\_073160[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL51185.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL43740.1|hypotheticalproteinEHI\_035110[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL48852.2|hypotheticalproteinEHI\_053460[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44972.1|leucinerichrepeat/proteinphosphatase2Cdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL49960.1|proteasomealphasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|AAA29106.1|,partial[Entamoebahistolytica] dbj|BAA21978.1|calcium-bindingprotein[Entamoebahistolytica] gb|EAL46920.1|translationinitiationfactorIF-2,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL51032.1|hypotheticalproteinEHI\_187030[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL45591.1|proteasomebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL49845.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL47328.1|ProteintransportproteinSEC61gammasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL50009.1|proteasomeregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL48414.1|proteasomebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|AAD09523.1|30kDatypelcollagenbindingprotein[Entamoebahistolytica]  
 dbj|BAN38562.1|26Sproteaseregulatorysubunit,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL45777.1|RasfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN38232.1|phosphoglyceratekinase,putative[Entamoebahistolytica]  
 dbj|BAN39508.1|ARP2/3complex34kdasubunit,putative[Entamoebahistolytica]  
 dbj|BAN39063.1|40SribosomalproteinS2,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EMD45460.1|HypotheticalproteinEHI5A\_253500[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EAL50397.1|hypotheticalproteinEHI\_155590[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL49306.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN39736.1|hypotheticalprotein[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL45414.1|eukaryoticinitiationfactor4E,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EDS88972.1|60SribosomalproteinL3,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL51973.1|caseinkinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMS17090.1|hypotheticalproteinKM1\_314160[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EMD45902.1|WDdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaKU27]  
 dbj|BAN37599.1|elongationfactor1-alpha1[Entamoebahistolytica]  
 dbj|BAN39519.1|60SribosomalproteinL7a,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL43803.1|tryptophanyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|AAO17820.1|putativelongiron-dependenthydrogenase2[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL51899.1|hypotheticalproteinEHI\_093920[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL51657.1|GTP-bindingproteinEhRabX36,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL50140.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] dbj|BAN40113.1|NADP-dependentalcoholdehydrogenase[Entamoebahistolytica]  
 gb|EMS16389.1|smallGTPaseEhRabM1,putative,partial[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EAL48987.1|hypotheticalproteinEHI\_007990[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL47312.1|40SribosomalproteinS28,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL49752.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

## Lista de proteínas únicas identificadas en ETQ 6h

---

gb|EAL51995.1|histoneacetyltransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50089.1|guaninenucleotideexchange factor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL45276.1|hypotheticalproteinEHI\_107050[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL52120.1|hypotheticalproteinEHI\_148300[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL51997.1|RNA-bindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46467.1|prolyl-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN39831.1|60SacidicribosomalproteinP0,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|AAM21053.1|AF498649\_1smallheatshockprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL46483.1|elongationfactor1-alpha1[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS10730.1|dipeptidyl-peptidase5precursor,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL47083.1|zincfingerprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50345.1|thioredoxinreductase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAK92362.1|AF337951\_1Gal/GalNAclectinIlg2[Entamoebahistolytica]  
gb|EDS89395.1|geranylgeranylpyrophosphatesynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL46339.1|60SribosomalproteinL31,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL44535.1|40SribosomalproteinS3,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38608.1|guaninenucleotide-bindingproteinsubunitbeta2-like1,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL45967.1|hypotheticalproteinEHI\_087610[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47816.1|ubiquitin-proteinligase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49343.1|molybdenumcofactorsulfuraseputative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47447.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL50847.2|hypotheticalproteinEHI\_178890[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN37770.1|fattyacidelongase,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EDS89519.1|galactosebindinglectin35kDasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL47676.1|60SribosomalproteinL7,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
emb|CAG39307.1|putativemembraneprotein[Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252]  
gb|EAL44223.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|AAA80188.1|nicotinamidenucleotidetranshydrogenase[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48106.1|ubiquitin-likeprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46690.1|hypotheticalproteinEHI\_054800[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL43986.1|hypotheticalproteinEHI\_193090[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38257.1|LIMzincfingerdomaincontainingprotein[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL48848.1|RabfamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
dbj|BAN38242.1|malatedehydrogenase,cytoplasmic,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL46413.1|RhofamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46902.1|Sec7domainprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL49985.2|hypotheticalproteinEHI\_026470[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48543.1|RNArecognitionmotifdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---



gb|EAL50139.1|hypotheticalproteinEHI\_131160[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN37589.1|40SribosomalproteinSA,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EMD46049.1|60SribosomalproteinL63,partial[EntamoebahistolyticaKU27]  
 dbj|BAN39533.1|proteasomesubunitaphatype5,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EMD44963.1|cortexillinII,putative[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EAL50899.1|40SribosomalproteinS9,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|AAA29118.1|EHZc3protein[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL50232.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|ENY61230.1|intermediatesubunitofgalactoselectin1,putative,partial[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS-A] gb|EAL46275.1|40SribosomalproteinS17,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAA21916.1|cysteinesynthase[Entamoebahistolytica]  
 gb|EDS88601.1|AIG1familyprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL46732.1|leucine-richrepeatcontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN38409.1|60SribosomalproteinL5,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL45681.1|hypotheticalproteinEHI\_049060[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL47926.2|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL43453.1|transketolase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMD47264.1|4Fe4Sbindingdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EMS15823.1|filopodin,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EAL44875.2|nucleosomeassemblyprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL49815.1|hypotheticalproteinEHI\_198580[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EDS89546.1|LIMzincfingerdomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL45000.1|cysteinyI-tRNAsynthetase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN38088.1|galactokinase,putative[Entamoebahistolytica] gb|EAL43668.2|solublecalcium-activatednucleotidase1,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EDS89445.1|ENTHdomainprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EMD49145.1|HypotheticalproteinEHI5A\_130390,partial[EntamoebahistolyticaKU27]  
 gb|EAL43703.1|26Sproteaseregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL47714.1|hypotheticalproteinEHI\_086230[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL45900.2|60SribosomalproteinL38,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL52140.1|proteinphosphataseregulatorysubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44160.2|hypotheticalproteinEHI\_077530[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44692.1|glucosamine--fructose-6-phosphateaminotransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL43983.1|iron-sulfurflavoprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL44352.2|acetylnornithinedeacetylase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN38700.1|60SribosomalproteinL13,putative[Entamoebahistolytica] gb|EMS13409.1|NAD+-dependentalcoholdehydrogenase[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
 gb|EAL47584.1|60SribosomalproteinL37a,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL46577.2|hypotheticalproteinEHI\_039860[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL47249.1|thioredoxin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL50393.1|hypotheticalproteinEHI\_155620[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL51232.1|aminopeptidase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 gb|EAL43215.1|hypotheticalproteinEHI\_013860[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
 dbj|BAN37644.1|alcoholdehydrogenase3,putative[Entamoebahistolytica]  
 gb|EAL50026.2|hypotheticalproteinEHI\_088050[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL50668.2|molybdenumcofactorsynthesisprotein3,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL46338.1|HADhydrolase,familyIA,variant3[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] dbj|BAN38549.1|hypotheticalprotein[Entamoebahistolytica]

gb|EAL47270.1|hypotheticalproteinEHI\_067260[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL45320.2|bacterialtransferasehexapeptidfamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EMD45616.1|HypotheticalproteinEHI5A\_069390[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|AAD52052.1|AF085196\_1Grainin1[Entamoebahistolytica] gb|EAL51236.1|(2r)-phospho-3-sulfolactatesynthase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL50616.1|hypotheticalproteinEHI\_169900[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL50794.1|ubiquitincarboxyl-terminalhydrolase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL48582.1|histoneH2A,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL49281.1|gelsolinrepeatprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL42807.1|iron-sulfurflavoprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL52075.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL51200.2|mutT/nudixfamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EMD47371.1|60SribosomalproteinL13,putative[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|EAL51562.1|GTP-bindingprotein,Rasfamily[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL49741.1|papainfamilycysteineproteasedomaincontainingprotein[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL47859.1|cysteinesynthaseA,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EMD45404.1|60SribosomalproteinL2/L8[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|EMD49335.1|chaperoninCPN602mitochondrialprecursor,putative[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|EAL48676.2|ubiquitin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL43117.1|60SribosomalproteinL24,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL50519.1|ribokinase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL46728.1|acetyltransferase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|ABI79445.1|cysteineproteinase5[Entamoebahistolytica] dbj|BAA00749.1|30,000-Mrantigen[Entamoebahistolytica]

gb|EAL50241.1|Oxysterolbindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL49102.2|RhofamilyGTPase[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EMS13483.1|peroxiredoxin,putative[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]

gb|EAL47925.1|hypotheticalproteinEHI\_199160[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EDS89491.1|hypotheticalproteinEHI\_136220[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL49444.1|hypotheticalproteinEHI\_010350[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

dbj|BAN38648.1|translationinitiationfactoreIF-5A,putative[Entamoebahistolytica]

gb|EMD48293.1|copine,putative[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|EAL52001.1|hypotheticalprotein,conserved[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL45131.1|proteasomealphasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL42849.1|Rabgeranylgeranyltransferasebetasubunit,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL52010.2|Rhoguaninenucleotideexchange factor,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS] gb|EAL51182.1|oxysterolbindingprotein,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

gb|EAL51512.1|Arginase,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

dbj|BAN37862.1|ribosomalproteinL10,putative[Entamoebahistolytica]

gb|EAL46251.1|hypotheticalproteinEHI\_138920[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

dbj|BAN39003.1|ribosomalproteinS4,putative[Entamoebahistolytica]

gb|EMD46378.1|serinecarboxypeptidase(S28)familyprotein[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|EMD43764.1|puromycin-sensitiveaminopeptidase,putative[EntamoebahistolyticaKU27]

gb|EMD44095.1|actin subfamilyprotein[EntamoebahistolyticaKU27] dbj|BAN37930.1|Fe-

hydrogenase,putative[Entamoebahistolytica] gb|AAP73786.1|synaptobrevin-  
like2[Entamoebahistolytica] dbj|BAN37915.1|typeAflavoprotein,putative[Entamoebahistolytica]  
gb|EAL49814.2|hypotheticalproteinEHI\_198620[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EMS15331.1|DnaKfamilyprotein[EntamoebahistolyticaHM-3:IMSS]  
gb|EAL44532.1|60SribosomalproteinL27,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL46785.1|synapsin,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]  
gb|EAL48052.1|eukaryotictranslationinitiationfactor6,putative[EntamoebahistolyticaHM-1:IMSS]

---

## XII. – Anexo 2

Artículo publicado

Luna-Nácar M, Navarrete-Perea J, Moguel B, Bobes RJ, Laclette JP, Carrero JC. Proteomic Study of *Entamoeba histolytica* Trophozoites, Cysts, and Cyst-Like Structures. PLoS One. 2016 May 26; 11(5):e0156018.

RESEARCH ARTICLE

# Proteomic Study of *Entamoeba histolytica* Trophozoites, Cysts, and Cyst-Like Structures

Milka Luna-Nácar, José Navarrete-Perea, Bárbara Moguel, Raúl J. Bobes, Juan P. Lacleste, Julio C. Carrero\*

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Tercer Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F., México

\* carrero@unam.mx



 OPEN ACCESS

**Citation:** Luna-Nácar M, Navarrete-Perea J, Moguel B, Bobes RJ, Lacleste JP, Carrero JC (2016) Proteomic Study of *Entamoeba histolytica* Trophozoites, Cysts, and Cyst-Like Structures. PLoS ONE 11(5): e0156018. doi:10.1371/journal.pone.0156018

**Editor:** Patricia Talamas-Rohana, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, MEXICO

**Received:** December 14, 2015

**Accepted:** May 9, 2016

**Published:** May 26, 2016

**Copyright:** © 2016 Luna-Nácar et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México, Number 167788 granted to JCC and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM, Number IN213611 granted to JCC. MLN gratefully acknowledges the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional

## Abstract

The cyst stage of *Entamoeba histolytica* is a promising therapeutic target against human amoebiasis. Our research team previously reported the production *in vitro* of Cyst-Like Structures (CLS) sharing structural features with cysts, including rounded shape, size reduction, multinucleation, and the formation of a chitin wall coupled to the overexpression of glucosamine 6-phosphate isomerase, the rate-limiting enzyme of the chitin synthesis pathway. A proteomic study of *E. histolytica* trophozoites, cysts, and *in vitro*-produced CLS is reported herein to determine the nature of CLS, widen our knowledge on the cyst stage, and identify possible proteins and pathways involved in the encystment process. Total protein extracts were obtained from *E. histolytica* trophozoites, CLS, and partially purified cysts recovered from the feces of amoebic human patients; extracts were trypsin-digested and analyzed by LC-MS/MS. In total, 1029 proteins were identified in trophozoites, 550 in CLS, and 411 in cysts, with 539, 299, and 84 proteins unique to each sample, respectively, and only 74 proteins shared by all three stages. About 70% of CLS proteins were shared with trophozoites, even though differences were observed in the relative protein abundance. While trophozoites showed a greater abundance of proteins associated to a metabolically active cell, CLS showed higher expression of proteins related to proteolysis, redox homeostasis, and stress response. In addition, the expression of genes encoding for the cyst wall proteins Jessie and Jacob was detected by RT-PCR and the Jacob protein identified by Western blotting and immunofluorescence in CLS. However, the proteomic profile of cysts as determined by LC-MS/MS was very dissimilar to that of trophozoites and CLS, with almost 40% of hypothetical proteins. Our global results suggest that CLS are more alike to trophozoites than to cysts, and they could be generated as a rapid survival response of trophozoites to a stressful condition, which allows the parasite to survive temporarily inside a chitin-like resistant cover containing Jacob protein. Our findings lead us to suggest that encystment and CLS formation could be distinct stress responses. In addition, we show that cysts express a high number of genes with unknown function, including four new, highly antigenic, possibly membrane-located proteins that could be targets of therapeutic and diagnostic usefulness.



Autónoma de México, and Conacyt for the scholarship PhD 389536/255914. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Amoebiasis, a disease caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, is the second cause of death due to intestinal parasitic infections [1, 2]. The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study estimated in 55,500 the number of deaths due to amoebiasis worldwide in 2010 [3]. Amoebiasis is acquired by ingesting water or food contaminated with *E. histolytica* cysts. This latent stage, whose chitin wall allows for its survival outside the host, is responsible for disseminating the parasite from one host to another, spreading the disease. Excystation occurs once the cyst reaches the small intestine, particularly the ileum, releasing trophozoites, the parasite stage that proliferates in the human large intestine and is responsible for the symptoms of amoebiasis [1, 4]. Most studies on *E. histolytica* infection have focused on the trophozoite stage, which is relatively easy to grow in axenic culture media. Unfortunately, information on the cyst stage is very scarce due to its inability to replicate and the lack of reproducible methods for promoting trophozoite encystment and cyst excystation *in vitro*.

Recently, omics technologies have provided large amounts of information on genome expression. While over 15 transcriptome studies have been performed on *E. histolytica* trophozoites under different conditions, to our knowledge only one study has been done on the cyst stage [5–8]. The same goes for proteomic studies on amoebiasis. Most works have focused on analyzing the expression profiles of trophozoites in different cell organelles under various conditions. By two-dimensional electrophoresis followed by MS, it has been analyzed whole extracts, and both soluble and insoluble proteins (400–1500 spots) [9, 10], several membrane, cytoskeletal, and signaling-associated proteins as well as metabolic and ribosomal proteins attached to the Gal/GalNac lectin [11]. Other studies have included phagosome composition and proteins associated to the phagocytosis process [12–16], the cell surface proteome that identified 12 protein families [17], the pre-mRNA splicing complexes that identified 36 proteins as involved, and other 50 proteins as possibly involved in co-transcriptional processes [18], 33 proteins modulated in cells overexpressing the EhPC4 transcription factor [19] and a pull-down assay that identified two endoribonucleases interacting with the EhCAF1 deadenylase [20]. In a more recent study, the components of trophozoite ER and Golgi apparatus were determined. About 1,500 proteins were grouped into two main classes, traffic machinery and GTPases, and about 100 markers were identified in both compartments [21]. Additionally, a comparison of the *E. histolytica* proteome with that of the related non-pathogen amoeba *E. dispar* has allowed the identification of peroxiredoxin and alcohol dehydrogenase 3 as proteins associated to virulence and pathogenicity [22,23].

In contrast, only one proteomic study on the cyst stage of *E. histolytica* has been published to date. In that work, cysts were partially purified from five stool samples from patients infected with *E. histolytica* and each sample was analyzed by LC-MS/MS. In total, 417 different proteins were identified in the five samples, 95 of which were classified as stage-specific [24]. Although that study provided valuable information about the composition of the cyst, there are still no studies focusing on the process of encystment in *E. histolytica*, which could have a high impact on the disease control. Encystment of the reptilian parasite *E. invadens* has been used as a model for the process in *E. histolytica*. However, unlike *E. invadens* that encyst *in vitro* relatively easy [25–28], the stimuli capable of inducing differentiation in *E. histolytica* remain unknown, suggesting that the process is more complex than in the related species. Another approach to studying the encystment process in *E. histolytica* arose with the description of cyst-like structures (CLS) obtained from trophozoites cultured under different conditions. Thus, detergent-resistant CLS have been obtained *in vitro* by incubating trophozoites with a mixture of  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$  ions [29] or with enterobacteria at a high  $CO_2$  tension in the presence of histamine [30]. Moreover, chitin-like material was detected by HPLC in CLS

obtained with the mixture of  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$  ions, suggesting that this treatment stimulates *E. histolytica* pathways related with chitin-like biosynthesis [31]. CLS described in a study by our research group were obtained under treatment of axenic trophozoites with 4mM hydrogen peroxide plus traces of metallic cations for 4 h [32]. These CLS showed features closely resembling genuine cysts, including rounded shape, size reduction, refringence, multinucleation (mainly 2 or 3 nuclei, and occasionally 4), and overexpression of glucosamine 6-phosphate isomerase, the rate-limiting enzyme in the chitin synthesis pathway [32]. In a subsequent study, CLS formation by hydrogen peroxide was inhibited in trophozoites in which glucosamine 6-phosphate isomerase expression was silenced by siRNA [33].

This study aimed to determine whether hydrogen peroxide-obtained CLS constitute an intermediate stage in the transformation of *E. histolytica* trophozoites into cysts, by performing a global comparison of the proteomes of *E. histolytica* trophozoites, cysts, and CLS obtained by LC-MS/MS. In addition to shed light on the proteomic nature of *E. histolytica* CLS obtained *in vitro*, this study provides new data on cyst composition, including several previously unpublished potential therapeutic and diagnostic targets.

## Material and Methods

### *Entamoeba histolytica* cultures

*E. histolytica* strain HM1: IMSS trophozoites were maintained in TYI-S-33 medium [34] supplemented with 15% adult bovine serum (Microlab), 3% vitamins (SAFC, Biosciences), and 1% antibiotic/antimycotic (Gibco) at 37°C under axenic conditions for 72 h.

### Cyst-like structures (CLS) induction

CLS induction was performed as previously reported [32]. Briefly, trophozoites were cultured in 50-ml bottles containing TYI-S-33 medium (approximately  $5 \times 10^6$  trophozoites per bottle) for 72 h and treated for 4 h with hydrogen peroxide 4 mM, 0.02 ppm of each Co, Cd, Cu, Ni, and Zn cations, and 0.01 ppm of Fe (Merck). After treatment, CLS were extensively washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 4°C, centrifuged at  $150 \times g$  for 5 min, resuspended in sarkosyl 0.1% in PBS, and allowed to sit for 20 min at room temperature. After three washes, the pellets of detergent-resistant CLS were processed to obtain protein extracts. In addition, aliquots of unstained and calcofluor white-stained CLS were analyzed under light and UV microscope, respectively, and used as fresh as possible in immunofluorescence experiments.

### Human stool samples

Human stool samples were provided by Laboratories CARPERMOR (Mexico City) following all applicable ethical protocols, including patient signed consent for sample donation. Approximately 80 samples, coprology-positive for complex *E. histolytica/E. dispar*, and as fresh as possible were processed for DNA isolation following all security measures for a biological sample level 2, as described below.

### DNA purification from human stool

The QIAamp® DNA Stool Kit (Qiagen) was used to purify DNA from human stool samples according to the supplier's directions. Briefly, 200 mg of each stool sample were weighed into a 2-ml microcentrifuge tube, added with 1.4 ml of ASL buffer and homogenized by vortexing. The mixture was heated for 5 min at 70°C and then homogenized and centrifuged at maximum speed for 1 min. The supernatant (approximately 1.2 ml) was placed in a new 2-ml tube and an Inhibitex tablet was added; the mixture was homogenized until dissolved and incubated for 1



min at room temperature. The tube with the mixture was centrifuged at full speed for 3 min and the supernatant (200  $\mu$ l) was placed in a 1.5-ml tube containing 15  $\mu$ l of proteinase K and 200  $\mu$ l of AL buffer. The solution was mixed for 15 s until homogenized and incubated at 70°C for 10 min. After incubation, 200  $\mu$ l of 96–100% ethanol was added, and the mixture was placed in an affinity column. The column was centrifuged at maximum speed for 1 min, washed twice with 500  $\mu$ l of each AW1 and AW2 buffers, and centrifuged at maximum speed for 3 min. The column was transferred to a 1.5-ml tube, and the DNA was eluted from the column with 200  $\mu$ l of AE buffer, incubated for 1 min at room temperature and centrifuged at maximum speed for 1 min. The obtained DNA was stored at -20°C until used.

### *E. histolytica* and *E. dispar* differential detection by PCR

Since *E. dispar* cysts are not visually distinguishable from *E. histolytica* cysts, a PCR assay was performed to identify both species in DNA from the coprology-positive feces obtained as mentioned above. A common forward primer EntaF 5'-ATG CAC GAG AGC GAA AGC AT-3' and two species specific reverse primers Ehr 5'-GAT CTA GAA ACA ATG CTT CTC T-3' and EdR, 5'-CAC CAC TTA CTA TCC CTA CC-3', were used for *E. histolytica* and *E. dispar* identification, respectively [35]. PCR reactions were performed on 100 ng of purified DNA using a HotStar Taq plus Master Mix Kit (Qiagen), according to the manufacturer's directions. Reactions were run as follows: 94°C for 7 min; 35 cycles of 94°C for 90 s, annealing for 1 min; 72°C for 1 min; and final incubation at 72°C for 7 min. Annealing temperature was set to 56°C for *E. histolytica* and to 58°C for *E. dispar* specific reverse primers, respectively. Amplicons were separated in 1%-agarose gels after staining with ethidium bromide, and visualized under UV light.

### Cyst isolation

Cysts were partially isolated from 10 stool samples positive for *E. histolytica* by PCR, as reported elsewhere [36]. Briefly, approximately 7 g of each stool sample were homogenized with 40 ml of PBS. Large particles were removed by filtering through a double-layer gauze. Filtrates were centrifuged at 150  $\times$  g for 7 min at 4°C; supernatants were decanted and pellets were extensively washed with PBS until supernatant was clear. Pellets were resuspended in 5 ml of distilled water. Suspensions were gently layered onto 40 ml of sucrose 1.5 M and centrifuged at 500  $\times$  g for 10 min at 4°C. Immediately, the cyst-containing interface was carefully removed, mixed with 20 ml of distilled water and centrifuged at 150  $\times$  g for 5 min at 4°C. Pellets were resuspended again in 5 ml of distilled water, layered onto 15 ml of sucrose 0.75 M, and centrifuged at 500  $\times$  g for 15 min at 4°C. Pellets containing cysts were stored at 4°C in PBS with sodium azide until used.

### Preparation of *E. histolytica* trophozoite, CLS and cyst protein extracts

To obtain trophozoite total extracts, cultures of 72 h were chilled on ice for 5 min and the cells harvested by centrifugation at 150  $\times$  g for 5 min. Then, trophozoites were transferred to Falcon tubes and washed five times with PBS followed by centrifugation at 150  $\times$  g for 5 min. Pellets from trophozoite or CLS mentioned above were washed and placed in 1 ml of PBS with protease inhibitors (Complete tablet, Sigma) on ice for 15 min. Then, samples underwent 10 liquid nitrogen/37°C freeze-thaw cycles and were centrifuged at 16,000  $\times$  g for 30 min at 4°C. Supernatants (total protein extracts) were transferred to clean tubes, and protein concentration was determined by the Bradford method [37]. Extracts were aliquoted and stored at -70°C until used.



Cyst protein extract was prepared from a pool of isolated cysts (about  $2 \times 10^5$ ) from 10 PCR-positive samples for *E. histolytica*, as follows: cysts were washed and placed in 500  $\mu$ l of PBS with protease inhibitors (Complete tablet, Sigma) on ice for 15 min. Then, samples underwent 10 liquid nitrogen/37°C freeze-thaw cycles and sonication for 30 min (15 s/15 s rest), followed by centrifugation at  $16,000 \times g$  for 30 min at 4°C. Supernatants (total protein extracts) were transferred to clean tubes, and protein concentration was determined by the Bradford method [37]. Cyst protein extract was stored at -70°C until used.

### Sample preparation for LC-MS/MS analysis

About 40  $\mu$ g of the trophozoite, CLS and cyst protein extracts were applied to 12% polyacrylamide gels and run just enough time to allow the mixture of proteins to enter the stacking gel and concentrate as a coarse band. Bands from each sample (trophozoites, cysts and CLS) were cut under sterile conditions and sent to Bioproximity Laboratories (Chantilly, VA) for LC-MS/MS analysis.

### Protein denaturation and digestion

Samples were prepared for digestion by the filter-assisted sample preparation (FASP) method [38]. Briefly, the samples were suspended in 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM DTT, briefly sonicated, and incubated at 40°C for 20 min. Samples were clarified by centrifugation, and then supernatants were transferred onto 30-kDa MWCO Amicon columns (Millipore), centrifuged at  $13,000 \times g$  for 30 min and resuspended in 8 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 7.6. Proteins in the sample were then alkylated with 15 mM iodoacetamide. After diluting in 2M urea, proteins were digested overnight with trypsin at an enzyme: substrate ratio of 1:40 at 37°C with constant agitation. Digested peptides were collected by centrifugation.

### Peptide desalting

About 20  $\mu$ g of the digested peptides were desalted using C18 STAGE stop-and-go extraction tips [39]. Briefly, a C18 STAGE tip was activated with methanol for each sample, and then conditioned with acetonitrile 60%:acetic acid 0.5%, followed by acetonitrile 2%/acetic acid 0.5%. Samples were loaded onto the tips and desalted with acetic acid 0.5%. Peptides were eluted with acetonitrile 60%:acetic acid 0.5% and lyophilized in a SpeedVac (Thermo Savant) apparatus to near dryness.

### Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Peptides were analyzed by LC-MS/MS. LC was performed on an Easy-nLC 1000 UHPLC system (Thermo Scientific, Waltham, MA). Mobile phase A was 97.5% MilliQ water, 2% acetonitrile, 0.5% acetic acid. Mobile phase B was 99.5% acetonitrile, 0.5% acetic acid. LC gradient ran from 0% B to 35% B over 210 min, then to 80% B for further 30 min. Samples were loaded directly into a C18 50 cm  $\times$  75  $\mu$ m column (Thermo Easy Spray PepMap). LC was interfaced to a quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Q-Exactive, Thermo Fisher) via nano-electrospray ionization using a source with an integrated column heater (Thermo Easy Spray). The column was heated to 50°C. An electrospray voltage of 2.2 kV was applied. The mass spectrometer was programmed to acquire, by data-dependent acquisition, tandem mass spectra from the top 20 ions in the full scan from 400–1200 m/z. Dynamic exclusion was set to 15 s, single-charged ions were excluded, isolation width was set to 1.6 Da, full MS resolution to 70,000 and MS/MS resolution to 17,500. Normalized collision energy was set to 25, automatic gain control to  $2e5$ , maximum fill MS to 20 ms, maximum fill MS/MS to 60 ms and the underfill ratio to 0.1%.

## Data processing and library searching

Mass spectrometer RAW data files were converted to the mz5 format using the ms convert [40]. Briefly, all searches required 10 ppm precursor mass tolerance, 0.02 Da fragment mass tolerance, strict tryptic cleavage, 0 or 1 missed cleavages, fixed modification of cysteine alkylation, variable modification of methionine oxidation, and expectation value scores of 0.01 or lower. Proteins were required to have 1 or more unique peptides across the analyzed samples with E-value scores of 0.01 or less.

## Bioinformatic analysis

Proteins identified in trophozoite, cyst, and CLS total extracts were analyzed with the BioVenn software for Venn diagram construction, STATISTICA 12 for correlation analysis, and DAVID Bioinformatics Resources 6.7 for functional classification [41, 42]. The proteins identified were also mapped with Gene Ontology terms using the Panther DB [43,44], and the overrepresentation test was performed using a *P*-value < 0.05. Those proteins that could not be annotated using Panther were annotated with Argot2 (total score > 200) [45–47]. The sub-cellular location of some proteins was predicted using CELLO v2.5 [48,49], and antigenicity was predicted using the Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale [50].

## *E. histolytica* trophozoites, CLS and cyst RNA purification

RNA was purified from trophozoites or CLS with the Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA). Briefly, approximately  $10^6$  trophozoites or CLS were added with 1 ml of Trizol and homogenized by vortexing. Subsequently, 1 ml of ethanol was added, and the homogenate was vortexed and placed on a Zymo-Spin IIC Column and centrifuged for 1 min at maximum speed. Then, the column was treated with 400  $\mu$ l of RNA Pre Wash and washed with 700  $\mu$ l of RNA Wash buffer, and then centrifuged for 1 min at maximum speed. Finally, the column was transferred to an Eppendorf tube and RNA was eluted with 50  $\mu$ l of RNase-free water. RNA was quantified and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used.

Cyst RNA was purified from the 0.25 g of sample stool with the Power Microbiome RNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) following the manufacturer's directions. Briefly, stool was placed into a 1-ml tube; 650  $\mu$ l of PM1 were added; the tube was vortexed for 10 min and centrifuged at maximum speed for 1 min. The supernatant was transferred into a new tube, 150  $\mu$ l of PM2 solution were added, and the mixture was centrifuged for 1 min. The supernatant was collected into a new tube and 650  $\mu$ l of PM3 and PM4 solutions were added. Then, 650  $\mu$ l of supernatant were loaded onto a Spin Filter and centrifuged for 1 min; 650  $\mu$ l of PM5 Solution were added and the Spin Filter was centrifuged for 1 min. Then, 50  $\mu$ l of DNase I Solution and 400  $\mu$ l of PM7 Solution were added to the Spin Filter and it was centrifuged for 1 min. The column was washed with PM5 and PM4 solutions and centrifuged for 1 min after each wash. Finally, RNA was eluted with 50  $\mu$ l of RNase-free water. RNA was quantified and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used.

## Reverse transcriptase PCR

RT-PCR was performed using the SuperScript One-Step RT-PCR kit with Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's specifications. Reactions were run using 200 ng of RNA from each sample. Samples were amplified as follows:  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 min;  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min; 40 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 15 s; annealing for 30 s;  $70^{\circ}\text{C}$  for 1 min; and final incubation at  $68^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Annealing temperature and the primers used are summarized in Table 1. Amplicons were resolved in 1% agarose gels for visualization.



**Table 1. Oligonucleotides used for RT-PCR of *Entamoeba histolytica* cyst wall proteins.**

Sequence Accession	Protein name	Primers F/R 5' -3'	Amplified size	Annealing T ° C
XM_001913371.1	Malic enzyme, putative	ACTCGGATCCATGGCACAATTAAGCAGATTCCCTCGAGTTTTCCAGTGACTTTGTTAA	1464	52
XM_645281.2	fructose-1,6-bisphosphate aldolase, putative	ACTCGGATCCATGGCTGCTAAGACTGTTAACATTCCCTCGAGATACCATGATTTTCCTGCTGAG	990	61
XM_645264.2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative	ACTCGGATCCATGTCAATTAAGGTCGGTATTAATTCCTCGAGATGAACTTAGAAATGATTTGGA	1000	58
XM_001914290.1	Gal/GalNAc (Fragment LC3)	TAGAAAGCTTATGTTCTAGTTTAAACATGTCCATTTTTCTAGATTAACATGTTTTCTTTGTGTAATAG	1028	59
XM_001914339.1	Peroxioredoxin	ACTCGGATCCATGTCTTGCAATCAACAAAAAGATTCCTCGAGTCTGTTTGTTTAAATGTTGTTAA	711	58
AF401986	Chitinase Jessie 1	AAGTGGATCCATGACACTAATTATTTCTTACCAAGCTTTTATTTATAATTTTCATAAA	273	63
AF401987	Chitinase Jessie 2	AAGTGGATCCATGATGATATTAATCATTTTACCAAGCTTTTAAACAATAATCATCATTT	294	65
AF401988	Chitinase Jessie 3	AAGTGAATTCATGAAATTAGCTGTTTTAATACCAAGCTTTTATTTGAATAATGAACT	1800	65
AF401984.1	Lectin Jacob	AAGTGGATCCATGAAAGCATTACTTGTTATCCCAAGCTTTTAAATACATGGATTGTTA	456	66
XM_652120.2	Chitin Synthase 2, putative	AAGTGGATCCATGTCAGTGAGTTCCCTATCCCAAGCTTTTACTCTGAATGAGAAAGG	2841	68
AF082517	ADP-ribosylation factor (ARF)	GTAGGACTTGATGCGTGAAGAATTAATGA	259	51

doi:10.1371/journal.pone.0156018.t001

### Western Blot against Jacob protein

A Western blot was performed to identify the Jacob protein in CLS and cysts. 15 µg of each sample were resolved in a 12% acrylamide gel and then transferred to a PVDF membrane. The membrane was blocked with milk 10% for 1 h at 37°C. Anti-Jacob 1:1000 (kindly donated by Dr. W.A. Petri Jr.) incubated overnight at 4°C and a goat HRP-conjugated anti-rabbit 1:50,000 (62–6120 ZYMED, San Francisco, CA) incubated for 2 h at 37°C, were used as primary and secondary antibodies, respectively. The Immune complex in the membrane was developed with the Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (Thermo Scientific). Extract from trophozoites was used as a negative control.

### Immunofluorescence against Jacob protein

CLS and cysts were fixed with paraformaldehyde 4% for 30 min at room temperature. Then, samples were washed three times with PBS and permeabilized with Triton 1% for 1 h at 50°C. Samples were blocked with BSA 1% for 1 h, and treated with the anti-Jacob 1:200 incubated overnight at 4°C and goat FITC-conjugated anti-rabbit 1:200 (F1262, Sigma, St. Louis, MO) incubated for 2 h at 37°C, were used as primary and secondary antibodies, respectively. Samples were immediately visualized under a fluorescence microscope. Trophozoites processed in parallel were used as a negative control.

## Results

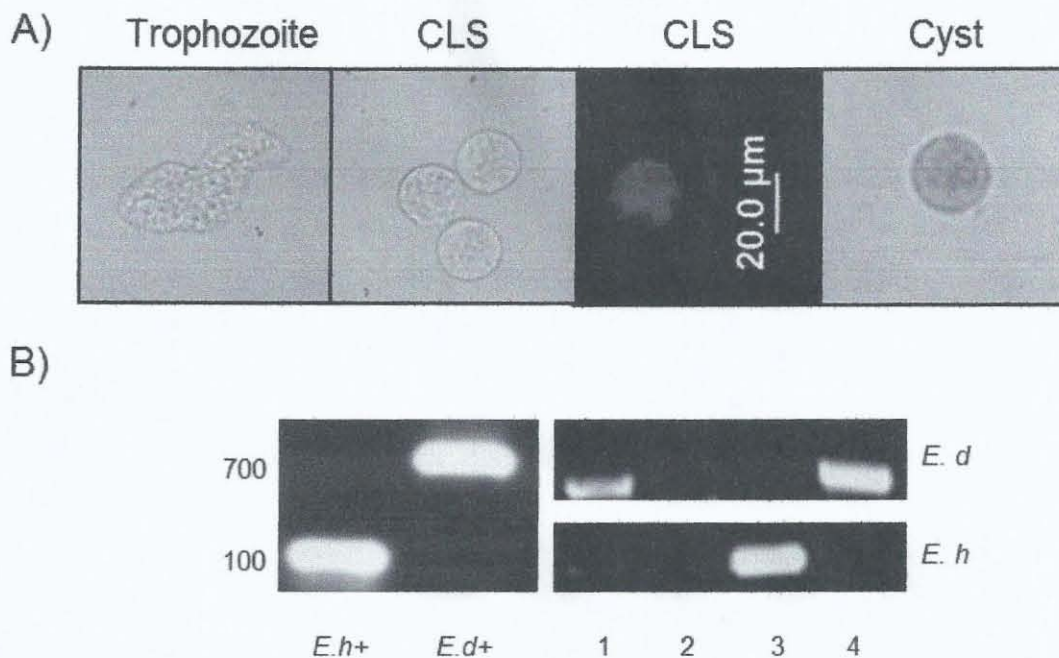
### CLS and cyst selection for the study

CLS were obtained after a 4-h treatment with hydrogen peroxide 4 mM as previously reported [32]. After detergent resistance selection with sarkosyl 0.1% for 20 min, the morphology of the obtained structures was verified by microscopy. CLS showed a rounded shape, size reduction, and refringence that resemble cysts isolated from fecal samples (Fig 1A). In addition, the cover of CLS was strongly stained with calcofluor white (Fig 1A); previous studies using CFDA showed that CLS are still viable at this time of treatment [32]. On the other hand, 10 stool samples were selected by PCR as uniquely positive for *E. histolytica* (~100 bp band) from 80 putatively positive amoeba samples as determined by coproparasitoscopic analysis. The other 70 samples were excluded from this study because they were either positive by PCR for *E. dispar* (~700 bp band) or negative for both amoeba species. In Fig 1B, a representative agarose gel with 4 samples analyzed by PCR is shown.

### Comparison of *E. histolytica* trophozoites, cysts and CLS proteomic data

Raw protein extracts from trophozoites, CLS, and cysts were analyzed by mass spectrometry. In total, 1990 proteins were identified: 1029 in trophozoites, 550 in CLS, and 411 in cysts (Fig 2A). However, only 1419 *E. histolytica* proteins were identified as different (S1 Table). This represents about 14% of the theoretical proteome of the parasite based on 9,938 predicted genes [51, 52]. Among the 1029 proteins identified in trophozoites, 789 are annotated and 240 are hypothetical proteins (23%). Out of the 550 proteins identified in CLS, 443 are annotated and 107 are hypothetical (19%), whereas out of the 411 proteins identified in cysts 250 are annotated and 161 proteins are hypothetical (almost 40%) (Fig 2B). The number of proteins identified in trophozoites was roughly the double of those found in cysts and CLS. About 25% of all proteins identified in this study are hypothetical or have not been characterized yet (All proteomic data have been deposited in the Proteome Xchange database under Accession No. PXD004030).



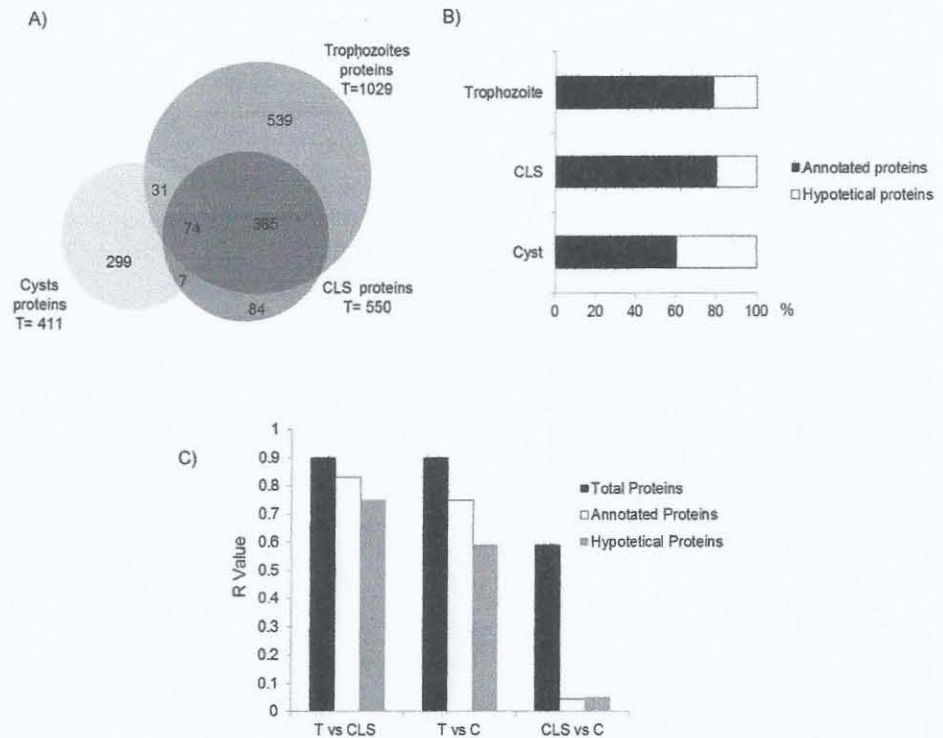


**Fig 1. CLS induction and stool samples positive for *E. histolytica*.** A) Samples used in this study. From left to right: *E. histolytica* trophozoites, CLS (induced from trophozoites after a 4 h treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM), CLS stained with calcofluor white and a cysts partially purified from a fecal sample and stained with Lugol. B) Representative agarose gel of the PCR products differentiating *E. histolytica* from *E. dispar*. Samples 1 and 4 were positive to *E. dispar*, sample 3 to *E. histolytica* and sample 2 negative. *E. histolytica* and *E. dispar* trophozoite DNA were used as positive controls (Eh+ and Ed+).

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g001

A comparison of the three proteomes showed that only 74 proteins are shared among trophozoites, cysts, and CLS (Fig 2A and Table 2). Additionally, 385 proteins are shared by trophozoites and CLS, whereas 31 proteins are shared by trophozoites and cysts. Only 7 proteins are shared between cysts and CLS. The analysis also showed 539, 299, and 84 proteins unique to trophozoites, cysts, and CLS samples, respectively. Therefore, based on the numbers of different proteins either shared or unique to each sample, CLS seem more akin to trophozoites than to cysts. To verify this, a statistical correlation test comparing all proteins identified in the three samples was performed. The results showed that CLS are more closely related to trophozoites than to cysts ( $R = 0.9$  vs.  $0.7$ , respectively; Fig 2C, black bars). It is noteworthy that when proteins were grouped as annotated or hypothetical, very low association levels were found between hypothetical proteins in trophozoites and CLS with respect to cysts (0.03 and 0.05, respectively; Fig 2C, gray bars).

The results show that the differences in trophozoites and CLS from cysts are largely based on hypothetical proteins when the presence or absence of proteins, rather than their relative abundance, is considered. This is interesting in the sense that hypothetical proteins in *E. histolytica* cysts could be important for the generation and/or maintenance of this stage. When the group of 74 proteins shared by the three samples was compared on the basis of relative abundance (peptide-hit score), 24 actin entries showed the highest peptide-hit score in all three samples. It is remarkable that peptide-hits for cellular metabolism proteins like pyruvate phosphate dikinase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, phosphoglycerate kinase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase, and galactokinase were more than double in trophozoites



**Fig 2. Comparison of proteomic data obtained from *E. histolytica* trophozoites, cysts and CLS.** A) Proteome comparison using the BioVenn software. B) Percentage of annotated and hypothetical proteins identified in each sample. C) Global protein association between samples, labeled as total, annotated, or hypothetical proteins as determined by correlation test. R-values closer to 1 indicate a closer association. T: Trophozoite; CLS: cyst-like structure; C: cyst.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g002

than in CLS and cysts (Table 2). In contrast, peptide-hit score was higher, in some cases two or three times higher, for oxidative stress enzymes like peroxiredoxin and two HSP70 (Bip and a putative one), as well as for disulfide isomerase and EF-hand calcium-binding domain-containing proteins in CLS samples than in trophozoites and cysts. It is worth mentioning the high expression in CLS of the 170-kDa heavy subunit of galactose-inhibitable lectin, given its role in cyst wall formation in *E. invadens* [53]. Finally, in cysts, the abundance of malic enzyme, putative 70-kDa heat shock proteins, and a 14-3-3 protein was relatively high, in addition to actins (Table 2).

As mentioned above, hundreds of unique proteins were identified in trophozoite and cyst samples, whereas CLS shared most proteins with trophozoites. Unique proteins with a high peptide-hit score may be stage-specific and might play a functional role. A list of the 15 top highly abundant, unique proteins of each sample and their possible function is shown in Table 3. Proteins involved in DNA-binding, translation, ribosome biogenesis, and actin polymerization were identified as relatively abundant in trophozoites. Grainin, a granule calcium-binding protein probably involved in control of endocytotic pathways and granule discharge, was identified in CLS with the highest peptide-hits score. Other unique proteins involved in proton transport, proteolysis, and redox homeostasis and stress response were also identified. In contrast, cysts showed high expression levels of many putative uncharacterized proteins (8



**Table 2. Proteins shared among trophozoites, cysts, and CLS as identified by LC-MS/MS.**

ID Accession Uniprot	Name	No. of matched peptides / Count peptide Hits		
		Trophozoites	Cysts	CLS
S0AUW6	Actin	97/645	10/68	46/373
S0AWJ4	Actin, putative	100/645	10/68	45/358
S0AWF4	Actin	96/640	10/68	45/363
S0AWZ1	Actin	100/639	10/68	46/363
S0AWJ9	Actin, putative	94/635	10/68	45/363
S0AUT4	Actin, putative	97/626	10/68	44/361
S0AUS7	Actin, putative	95/616	9/64	43/354
S0AVA7	Actin, putative	94/608	9/66	44/361
S0AWA2	Actin, putative	91/605	10/68	40/331
S0AXB5	Actin, putative	83/596	11/70	40/331
<b>Q24801</b>	<b>Pyruvate phosphate dikinase</b>	<b>113/587</b>	<b>2/4</b>	<b>64/285</b>
S0AV75	Actin, putative	92/586	10/68	45/346
Q9TYD6	Actin	96/583	10/68	43/342
S0AUR6	Actin, putative	90/583	9/64	40/332
S0AV23	Actin, putative	87/579	8/51	43/324
S0AVQ9	Actin, putative	90/568	10/68	46/337
S0AWT4	Actin, putative	74/536	8/63	34/396
B1N621	Actin, putative	79/487	9/66	38/282
S0AW09	Actin, putative	86/478	8/35	40/285
S0AV15	Actin, putative	75/444	8/38	38/280
S0AVT2	Actin, putative	66/421	7/50	35/251
<b>C4LVR9</b>	<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>	<b>71/333</b>	<b>1/2</b>	<b>30/105</b>
<b>S0AX11</b>	<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>	<b>69/330</b>	<b>1/2</b>	<b>30/105</b>
S0AYM0	Actin, putative	80/316	3/19	32/148
S0B0T0	Actin, putative	73/282	2/15	30/133
S0B1Y3	Actin	73/276	2/15	29/116
C4LU72	Myosin heavy chain	100/226	1/1	37/73
Q07569	Myosin heavy chain	83/197	1/1	31/65
B1N306	Elongation factor 2	69/195	1/1	12/28
<b>B1N2J0</b>	<b>Malic enzyme, putative</b>	<b>52/185</b>	<b>2/5</b>	<b>20/51</b>
C4LY85	Ubiquitin, putative	11/176	1/1	4/16
<b>G5EKL5</b>	<b>Malic enzyme</b>	<b>48/174</b>	<b>2/5</b>	<b>18/45</b>
<b>S0AW44</b>	<b>Malic enzyme, putative</b>	<b>46/172</b>	<b>2/5</b>	<b>18/48</b>
<b>S0AZU7</b>	<b>Phosphoglycerate kinase</b>	<b>33/156</b>	<b>1/1</b>	<b>15/45</b>
S0AWG4	Elongation factor 1- $\alpha$	38/150	1/3	21/86
<b>C4M3S5</b>	<b>Heat shock protein 70, putative</b>	<b>45/150</b>	<b>2/5</b>	<b>19/54</b>
O15593	Actin	23/136	1/2	5/60
<b>C4LXD7</b>	<b>Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, putative</b>	<b>45/133</b>	<b>2/3</b>	<b>16/36</b>
S0B0R7	Elongation factor 1- $\alpha$	33/117	1/3	18/72
<b>C4M3Q0</b>	<b>Peroxiredoxin</b>	<b>31/98</b>	<b>1/4</b>	<b>27/124</b>
<b>C4MB38</b>	<b>Protein disulfide isomerase, putative</b>	<b>29/93</b>	<b>1/1</b>	<b>35/180</b>
<b>Q24835</b>	<b>Galactose-specific adhesin 170kD subunit</b>	<b>35/91</b>	<b>1/1</b>	<b>54/160</b>
<b>B1N3C7</b>	<b>Galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative</b>	<b>33/90</b>	<b>1/1</b>	<b>55/166</b>
<b>B1N5A8</b>	<b>Peroxiredoxin</b>	<b>26/90</b>	<b>1/4</b>	<b>23/116</b>

(Continued)

Table 2. (Continued)

ID Accession Uniprot	Name	No. of matched peptides / Count peptide Hits		
		Trophozoites	Cysts	CLS
O15729	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	16/89	1/1	5/13
<b>C4LTM0</b>	<b>Gal/GalNAc lectin heavy subunit</b>	<b>29/81</b>	<b>1/1</b>	<b>50/153</b>
<b>B1N486</b>	<b>Heat shock protein 70, putative</b>	<b>29/69</b>	<b>2/5</b>	<b>9/28</b>
C4LYJ7	Galactokinase, putative	21/61	1/2	10/30
<b>C4M770</b>	<b>70 kDa heat shock protein, putative</b>	<b>24/59</b>	<b>2/2</b>	<b>43/177</b>
O15601	Elongation factor 1 $\alpha$	12/55	1/3	8/26
<b>O77164</b>	<b>70 kDa heat shock protein Hsp70-Bip</b>	<b>21/50</b>	<b>2/2</b>	<b>37/142</b>
C4M0F4	14-3-3 protein 3	18/47	1/4	5/11
C4LVD3	Sulfate adenylyltransferase, putative	20/43	2/2	6/11
C4M6Y2	Polyadenylate-binding protein, putative	16/28	1/1	3/5
B1N336	40S ribosomal protein S4, putative	11/27	1/1	1/2
B1N368	Putative uncharacterized protein	14/26	1/1	2/4
C4M711	Putative uncharacterized protein	9/26	1/1	2/2
C4M9P2	Filopodin, putative	11/21	1/1	6/9
<b>C4MBE2</b>	<b>EF-hand calcium-binding domain containing protein</b>	<b>6/17</b>	<b>1/4</b>	<b>8/72</b>
Q9BLE4	Small GTPase Rab11B	9/17	1/1	6/7
Q24834	Disulphide oxidoreductase	6/16	1/1	3/4
Q9BLE8	Small GTPase Rab7A	4/14	2/2	2/4
C4M6S2	60S ribosomal protein L14, putative	5/13	1/2	2/3
C4M8Z5	Putative uncharacterized protein	6/12	1/1	1/1
Q6AW60	EhRab11A protein	6/11	1/1	5/6
C4M846	26s protease regulatory subunit	6/10	1/1	2/2
C4LYV2	60S ribosomal protein L7, putative	6/9	1/1	1/2
C4LXG1	Purine nucleoside phosphorylase, putative	3/7	1/1	1/2
C4M7T9	Ubiquitin-activating enzyme, putative	4/6	1/3	2/4
B1N384	60S ribosomal protein L4, putative	2/5	1/1	1/2
C4M3X0	Calcium-transporting ATPase	3/5	2/3	2/3
Q27642	Calcium-transporting ATPase	2/4	1/1	2/3
C4LYNO	Putative uncharacterized protein	2/2	1/1	4/9
C4M0V2	Multidrug resistance protein, putative	1/1	1/1	1/3

Proteins in bold are discussed in the text

doi:10.1371/journal.pone.0156018.t002

out 15 proteins with the highest peptide-hit score) in addition to a putative nuclear transcription factor, an aminoglycoside 3'-phosphotransferase, and an alkyl sulfatase.

Predictions of functional analysis of the annotated proteins (approximately 75% of all identified proteins) using the bioinformatics tool DAVID was performed [42]. Trophozoite, CLS, and cyst proteins were grouped into different functional groups, with trophozoites showing more functional protein groups than CLS or cysts. Trophozoite proteins were mainly grouped in clusters of translation (40%), proteolysis (15%), phosphorylation (12%), and signal transduction and amino acid activation processes (10%) (Fig 3, white bars). CLS proteins showed a pattern quite similar to trophozoites, with translation, proteolysis, and signal transduction clusters grouping over 50% of proteins, and with percentages close to those observed in



**Table 3. Proteins identified as unique with highest peptide-hit score in trophozoites, CLS, and cysts.**

Accession number	Protein name	No. of matched peptides/ Count peptides	Function
<b>Trophozoites</b>			
C4LV11	Putative uncharacterized protein	17/35	<b>unknown function</b>
C4LWJ6	LIM zinc finger domain containing protein	9/32	<i>zinc ion binding</i>
C4LV07	Malate dehydrogenase, putative	7/30	<i>oxidoreductase activity</i>
C4LT49	40S ribosomal protein S24, putative	11/29	<b>translation</b>
B1N3R9	60S ribosomal protein L7a, putative	10/27	<b>ribosome biogenesis</b>
C4M0A8	Putative uncharacterized protein	16/26	<b>unknown function</b>
C4M0Q2	40S ribosomal protein S8	12/24	<b>translation</b>
C4M727	60S ribosomal protein L27, putative	11/24	<b>translation</b>
C4LUC7	Non-conventional myosin IB	11/23	<i>ATP binding</i>
C4LW30	RNA modification enzymes, MiaB-family	12/23	<b>RNA modification</b>
C4LZB0	40S ribosomal protein S6	8/23	<b>translation</b>
C4M7H1	Actobindin, putative	10/23	<b>binds actin monomers</b>
C4LZ12	Tyrosyl-tRNA synthetase, putative	9/22	<b>tRNA aminoacylation for protein translation</b>
B1N2Z3	60S acidic ribosomal protein P0, putative	10/21	<b>ribosome biogenesis</b>
C4LSV0	ARP2/3 complex 20 kDa subunit, putative	10/21	<b>actin filament polymerization</b>
<b>CLS</b>			
B1N4A1	Grainin, putative	9/22	<i>calcium ion binding</i>
C4M784	Putative uncharacterized protein	10/18	<i>catalytic activity</i>
C4LTM6	Serine-threonine-isoleucine rich protein, putative	8/15	<b>integral component of membrane</b>
C4LU65	Vacuolar ATP synthase subunit H, putative	6/14	<b>ATP hydrolysis coupled proton transport</b>
B1N330	Serine-threonine-isoleucine rich protein, putative	6/11	<b>integral component of membrane</b>
C4LU31	Thioredoxin, putative	4/8	<b>cell redox homeostasis</b>
C4LUQ2	Glucosidase, putative	3/6	<b>carbohydrate metabolic process</b>
C4LTT0	Cysteine proteinase, putative	3/6	<i>cysteine-type peptidase activity</i>
C4LTV9	Uncharacterized protein	3/5	<b>unknown function</b>
C4LV34	Putative uncharacterized protein	2/5	<b>unknown function</b>
C4LT65	Heat shock protein 70, putative	1/4	<b>Stress response</b>
C4M916	Copine, putative	2/4	<i>calcium-dependent membrane binding proteins</i>
C4LX23	RhoGAP domain containing protein	2/4	<b>signal transduction</b>
C4M6M0	Putative uncharacterized protein	1/4	<b>small GTPase mediated signal transduction</b>
C4M741	Cortexillin, putative	2/4	<b>Cytokinesis</b>
<b>Cyst</b>			
C4M4Q8	Nuclear transcription factor, putative	1/29	<i>sequence-specific DNA binding</i>
C4M6B9	Putative uncharacterized protein	1/23	<i>RNA binding</i>
B1N624	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase, putative	4/16	<b>response to antibiotic</b>
C4M8Z0	Alkyl sulfatase, putative	1/15	<i>alkyl sulphatase activity</i>
C4MBE9	Putative uncharacterized protein	2/12	<b>unknown function</b>
C4M1F3	Putative uncharacterized protein	1/11	<b>unknown function</b>
C4M977	Putative uncharacterized protein	1/11	<b>rRNA processing</b>
C4LW71	DNA mismatch repair protein PMS1, putative	1/7	<b>mismatch repair</b>

(Continued)

Table 3. (Continued)

Accession number	Protein name	No. of matched peptides/ Count peptides	Function
C4LX70	Putative uncharacterized protein	1/5	<b>double-strand break repair via non-homologous</b>
C4M4W5	Putative uncharacterized protein	1/5	<b>unknown function</b>
C4LYB9	Putative uncharacterized protein	1/4	<b>unknown function</b>
C4M2G7	Putative uncharacterized protein	1/4	<i>phosphoric ester hydrolase activity</i>
B1N3D1	Tyrosine-protein kinase 2, putative	1/3	<i>ATP binding</i>
B9U2P3	Organellar DNA polymerase 1	2/3	<b>DNA replication</b>
C4LV85	Centromeric protein E, putative	2/3	<b>kinesin-like motor protein</b>

Molecular function shown in italics. Biological function shown in bold. Unknown function: Unknown function in *E. histolytica*.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.t003

trophozoites (Fig 3, gray bars). Phosphorylation, signal transduction and, notably, non-membrane bounded organelle clusters included around 60% of cyst proteins.

The functional categories that are either shared or unique among samples are shown in Fig 4. In total, 12 categories were shared by the three samples, including metabolic, transport, and localization processes. Trophozoites and cysts shared three functional categories, while trophozoites and CLS shared eight categories. It is important to mention that cysts and CLS failed to share any functional categories. Furthermore, trophozoites, CLS, and cysts have 8, 1 and 11 unique categories.

An overrepresentation test was performed using PANTHER [43,44] to determine the biological processes that were enriched in each analyzed sample. Several processes were identified as enriched in trophozoites ( $P < 0.001$ ): a sulfur compound metabolic process, respiratory electron transport chain, generation of precursor metabolites and energy, translation and monosaccharide metabolic processes. Confirming the high identity of CLS with trophozoites, an over-expression related to homologous processes in the former was also identified in the latter,

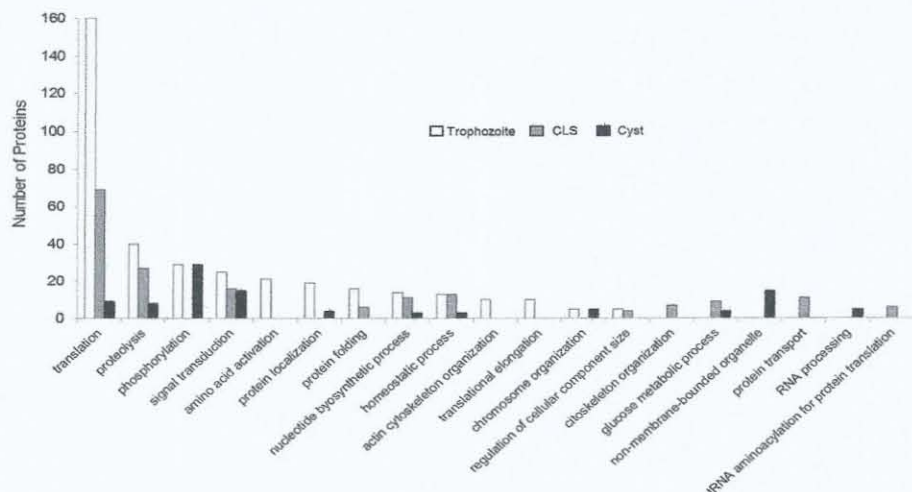
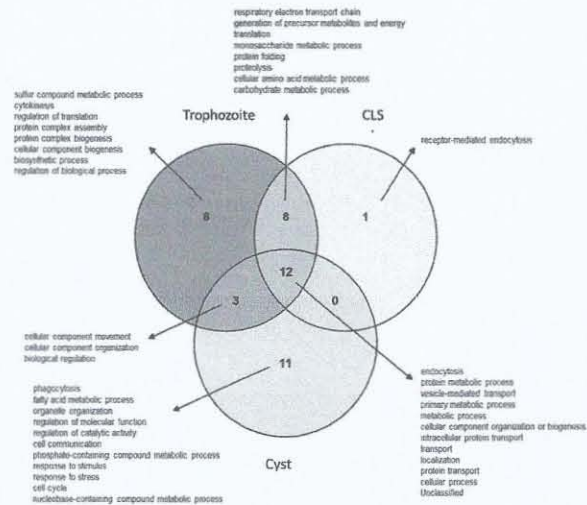


Fig 3. Functional classification of proteins identified in trophozoites, cysts, and CLS total extracts. The number of proteins (left y-axis) in each of 19 functional groups is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g003





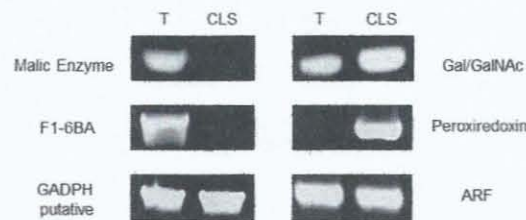
**Fig 4. Comparison of functional categories among trophozoites, CLS and cysts.** A functional comparison among the three cell types is represented in a Venn diagram. Intersections show shared functions among the analyzed samples.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g004

except for the sulfur compound metabolic process. Furthermore, enrichment was also observed in other CLS processes such as proteolysis and protein folding ( $P < 0.001$ ). Finally, the most enriched processes in cysts were phagocytosis, fatty acid metabolic processes, endocytosis, cellular component movement, and organelle organization ( $P < 0.001$ ). It is noteworthy that translation and metabolism processes aren't enriched in cysts. The complete enrichment analysis is shown in S2 Table.

### Validation of proteins identified in proteomic study by RT-PCR

Five proteins were selected to validate the proteomic findings in our study. Three proteins that were identified as less abundant in CLS with respect to trophozoites (malic enzyme, fructose 1,6-bisphosphate aldolase, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]), and two proteins more abundant in CLS than in trophozoites (peroxiredoxin, associated with oxidative stress response, and the Gal/GalNAc lectin, associated to encystation). In agreement with the proteomic results, the RT-PCR showed that malic enzyme and fructose 1,6-bisphosphate aldolase were not expressed in CLS, in contrast with trophozoites where the expression was clearly detected (Fig 5). However, GAPDH showed similar expression levels in CLS and trophozoites. On the other hand, peroxiredoxin mRNA expression was observed in CLS but not in trophozoites, and the Gal/GalNAc lectin (fragment LC3 of the heavy chain) showed a 2-fold increase in CLS with respect to trophozoites (Fig 5), in accordance with the proteomic results. The ADP-ribosylation factor, used as internal control, was expressed at similar level in both samples. Unfortunately, we were unable to amplify the mRNA of none of the tested genes for validation in cyst RNA, although we amplified *E. histolytica* ribosomal RNA genes in that sample, suggesting that the messenger was present and intact (data not shown). The reason for the lack of amplification is unknown, but it could be related with the low concentration of *E. histolytica* cyst mRNA in the sample due to contamination with other components in stool, or to an arrest in RNA production because cyst is a metabolically inactive stage (latency stage).



**Fig 5. Validation of proteins identified by RT-PCR.** Five proteins were selected for RT-PCR validation. Left above: malic enzyme. Left middle: F1-6BA, fructose 1,6-bisphosphate aldolase. Left below: GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Right above: Gal/GalNAc lectin LC3 fragment. Right middle: peroxiredoxin. Right below: ARF, ADP-ribosylation factor, used as loading control. T: trophozoite, CLS: cyst-like structure.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g005

However, ribosomal RNA would be amplified because it is the most abundant RNA form in a cell. Oligonucleotides used in this study are shown in Table 1.

### Expression analysis of cyst wall proteins in CLS

Even though our results indicate that CLS resemble more trophozoites than cysts, previous studies in our group showed that CLS exhibit some morphological and structural characteristics of cysts, including multinucleation and a detergent-resistant wall susceptible to calcofluor-white staining [32]. In addition, CLS overexpress glucosamine 6-phosphate isomerase, the rate-limiting enzyme of the chitin synthesis pathway, suggesting an activation of the chitin formation route in CLS. However, except for the 170-kDa Gal-lectin subunit, other structural cyst wall proteins expected to be present in *E. histolytica* cysts were not identified in the current proteomic analysis, neither in CLS nor in cysts. Thus, the expression of genes encoding for some of these proteins was evaluated by semi-quantitative RT-PCR using *E. histolytica* specific primers for Jessie 1, 2, and 3; the Jacob protein; and chitin synthase. The ADP-ribosylation factor was included as a loading control. Primers used in this study are shown in Table 1.

Our results showed the expression of the cyst wall proteins Jessie 1, Jessie 3, and Jacob in CLS, whereas only the Jacob protein mRNA was detected in trophozoites. Although CLS have a detergent-resistant wall suggesting the presence of chitin, no chitin synthase expression was detected in that stage (Fig 6). As mentioned above, we were unable to amplify mRNA from none of the tested genes in cyst RNA.



**Fig 6. RT-PCR of transcripts encoding for cyst wall proteins in trophozoites and CLS.** RNA was isolated from trophozoites and CLS samples and used to perform a RT-PCR for a number of cyst wall specific proteins: Jessie 1 (J1), Jessie 2 (J2), Jessie 3 (J3), Jacob, and chitin synthase (CS). RT-PCR of the ADP-ribosylation factor (ARF) was used as an internal control. Odd numbers: trophozoites samples; even numbers: CLS samples.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g006

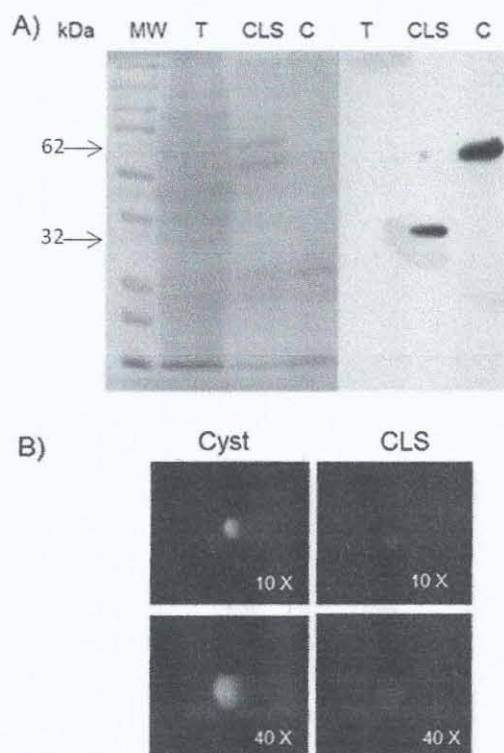


### Jacob protein expression in CLS

To determine whether the Jacob protein, previously reported in *E. histolytica* cyst wall [24], is expressed in CLS, a Western blot of CLS extracts and immunofluorescence on CLS were performed. A clear unique band of ~32 kDa was identified in CLS extracts, whereas a unique band of ~62 kDa was identified in cysts extracts (Fig 7A). This difference could correspond to different isoforms of the Jacob protein, being previously reported as highly polymorphic in cultured amoebas and clinical isolates and showing multiple posttranslational modifications [54, 55]. Furthermore, the Jacob protein was also detected in CLS surface by immunofluorescence, although with less intensity than the signal obtained in cysts (Fig 7B). This result suggests that this cyst wall protein is expressed in CLS, but as a different isoform to that expressed in cysts.

### Analysis of cyst proteome

In 2012, Ali *et al.* published the first and to date only *E. histolytica* cyst proteome, using fecal samples from Indian patients [24]. To contribute to the incipient knowledge of this essential stage, our proteomic results were compared with the previously published data. While a similar number of proteins were identified in both studies (417 against 411 proteins), only 16 proteins



**Fig 7. Jacob protein expression in CLS and cyst.** A) 15 µg of sample protein were resolved on 12% acrylamide gel (Coomassie blue-stained) and transferred to a PVDF membrane. Anti-Jacob 1:1000 and a goat HRP-conjugated anti-rabbit 1:50,000 antibodies were used. Unique bands of around 30-kDa and 62-kDa were observed in CLS and cyst samples, respectively, but not in a trophozoites sample. T: Trophozoite, CLS: Cyst-like structure, C: Cyst. B) Immunofluorescence on fixed and permeabilized cyst and CLS using anti-Jacob 1:200 and a goat FITC-conjugated anti-rabbit 1:200 antibodies.

doi:10.1371/journal.pone.0156018.g007

Table 4. Proteins identified in cysts in both studies.

Gene name	ID Uniprot	Name	Sucellular localization	% Antigenicity
EH_113570	C4M9W2	Kinesin-like protein	Nuclear	43.17
<b>EH_056650</b>	<b>C4M9T0</b>	<b>Serine/threonine-protein phosphatase</b>	<b>Plasma membrane</b>	<b>57.17</b>
EH_103530	C4LVJ7	DNA primase	Nuclear	56.31
EH_110170	C4LU71	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase domain containing protein	Nuclear	53.38
<b>EH_086140</b>	<b>C4M369</b>	<b>Ras guanine Nucleotide Exchange factor, putative</b>	<b>Plasma membrane</b>	<b>63.52</b>
EH_094140	C4LYK1	Rab GTPase activating protein, putative	Nuclear	63.29
EH_004750	C4M071	Signal recognition particle protein SRP54, putative	Cytoplasm	42.0
<b>EH_134750</b>	<b>C4M024</b>	<b>Protein tyrosine domain-containing protein</b>	<b>Plasma membrane and Nuclear</b>	<b>61.6</b>
EH_152390	C4LSS6	Protein kinase domain containing protein	Nuclear	63.68
EH_164910	C4M1Y4	Serine/threonine-protein kinase, putative	Nuclear	50.34
EH_010740	C4LYW1	Putative uncharacterized protein	Nuclear	56.91
EH_031640	C4MBA2	Putative uncharacterized protein	Cytoplasm	54.2
EH_123250	C4MAL5	Putative uncharacterized protein	Nuclear	33.7
<b>EH_146970</b>	<b>C4M8S8</b>	<b>Putative uncharacterized protein</b>	<b>Plasma membrane and Nuclear</b>	<b>63.58</b>
EH_148300	C4LT00	Putative uncharacterized protein	Nuclear	48.65
EH_193490	C4M4V1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein	Cytoplasm	56.19

Proteins are shown in bold with plasma membrane localization (potential therapeutic targets)

doi:10.1371/journal.pone.0156018.t004

regarded as stage-specific were shared by cysts in both studies (Table 4). Therefore, the sub-cellular location of these 16 proteins using CELLO v2.5 [48,49] and their antigenicity using the Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale [50] were herein predicted. Our results showed 9 proteins with nuclear localization, three proteins located in the cytoplasm, two in the plasma membrane, and two with both nuclear and plasma membrane locations. Noticeably, three out of the four of plasma membrane proteins presented an antigenicity score > 60%, and two of them have transmembrane regions. These proteins could be considered previously undescribed *E. histolytica* cyst-based therapeutic and diagnostic targets and deserve further studies (Table 4, grey labels).

As mentioned above, about 40% of all identified cyst proteins were grouped as hypothetical proteins, roughly the double of proteins identified in the same category for trophozoites and CLS (Fig 2B). In order to further characterize those cyst proteins, all 161 hypothetical proteins were categorized using Argot2 bioinformatics tool [45–47]. Theoretical functional categories with three or more proteins, both biological and molecular, are shown in Table 5.

## Discussion

A proteomic comparison among the *E. histolytica* trophozoite, cyst, and CLS stages was performed for the first time in this study, employing LC-MS/MS on samples processed in parallel. In addition to contributing to the identification of new stage-specific proteins in trophozoites and cysts, which are completely differentiated parasite stages, the proteome of previously uncharacterized, detergent-resistant structures, was analyzed. These cyst-like structures were obtained *in vitro* by exposing axenic trophozoites to hydrogen peroxide 4 mM for 4 h. Similar structures have been reported by other research groups in trophozoite cultures treated with different stimuli [29–31] when attempting to promote *E. histolytica* encystment *in vitro*, a critical process for the continuity of the amoeba life cycle and disease transmission. The CLS obtained by our group after oxidative stress showed structural features alike to real cysts, such as multi-nucleation (2 and 3 nuclei), refringence, size reduction and a chitin-type cover which confers



**Table 5. List of functional categories, both biological and molecular, identified with Argot2 for hypothetical cyst proteins.**

Biological process for hypothetical proteins	Molecular process for hypothetical proteins
Metabolic process	Hydrolase activity
Positive regulation of GTPase activity	ATP binding
Small GTPase mediated signal transduction	DNA binding
Phosphorylation	Guanyl-nucleotide exchange factor activity
Nucleosome assembly	Zinc ion binding
Protein phosphorylation	Metal ion binding
Signal transduction	Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups
Double-strand break repair	Kinase activity
rRNA processing	Nucleic acid binding
	Nucleotide binding
	Protein serine/threonine kinase activity
	RNA binding
	Transferase activity

doi:10.1371/journal.pone.0156018.t005

resistance to detergent concentrations that usually lyse trophozoites. In addition, CLS overexpressed the gene encoding for Gln6PI, the first enzyme in the theoretical chitin synthesis pathway in *E. histolytica* [32]; on the other hand, its knockdown using siRNA drastically reduced the formation of hydrogen peroxide-dependent CLS [33]. The absence of animal models for infection with *E. histolytica* cysts has hindered the functional comparative studies with CLS, leaving proteomic studies as a promising approach to determine the true nature of CLS and its possible relevance to understand the amoebic encystment process.

A global proteomic analysis by LC-MS/MS showed that CLS are more alike to trophozoites than to cysts. CLS shared 83.4% (459/550) of proteins with trophozoites and only 1.3% (7/550) with cysts. The main differences with trophozoites were seen on the relative abundance of proteins. These results were unexpected, since CLS obtained under exposure to hydrogen peroxide exhibited structural features resembling cysts, as mentioned above [32,33]. Even though we were unable to identify chitin-associated proteins neither in CLS nor in cysts by LC-MS/MS, we detected the presence of the cyst wall protein Jacob by WB in extracts from both samples but not in trophozoites, demonstrating that at least this protein is present in CLS. The reason behind the difference in size between Jacob proteins identified by WB in cysts and CLS is unknown, but it could be due to variants differentially expressed between the two samples, as it is well known that *E. histolytica* has multiple genes encoding for Jacob isoforms [54, 55]. Furthermore, the expression of mRNA encoding for the cyst wall proteins Jessie 1, Jessie 3, and Jacob, but not Jessie 2 nor chitin synthase, were identified by RT-PCR in CLS, suggesting that at least the mRNA encoding for two Jessie and the Jacob proteins were present. Thus, the difficulty in detecting cyst wall proteins in CLS by proteomic analysis might be related to issues in solubilizing chitin covers in the extracts. The previous proteomic study of *E. histolytica* cyst detected those proteins after analyzing five individual samples, with a very low peptide-hit score for each protein, supporting the scarcity of chitin wall-associated proteins in the extracts [24]. By contrast, in our study we evaluated a pool of cyst samples, and this may have reduced the possibility of detecting cyst wall proteins. Further studies regarding the protein composition of *E. histolytica* cyst and CLS walls should be conducted to confirm the presence of those proteins in cysts and to determine whether they are also present in CLS.

Proteome analysis showed that the most abundant CLS proteins include those involved in proton transport, proteolysis, redox homeostasis, and stress response. In addition, proteins involved in glycolysis and metabolism in general were found downregulated with respect to trophozoites, suggesting a protective response against oxidative shock caused by exposure to hydrogen peroxide. Noticeably, a previous report by Tomoyoshi's group showed that oxidative stress inhibits glycolysis while increasing glycerol production, with a concomitant activation of the chitin biosynthesis pathway [56]. The results herein reported, along with the previous report on a chitin-like cover in CLS, suggest that these structures could be generated in trophozoites as a rapid survival response to a stressful condition, which allows the parasite to temporarily survive inside a chitin-like resistant cover while the insult passes. Then, we speculate that CLS could revert to trophozoites if favorable conditions are met (our unpublished observations) or under adequate (unknown) stimuli they could follow their differentiation into real cysts, a process that could involve several non-described stages and takes between 24–72 h as it has been described in *E. invadens* and *Giardia* sp. [28,57]. Therefore, encystment could take a long time for a protozoan to respond against environmental stress that can kill it within a few hours or even minutes. Other possibility is that CLS will not proceed to cysts under any circumstance, and both structures are part of different processes. In this regard, structures called "pseudocysts" have been reported to form under acute stress conditions, like exposition to organic solvents, in the free-living amoeba *Acanthamoeba*, responsible for keratitis in humans [58, 59]. These structures, which were formed quickly under stress, are partially resistant thanks to a simple coat formed by some of the cyst wall proteins, and are reversible to trophozoite under suitable conditions. Therefore, the authors of that work suggest that encystation and pseudocyst formation are distinct responses to stress. Although the CLS herein studied share some characteristics with *Acanthamoeba* pseudocysts, a similar pseudocyst development has not been reported so far in *E. histolytica*; it would be interesting to evaluate this possibility. Further structural, functional, and biochemical characterization studies on CLS are being carried out in our laboratory to confirm this possibility.

On the other hand, the proteomic study herein reported has contributed to the knowledge on the protein profile of the differentiation stages of *E. histolytica*, in particular the cyst stage, for which there is only one previous report [24]. Thus, the trophozoite proteome described here, equivalent to about 12% of the open reading frames predicted in the available parasite genome [51, 52], reassert it as a highly metabolically active stage, mainly expressing proteins associated to glycolysis/glycogen metabolism and cytoskeleton function, as described elsewhere [10]. Based on peptide-hit scores, actin showed the highest relative abundance, followed by proteins associated to proteolysis, phosphorylation, signal transduction, and translation, this latter representing approximately 40% of total proteins. Furthermore, metabolic enzymes such as fructose 1,6-bisphosphate aldolase, NADP-dependent alcohol-dehydrogenase-1, and phosphoglycerate kinase were also identified with high peptide-hit scores. These findings are in agreement with a previous study, where actin and these enzymes were identified as the most prominent spots in solubilized proteins from trophozoite extracts resolved by 2-D SDS [9]. In addition, we also detected proteins that have previously been associated with the virulence and pathogenicity of *E. histolytica* such as peroxiredoxin and alcohol dehydrogenase 3 [22,23]. It is noteworthy that 23% of the total number of proteins identified in trophozoites are still uncharacterized, and thus they represent an opportunity for future studies on new therapeutic or diagnostic targets in this parasite stage.

With respect to the cyst, herein we report 411 proteins, a number quite similar to the 417 identified in the only proteomic study of *E. histolytica* cysts previously reported [24]. The number of cyst proteins identified in both studies was low, probably due to a masking by human and bacterial contaminants, which counted for about 90% of proteins in the samples (data not shown).



In total, 299 cyst stage-specific proteins not shared neither with trophozoites nor with CLS were identified in our study. In comparison, 195 proteins were already reported as cyst-specific, of which only 16 were shared by samples in both studies. This adds 283 new proteins to the previously identified set in cysts, contributing to the knowledge of this essential stage of the *E. histolytica* life cycle. Moreover, the 16 proteins identified in *E. histolytica* cysts isolated from patients from different geographical regions (India and Mexico) should be further explored as targets for cyst-based amoebiasis diagnostic tests; particularly, four of them were theoretically located at the plasma membrane by analysis *in silico* (Table 4). Furthermore, at least seven hypothetical and seven annotated proteins identified in cysts with the highest peptide-hit scores are also probable therapeutic targets for future studies (Table 3). Along with proteins involved in phosphorylation and signal transduction, cyst proteome showed a lower number of proteins in all functional groups (Fig 3), suggesting a general decrease in the metabolic activity consistent with what is known for latent life-cycle stages. It is noteworthy that 40% of the cyst proteome herein reported are hypothetical proteins, suggesting that our knowledge on the biology of *E. histolytica* cyst is still incipient and that the uncharacterized proteins, some of which showed a very high relative abundance, could play an important role in cyst formation and maintenance.

Finally, further structural, functional, and biochemical characterization studies on CLS and cysts should be carried out to determine the real nature of the former and to determine the role of the highly expressed but yet uncharacterized proteins identified in the latter.

## Supporting Information

**S1 Table. Total proteins identified in *E. histolytica* trophozoites, CLS, and cysts.**  
(XLS)

**S2 Table. Overrepresentation test of *E. histolytica* trophozoites, CLS, and cyst proteins.**  
(XLS)

## Acknowledgments

This work was part of the doctoral thesis of Milka Azucena Luna Nacar, who gratefully acknowledges the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Conacyt for the scholarship PhD 389536/255914. We thank Mario Néquiz-Avendaño for amoeba culturing, Salvador Rodriguez and CARPERMOR Laboratories for providing stool samples, Jeovanis Gil for bioinformatic assistance and Pavel Petrosyan for technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MLN JPL JCC. Performed the experiments: MLN JNP. Analyzed the data: MLN JCC JNP BM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCC RJB JPL. Wrote the paper: MLN JCC RJB JPL.

## References

1. Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003; 361(9362):1025–34. PMID: 12660071.
2. Ali IK. Intestinal Amebae. *Clin Lab Med*. 2015; 35(2):393–422. doi: 10.1016/j.cll.2015.02.009 PMID: 26004649.
3. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859):2095–128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0 PMID: 23245604.

4. Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(6):1023–32. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.008 PMID: 19540361.
5. MacFarlane RC, Shah PH, Singh U. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Int J Parasitol.* 2005; 35 (5): 533–42. PMID: 15826645.
6. MacFarlane RC, Bhattacharya D, Singh U. Genomic DNA microarrays for *Entamoeba histolytica*: applications for use in expression profiling and strain genotyping. *Exp Parasitol.* 2005; 110 (3): 196–202. PMID: 15955312.
7. MacFarlane RC, Singh U. Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infect Immun.* 2006; 74 (1): 340–51. PMID: 16368989.
8. Ehrenkauf G, Haque R, Hackney J, Eichinger D, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol.* 2007; 9(6): 1426–44. PMID: 17250591.
9. Leitsch D, Radauer C, Paschinger K, Wilson I, Breiteneder H, Scheiner O, et al. *Entamoeba histolytica*: Analysis of the trophozoite proteome by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Exp Parasitol.* 2005; 110 (3): 191–95. PMID: 15955311.
10. Tolstrup J, Krause E, Tannich E, Bruchhaus I. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology.* 2007; 134(Pt 2): 289–98. PMID: 17032470.
11. McCoy J, Mann B. Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.* 2005; 110(3):220–25. PMID: 15955316.
12. Marion S, Laurent C, Guillen M. Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol.* 2005; 7 (10): 1504–18. PMID: 16153248.
13. Okada M, Huston CD, Mann BJ, Petri WA Jr, Kita K, Nozaki T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(4): 827–31. PMID: 15821141.
14. Okada M, Huston CD, Oue M, Mann BJ, Petri WA Jr, Kita K, et al. Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 145 (2): 171–83. PMID: 16290089.
15. Boettner DR, Huston CD, Linford AS, Buss SN, Houpt E, Sherman NE, et al. *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLoS Pathog.* 2008; 4 (1): e8. doi: 10.1371/journal.ppat.0040008 PMID: 18208324.
16. Buss SN, Hamano S, Vidrich A, Evans C, Zhang Y, Crasta OR, et al. Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. *Int J Parasitol.* 2010; 40 (7): 833–43. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.12.007 PMID: 20083116.
17. Biller L, Mathiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, et al. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics.* 2014; 13 (1): 132–44. doi: 10.1074/mcp.M113.031393 PMID: 24136294.
18. Valdéz J, Nozaki T, Sato E, Chiba Y, Nakada-Tsukui K, Villegas-Sepúlveda N, et al. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J Proteomics.* 2014; 111: 30–45. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.027 PMID: 25109466.
19. Hernández de la Cruz O, Muñoz-Lino M, Guillén N, Weber C, Marchant L, López-Rosas I, et al. Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*. *J Proteomics.* 2014; 111: 46–58 doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.041 PMID: 24721673.
20. López-Rosas I, Marchant L, Gallo Olvera B, Guillén N, Weber C, Hernández de la Cruz O, et al. Proteomic analysis identifies endoribonuclease EhL-PSP and EhRRP4 exosome protein as novel interactors of EhCAF1 deadenylase. *J Proteomics.* 2014; 111:59–73. doi: 10.1016/j.jprot.2014.06.019 PMID: 24998979.
21. Perdomo D, Ait-Ammar N, Syan S, Sachse, Jhingan GD, Guillen N. Cellular and proteomics analysis of the endomembrane system from the unicellular *Entamoeba histolytica*. *J Proteomics.* 2015; 112:125–40. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.034 PMID: 25109464.
22. Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR, Stanley SL Jr. Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol.* 2006; 61 (6): 1523–32. PMID: 16968225.
23. David PH, Chen M, Zhang X, Clark CG, Townsend RR, Stanley SL Jr. Proteomic comparison of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and the role of *E. histolytica* alcohol dehydrogenase 3 in virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3 (4): e415. doi: 10.1371/journal.pntd.0000415 PMID: 19365541.



24. Ali IK, Haque R, Siddique A, Kabir M, Sherman NE, Gray SA, et al. Proteomic analysis of the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(5): e1643. doi: 10.1371/journal.pntd.0001643 PMID: 22590659.
25. Rengpien S, Bailey GB. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. *J Parasitol*. 1975; 61(1):24–30. PMID: 163898.
26. Bailey GB, Rengpien S. Osmotic stress as a factor controlling encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch Invest Med (Mex)*. 1980; 11(1 Suppl):11–6. PMID: 7469635.
27. Vázquezdelara-Cisneros LG, Arroyo-Begovich A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol*. 1984; 70 (5): 629–33. PMID: 6512629.
28. Avron B, Stolarsky T, Chayen A, Mirelman D. Encystation of *Entamoeba invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *J Protozool*. 1986; 33 (4):522–5. PMID: 3795143.
29. Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Galindo JM, Said-Fernández S. Mg, Mn and Co Ions Enhance the Formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate. *Arch Med Res*. 2000; 31(2):162–8. PMID: 10880721.
30. Barrón-González MP, Villareal-Treviño L, Reséndez-Pérez D, Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. *Entamoeba histolytica*: Cyst-like structures in vitro induction. *Exp Parasitol*. 2008; 118(4):600–3. PMID: 18083165.
31. Said-Fernández S, Campos-Góngora E, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez HG, Vargas-Villareal J, Viader-Salvadó JM. Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup> Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material. *J Parasitol*. 2001; 87(4):919–23. PMID: 11534662.
32. Aguilar-Díaz H, Díaz-Gallardo M, Laclette JP, Carrero JC. *In vitro* induction of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures from Trophozoites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(2):e607. doi: 10.1371/journal.pntd.0000607 PMID: 20169067.
33. Aguilar-Díaz H, Laclette JP, Carrero JC. Silencing of *Entamoeba histolytica* glucosamine 6-phosphate isomerase by RNA interference inhibits the formation of cyst-like structures. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:758341. doi: 10.1155/2013/758341 PMID: 23484154.
34. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978; 72(4):431–2. PMID: 212851.
35. Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, Leelayoova S, Chavalitshewinkoon-Petmitr P. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9):3196–200. PMID: 16954247.
36. Walderich B, Müller L, Bracha R, Knobloch J, Burchard GD. A new method for isolation and differentiation of native *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts from fecal samples. *Parasitol Res*. 1997; 83 (7):719–21. PMID: 9272565.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248–54. PMID: 942051.
38. Wisniewski J, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 2009; 6:359–62 doi: 10.1038/nmeth.1322 PMID: 19377485.
39. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*. 2007; 2(8):1896–906 doi: 10.1038/nprot.2007.261 PMID: 17703201.
40. Chambers M, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman D, Neumann S, et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*. 2012; 30:918–20. doi: 10.1038/nbt.2377 PMID: 23051804.
41. Hulsen T, Vlieg J, Alkema W. BioVenn- a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 2008; 9:488 1–6 doi: 10.1186/1471-2164-9-488 PMID: 18925949.
42. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009; 4(1): 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211 PMID: 19131956.
43. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. Panther in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res*. 2013; 4: 377–86.
44. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc*. 2013; 8:1551–66. doi: 10.1038/nprot.2013-092 PMID: 23868073.
45. Fontana P, Cestaro A, Velasco R, Formentin E, Toppo S. Rapid annotation of anonymous sequences from genome projects using semantic similarities and a weighting scheme in gene ontology. *PLoS One*. 2009; 4 (2):e4619. doi: 10.1371/journal.pone.0004619 PMID: 19247487.

46. Falda M, Toppo S, Pescarolo A, Lavezzo E, Di Camillo B, Facchinetti A, et al. Argot2: a large scale function prediction tool relying on semantic similarity of weighted Gene Ontology terms. *BMC bioinformatics*. 2012; 13(Suppl 4):S14 1-9. doi: 10.1186/1471-2105-13-S4-S14 PMID: 22536960.
47. Radivojac P, Clark WT, Oron TR, Schnoes AM, Wittkop T, Sokolov A, et al. A large-scale evaluation of computational protein function prediction. *Nat Methods*. 2013; 10(3):221–7. doi: 10.1038/nmeth.2340 PMID: 23353650.
48. Yu CS, Lin CJ, Hwang JK. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* 2004; 13 (5):1402–06. PMID: 15096640.
49. Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*. 2006; 15; 64(3):643–51. PMID: 16752418.
50. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990; 10; 276(1–2): 172–4. PMID: 1702393.
51. Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 2005; 24; 433(7028):865–8. PMID: 15729342.
52. Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, et al. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 15; 4(6): e716. doi: 10.1371/journal.pntd.0000716 PMID: 20559563.
53. Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001; 48(1): 17–21. PMID: 11249188.
54. Ghosh SK, Van Dellen KL, Chatterjee A, Dey T, Haque R, Robbins PW, et al. The Jacob2 lectin of the *Entamoeba histolytica* cyst wall binds chitin and is polymorphic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 20; 4(7): e750. doi: 10.1371/journal.pntd.0000750 PMID: 20652032.
55. Van Dellen KL, Chatterjee A, Ratner DM, Magnelli PE, Cipollo JF, Steffen M, et al. Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryot Cell*. 2006; 5 (5):836–48. PMID: 16682461.
56. Husain A, Sato D, Jeelani G, Soga T, Nozaki T. Dramatic increase in glycerol byosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(9): e1831. doi: 10.1371/journal.pntd.000183 PMID: 23029590.
57. Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997; 61(3):294–304. PMID: 9293183.
58. Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E. Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. *Exp Parasitol*. 2011; 127(1):326–8. doi: 10.1016/j.exppara.2010.08.014 PMID: 20728440.
59. Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E. Stress-induced pseudocyst formation—a newly identified mechanism of protection against organic solvents in *Acanthamoebae* of the T4 genotype. *Protist*. 2011; 162 (1):58–69. doi: 10.1016/j.protis.2010.03.006 PMID: 20650683.