



Universidad Autónoma de Sinaloa

**Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

**“Factores de Virulencia Regulados por Hierro en los
Parásitos Amitocondriados
Entamoeba histolytica y *Giardia duodenalis*”**

TESIS

Que presenta

Aurora Alicia Gastelum Martinez

como requisito para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biotecnología de Salud

Directores de Tesis

Dra. Claudia del Rosario León Sicairos

A handwritten signature in blue ink, reading 'Claudia del Rosario León Sicairos'.

Dr. José Antonio Garzón Tizado

A handwritten signature in blue ink, reading 'José Antonio Garzón Tizado'.

Culiacán de Rosales, Sinaloa. Marzo de 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 del febrero del año 2021, la que suscribe Aurora Alicia Gastelum Martinez alumna del Doctorado en Ciencias en Biotecnología, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, con número de cuenta 05378869, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños y Dr. José Antonio Garzón Tiznado cede los derechos del trabajo titulado "Factores de Virulencia Regulados por Hierro en los Parásitos Amitocondriados *E. histolytica* y *G. duodenalis*", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Aurora Alicia Gastelum Martinez

PRESENTACIÓN

La presente investigación, titulada “Factores de virulencia regulados por hierro en los parásitos amitocondriados *Entamoeba histolytica* y *Giardia duodenalis*”, se llevó a cabo en el Laboratorio N°19, *Patología y Biología Celular y Molecular* del Programa Regional de Posgrado en *Biotecnología*, ubicado en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, localizada en la ciudad de Culiacán de Rosales en el Estado de Sinaloa. Como asesores académicos participaron: Dr. Vicente Adrián Canizalez Román, Dra. Nidia Maribel León Sicairos, Dr. Héctor Manuel Flores Villaseñor, Dra. Mireya De La Garza Amaya (Asesora Externa), Dr. José Antonio Garzón Tiznado (Director de tesis) y Dra. Claudia del Rosario León Sicairos (Directora de tesis). Este proyecto de investigación se desarrolló con fondos institucionales del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, así como de la Secretaría de Educación Pública y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT, No. de proyecto 152772) y Ciencia de Frontera 2019 (No. de proyecto 51241) también de CONACyT, cuya responsable técnica es la Dra. Claudia del Rosario León Sicairos.

El proyecto de investigación tuvo carácter interinstitucional, ya que colaboraron la Facultad de Medicina y Facultad de Ciencias Químico-Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS); así como, el Centro de Investigación y Estudios Avanzados - Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Zacatenco. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) apoyó a la MC. Aurora Alicia Gastelum Martínez, a través de *Beca Tesis para Estudios de Doctorado 2016-2020*.

DEDICATORIA

Todo el trabajo está dedicado primeramente a Dios, quien me ha brindado la oportunidad y la dicha de llegar hasta esta etapa de gran satisfacción personal como profesional.

A mis padres, por darme la vida y su apoyo a lo largo de mi vida, pero sobre a todo a mi madre por darme su interminable apoyo de manera incondicional, por todas sus enseñanzas, sus consejos, su paciencia, a mi suegra quien junto a mi madre se encargaron de mi principal tesoro cuando yo me encontraba en el posgrado.

A mi padre quien me enseñó, que siempre se puede volver a empezar, que no importa cual sea el reto, soy capaz de sobreloarlo con éxito.

A mi esposo Gerardo, quien definitivamente fue y ha sido mi pilar más fuerte en este camino, quien es el amor de mi vida, mi compañero y el padre de mis hijos, gracias por todo tu apoyo, por darme el equilibrio que aveces pierdo, por darme todo lo mejor de ti, por no soltarme de la mano hasta culminar esta meta. Te amo.

A mis tesoros Diego y Elisa, quienes llegaron a alumbrarme los días, cambiarme motivos, darme fuerzas y ganas de ser lo mejor por ellos y para ellos, quienes son el motor de todo y quien sin duda es la mejor forma de sentir a dios en la tierra.

Diego, Elisa, se que algún día leerán esto, y solo quiero que sepan que los amo profundamente desde que se formaron en mi, que por ustedes he decido ser la mejor versión de mi.

Diego, si en algún momento te descuidé por esto, es por que estaba segura era lo mejor para ambos para nuestra hermosa familia. Te amo.

Elisa, gracias por venir a completar nuestra vida, a regalarnos tanta felicidad y unión en nuestra familia. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas que hicieron posible este trabajo de investigación:

A la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños, quien sin conocerme confió en mi y me dió la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo como su alumna para llevar a cabo este proyecto, de quién he recibido un infinito apoyo en lo profesional y en lo personal, me llevo conmigo un ejemplo de vida, le expreso mi gran admiración como persona, como mujer, pero sobretodo como profesional en todos los ámbitos en los que se desarrolla, es un orgullo para mi ser su alumna, no me queda mas que darle un millón de gracias, las cuales jamas serán suficientes.

A la Dr. Garzón por aceptar ser mi director de tesis y aceptarme bajo su tutela, así como siempre darse el tiempo de enseñarme con una sonrisa en su rostro, muchas gracias también por su apoyo.

Al Dr. Reyes por permitirme ser parte de este posgrado, por siempre apoyarnos y darnos ánimo y ese gran ejemplo, a la Dra. Cuevas por hacer que esto se diera en tiempo y forma, sin duda, son ejemplos a seguir, personas que admiro que se convirtieron en amigos, gracias.

A la MC. Laura Yuliana Plata Guzmán, a quién le agradezco haberme arropado con sus conocimientos en la bioinformática como en el área técnica, muchas gracias, compañera ha sido un placer compartir esta etapa a tu lado.

A mis compañeros de laboratorio: QFB Luz Adriana Reyes Sánchez y MC Denisse Arellano, a los tesisistas Gilmar, Gabriel, Nelida, Jordy, y a todos los chicos de servicio social, que durante este periodo de cuatro años me acompañaron en diferentes periodos gracias por su valioso apoyo, por su compañerismo, porque siempre crear un ambiente positivo, pero sobre todo por su amistad.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN	11
III. REVISIÓN DE LITERATURA	14
A. Entamoeba histolytica	14
1. Generalidades	14
2. Morfología	14
3. Epidemiología	17
4. Ciclo biológico	20
5. Manifestaciones clínicas de la amebiasis	22
6. Diagnóstico	22
7. Tratamiento y profilaxis	23
8. Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia (FV)	24
a) Adhesión	24
b) Citólisis	26
c) Fagocitosis	27
B. Giardia duodenalis (intestinalis o lamblia)	28
1. Generalidades	28
2. Morfología	29
3. Epidemiología	33
4. Ciclo biológico	36
5. Manifestaciones clínicas de la giardiasis	38
6. Diagnóstico	39
7. Tratamiento y profilaxis	40
8. Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia (FV)	40

C. Homeostasis del hierro	43
1. Absorción del hierro	43
2. Homeostasis de hierro en la célula	45
a. Sistema tipo IRE/IRP	46
1. Elementos de respuesta a hierro (IREs)	46
2. Proteínas reguladoras de hierro (IRPs)	48
Proteína reguladora de hierro 1 (IRP1)	48
Proteína reguladora de hierro 2 (IRP2)	50
Regulación por el sistema IRE/IRP para Ft y RTf	52
3. Importancia del hierro para microorganismos patógenos	54
a) <i>Entamoeba histolytica</i>	56
1. Importancia del hierro	56
2. Metabolismo del hierro	56
3. Efecto del hierro en la virulencia	57
b) <i>Giardia duodenalis</i>	58
1. Importancia del hierro	58
c) Presencia de IREs en protozoarios	59
d) Presencia de proteínas de unión a RNA en protozoarios	63
IV. JUSTIFICACIÓN	68
V. OBJETIVOS	69
A. Objetivo general	69
B. Objetivos específicos	69
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	70
A. MATERIALES	70
a. Cultivos del parásitos	70
b. Reactivos	70
B. MÉTODOS	70
1. Búsqueda de FV modulados por hierro en <i>E. histolytica</i> y <i>G. duodenalis</i>	70
2. Identificación de proteínas tipo IRPs	70

a.	Análisis bioinformático del proteoma de los parásitos <i>E. histolytica</i> y <i>G. duodenalis</i>	70
b.	Búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos en posibles ortólogos	72
c.	Modelado en 3D de las secuencias aminoácidas	72
3.	Presencia del mecanismo de regulación por hierro a nivel post-transcripcional por interacciones RNA-proteínas en sistema homólogo y heterólogo en <i>G. duodenalis</i>	73
a.	Cultivo de <i>G. duodenalis</i>	73
b.	Extractos citoplasmáticos de <i>G. duodenalis</i>	73
c.	Obtención de amplicones por PCR	75
d.	Transcripción <i>in vitro</i> de IREs	75
e.	Ensayos de cambio de movilidad electroforética de RNA (REMSA)	76
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
A.	Identificación de factores de virulencia que modulan su expresión en base a la concentración de hierro en <i>E. histolytica</i>	77
a.	Cistein Proteinasas	79
b.	Proteínas de unión a Hb	80
c.	Proteínas de oxidación y reducción	84
d.	Proteínas de organización del citoesqueleto de actina	84
e.	Enzimas metabólicas	89
B.	Identificación de factores de virulencia que modulan su expresión en base a la concentración de hierro en <i>G. duodenalis</i>	92
a.	Proteínas de respuesta al estrés oxidativo (PFOR, por sus siglas en inglés)	92
b.	Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP, por sus siglas en inglés)	93
C.	Identificación y caracterización <i>in silico</i> de la proteínas tipo IRP (unión a RNA) en el proteoma de <i>E. histolytica</i> y <i>G. duodenalis</i> .	96
1.	<i>E. histolytica</i>	96

a.	<i>Sondeo de proteínas IRP humanas en el proteoma, búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos y modelado en 3D de posibles ortólogos</i>	96
b.	<i>Sondeo de proteínas tipo IRP de protozoarios en el proteoma y búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos</i>	106
1.	<i>G. duodenalis</i>	127
a.	<i>Sondeo de proteínas IRP de humano en el proteoma y búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos y RNA</i>	127
b.	<i>Sondeo de proteínas tipo IRP de protozoarios en el proteoma y búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos y RNA</i>	129
D.	Estandarización de técnicas de Extractos Citoplasmáticos, Transcripción <i>in vitro</i> y Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética con RNA (REMSA, por sus siglas en inglés).	151
1.	Obtención de Proteínas Citoplasmáticas de <i>G. duodenalis</i>	151
2.	Obtención de amplicones para construcción de IREs <i>in vitro</i>	153
3.	Transcripción <i>in vitro</i> de IREs	155
E.	Presencia de un sistema heterólogo y homólogo tipo IRE/IRP en <i>G. duodenalis</i> .	155
1.	Ensayos de cambio de movilidad electroforética REMSA	155
VII.	CONCLUSIONES	164
VIII.	ABREVIATURAS	165
IX.	LITERATURA CITADA	169
X.	ANEXOS	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Estadios morfológicos de <i>Entamoeba histolytica</i> .	16
2	Casos por entidad federativa de amebiasis intestinal hasta la semana epidemiológica 42 del 2020.	18
3	Casos por entidad federativa de absceso hepático amebiano hasta la semana epidemiológica 42 del 2020.	19
4	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .	21
5	Morfología de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i> .	31
6	Casos nuevos de giardiasis hasta la semana 39 del 2020 en los Estados Unidos Mexicanos.	35
7	Ciclo biológico de <i>G. duodenalis</i> .	37
8	Motivos típicos de Elementos de Respuesta al Hierro –IRE, por sus siglas en inglés-.	47
9	Estructura lineal de la proteína IRP1 y representación del IRE.	49
10	Proteína Reguladora de Hierro 2 –IRP2-.	51
11	Regulación del hierro por el mecanismo IRE/IRP.	53
12	IRE-like de Tvcp4 de <i>T. vaginalis</i> .	61
13	IRE-like de Tvcp12 de <i>T. vaginalis</i> .	62
14	Regulación de FV dependientes de hierro en <i>E. histolytica</i> .	78
15	Ensayos e RT-PCR semicuantitativos con cebadores específicos para EhCP5, EhFeSOD, EhPRL21, Ehhmbp26 y EhActin.	88
16	Resultados de análisis <i>in silico</i> de IRPs de <i>Homo sapiens</i> en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	97
17	Alineamiento en ClustalW entre la IRP-2 de humano y la secuencia tipo IRP EHI_050750 de <i>E. histolytica</i> .	101
18	Posibles IRPs en <i>E. histolytica</i> .	102

19	Modelo 3D del posible ortólogo de IRP2 de <i>H. sapiens</i> en <i>E. histolytica</i> denominado proteína rica en leucina EHI_050750A-p1).	104
20	Modelo 3D del posible ortólogo de IRP2 de <i>H. sapiens</i> en <i>E. histolytica</i> denominado proteína hipotética (EHI_036510A-p1).	105
21	Resultados de análisis <i>in silico</i> de PfIRPa de <i>Plasmodium falciparum</i> en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	107
22	Resultados de sondeo de TvACTN2 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	109
23	Sistema homólogo de <i>E. histolytica</i> : Interacción entre IREs de <i>Actina</i> y <i>Ehhmbp26</i> y proteínas citoplásmicas.	112
24	Resultados de sondeo de TvACTN3 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	114
25	Resultados de sondeo de HSP70-4 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	116
26	Resultados de análisis <i>in silico</i> de Actina de <i>T. vaginalis</i> (TvAC_054030) en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	119
27	Resultados de análisis <i>in silico</i> de búsqueda directa de "iron-related proteins" en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	121
28	Resultados de análisis <i>in silico</i> de IRP1 de <i>H. sapiens</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	128
29	Resultados de análisis <i>in silico</i> de la sonda PfIRPa de <i>P. falciparum</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	130
30	Resultados de análisis <i>in silico</i> de la sonda TvACT3 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	133
31	Resultados de análisis <i>in silico</i> de las sondas de Actina TVAG_054030, TVAG_200190 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> para el aislado WB.	136
32	Resultados de análisis <i>in silico</i> de la búsqueda directa de Actina en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	139

33	Resultados de análisis <i>in silico</i> del sondeo de HSP70-4 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	143
34	Resultados de análisis <i>in silico</i> de la búsqueda directa de proteínas relacionadas con hierro en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	146
35	Posibles IRPs en <i>G. duodenalis</i> .	150
36	Extractos Citoplasmáticos de <i>G. duodenalis</i> .	152
37	Gel de integridad de amplicones de PCR.	154
38	Gel de interacción de extractos citoplasmáticos (EC) en condiciones normales de cultivo del parásito con el IRE de ferritina de humano (IREfeh).	157
39	Gel de Interacción entre los Extractos Citoplasmáticos en condiciones de cultivo del parásito en Restricción y Alto hierro con IREfeh.	159
40	Interacción entre IREs y extractos citoplasmáticos de <i>G. duodenalis</i> .	161
41	Interacción entre los extractos citoplasmáticos de giardia en diferentes condiciones de hierro con IRE de ferritina de humano e IRE de Actina de <i>G. duodenalis</i> .	163

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Características de Proteínas Reguladoras de Hierro IRP de humano y de proteínas tipo IRP en parásitos protozoarios.	67
2	Secuencias de proteínas IRP o tipo IRP utilizadas para buscar al ortólogo de IRP en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	71
3	Cistein proteinasas como factores de virulencia modulados por hierro en <i>E. histolytica</i> .	81
4	Proteínas de unión a hemoglobina como factores de virulencia modulados por hierro en <i>E. histolytica</i> .	83
5	Proteínas de Oxidación-reducción como factores de virulencia regulados por hierro en <i>E. histolytica</i> .	85
6	Actina y proteínas de organización del citoesqueleto como factores de virulencia modulados por hierro en <i>E. histolytica</i>	86
7	Enzimas metabólicas como factores de virulencia regulados por hierro en <i>E. histolytica</i> .	90
8	Proteínas de respuesta al estrés oxidativo (PFOR) como factores de virulencia regulados por hierro en <i>G. duodenalis</i> .	94
9	Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP) como factores de virulencia regulados por hierro en <i>G. duodenalis</i> .	95
10	Posibles ortólogos de IRP1 e IRP2 de humano en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	98
11	Secuencias aminoacídicas obtenidas de las sondas de <i>T. vaginalis</i> sondeadas en el proteoma de <i>E. histolytica</i> para identificar posibles proteínas de unión a ácidos nucleicos.	110
12	Resultados de análisis <i>in silico</i> de búsqueda directa de "iron-related proteins" en el proteoma de <i>E. histolytica</i> .	122

13	Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de fIRPa de <i>P. falciparum</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	131
14	Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de TvACT3 en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	134
15	Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de sondas de actina en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	135
16	Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de la búsqueda directa de actina en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	140
17	Secuencias aminoacídicas obtenidas del sondeo de HSP70-4 de <i>T. vaginalis</i> en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	144
18	Secuencias aminoacídicas obtenidas de la búsqueda de proteínas relacionadas con el hierro en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> que mostraron motivos de unión a ácidos nucleicos.	147

I. RESUMEN

Entamoeba histolytica y *Giardia duodenalis*, son dos protozoos que causan infecciones intestinales, amebiasis y giardiosis respectivamente, ambas parasitosis tienen gran relevancia en la salud pública a nivel mundial. En México, se ha reportado una prevalencia superior al 30% en algunas zonas, entre ellas Sinaloa. Estos protozoarios requieren altas concentraciones de hierro para sobrevivir y efectuar su patogenicidad; sin embargo, los mecanismos de homeostasis y efecto del hierro en los mitocondrios aún se encuentran en estudio. En células eucariotas la homeostasis del hierro se regula a través de un sistema post-transcripcional IRE/IRP ("Iron Responsive Element" / "Iron Regulatory Protein"). Los IREs son estructuras de tallo-burbuja localizadas en las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) de los RNAm que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del hierro; las IRPs son proteínas reguladas por hierro que se unen a los IREs en condiciones de restricción de hierro y, dependiendo de la localización del IRE, pueden promover o inhibir la traducción de dichas proteínas. En *E. histolytica* y *G. duodenalis* hipotetizamos que la concentración de hierro puede modular la expresión de factores de virulencia (FV), entre los que podemos encontrar proteínas tipo IRP que indicarían la presencia de un sistema tipo IRE/IRP. La metodología comprende una búsqueda bibliográfica y análisis *in silico* de FV que se modulan por hierro en ambos protozoarios, posteriormente se identificaron y caracterizaron FV que pudiesen actuar como proteínas tipo IRP, encontrando candidatos como actininas, actinas o chaperonas de DNAk para *E. histolytica* y proteínas variantes de antígenos de superficie (VSP) para *G. duodenalis*. Posteriormente, se estandarizaron metodologías para estudios de interacción RNA-proteínas sin marcaje radiactivo y se demostró de manera experimental la presencia de un sistema homólogo en *G. duodenalis*, al interactuar el IRE de *Ferritina* de humano (IRE_{feh}) y un IRE de *Actina* de *G. duodenalis*, ambos obtenidos por transcripción *in vitro*, con extractos citoplasmáticos del parásito en Ensayos de Cambio de Movilidad Electroforética con RNA (REMSA). Los resultados sugieren la presencia de un sistema de regulación postranscripcional homólogo en *G. duodenalis* tipo IRE/IRP. En conclusión, en este trabajo se describen factores de virulencia regulados por hierro y se muestran resultados preliminares de la presencia e interacción de elementos que integran el mecanismo IRE/IRP en dos parásitos de importancia médica, lo que ayudaría en un futuro para la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica and *Giardia duodenalis* are two protozoa that cause intestinal infections, amoebiasis and giardiasis respectively, both parasitoses have great relevance in public health worldwide. In Mexico, a prevalence of more than 30% has been reported in some areas, including Sinaloa. These protozoa require high concentrations of iron to survive and affect their pathogenicity; however, the mechanisms of homeostasis and the effect of iron on amitochondriates remain under study. In eukaryotic cells, iron homeostasis is regulated through a post-transcriptional IRE/IRP system ((Iron Responsive Element / Iron Regulatory Protein). IREs are stem-loops structures located in the 5' and 3' untranslated regions (UTR) of mRNA encoding proteins involved in iron metabolism. IRPs are iron regulatory proteins that are capable to binds IREs in low iron conditions and, depending on IRE location, can promote or inhibit proteins translation. In *E. histolytica* and *G. duodenalis* we hypothesized that iron concentration could modulate the expression of virulence factors (VF), including IRP-like proteins that would indicate the presence of a homologous IRE/IRP system. The methodology used involve a bibliographic search and *in silico* analysis of VF that were modulated by iron in both protozoa, then, VF that could act as IRP-like proteins were identified and characterized, the results showed candidates such as actinins, actins or DNAk chaperones in *E. histolytica* and proteins with specific surface antigen variants (VSP) in *G. duodenalis*. In addition, RNA-proteins interactions without radiolabelling assays were standardized. Subsequently, the presence of a homologous system in *G. duodenalis* was experimentally analyzed, by interacting the human Ferritin IRE (IRE_{feh}) and a *G. duodenalis* Actin IRE-like, both obtained by *in vitro* transcription, with cytoplasmic extracts of the parasite in RNA-electrophoretic mobility shift assays (REMSA). The results suggest the presence of a homologous postranscriptional regulation system in *G. duodenalis* IRE/IRP-like. In conclusion, this work describes iron regulated virulence factors and shows preliminary data of the presence and interaction of elements of the IRE/IRP mechanism in two parasites of medical importance, which would help in the future in the search for new pharmacological targets.

II. INTRODUCCIÓN

Dos protozoarios responsables de enfermedades intestinales con gran impacto en la salud pública a nivel mundial son *Entamoeba histolytica* y *Giardia duodenalis*, agentes causales de la amebiasis y giardiasis respectivamente, tanto una como la otra constituyen parasitosis con gran importancia epidemiológica y clínica por su alta morbilidad y patogenicidad, su prevalencia se concentra en países desarrollados y en vías de desarrollo, así como en sitios con higiene deficiente, su mayor prevalencia es en población pediátrica (Domínguez 2018; Vivancos et al. 2018)

Tanto *E. histolytica* como *G. duodenalis* son adquiridos por los humanos a través de la ruta fecal-oral, mediante la ingesta de agua, alimentos o fómites contaminados con quistes maduros. Para poder iniciar una infección, ambos parásitos necesitan ser ingeridos por el hospedero y desarrollar procesos de desenquistamiento para su posterior colonización, infección, sobrevivencia y virulencia y continuar con el enquistamiento, para completar con su ciclo biológico (CDC, 2015, 2020).

El hierro es un elemento esencial para cualquier organismo viviente; sin embargo, su deficiencia o exceso pueden ser dañinos para las células, por su capacidad de generar especies reactivas del oxígeno, por lo que su regulación es un proceso meticuloso en los vertebrados (Pérez et al. 2005), que va desde la modulación de la absorción del elemento por el organismo, hasta mecanismos de regulación post-transcripcionales entre los cuales el más estudiado es el sistema IRE/IRP, el cual es un sistema de control de la expresión de genes dependiente de la concentración de hierro en el organismo; para que este sea funcional se requiere de Elementos de Respuesta al Hierro (IRE, por sus siglas en inglés) y Proteínas Reguladoras de Hierro (IRP, por sus siglas en inglés). En los humanos, existen dos proteínas reguladoras de hierro conocidas como IRP1 e IRP2, ambas con poder de unión a los IREs del mRNA (Pantopoulos 2004; Zhou and Tan 2017). Los IREs son estructuras de tallo-burbuja localizados en las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) de los RNAm que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del hierro; las IRPs son proteínas reguladas por hierro que se unen a los IREs en condiciones de restricción de hierro y, dependiendo de la localización del IRE, pueden promover o inhibir la traducción (Pantopoulos 2004; Zhou and Tan 2017).

Para *E. histolytica* y *G. duodenalis* se ha reportado una alta necesidad del metal; además, de que esta puede estar relacionada directamente con su virulencia (Calla-Choque et al. 2014; Figueroa-Angulo et al. 2015; Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación). Por su parte, la obtención y metabolismo del hierro por algunos protozoarios patógenos (*T. vaginalis*, *P. falciparum* y *T. gondii*) es regulada por un mecanismo similar al sistema IRE/IRP para la expresión de factores de virulencia (FV), los cuales se definen como todas aquellas moléculas involucradas en la progresión de los mecanismos de patogenicidad y resistencia al hospedero (Figueroa-Angulo et al. 2015; Loyevsky et al. 2001).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se realizaron análisis bioinformáticos dentro de los genomas de ambos protozoarios y se encontraron varias estructuras tipo tallo burbuja en las regiones no traducidas de genes de diversos FV que se modulan por hierro, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de regulación por hierro de tipo IRE/IRP similar al de eucariontes superiores; además, se demostró experimentalmente que estos IREs son capaces de unirse a las IRPs de humano (Plata-Guzmán et al. 2021; en preparación, Quintero-Gallegos, 2016; Reyes-Sánchez, 2016; Soto-Castro, et al. 2017).

Lo anterior, establece las bases para constituir el propósito de la investigación que busca identificar y caracterizar *in silico* factores de virulencia que sean regulados por hierro, así como las proteínas de regulación de hierro (IRP-like) para estudiar posteriormente la interacción de elementos que sugieran la presencia del mecanismo de regulación post-transcripcional por hierro del tipo IRE/IRP en *E. histolytica* y *G. duodenalis*.

Comprender la biología de este parásito a través de su respuesta al hierro puede ayudarnos a generar conocimiento acerca de su metabolismo. Además, estos resultados pueden aplicarse en un futuro para el bloqueo de moléculas que participan en la virulencia, desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico o blancos farmacológicos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. *Entamoeba histolytica*

1. Generalidades

Entamoeba histolytica es un protozoo patógeno, que parasita principalmente al ser humano; además de ser capaz de infectar a mamíferos como perros, gatos, cerdos y ratas y experimentalmente a conejos y roedores (OPS 2003). Este agente infeccioso es responsable de la amebiasis en humanos, la cual se encuentra clasificada en dos tipos, amebiasis intestinales y extra-intestinales; así mismo puede ser asintomática o provocar enfermedades graves como colitis amebiana, absesos hepáticos e incluso provocar la muerte (Flores-Cuevas 2012; Ghosh et al. 2019).

Este parásito protozoo es capaz de infectar a personas de todo el mundo; sin embargo, es más común en personas que viven en áreas tropicales, con pocas condiciones de higiene y de bajo nivel socioeconómico, a su vez, es más frecuente en niños y adultos jóvenes, no obstante, ataca a personas de cualquier edad (CDC, 2015; Ynfantes Almeyda, 2018).

Por su mecanismo de transmisión, la amebiasis pertenece al grupo de las protozoosis transmitidas por vía fecal-oral, ya que las formas infectantes de los parásitos son ingeridas por medio de los alimentos, bebidas, fómites o incluso las manos contaminadas con quistes del protozoo (Kantor et al. 2018; Romero 2007).

E. histolytica es un comensal del intestino grueso, que en ocasiones puede invadir la mucosa intestinal del humano y puede diseminarse por vía hemática a diversos órganos como el hígado, pulmones, cerebro, entre otros (Flores-Cuevas 2012; Kantor et al. 2018).

2. Morfología

E. histolytica se presenta en la naturaleza en dos estadios morfológicos: trofozoítos (forma invasiva) y quistes (forma infectiva) (Figura 1).

El trofozoíto o amiba corresponde a la forma trófica o vegetativa, móvil y activa, que emite pseudópodos y filópodos a base de material protoplásmico locomotor y presenta un uroide en la parte posterior conformada principalmente de miosina II. Los trofozoítos viven en el intestino grueso del hospedero (OPS 2003). La forma trófica es extraordinariamente pleiomórfica: su contorno puede ser alargado, redondo o irregular; esto por lo fluido de su citoplasma y la capacidad de

reestructuración de su citoplasma, sus dimensiones varían de 10 a 60 μm y más frecuentemente entre los 20 y 40 μm . El prequiste es el estadio que se presenta cuando las condiciones del medio ambiente son desfavorables para la vida del trofozoíto, el cual se redondea y comienza a sintetizar un polisacárido constituido de N-acetilglucosamina, que se deposita sobre su superficie, deteniendo su reproducción y movimiento. Además de ser esférico e inmóvil, no existe diferenciación de ectoplasma y endoplasma, su pared se engruesa y cuenta con un solo núcleo. Sin embargo, su metabolismo no cesa ya que parte de sus carbohidratos los almacena en forma de glucógeno el cual utiliza para obtener energía cuando se desenquista (Becerril-Flores et al. 2014; Torres-Guerrero et al. 1991).

El quiste es el elemento infectante en la naturaleza, sobrevive al suelo húmedo durante una semana por lo menos, si la temperatura oscila entre los 28 y 34°C, y hasta un mes, si la temperatura es de 10°C. Presenta una forma esférica (oval o esférica) y mide aproximadamente entre 5 y 20 micras; posee cuatro núcleos y una pared gruesa en su forma madura de aproximadamente 125 -150 nm de grosor y está formada principalmente por quitina, en ocasiones presenta una vacuola con glucógeno. El quiste es resistente al jugo gástrico y cifras habituales de cloro en el agua (Campos-Peralta et al. 2011).

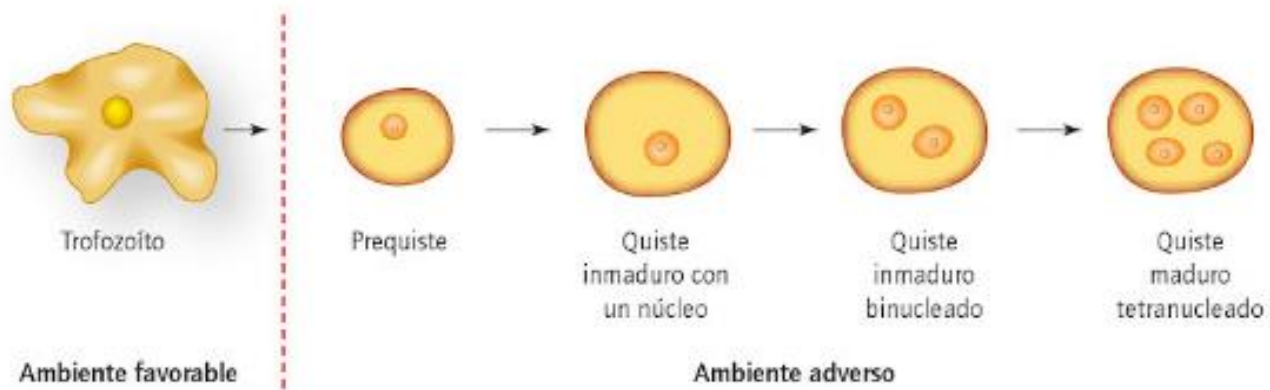


Fig. 1. Estadios morfológicos de *Entamoeba histolytica*. Trofozoítos (ambiente favorable o intestinal), prequistes y quistes (ambiente adverso) (Becerril-Flores et al. 2014).

3. Epidemiología

Este parásito patógeno es cosmopolita de elevada prevalencia, sin embargo el impacto global es difícil de cuantificar, se calcula que la prevalencia promedio de la amebiasis en el mundo es del 10%; sin embargo, esta no se puede calcular de forma eficiente por la presencia de especies no patogénicas como *E. dispar* y *E. moshkovskii*, entre otras (Chacín-Bonilla 2013). Además de la gran cantidad de asintomáticos (90%). Existen grupos de riesgo entre los que se destacan viajeros, inmigrantes de zonas endémicas y hombres que tienen sexo con otros hombres (Domínguez 2018; Jackson 1998; Shirley et al. 2018; Walsh 1986).

Se calcula que su prevalencia alcanza entre un 50 y 80% de los países de ingresos bajos; mientras que, en países en desarrollo esta se estima entre el 1 y el 40%; así como en zonas tropicales y subtropicales; sin embargo, la evidencia científica es muy escasa (Chacín-Bonilla, 2013).

Mundialmente es la tercera parasitosis más importante, solo después de la malaria y schistosomiasis, y es capaz de ocasionar la muerte. Se estima que ocasiona aproximadamente entre 40 mil y 110 mil muertes al año, colocándola como la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias (Ali and Nozaki 2007; López-Soto et al. 2009; Petter et al. 1994; Shirley et al. 2019).

En México se ha documentado una seroprevalencia de *E. histolytica* en algunas regiones superior al 42% y ocupa el décimo lugar dentro de las patologías con mayor prevalencia en el país (Alvarado-Esquivel et al. 2015; Saavedra and García 2017; Shirley et al. 2019). Según el reporte epidemiológico para la semana 43 del año 2020, se habían reportado a 159 386 casos de amebiasis intestinal en México. Sinaloa por su parte, reportó a la semana 42 del 2020, 2 326 casos de los cuales 1 070 pertenecen a personas de sexo masculino y 1 256 al sexo femenino (Figura 2).

Por otro lado, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud reportó 637 casos de absceso hepático amebiano en México en el acumulado del 2019 para la semana 42; mientras que, el acumulado para esta misma semana en 2020 es 463 casos a nivel nacional.

En Sinaloa, se presentaron 27 casos hasta la semana 42 del 2020, 23 de sexo masculino y solo 4 de sexo femenino (Figura 3).

ENTIDAD FEDERATIVA	Amebiasis Intestinal CIE-10 ^a Rev. A06.0-A06.3, A06.9			
	Sem.	2020		2019
		M	F	Acum.
Aguascalientes	10	281	355	1 372
Baja California	12	184	278	825
Baja California Sur	17	259	274	870
Campeche	33	715	788	2 634
Coahuila	18	418	451	2 345
Colima	9	225	298	1 025
Chiapas	303	5 250	6 805	20 669
Chihuahua	18	436	564	2 072
Ciudad de México	38	1 190	1 292	4 585
Durango	17	392	447	1 290
Guanajuato	14	518	591	2 652
Guerrero	151	2 895	3 796	10 043
Hidalgo	53	1 258	1 609	5 805
Jalisco	47	1 380	1 402	4 403
México	145	3 070	3 550	11 194
Michoacán	30	604	769	2 183
Morelos	21	854	991	2 167
Navarro	48	1 358	1 606	5 670
Nuevo León	29	417	417	1 605
Oaxaca	238	4 493	5 992	15 839
Puebla	210	3 629	4 583	12 667
Querétaro	19	315	482	977
Quintana Roo	34	985	988	3 644
San Luis Potosí	33	841	1 065	3 019
Sinaloa	49	1 070	1 256	5 578
Sonora	18	388	592	1 421
Tabasco	106	2 312	2 607	6 902
Tamaulipas	49	921	1 195	3 563
Tlaxcala	20	426	559	1 564
Veracruz	234	3 891	4 687	12 995
Yucatán	30	1 044	1 207	5 540
Zacatecas	24	479	621	2 268
TOTAL	2 077	42 476	51 917	159 386

Fig. 2. Casos por entidad federativa de amebiasis intestinal hasta la semana epidemiológica 42 del 2020 (SSA, 2020).

ENTIDAD FEDERATIVA	Absceso Hepático Amebiano CIE-10 ^ª REV. A06.4			
	Sem.	2020		2019
		Acum.		Acum.
		M	F	
Aguascalientes	-	3	-	7
Baja California	-	11	6	17
Baja California S	-	6	-	10
Campeche	-	-	1	6
Coahuila	-	6	1	1
Colima	-	3	3	3
Chiapas	-	12	7	39
Chihuahua	-	12	8	25
Ciudad de México	-	9	2	63
Durango	-	2	2	5
Guanajuato	-	11	4	8
Guerrero	-	1	6	37
Hidalgo	-	6	3	6
Jalisco	-	28	17	46
México	-	13	9	54
Michoacán	-	10	9	18
Morelos	1	3	-	3
Navarro	-	5	5	10
Nuevo León	-	4	4	10
Oaxaca	-	5	4	13
Puebla	1	9	5	15
Querétaro	-	1	-	2
Quintana Roo	-	1	1	2
San Luis Potosí	-	20	36	5
Sinaloa	1	23	4	62
Sonora	-	29	15	31
Tabasco	-	2	-	25
Tamaulipas	-	4	5	2
Tlaxcala	-	1	-	5
Veracruz	-	19	33	83
Yucatán	-	5	2	13
Zacatecas	-	3	4	11
TOTAL	3	267	196	637

Fig. 3. Casos por entidad federativa de absceso hepático amebiano hasta la semana epidemiológica 42 del 2020 (SSA, 2020).

4. Ciclo biológico

La parasitosis se adquiere al consumir los quistes maduros, estos se transmiten a través de la ruta fecal-oral, consumiendo alimentos, bebidas y fómites contaminados, el principal reservorio de *E. histolytica* es el hombre y aunque este patógeno se puede encontrar en animales, no existe evidencia que puede ocurrir transmisión entre animales y humanos; sin embargo, se ha reportado que el protozooario es capaz de transmitirse por algunas prácticas sexuales (Campos-Peralta, et al. 2011; Organización Panamericana de la Salud, 2003; Shirley et al. 2018).

Una vez que el quiste maduro es ingerido, desciende por el sistema digestivo hasta entrar en contacto con los jugos digestivos, donde la pared de quitina del quiste es reblandecida y se inicia el proceso de desenquistamiento, el quiste continúa viajando por el tracto intestinal hasta llegar a la sección final del intestino delgado conocida como íleon, en donde se finaliza el desenquistamiento, y finalmente se originan protoplastos desnudos tetranucleados que dan lugar a formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas las cuales, las que crecen a trofozoítos maduros que migran al ciego (intestino grueso) y se adhieren a la mucosa intestinal. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria, y pueden continuar como trofozoítos o formar quistes, según las condiciones del medio, los trofozoítos se dividen en formas más pequeñas, dejan de alimentarse y se rodean de una pared más gruesa y resiste para dar lugar a su transformación, al principio estos son mononucleares; luego se subdividen por dos mitosis consecutivas, por lo que al finalizar contienen 4 núcleos, las formas quísticas se expulsan por medio de las heces (Campos-Peralta et al. 2011; Kantor et al. 2018; Organización Panamericana de la Salud, 2003) (Figura 4).

Los trofozoítos pueden colonizar la mucosa intestinal y ocasionar desde síntomas leves hasta disentería grave. Cuando ha invadido el epitelio intestinal, el parásito puede diseminarse a través del torrente sanguíneo, originando lesiones extra-intestinales principalmente en hígado y, con menor frecuencia en pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón. Alternativamente, bajo condiciones aún no determinadas, los trofozoítos se dividen por fisión binaria y pueden enquistarse para salir al ambiente con las heces y así contaminar agua y alimentos, para infectar de nuevo a otros individuos, completando su ciclo de vida (Campos-Peralta, et al. 2011; Kaur et al. 2004).

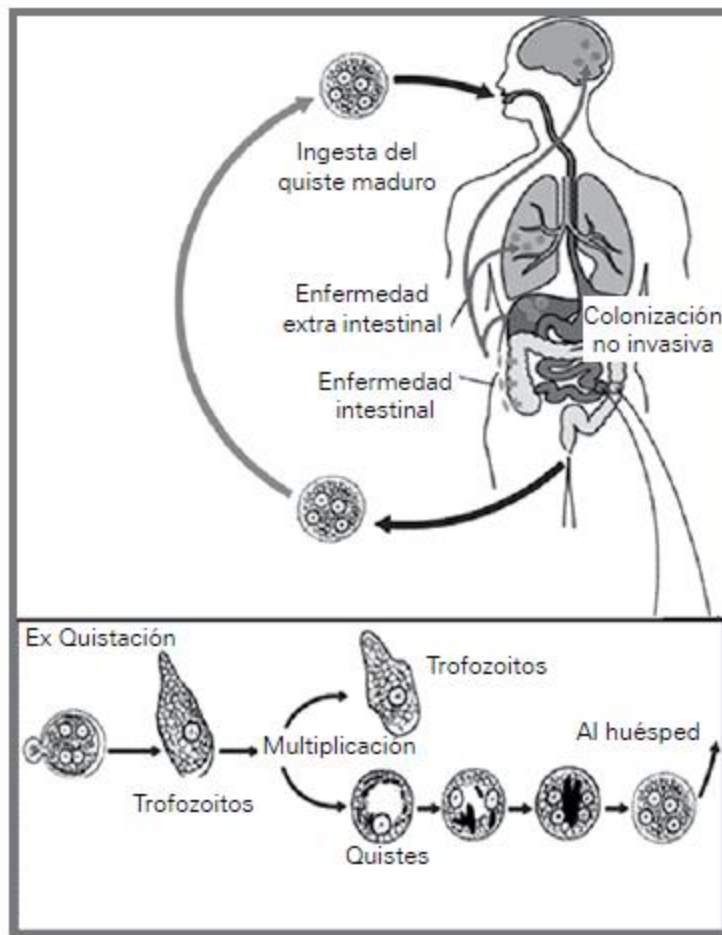


Fig. 4. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. El parásito *E. histolytica* tiene dos estadios en su ciclo de vida: trofozoíto y quiste. La fase de infección comienza por la ingestión de alimentos, agua o fómites contaminados con quistes, seguida de un proceso de exquistación y colonización del intestino dada por trofozoítos causando la enfermedad (CDC 2020).

5. Manifestaciones clínicas de la amebiasis

El cuadro clínico producido por *E. histolytica* es conocido como amebiasis y sólo en alrededor del 10% al 20% de las personas que están infectadas con *E. histolytica* se presentan síntomas de la infección, es decir que alrededor del 80% son asintomáticos al parásito (Domínguez, 2018; Secretaría de Salud, 2009). La amebiasis se clasifica por sus manifestaciones sintomáticas y asintomáticas, por su localización intestinal o extra-intestinal y por su evolución en aguda y crónica (Flores-Cuevas, 2012; Saavedra and García, 2017).

Los síntomas suelen ser muy leves y pueden incluir heces sueltas (diarrea) con pocas heces, dolor de estómago y calambres estomacales. Por su parte, la disentería amebiana es una forma grave de amebiasis asociada con dolor estomacal, heces mezcladas con sangre y fiebre. En raras ocasiones, *E. histolytica* evoluciona a formas graves como colitis ulcerosa y megacolon tóxico que pueden llegar a perforar el intestino u ocasionar un ameboma en donde se forma una masa pseudotumoral que puede obstruir el colon. Otra manifestación clínica de *E. histolytica* son las amebiasis extraintestinales donde la más frecuente es la invasión del hígado formando un absceso (una acumulación de pus) conocido como Absceso Hepático Amebiano o el agrandamiento del hígado (hepatomegalia). En un pequeño número de casos, se ha demostrado que se propaga a otras partes del cuerpo, tales como los pulmones, corazón o el cerebro, pero esto es muy poco frecuente (Olivos-García, et al. 2009; Petri, 2009; Saavedra and García, 2017).

6. Diagnóstico

El diagnóstico en laboratorio de la amebiasis se lleva a cabo mediante técnicas parasitológicas, inmunológicas, moleculares, imagenológicas e incluso histológicas. El diagnóstico definitivo se realiza con base en las manifestaciones clínicas y la observación de quistes o trofozoitos obtenidos de muestras fecales, raspados o biopsias. Es importante enfatizar que la mayor parte de los estudios de laboratorio no son útiles para diferenciar *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. Moshkovskii* y *E. bangladesí* (Nowak, et al. 2015).

En el diagnóstico directo se requiere de heces fecales de los sujetos infectados para la detección de trofozoitos en la fase de diarrea. La inspección debe hacerse de zonas de la muestra con moco y/o sangre; sin embargo, se pueden requerir varias muestras de heces, ya que *E. histolytica* no siempre se encuentra en la muestra. Los métodos directos utilizados son:

1. Frotis fecal grueso en celofán
2. Frotis frescos con solución salina y yodo
3. Método de concentración
4. Frotis teñidos con tinción permanente

(Chacín-Bonilla, 2013; OPS, 2020).

El diagnóstico también se puede realizar a través de pruebas inmunológicas (ELISA, contraelectroforesis, inmunofluorescencia indirecta). Por su parte, la prueba serológica de detección de antígenos fecales de *E. histolytica* TechLab reporta una sensibilidad del 87% y una especificidad mayor al 90%, sin embargo, el paciente puede dar positivo después de años de la infección (Domínguez, 2018).

Algunos laboratorios, principalmente de investigación, cuentan con técnicas moleculares de mayor sensibilidad y especificidad:

- Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR) para la identificación de especie y para detección cuantitativa. Esta puede realizarse en punto final o en tiempo real.
- Cultivo de heces fecales y posterior análisis de isoenzimas.

7. Tratamiento y profilaxis

Se recomienda que todos los casos de infección con *E. histolytica* que manifiesten sintomatología sean tratados, el tratamiento debe ser prescrito por un médico y debe ser de acuerdo a la localización del trofozoíto, edad del paciente, severidad de las manifestaciones, disponibilidad de fármacos, eficacia clínica y condiciones generales del paciente (embarazo, inmunosuprimidos, entre otros) (Botero and Restrepo, 1992; Domínguez, 2018).

Existen drogas antiamebianas (antibióticos) disponibles para tratar la amibiasis. Estos antibióticos actúan en diferentes niveles del tejido del hospedero:

- Fármacos lumbinales: Teclozán o furoato, paromomicina, dihidroquinoleínas.
- Fármacos de contacto: Quinfamida, etofamida, diloxamida.
- Fármacos utilizados en formas invasivas de la enfermedad: Metronidazol, ornidazol, hemezol, secnidazol, tinidazol, nitazoxanida.

Estas últimas son las de mayor elección, debido a que el 90% de los pacientes reaccionan positivamente a estos tratamientos, siendo el tratamiento de primera elección el metronidazol; sin embargo, tinidazol, es el mayor eficacia y asociado a menor cantidad de eventos adversos según la literatura científica (Botero and Restrepo, 1992; Domínguez, 2018).

Las medidas de profilaxis van encaminadas a mejorar el saneamiento ambiental y mejorar la higiene individual, el tratamiento de las personas infectadas, el examen de las personas en contacto y la lucha contra las determinantes sociales de transmisión del protozooario (Chacín-Bonilla, 2013).

8. Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia (FV)

El origen de la enfermedad se encuentra influenciada por factores del hospedero, parásito y del medio ambiente que afectan la susceptibilidad y desenlace de la infección (Petri, et al. 2009). En el hospedero, la susceptibilidad se afecta por factores como la desnutrición, edad, embarazo, factores genéticos, género, uso de drogas, alcoholismo y microbiota (Bracha and Mirelman, 1983; Cheng, et al. 2001; Domínguez, 2018; Petri, et al. 1987); mientras que, el genotipo del parásito pareciera influir directamente en el desenlace de la enfermedad (Mann and Lockhart, 1998).

Aun cuando se conoce una amplia gama de manifestaciones clínico-patológicas de la enfermedad y la capacidad destructiva de los trofozoitos de *E. histolytica* en los tejidos (sobre todo en el intestino grueso e hígado), todavía se desconoce porqué una minoría desarrolla la enfermedad, así mismo, aún se encuentran en estudio los mecanismos intrínsecos de la amiba, los microambientes que influyen en la destrucción de tejidos del hospedero y los procesos moleculares inherentes a la patogenicidad (Anaya-Velázquez and Padilla-Vaca, 2011; Bernal, 1997; Ghosh et al. 2019; Olivos-García et al. 2011).

Los trofozoitos de *E. histolytica* son capaces de causar daño a diversas líneas celulares, entre las que se encuentran los enterocitos, donde son activados con el factor de transcripción NF-kappa β (Gómez et al. 2007; Zhang et al. 2000).

En el mecanismo patogénico de *E. histolytica* se distinguen tres pasos clave sobre la célula blanco: adhesión, citólisis y fagocitosis (Ghosh et al. 2019; Orozco et al. 1982), las cuales se encuentran mediadas por factores de virulencia.

a) Adhesión. Es el primer paso para la invasión intestinal por los trofozoitos de *E. histolytica* es el contacto y la adherencia a las células epiteliales del intestino del hospedero, las cuales se

encuentran recubiertas con una capa de mucina (110 a 160 nm), la cual es principal obstáculo para invadirlas y destruirlas. Para lograr disrumpirla, las lectinas de *E. histolytica* deben de entrar en contacto con las glucoproteínas de mucosa de colon para así lograr la proteólisis de MUC2 el principal componente de la mucosa intestinal. Esta adherencia requiere de mecanismos específicos que involucran moléculas de superficie de la amiba llamadas adhesinas y sus receptores presentes en las células blanco, así mismo, primero tiene que darse una colonización del intestino por parte del parásito para la posterior disrupción de la mucosa (Gómez et al. 2007; Radvin, 1986; Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009).

Se han reportado algunas proteínas de *E. histolytica* involucradas en el contacto con las células blanco. Entre las más importantes podemos encontrar a las lectinas Gal-Lec y galactosa /N-acetilgalactosamina -Gal/GalNac-. La Lectina Gal/GalNac es una adhesina que media la unión del parásito a la célula blanco y existe evidencia que células que no expresan esta proteína son resistentes a muerte por el parásito, también participa en la transducción de señales y en la evasión del sistema del complemento del huésped (Domínguez, 2018; Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009).

Gal/GalNac es una glucoproteína multimérica de 260 kDa, que reconoce residuos expuestos de galactosa/Nacetil-D-galactosamina en las glucoproteínas de la membrana de la célula diana. Gal/GalNac está constituida por un heterodímero compuesto por la subunidad pesada (Hgl) de 170 kDa, disulfito ligado a un glucosilfosfatidilinositol (GPI), este complejo se encuentra ligado por puentes disulfuro a la subunidad liviana (Lgl) de 30 o 35 kDa, la cual se encuentra unida por puentes disulfuro y uniones no covalentes a la unidad intermedia (Igl) de 150 KDa (Cheng et al. 2001; Gómez et al. 2007).

La subunidad pesada se codifica por 5 genes; el dominio citoplasmático reconoce específicamente la galactosa/N-acetil-D-galactosamina y su secuencia presenta homología con las integrinas $\beta 2$ y $\beta 750$. La subunidad liviana participa en la regulación de la adhesión y a la señalización de eventos asociados con la virulencia (Tachibana et al. 2004).

La lectina Gal/GalNac, puede ser inhibida por la misma mucina del intestino; sin embargo *E. histolytica* responde con la secreción de diferentes enzimas que degradan proteínas y carbohidratos, como la glucosidasa, manosidasa, galactosidasa, fucocidasa, xilosidasa,

glucoronidasa, N-acetil-Dgalactosaminidasa entre otras proteasas de cisteína, para generar la alteración de la mucosa y aumentar su afinidad por las proteasas y otras sustancias que la ameba secreta (Gómez et al. 2007).

De las proteínas que participan en la adhesión, las lectinas presentes en la membrana plasmática de *E. histolytica* son las principales mediadoras de la adherencia de la ameba a células epiteliales, eritrocitos y neutrófilos, entre otros.

Esta adherencia es lograda por la acción citolítica que el parásito posee, como proteasas y amebaporos.

Además, se ha observado su participación en histólisis y evasión del sistema inmune a través de la unión a factores del complemento, y la interrupción de la formación del ensamble del complejo de ataque sobre la membrana de los trofozoítos (Arroyo and Orozco, 1987; Radvin, 1986). Otro factor de virulencia altamente estudiado involucrado en la adhesión del parásito a la célula es la adhesina EhADH112, la cual se encuentra dentro del complejo EhCPADH, la cual también participa en los procesos de fagocitosis. Otros factores de virulencia involucrados con la adhesión son la lectina L220 y la proteína rica en serina (SRHP) (Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009).

b) Citólisis. Cuando *E. histolytica* establece contacto con las células blanco, ocurre la histólisis. Este es el mecanismo al que *E. histolytica* debe su nombre por su capacidad para destruir a los tejidos. Dicho mecanismo está mediado principalmente por dos proteínas: las cisteín-proteasas (CPs) que tienen la capacidad de degradar la matriz extraelular y participar en los procesos de lisis celular y los péptidos formadores de poros, llamados amebaporos, que forman canales que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas, rompiendo la osmosis celular (Gómez et al. 2007; Keene et al. 1990).

Los amebaporos son enzimas proteolíticas (colagenasas y proteasas, que facilitan la invasión de las células de huésped y son conocidas como “formadoras de poros” el proceso de invasión de tejidos, la membrana es permeada y se implantan en la membrana bi-lipídica de la célula huésped por la unión con fosfolípidos aniónicos a bajo pH; allí se forman oligómeros, proceso mediado por la interacción péptido-péptido, y se expanden lateralmente, dando lugar a una molécula de mayor tamaño. Esto causa la degradación del colágeno y los oligosacáridos de la matriz celular, formando canales por los que se propagan iones (salida de Na⁺ y K⁺ y entrada de Ca²⁺), agua y otras

pequeñas moléculas; como resultado de este intercambio, el medio celular interno cambia y se produce la citólisis por choque osmótico. Las amebaporos, son uno de los primordiales factores de patogenia de *E. histolytica*, cuya función más importante es eliminar las bacterias ingeridas dentro de las vacuolas digestivas y pueden inducir la necrosis de células epiteliales y leucocitos durante la invasión del parásito.

Otro factor considerado esencial para la habilidad de causar daño son las proteasas de cisteína (CPs), las cuales son enzimas proteolíticas capaces de degradar proteínas como la fibronectina, la laminina y el colágeno, entre otras; y a su vez, separan las células, facilitando la invasión. Las CPs son secretadas por el protozoo dentro de su microambiente y están involucradas en las interacciones de la *E. histolytica* con la respuesta inmune del huésped. La evasión de la respuesta inmune por proteasas de cisteína es causada por su capacidad de degradar las inmunoglobulinas (como IgA e IgG, componentes de la respuesta inmune humoral) y la proteína precursora proIL-18, (responsable de la maduración de la citocina IL-18, clave en los procesos proinflamatorios y una importante mediadora de la respuesta Th1); además, inducen la activación de macrófagos y la secreción del IFN, eventos primordiales en el ataque contra los trofozoítos.

Además, la literatura ha reportado que la Lectina Gal/GalNac se encuentra involucrada en la activación de la captasa -3 que conduce a la apoptosis, aunque el mecanismo no ha sido esclarecido (Ghosh et al. 2019; Gómez et al. 2007).

c) Fagocitosis. Es un proceso activo considerado un mecanismo de patogenicidad. El proceso de fagocitosis consiste en la ingestión de fragmentos celulares, células vivas, partículas inertes y la típica ingestión de glóbulos rojos (eritrofagocitosis). En este proceso, la unión del parásito puede estar mediada por fuerzas electrostáticas. Pero también existen mecanismos sumamente específicos en los que intervienen moléculas de superficie, CPs, y componentes del citoesqueleto (Bracha et al. 2002). Este proceso va complementado por la formación del fagolisosoma, dirigido por GTPasas y proteínas Rab, que actúan como moduladores en la regulación de la fusión vesicular con las membranas de la célula blanco (Bracha et al. 2002; Young et al. 1992). Recientemente se observó que *E. histolytica*, “muere” las células vivas, provocando la pérdida de la integridad de la membrana y la elevación de la concentración Ca^{2+} intracelular y causando la muerte de la célula, este mecanismo se ha conocido como “Trogocitosis”, así mismo,

se ha demostrado que factores de virulencia de vías de señalización como EhC2Pk y PI3K, regulan parcialmente los procesos de fagocitosis y trogocitosis (Ghosh et al. 2019; Ralston et al. 2014). Durante estos procesos de colonización, disrupción de la mucosa, adhesión, citólisis y fagocitosis de *E. histolytica*, las células diana liberan diversos quimioatrayentes y citosinas proinflamatorias que dan arranque a la respuesta inflamatoria aguda (Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009).

B. *Giardia duodenalis* (intestinalis o lamblia)

1. Generalidades

Giardia duodenalis es un protozoo patógeno causal de la giardiasis, la parasitosis intestinal más común y endémica en todo el mundo, que puede ocasionar diarrea aguda o persistente, vómitos, mala absorción con esteatorrea, disentería, inflamación del duodeno y yeyuno, dolor abdominal, timpanismo e incluso puede colonizar la vesícula biliar; además, en infantes puede ocasionar anemia, retraso del crecimiento y/o cognición; sin embargo, gran número de las infecciones con este patógeno son asintomáticas (Barros et al. 1994; Salud, 2008; Thompson, 2008; Vivancos et al. 2018).

G. duodenalis es considerado OMS como un patógeno causal de una enfermedad tropical, para el cual se ha reportado una prevalencia de hasta el 33% en estas regiones (tropicales y subtropicales) en adultos (Bartelt and Sartor, 2015; Rivera et al. 2002), así mismo presenta alta incidencia en países en vías de desarrollo y se ha asociado a brotes epidémicos importantes en Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos de Norteamérica (Busatti et al. 2013; Lane and Lloyd, 2002).

La giardiasis presenta una distribución muy amplia, con 10-15% de la población mundial infectada en promedio, en algunas regiones la prevalencia de infección en niños pequeños se aproxima al 100%, los niños de 1 a 5 años son infectados con mayor frecuencia (Salud, 2008). Se ha estimado que a nivel mundial alrededor de 280 millones de personas son infectadas anualmente, principalmente en Latino América, Asia y África, de los cuales 500 mil sufren la enfermedad (AMSE 2016; Bartelt and Sartor, 2015; Mark-Carew et al. 2013).

G. duodenalis es transmitida por la vía fecal-oral a través de alimentos, fómites, agua o incluso manos contaminadas con formas infectantes del patógeno (CDC, 2020).

2. Morfología

El agente causal de la giardiasis es *G. duodenalis*, un protozooario no invasivo, microaerofílico, que se reproduce por división binaria en la superficie de intestino delgado y en su ciclo biológico presenta dos estadios: trofozoíto y quiste (CDC 2020).

El trofozoíto, o forma vegetativa o reproductiva de *G. duodenalis*, mide de 9 a 20 micras de longitud por 5 a 15 de ancho y de 5 a 9 de grosor, es de aspecto piriforme (redondeados en su porción anterior y cada vez más afilados en su extremo posterior) con una cara dorsal convexa, una ventral cóncava, al ser vistos lateralmente son aplanados. La forma vegetativa de *G. duodenalis* posee dos núcleos idénticos con endosoma y transcripcionalmente activos, dispuestos simétricamente a los lados de la línea media longitudinal y en la mitad anterior del parásito con forma ovoide y un cariosoma central, formado por cromatina o por granos finos que, en ocasiones, pueden encontrarse dispersos en el nucleoplasma. La membrana nuclear, no está cubierta de cromatina (Fonte 2009; López-Romero 2016). Los núcleos contienen genomas poliploides; sin embargo, aún no está claro el objetivo de estos. Para la adhesión, desprendimiento y movimiento, *G. duodenalis* en su forma infectiva utiliza el citoesqueleto formado principalmente por proteínas como la tubulina, giardina, actina, entre otras (Rivera et al. 2002). El citoesqueleto expone varias estructuras microtubulares, como el disco ventral o adhesivo, los cuerpos medianos y los flagelos. El disco adhesivo se ubica en la superficie ventral del trofozoíto abarcando tres cuartas partes de esta, es una estructura cóncava y bilobulada, de 0,4 μ de grosor máximo, es una estructura rígida y se encuentra fortalecida por microtúbulos y cintas fibrosas dorsales (que cursan desde los microtúbulos al citoplasma), se encuentra rodeada por un anillo de citoplasma contráctil (Figura 5). El disco adhesivo, es el responsable de la capacidad del parásito de adherirse a células del hospedero funcionando como una ventosa (Fonte, 2009). Cuatro pares de flagelos emergen de cada trofozoíto: ventrales, anteriores, posteriores y caudales. Los flagelos, que son estructuras móviles responsables de la locomoción del parásito, la cual se da por la rotación alrededor de su eje longitudinal para crear una fuerza de propulsión que ocasiona que *G. duodenalis* puede alcanzar velocidades de 12-40 $\mu\text{m/s}$ (Lenaghan et al. 2011).

Los cuerpos medianos son elementos únicos del género *Giardia* y su función aún no se define, han sido nombrados de diversas maneras por varios autores: cuerpos parabasales, kinetoplastos y cuerpos cromatoidales. Sin embargo, los estudios de ultraestructura de alta resolución realizados hasta el presente niegan su participación en las actividades biológicas a las que aluden esas denominaciones, se encuentran situados encima de los axonemas de los flagelos caudales, inmediatamente detrás del disco adhesivo, se describen como un par de estructuras alargadas, de coloración oscura, ligeramente curvas, dispuestas de manera oblicua o transversal y muy próximas entre sí (Fonte 2009).

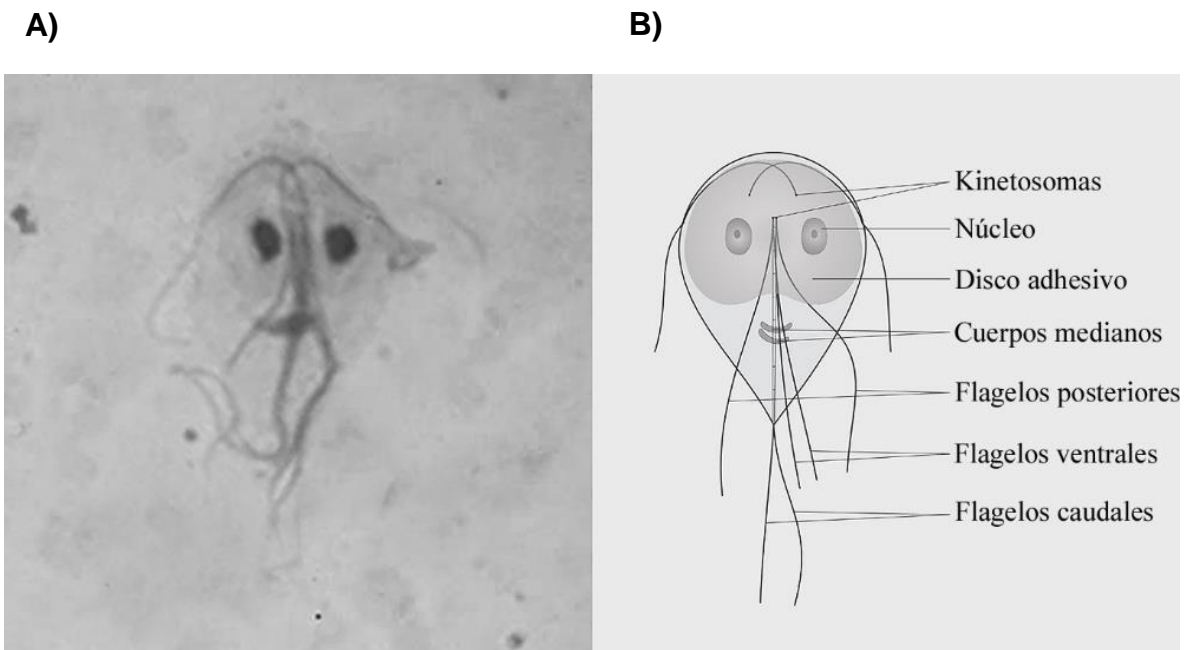


Fig. 5. Morfología de trofozoítos de *G. duodenalis*. A) Trofozoíto de *G. duoedenalis* en tinción con Giemsa y B) Diagrama correspondiente (Fonte, 2009).

Así mismo es importante mencionar que la entidad patógena de *G. duodenalis* carece de mitocondrias y peroxisomas, y en su lugar presentan vestigios de estos organelos llamados mitosomas, los cuales son minúsculos ($<2 \mu\text{m}$), y manifiestan una importante reducción de proteínas, presentan doble membranas y retienen la función mitocondrial: la biosíntesis de Fe/S y nucleolo (Heinz and Lithgow, 2013; Makiuchi and Nozaki, 2014). Otra característica es que tienen organelos como vacuolas, lisosomas, cisternas aplanadas semejantes al sistema de Golgi, y un sistema reticular similar al retículo endoplásmico rugoso (Campos-Peralta, et al. 2011).

Los quistes de *G. duodenalis* son el elemento infectante y de resistencia del microorganismo en la naturaleza. Los quistes maduros pueden sobrevivir más de dos meses en agua a 8°C y alrededor de un mes a 21°C ; sin embargo, son sensibles a la luz solar, desecación y temperaturas bajas (congelamiento), además de mostrar sensibilidad a soluciones desinfectantes de sales de amonio cuaternario; sin embargo, las condiciones de cloración normales en el agua de consumo no los afectan. La dosis media infectante de la giardiasis para el hombre es de 10 quistes (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

Los quistes presentan una forma elipsoidal (oval o redondeada), que mide aproximadamente entre 8 y $12 \mu\text{m}$ de longitud por $5\text{-}8 \mu\text{m}$ de ancho; los quistes presentan cuatro núcleos a diferencia de los pre-quistes o inmaduros que solo presentan dos, el cariosoma nuclear puede situarse en el centro o de forma excéntrica y la membrana nuclear carece de cromatina. El citoplasma por su parte es granular, fino y separado de la pared quística que presenta un espesor de $0,3 \mu\text{m}$ de espesor y es continua a la membrana plasmática del parásito. La pared del quiste se caracteriza por ser refráctil y su porción externa está compuesta por un complejo fibrilar que contiene de 7 a 20 filamentos y se encuentra compuesta principalmente por N-acetilgalactosamina (GalNAc), mientras que, la porción interna de la pared es membranosa. Ambas se encuentran separadas por el espacio periplásmico. En el citoplasma del quiste se observan también ocho axonemas, dos láminas de microtúbulos (10 a 20 microtúbulos cada una), numerosos ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral (Rivera et al. 2002; Soriano-Alcaraz, 2005; Tay-Zavala 2010; Uribarren-Berrueta, 2015). La actividad metabólica de los quistes es solo de un 10–20% de la desarrollada por los trofozoítos.

3. Epidemiología

La giardiasis es una parasitosis cosmopolita que se puede desarrollar de forma endémica o epidémica, la prevalencia de la enfermedad fluctúa entre el 2 y el 4% de la población adulta y el 8% de los infantes en los países en desarrollo y se estima que en promedio entre el 10-15% de la población mundial se encuentra infectada con el parásito y del 20 al 30% en países industrializados, siendo la población pediátrica la mayormente afectada (Dunn and Juergens, 2020; Fink and Singer, 2017).

Su mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, así como en países en desarrollo donde afecta hasta el 33% de los adultos (Dunn and Juergens, 2020; Goyal et al. 2013; Organización Panamericana de la Salud, 2003; Soriano-Alcaraz, 2005).

Las personas pueden ser infectadas con una dosis mínima infectiva de 10 quistes maduros del parásito mediante el consumo de la forma infectiva de *G. duodenalis*, a través de agua, alimentos o fómites contaminados, así mismo, una persona infectada puede propagar la enfermedad ya que esta llega a arrojar de 1 a 10 millones de quistes en sus evacuaciones diarias (esto puede durar durante meses), por lo que la falta de higiene o hacinamiento son determinantes en la distribución de la enfermedad (Bartelt and Sartor, 2015; CDC, 2020). La prevalencia de la enfermedad es inversamente proporcional a la sanidad ambiental (Vázquez and Campos, 2009).

El reservorio fundamental de *G. duodenalis* es el hombre, enfermo o como portador asintomático. Sin embargo, la infección está muy extendida entre animales domésticos (perros, gatos, pájaros, caballos, cabras, ovejas, vacas, entre otros) y en un amplio rango de mamíferos salvajes y aves, esto aunado a la resistencia de los quistes de *Giardia* a las medidas convencionales de tratamiento, ha contribuido a los brotes de giardiasis, que se encuentran relacionados a agua recreativa y de consumo, así como a vegetales no cocinados principalmente (Bouزيد, et al. 2008; Le Chavelier, et al. 1991).

La prevalencia de giardiasis en México fluctúa entre el 2% y 50% en algunos estados (Sinaloa, Sonora y Yucatán) (García-Cervantes, et al. 2017; Gutiérrez-Jiménez, et al. 2017), así mismo, se calcula que en México existen 9 millones de personas con el agente patógeno y la giardiasis es la parasitosis más común en la república, en palabras de la Dra. Rosa María del

Refugio Bermúdez Cruz, científica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) “La mitad de la población ha tenido o sufre el padecimiento” (PMFarma, 2015).

En México, hasta la semana 39 del 2020 se reportaron en el boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (SSA) 8,924 casos de giardiasis, a nivel nacional de los cuales 920 corresponden al estado de Sinaloa (Figura 6), ocupando el segundo lugar en casos de giardiasis a nivel nacional, después del estado de Chiapas (SSA, 2020).

En el estado de Sinaloa la literatura ha reportado un 31% de prevalencia de la enfermedad, además de que el genotipo A1 es el mas prevalente en las familias y la presencia de el genotipo B (García-Cervantes et al. 2017)

ENTIDAD FEDERATIVA	Giardiasis CIE-10 ^a REV. A07.1			
	Sem.	2020		2019
		Acum.		Acum.
		M	F	
Aguascalientes	-	2	8	14
Baja California	1	17	15	63
Baja California Sur	1	6	15	45
Campeche	3	41	43	151
Coahuila	-	9	13	38
Colima	1	40	35	66
Chiapas	7	238	267	1190
Chihuahua	2	26	28	124
Ciudad de México	6	75	89	339
Durango	-	3	9	24
Guanajuato	1	19	34	54
Guerrero	4	97	106	423
Hidalgo	1	32	36	105
Jalisco	9	78	70	191
México	1	92	110	729
Michoacán	-	16	27	93
Morelos	-	5	8	19
Nayarit	3	25	36	181
Nuevo León	4	29	40	168
Oaxaca	4	200	184	838
Puebla	5	160	154	327
Querétaro	-	6	15	40
Quintana Roo	1	58	83	188
San Luis Potosí	2	69	123	310
Sinaloa	11	115	159	920
Sonora	3	48	64	373
Tabasco	6	105	118	277
Tamaulipas	-	87	101	216
Tlaxcala	1	7	19	32
Veracruz	13	209	211	859
Yucatán	1	83	88	428
Zacatecas	3	32	31	99
TOTAL	94	2 029	2 339	8 924

Fig. 6. Casos nuevos de giardiasis hasta la semana 39 del 2020 en los Estados Unidos Mexicanos (SSA, 2020).

4. Ciclo biológico

En el ciclo vital del parásito incluyen dos estadios que permiten su reproducción y sobrevivencia. La forma patogénica del parásito es conocida como trofozoíto y es capaz de adherirse a las células del intestino y ocasionar las manifestaciones clínicas de la giardiasis, en tanto que el quiste constituye la entidad de resistencia y transmisión de la giardiasis. Para llevar a cabo su ciclo biológico el parásito realiza dos procesos de diferenciación en el hospedero: el desenquistamiento y el enquistamiento (Rascón and Mckerrow, 2013).

La infección ocurre cuando un hospedero susceptible ingiere quistes viables y maduros de *G. duodenalis* (10 quistes), ya sea por agua, alimentos, manos o fómites contaminados, una vez que estos arriban en el estómago inicia el proceso de desenquistamiento desencadenado por la actividad de las enzimas hidrolíticas pancreáticas así como por el medio ácido de este órgano (pH 2) y culmina en el duodeno bajo la influencia de secreciones pancreáticas cuando se rompe la pared quística y emerge del quiste una masa tetranucleada de protoplasma denominada excizoito, el cual se divide dos veces por fisión binaria para formar 4 trofozoítos que se adhieren a las microvellosidades intestinales del duodeno y se dividen por fisión binaria longitudinal, donde pueden colonizar la mucosa intestinal o desplazarse libremente. Los trofozoítos crecen hasta que el pH se vuelve alcalino y el colesterol disminuye por las sales biliares en la parte distal del intestino y se presentan las condiciones apropiadas para señalización del proceso de enquistamiento el cual se realiza principalmente en el yeyuno, probablemente por la acción de la bilis (Adam, 2001; Vivancos et al. 2018).

Los quistes son expulsados por el huésped principalmente en evacuaciones no diarreicas y permanecen en estado de latencia en el medio ambiente por semanas o meses (Figura 7), debido a las características, particularmente de la pared del quiste, puede sobrevivir en el medio externo aún y cuando se presentan variaciones drásticas de pH, sin embargo, su supervivencia se ve mermada en ambientes secos o con temperaturas superiores a los 25°C (Arguello-Garcia et al. 2002; Bartelt and Sartor, 2015; INSHT, 2015).

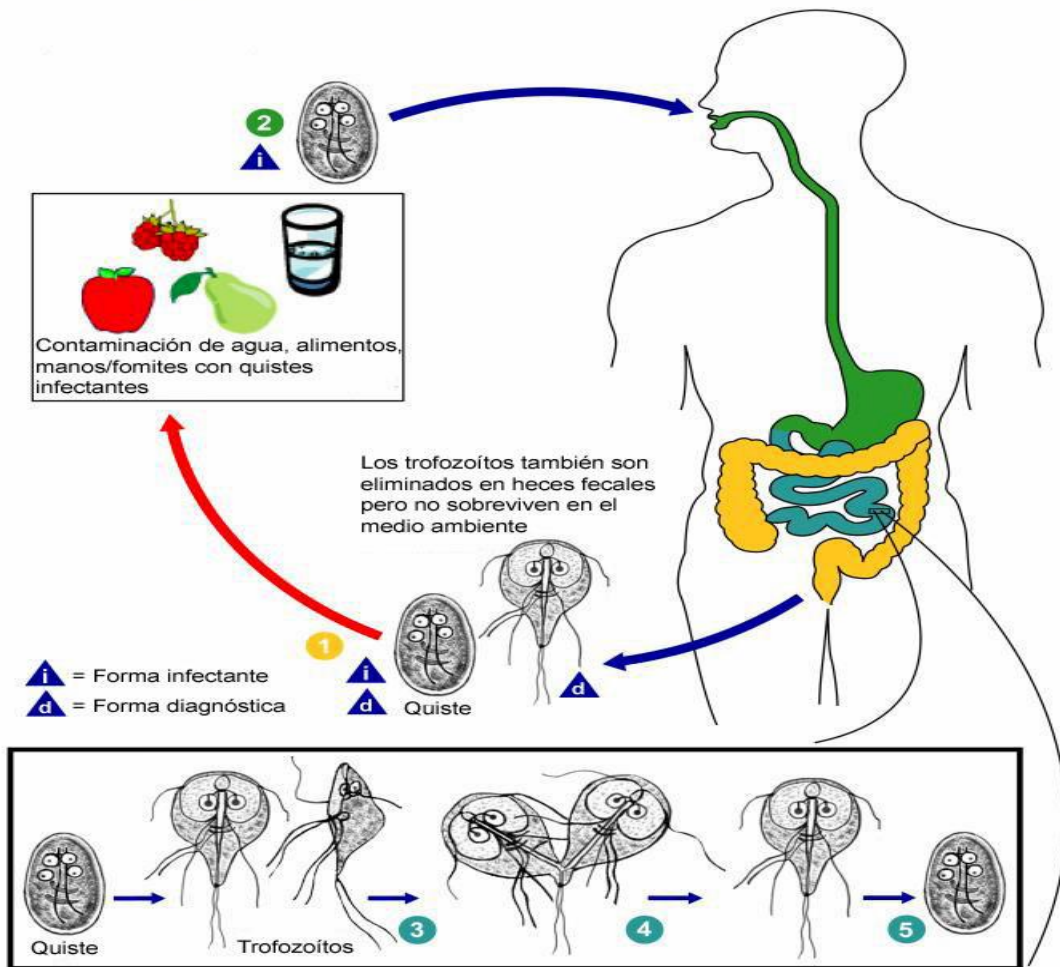


Fig. 7. Ciclo biológico de *G. duodenalis*. El parásito tiene dos estadios en su ciclo de vida: trofozoíto y quiste. La fase de infección comienza por la ingestión de alimentos, agua o fómites contaminados con quistes, seguida de un proceso de exquistación y colonización del intestino dada por trofozoítos causando la enfermedad (CDC, 2020).

5. Manifestaciones clínicas de la giardiasis

En los humanos la giardiasis puede ser desde asintomática o causar malestares intestinales transitorios hasta diarreas agudas o crónicas con heces espesas o estratorreicas y múltiples complicaciones. En los pacientes con giardiasis la sintomatología clínica puede manifestarse de 9 a 20 días después del consumo del ente infectante. La duración de la fase aguda de los síntomas es de 3 a 4 días y no es mortal para los humanos (Escobedo and Cimerman, 2007; Robertson et al. 2010; Wolfe, 1992). Sin embargo, los síntomas de la giardiasis presentan alta variabilidad de persona a persona, esto depende de factores individuales de la respuesta inmunitaria principalmente, el estado nutricional del hospedero, la microbiota del hospedero, la presencia de enteropatógenos coinfectantes además de factores intrínsecos del parásito como la virulencia del aislado, la dosis infectante o la duración de la parasitosis (Bartelt and Sartor, 2015; Wolfe, 1992). Un punto para destacar es que en la giardiasis el periodo de latencia y la duración de la infección no guardan relación con el tamaño del inóculo. Hasta un 60% de los pacientes infectados por *G. duodenalis* cursan con una infección asintomática. La giardiasis asintomática es más frecuente en niños y adultos de áreas endémicas donde las reinfecciones son muy frecuentes (Soriano-Alcaraz, 2005).

Aunque la giardiasis suele resolverse de forma espontánea, con un curso auto limitado, en otras ocasiones la parasitación puede durar semanas o meses en ausencia de tratamiento. Además, las formas agudas pueden evolucionar, en un número limitado de casos, a infección crónica, con mayor frecuencia entre la población infantil (Cabrera-Licona et al. 2020; Soriano-Alcaraz, 2005).

La sintomatología gastrointestinal es la más frecuente y comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden darse de manera aguda, sub-aguda o crónica. Una fase aguda suele incluir desde diarrea explosiva, acuosa y maloliente, generalmente acompañada de náuseas, anorexia, gorgoteo abdominal y dolor abdominal de localización epigástrica y, algunas veces, fiebre moderada y escalofríos (Wolfe, 1992). Otras veces las heces son pastosas, matinales o postprandiales sobre todo, de color amarillento o claro (Díaz and Fernández-Alonso, 1996); mientras que, las fases sub-agudas o crónicas pueden extenderse varios meses y se encuentran caracterizadas por malestar abdominal acompañado de dolor epigástrico difuso, así como diarreas

que pueden persistir o alternar con periodos de estreñimiento, pérdida de peso, retrasos en el crecimiento y disensión abdominal, así como anorexia, eructos con olor azufre, flatulencias, en algunos casos es posible que se presente cefalea (Cordingley and Crawford, 1986; Korman and Deckelbaum, 1993). Otra manifestación clínica asociada a la giardiosis es la mala absorción de grasas (acompañada de esteatorrea), glucosa, xilosa, así como de vitaminas (A, B₁₂ y E), hierro y ácido fólico (Cordingley and Crawford, 1986; Korman and Deckelbaum, 1993; Meyer and Radulescu, 1979).

Las complicaciones de la giardiasis pueden incluir síndrome del intestino irritable, fatiga crónica, alergias alimentarias, anemia, artritis reactiva, desnutrición, deterioro de la cognición, incluso manifestaciones oculares inflamatorias (Bartelt and Sartor, 2015).

6. Diagnóstico

El diagnóstico de la giardiosis se establece con la identificación del parásito en las heces del paciente (estándar de oro) y alteraciones bioquímicas o hematológicas del huésped; aunque el primer paso para su diagnóstico es la anamnesis, la cual enlista los síntomas del paciente (Alparo Herrera, 2005; Salud, 2008). El método recomendado por los parasitólogos es el examen con microscopía óptica de las heces para la identificación de quistes y en algunas ocasiones de los trofozoítos en muestras de heces. Los exámenes deben realizarse en tres muestras fecales a intervalos entre dos o tres días por un periodo máximo de 10 días, la necesidad de examinar al menos dos o tres muestras se debe, como es sabido, a la irregular eliminación del parásito en las heces fecales, observándose una gran variabilidad en el número de quistes excretados, incluso se han descrito para *G. duodenalis* periodos negativos que pueden durar varios días donde dicha eliminación es nula (Díaz and Fernández-Alonso Borrajo, 1996). El examen se realiza directamente en fresco, las muestras se tiñen con tricromo o hematoxilina férrica (Rivera et al. 2002).

En algunos pacientes con diarrea crónica y malabsorción, pueden dar resultados de falsos negativos, en estos casos se puede recurrir a una biopsia del tejido intestinal. La muestra duodenal puede obtenerse bien, con la utilización del Enterotest, o bien, por esófago-gastro-duodenoscopia con aspiración o biopsia duodenal. La biopsia duodenal puede ser obtenida sin endoscopia utilizando una sonda nasogástrica (tubo de Rubin) unida a una cápsula de Crosby o Carey

(enfermedad de Whipple, enfermedad de Crohn, linfoma, esprue, ciclosporidiosis, criptosporidiosis, etc).

Otras formas de realizar el diagnóstico de la giardiasis son a través de:

- Detección de antígenos en heces (Díaz and Fernández-Alonso Borrajo, 1996; Rivera et al. 2002; Wolfe, 1992).
- Detección por PCR en heces (Ghosh et al. 2000).
- Métodos serológicos (Cabrera-Licona et al. 2020).

7. Tratamiento y profilaxis

Existe un gran número de fármacos para el tratamiento de la giardiasis entre los que podemos encontrar diversas familias como 5-nitrofuranos, 5-nitroimidazoles, 5-nitrotiazoles, aminoglucosidos y bencimidazoles. La familia de los 5-nitroimidazoles (5-NI) es la mas usada para el tratamiento por su alta efectividad y alto costo, esta familia incluye metronidazol tinidazol, secnidazol y el ornidazol, que en sus formas reducidas (grupo nitro) provocan la formación de compuestos inestables y tóxicos, modificación en la estructura helicoidal del DNA del parásito con ruptura de sus hebras y pérdida de sus funciones (Cabrera-Licona et al. 2020; Liu and Weller, 1996; Vivancos et al. 2018).

El metronidazol y el tinidazol son los que han demostrado *in vitro* una mayor actividad. El metronidazol se administra en dosis de 15 a 20 mg/K/día fraccionado en 3 dosis por un periodo de 7 días (Vázquez, 2001). Este fármaco, de manera ocasional, puede provocar cefalea, náuseas, vértigo, diarrea, sabor metálico y hepatotoxicidad.

8. Mecanismos de patogenia y factores de virulencia

Uno de los aspectos de gran relevancia actual en el estudio de la giardiasis es su patogenesis, por lo que definir los mecanismos patogénicos de esta infección se vuelve de gran relevancia. La patogénesis de *G. duodenalis* es un proceso que involucra los productos del parásito (factores de virulencia) y la respuesta inflamatoria del sistema inmune del hospedero que concluyen en lesiones a la mucosa, daño a los enterocitos, pérdida del borde cepillo de las células epiteliales, acortamiento de las microvellosidades y pérdida de la funcionalidad de la barrera epitelial y modificación de la microflora intestinal (Meloni et al. 1995; Scott et al. 2000; Vivancos et al. 2018).

Factores dependientes de *G. duodenalis*: El proceso de patogénesis es multifactorial y comienza con la adhesión del parásito hacia los enterocitos del duodeno. La adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal es a través de un disco ventral especializado, el cual es crucial para iniciar la colonización, así como para mantener la infección (Dunn and Juergens, 2020).

Las α -giardinas, son receptores específicos relacionadas a las anexinas que son altamente expresadas en *Giardia*, las cuales están implicadas en la unión del parásito a la mucosa intestinal, así como en el montaje y desmontaje del citoesqueleto que marca la transición de trofozoítos infecciosos transmisibles a quiste, éstas en conjunto con el disco ventral, establecen interacciones receptor-ligando alterando la topografía del enterocito (Yoshida et al. 2011)

Se han propuesto diferentes mecanismos posibles de adhesión de este parásito: A) Adhesión por factores físicos ocasionada por fuerza de succión por debajo del disco ventral por movimientos propulsivos de los flagelos ventrales; generando presión negativa a su vez ocasionada por fuerza hidrodinámica, B) Procesos mecánicos relacionados con proteínas contráctiles del disco ventral y del fleco ventrolateral, entre las que podemos destacar la miocina, la actina, tropomiocina, giardinas, vinculinas, entre otras; además de moléculas de superficie que permiten la unión el trofozoíto a receptores específicos en las células epiteliales del hospedero, C) Mecanismos enzimáticos donde algunas enzimas atacan a las glicoproteínas de los enterocitos y alteran las microvellosidades, D) Tóxicos, donde se sugiere la presencia de toxinas, que dañan el epitelio intestinal, la literatura reporta una VSP (Proteínas variantes de superficie, por sus siglas en inglés) con un 57% de homología con la sarafotoxina, encontrada en la vívora de cascabel y E) Barreras Mecánicas, lograda por la colonización excesiva de los trofozoitos en el yeyuno y duodeno (Rodas, 2014). Con el propósito de estudiar el fenómeno de adhesión del parásito a células epiteliales se han empleado diversos modelos, los cuales han aportado conocimientos en cuanto a los factores que participan en la adhesión del parásito a la célula hospedera, pero se conoce poco sobre las moléculas que se expresan durante esta interacción y que pueden jugar un papel importante en el establecimiento del parásito.

La patogénesis de la giardiasis se puede describir en mecanismos específicos entre los que se encuentran:

- a) Lesión directa de la mucosa intestinal, ocasionada por los parásitos como la respuesta inmune del hospedero.
 - b) Impedimento de la absorción de grasas y vitaminas liposolubles, por barrera mecánica de parásitos y competencia con el huésped.
 - c) Falta de conjugación de sales biliares por crecimiento de microbiota intestinal excesiva.
 - d) Reducción de enzimas en la mucosa por la diarrea acuosa.
 - e) Producción de enterotoxinas por trofozoítos.
- (Alparo-Herrera, 2005).

Por su parte, la respuesta inmune del hospedero responde con la activación e incremento de los linfocitos T por la presencia de VSPs en el trofozoíto, que se traduce la secreción de citosinas y activación de macrófagos que logran la atrofia de las microvellosidades, la cual representa un factor clave en la producción de las enfermedades diarreicas a través de malabsorción y mala digestión. Estudios previos, en los cuales se han utilizado parásitos de pacientes con sintomatología de giardiasis, han establecido que *Giardia* causa un fenómeno de malabsorción de carbohidratos como glucosa, vitaminas como vitamina B₁₂ y K¹⁴, sodio y agua, así como una reducción o pérdida en la actividad de la disacaridasas como son: lactasa, maltasa, sacarasa, etc. debido a la pérdida de la superficie absorbente del epitelio intestinal (Alparo-Herrera, 2005). Además, debido a este fenómeno de malabsorción, se observa una hipersecreción de cloro y electrolitos que provoca acumulación de fluidos en el lumen de intestino durante la infección crónica. Asimismo, se ha descrito la reducción y distorsión del borde de las microvellosidades, aumento en el índice mitótico de las células de las criptas epiteliales, interferencia en el metabolismo de sales y ácidos biliares (Gomollón, 2010).

Algunas proteasas de tipo cisteína son liberadas por el trofozoíto, la principal función de las cisteín proteasas se encuentra en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento. El transcrito de la cisteín proteasa 2 (CP2) se sobreexpresa en las etapas vegetativa y de enquistamiento de los trofozoítos. La CP2 participa en la degradación de proteínas de la pared quística y se encuentra localizada en vesículas específicas para el enquistamiento; dichas vesículas contienen los materiales precursores necesarios para la formación de la pared del quiste

(Rascón and Mckerrow, 2013). La actividad atribuida a otras proteasas se ha observado en cultivos de *G. duodenalis* e independientemente del análisis del genoma se ha confirmado la presencia de serina, treonina, metalo, aspártico y aminopeptidasas. Sin embargo, sólo dos proteasas han sido caracterizadas parcialmente en *Giardia*; la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) y la proproteína convertasa subtilisina (GSPC), ambas son proteasas de serina que se encuentran implicadas en los procesos de enquistamiento (DPP IV y GSPC) y desenquistamiento (GSPC) (Rascón and Mckerrow, 2013).

Factores dependientes del hospedador: Una de las variables determinantes es el sistema inmune del hospedador como la hipogammaglobulinemia (congénita, común variable, ligada al cromosoma X), o el déficit selectivo de IgA (afecta al 10% de la población). Otros factores son los antígenos de histocompatibilidad (HLA): HLA-A1, A2, B8 y B12. La malnutrición calórico-proteica aumenta la gravedad de la giardiosis por disminución de la producción de enterocitos en los *villus* intestinales y la microbiota del mismo (Soriano-Alcaraz, 2005).

C. Homeostasis del hierro

1. Absorción del hierro

El hierro es un elemento esencial para la vida por su participación en procesos de reducción y oxidación del metabolismo de todos los organismos vivos, puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico), lo que le permite participar en reacciones que controlan el flujo de electrones a través de rutas bioenergéticas, la síntesis de DNA, el aporte de oxígeno a los tejidos, como cofactor de proteínas que participan en el metabolismo del oxígeno y transporte de electrones (Guevara, 2020; Ortiz, 2019; Pérez et al. 2005).

En el ser humano el metabolismo del hierro es de suma importancia, la captación del hierro se lleva a cabo en el duodeno y yeyuno proximal, a través de diversas vías en los enterocitos, la cual puede darse en cualquiera de sus estados de oxidación. En su estado ferroso (hierro inorgánico) la absorción se da a través del Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1), también conocido como DCT1 ("Divalent metal transporter" 1), o Nramp2 ("Natural-resistance-associated macrophage protein" 2). En caso de ser necesario el DcytB (Citocromo B duodenal), situado en la cara apical del enterocito es capaz de reducir el hierro dietario para absorberlo por esta vía, algunas sustancias como la vitamina C y algunos azúcares pueden participar su absorción (Latunde-Dada

et al. 2002; Ortiz, 2019). Mientras que, en su estado férrico, la absorción se realiza a través de una proteína miembro de la familia de las integrinas, β_3 -integrina, la cual transfiere el ión a la proteína chaperona mobilferrina o por el transportador acarreador de hemoproteínas ("Heme Carrier Protein", HCP1), sin embargo, este es muy poco absorbible (Conrad et al. 1993; Sermini et al. 2017).

Una ruta alterna para la absorción del metal es a través del grupo hemo, el cual es liberado de la mioglobina y hemoglobina por la acción de enzimas pancreáticas e introducido a la célula del intestino por una metaloporfina intacta (Ortiz, 2019; Uzel and Conrad, 1998). Una vez en el interior, sin importar la vía de absorción el ión es reducido a su forma ferrosa, por la paraferitina, la cual es un complejo proteico citoplasmático conformado por β_3 -integrina, mobilferrina, flavin monooxigenasa y β_2 -microglobulina y utiliza una cadena de transporte de electrones con energía derivada de NADPH para llevar a cabo la reducción del hierro absorbido (Worthington et al. 2001).

Una vez dentro de la célula, este puede ser almacenado en la ferritina o puede ser liberado por la cara basolateral del enterocito mediante la proteína ferroportina, también llamada como Iregl ("Iron-regulated transporter" 1) o MTP1 ("Metal transporter protein" 1), este paso es mediado por la hormona hepcidina (Sermini et al. 2017).

Si la concentración de hierro en el organismo es elevada, esta hormona se libera en grandes cantidades, secuestrando a la proteína ferroportina y por consecuencia inhibiendo la liberación del hierro por la cara basolateral del enterocito. Esta hormona regula negativamente la absorción del hierro (Garcia-Rosolen et al. 2010).

Una vez liberado el hierro por la cara basolateral del enterocito, es nuevamente oxidado (Fe^{3+}) por la ferroxidasa ceruloplasmina en plasma o por la hepaestina en la membrana basolateral del enterocito. El hierro férrico es capturado por la Tf en la circulación y, por medio de esta proteína, el hierro se transporta por el torrente sanguíneo a las diversas células del organismo, principalmente a los precursores eritroides y a los hepatocitos en los cuales suele ser almacenado en forma de ferritina. Las células internalizan el hierro mediante el receptor para transferrina (RTf), el cual capta el hierro unido a transferrina. El complejo Tf-RTf que se encuentra en la superficie celular es endocitado y posteriormente acidificado en el endosoma. Esta acidificación causa un cambio conformacional en el complejo Tf-RTf permitiendo la liberación del hierro de este, abandonado el endosoma por medio del DMT1. El hierro intracelular suele ser utilizado

rápidamente para la síntesis de proteínas que lo requieran, mientras que el excedente de hierro es secuestrado por la ferritina (Pantopoulos, 2004; Wang and Pantopoulos, 2011).

2. Homeostasis del hierro en la célula

En el organismo, el hierro se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. El compartimiento funcional está conformado por los diversos compuestos celulares que participan o cumplen funciones metabólicas y enzimáticas; mientras que el compartimiento de depósito contiene la reserva corporal del metal (almacenamiento y transporte) (Ortiz, 2019).

El transporte de hierro unido a la Transferrina –Tf- plasmática facilita el intercambio del metal entre ambos compartimientos. El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el sistema monocito-macrófago del bazo, el hígado y la médula ósea (Villegas-Martínez, 2018). En los organismos, el metal debe estar unido a una proteína ya que su presencia aislada produce daños graves en los tejidos. La toxicidad es ocasionada por la habilidad del hierro libre de generar radicales hidroxilos que en ocasiones causan la peroxidación de las membranas lipídicas y otros constituyentes celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Crichton et al. 2002; Ortiz, 2019). Por esta razón, la absorción y concentración de este metal son reguladas cuidadosamente. Cuando existe poco hierro se produce anemia; mientras que, si existe hierro en exceso, causa daño en los órganos por siderosis.

En procariontes, la regulación por hierro se da principalmente por la proteína represora Fur la cual regula los genes que están involucrados en la captación de hierro y la biosíntesis de sideróforos (queladores específicos para Fe^{3+}) en respuesta al nivel de hierro en la célula. La secuencia que reconoce Fur es GATAATGATAATCATTATC conocida como caja Fur (Hantke, 2001).

En eucariotas, el hierro se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. El transporte de hierro unido a la Tf facilita el intercambio de metal entre ambos compartimientos. El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a Ft, por otra parte, Tf se une al rTF y este complejo es endocitado y acidificado por una bomba de protones en el endosoma temprano por lo que se afecta la conformación del complejo Tf/rTf para liberar el hierro (Ortiz, 2019; Sermini et al. 2017; Villegas-Martínez, 2018). Las proteínas que participan en

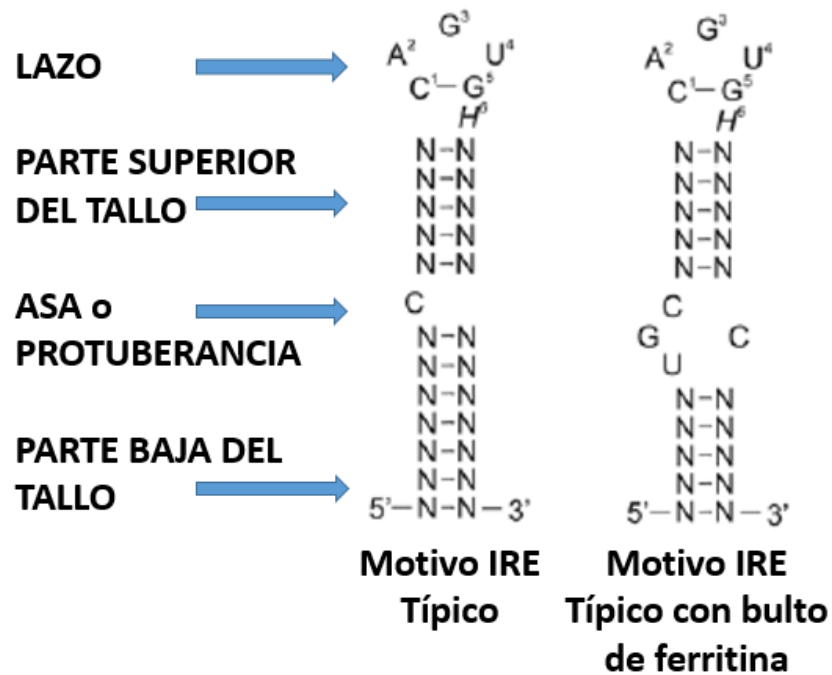
la captura, almacenamiento, utilización y transporte de este metal deben ser reguladas coordinadamente. Las señales y mecanismos regulatorios que orquestan su secreción involucran la modulación de la transcripción, estabilidad del RNAm, traducción y modificaciones postraduccionales (Hentze et al. 2004; Pérez et al. 2005; Sermini et al. 2017).

a) Sistema tipo IRE/IRP

La expresión de las proteínas clave involucradas en el metabolismo del hierro son controlados post-transcripcionalmente por los niveles intracelulares del metal. El mecanismo de regulación es mediado por interacciones específicas entre secuencias IRE localizadas en los respectivos RNAm y proteínas citoplasmáticas denominadas IRP. La regulación post-transcripcional por el sistema IRE/IRP es la más estudiada. En el ser humano las proteínas citoplásmicas reguladoras de hierro, IRP-1 e IRP-2, interactúan con IREs (Pantopoulos, 2004; Wessling-Resnick, 2020).

1) Elementos de respuesta a hierro (IREs)

Los IREs son secuencias de nucleótidos filogenéticamente conservadas, están constituidas por ~30 bases de longitud que forman una estructura secundaria en forma de horquilla (“hairpin” o “stem-loop”) o también conocidas como tallo-burbuja conservadas, que contienen el motivo CAGUNGN y se localizan en las regiones no codificantes o no traducidas (UTR) de los RNAm, situadas en los extremos 5’ o 3’ de los RNAm y, dependiendo de la posición, difiere el efecto que ocasiona su interacción con las IRP (Figura 8) las cuales actúan como sensores del contenido celular de hierro (Joshi et al. 2012; Pantopoulos, 2004; Selezneva et al. 2013; Zhou and Tan, 2017). Las IREs situadas en la región UTR 5’ actúan regulando la unión del mensajero al ribosoma o sea, controlando la iniciación de la traducción y aquellas ubicadas en la región UTR 3’, modulan la estabilidad o degradación del RNAm por acción de endorribonucleasas que codifican proteínas relacionadas a la homeostasis del hierro (Pantopoulos, 2004; Wessling-Resnick, 2020).



H*, puede ser A, C, o U

Fig. 81. Motivos típicos de Elementos de Respuesta al Hierro –IRE, por sus siglas en inglés-. Los IREs son estructuras tallo-burbuja de 28 a 36 nucleótidos que presentan características como un asa o protuberancia y motivo de unión conservados en la burbuja (Modificado de Pantopoulos, 2004; Zhou and Tan, 2017).

2) Proteínas Reguladoras de Hierro (IRPs)

Las proteínas IRPs (Proteínas Reguladoras de Hierro) también denominadas como IFR ó IRE-BP interactúan con los IREs, en mamíferos se han reportado dos proteínas, la IRP1 e IRP2, ambas comparten amplia homología, ya que son 57% idénticas y 79% similares; sin embargo, estas no comparten secuencias similares para la unión con los mRNAs conocidas, pero ambas pueden actuar como potenciadores o inhibidores de la traducción (Basilion et al. 1994; Samaniego et al. 1994; Volz, 2008; Zhou and Tan, 2017).

Proteína Reguladora de Hierro 1 (IRP1)

La proteína IRP1, se localiza en el citosol en condiciones normales, se expresa de manera predominante en hígado, riñón y grasa parda, tiene un peso molecular de 98 kDa, una longitud de 889 aminoácidos (aa) y contiene un grupo 4Fe-4S. La IRP1 es miembro de la familia de las aconitasas, es decir que tiene actividad en ciclo de Krebs y como proteína de unión al RNA convirtiéndola en una proteína bifuncional (Khan et al. 2017; Meyron-Holtz et al. 2004).

La IRP1 exhibe 4 dominios y un "link" de cambio conformacional que cambia la proteína de su conformación aconitasa a IRP o viceversa (Figura 9) (Dupuy et al. 2006; Volz, 2008).

La unión IRP1- RNA ocurre principalmente a través de enlaces hechos al bucle terminal y al tallo que interrumpen en la C a través de sitios separados, aproximadamente dos docenas de enlaces participan en la interacción, proporcionando afinidad y especificidad (Khan et al. 2017). Se han identificado 24 aminoácidos que se unen a los IREs (Butt et al. 1996; Dupuy et al. 2006; Volz, 2008) en el dominio 1 son H126 y R149, dominio 2 L262, R269, N298 y E302, en el dominio 3 S371, K379, T438, N439, N535, R536 y L551 y en el dominio 4 S681, P682, G684, N685, R688, S708, R713, R728, R780, D781 y W782.

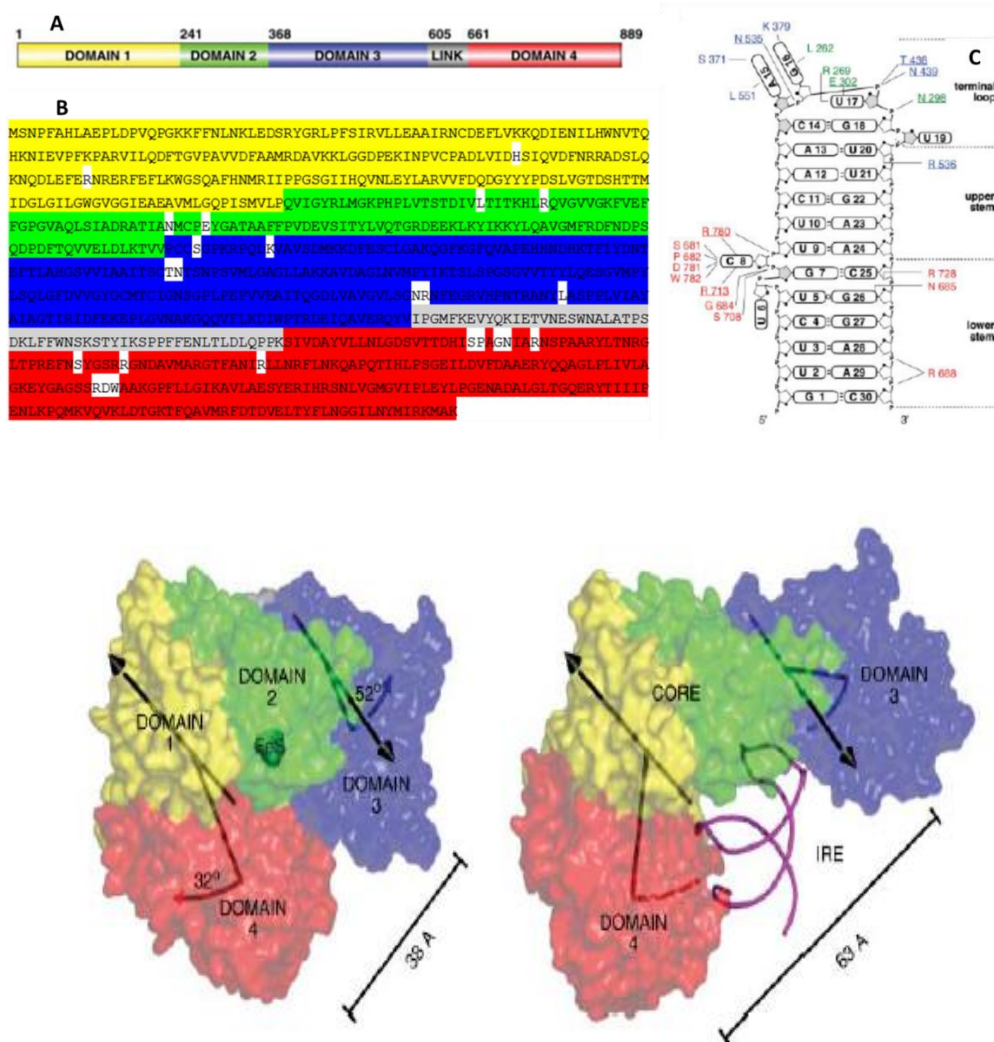


Fig. 9. Estructura lineal de la proteína IRP1 y representación del IRE. A. Representación lineal por dominios de la proteína IRP. B. Secuencia en aminoácidos de la IRP1 y aminoácidos de unión al IRE. Amarillo: Dominio 1 (1 al 240 aa). Verde: Dominio 2 (241-367 aa) Azul: Dominio 3 (367-604 aa). Gris: "Link" (605-660 aa). Rojo: Dominio 4 (661-889 aa). En blanco los aminoácidos que interactúan con el RNA. C. Resumen esquemático de las interacciones RNA-proteína. D. Aconitasa/Proteína Reguladora de Hierro 1 –IRP1-. Diferencias en la posición del dominio entre aconitasa (izquierda) y la IRP: Complejo RNA-Proteína (derecha) (Dupuy et al. 2006; Volz, 2008).

Proteína Reguladora de Hierro 2 (IRP2)

La IRP-2 es 60-70% idéntica a IRP1 pero mantiene diferencias fundamentales como la presencia de una inserción de 73 aa, como la ausencia del cluster Fe-S, de actividad aconitasa y en condiciones donde la concentración de hierro es elevada es degradada vía proteosoma; sin embargo, presenta elevada afinidad a secuencias IRE en condiciones de restricción de hierro (Jiao et al. 2019; Joshi et al. 2012).

La IRP2 está constituida por 4 dominios con un total de 964 aa (Figura 10) y presenta un peso molecular de 106 kDa, estructuralmente, la diferencia más relevante es que dentro del primer dominio presenta una región rica en prolina y cisteína en extremo amino-terminal, en un tramo de 73 aa al que se le han atribuido funciones en la detección del hierro y en la degradación mediada por proteosoma, la cual es regulada por los sitios de oxidación de tres residuos de cisteína (C168, C174 y C178) (Joshi et al. 2012; Samaniego et al. 1994)

Los aminoácidos de unión a los IREs en el RNAm que presenta IRP2 son K611, R616, R774 y R855, además se ha comprobado que la sustitución por residuos de glutamina en una posición no afecta la afinidad sobre los IREs (Butt et al. 1996).

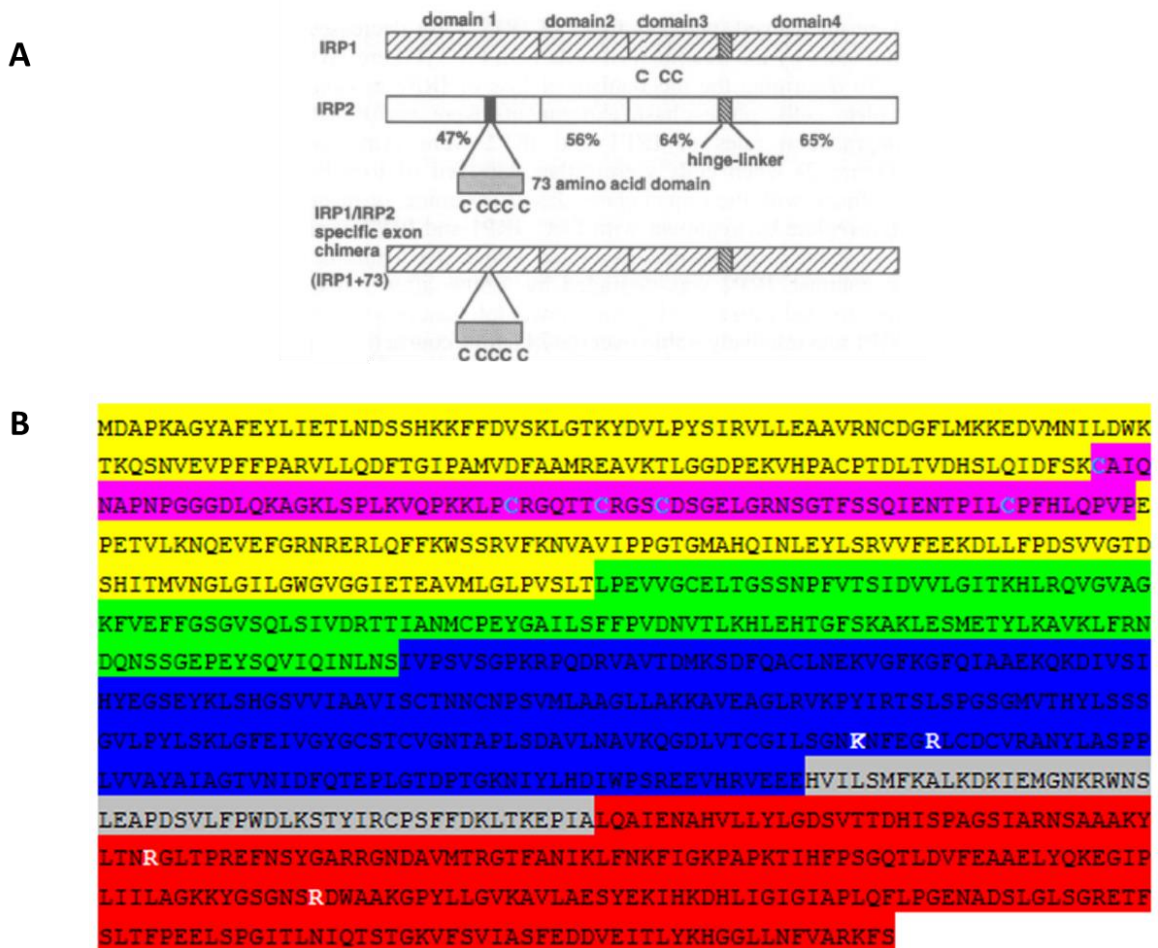


Fig. 10. Proteína Reguladora de Hierro 2 –IRP2-. A. Comparación de las proteínas IRP1 vs IRP2 (Iwai et al. 1995). B. Secuencia de aminoácidos y dominios de la proteína IRP2. Dominio 1: Amarillo. En rosa se encuentra representado el inserto de 73 aminoácidos que sirve como señal para la degradación vía proteosoma. C, cisteínas de oxidación. Dominio 2: Verde. Dominio 3: Azul. K y R, aminoácido de enlace al IRE. “Link”: Gris. Dominio 4: Rojo. R, aminoácidos de enlace al IRE (Butt et al. 1996).

Regulación por el sistema IRE/IRP para ferritina (Ft) y el receptor de transferrina (RTf).

En el sistema IRE/IRP los ejemplos más estudiados son el receptor de transferrina RTf y ferritina FT, los cuales se ejemplifican en la Figura 11.

La secuencia IRE localizada en el extremo 5'-UTR del RNAm de ferritina (cadena liviana y pesada) y de la enzima δ -aminolevulinato sintetasa es reconocida por la proteína IRP y este complejo IRE/IRP inhibe/bloquea su traducción (Muckenthaler et al. 1998; Pérez et al. 2005).

El segundo tipo de regulación ocurre cuando el IRE está localizado en el extremo 3'-UTR del RNAm. El receptor de transferrina, por ejemplo, posee cinco estructuras altamente conservadas de IREs en esta región y sirven para estabilizar el RNAm cuando se une la IRP, es decir la interacción IRE-IRP protege al mensajero de la degradación, permitiendo, de esta manera, su traducción con la consecuente síntesis del receptor (Hentze and Kuhnt, 1996; Pérez et al. 2005).

La mayoría de los IREs son estructuralmente similares. Los IREs canónicos tienen 31 nucleótidos de los cuales seis forman una burbuja con la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3', un tallo de cinco bases apareadas, una pequeña asa o protuberancia asimétrica con una citocina no apareada en la hebra 5' y un tallo adicional de longitud variable (Joshi et al. 2012).

El almacén de hierro intracelular regula la unión de las proteínas IRP-1 e IRP-2 por mecanismos distintos, cuando los niveles de hierro son altos, un grupo 4Fe-4S de la IRP-1 se ensambla y se inhibe la actividad de unión al IRE por lo que se convierte en aconitasa, mientras que IRP2 es degradada vía proteasoma, se ha relacionado a esta degradación la inserción de 73 aminoácidos ricos en prolina y cisteína en el extremo amino-terminal (Guo et al. 1995; Khan et al. 2017).

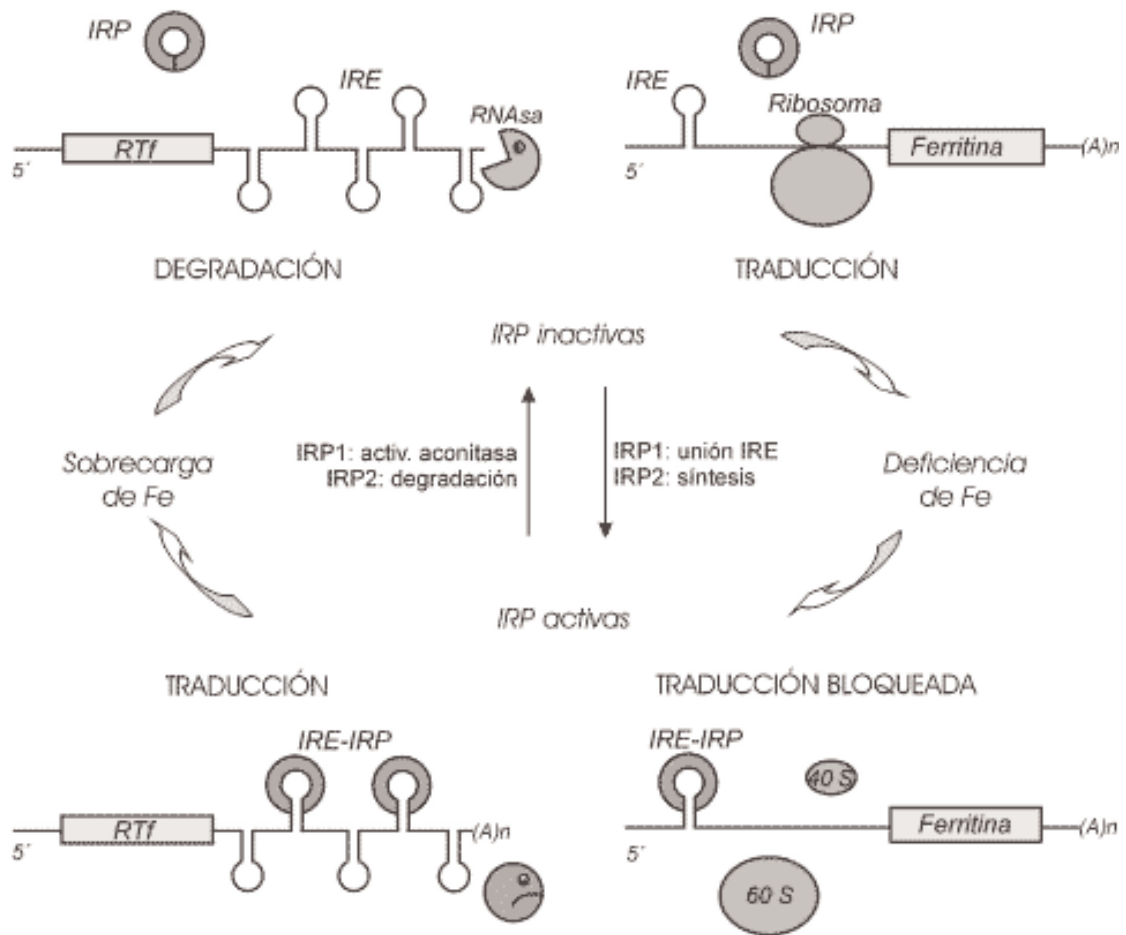


Fig. 11. Regulación del hierro por el mecanismo IRE/IRP. RTf: receptor de transferrina, IRP (“Iron Regulatory Protein”), Proteína regulada por hierro; IRE (“Iron Responsive Element”), Elemento que responde al hierro, Secuencia de RNA que interacciona con las IRPs; RNAsa: nucleasa degradadora de RNA (Pérez et al. 2005).

3. Importancia del hierro para microorganismos patógenos

Cualquier microorganismo invasor que llega a un hospedero necesita adquirir hierro con el fin de adherirse, infectar, crecer, establecerse, colonizar y dañar a la célula o al tejido blanco. Así, si un microorganismo patógeno posee diversos sistemas de adquisición de hierro, tendrá capacidad para multiplicarse dentro de diversos nichos, por lo que estos son cruciales en el establecimiento y progresión de una enfermedad (Vaca-Pacheco et al. 2010).

El papel de hierro es contradictorio por un lado es cofactor en procesos biológicos y por el otro puede ser tóxico y en concentraciones elevadas favorecer las infecciones, por lo que la concentración de hierro en circulación debe ser prácticamente nula, ya que de encontrarse libre puede generar la reacción de Fenton y generar especies reactivas al oxígeno que ocasionen daño. En el cuerpo humano en su mayoría se encuentra unido a proteínas, tales como transferrina (Tf) en suero, hemoglobina (Hb) y ferritina (Ft) dentro de células y Lf en mucosas y fluidos extracelulares, entre otras; siendo la fuente de hierro más abundante dentro de una infección por patógenos la transferrina (del Castillo-Rueda and Khosravi-Shahi, 2010; López-Soto, González-Robles, et al. 2009; Reyes-López et al. 2012; Sheldon et al. 2016).

Sin embargo, obtener hierro del hospedero es complicado, debido a que el hospedero responde durante la infección del microorganismo patógeno con diversas estrategias para disminuir la disponibilidad del catión en el lugar de la infección, entre las que destacan:

- Síntesis de hepcidina regulada positivamente para la reducción de hierro en el suero.
- Aumento de la síntesis de Ft, con el fin de mantener al hierro en el almacenaje celular.
- Disminución de la síntesis de Tf, con el objetivo de disminuir la cantidad de hierro circulante.
- Liberación Apo-Tf (sin hierro) por neutrófilos en el sitio de infección, con el propósito de capturar el hierro disponible en los fluidos extracelulares; además, se ha reportado que esta molécula ha presentado acción microbicida en algunos patógenos.

- Captación del hierro a través de fagocitosis de la holo-Lf por macrófagos, ya que esta molécula es reportada como una de las fuentes principales de donde algunos patógenos obtienen el hierro.

(León-Sicairos et al. 2017; Vaca-Pacheco et al. 2010; Wessling-Resnick, 2020).

Por su parte, el microorganismo también cuenta con sofisticadas técnicas para adquirir el hierro de las fuentes disponibles:

- Producción de sideróforos, los cuales son capaces de obtener el hierro de proteínas como la holo-Tf y la holo-Lf, éstos solo se presentan en bacterias y hongos. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (menos de 1 kDa) que tienen una alta afinidad por hierro y lo captan de holoLf (proteína que contiene hierro).
- Reducción del complejo Fe^{3+} a Fe^{+2} por feroreductasas, las cuales son capaces de liberar el hierro.
- La generación de receptores (proteínas de superficie) específicas para las proteínas que contienen el hierro.
- Secreción de proteasas que separan el hierro de las proteínas de transporte.

Las últimas tres son usadas por bacterias, hongos y algunos protozoarios. Todos los anteriores son considerados mecanismos de virulencia de los patógenos (López-Soto et al. 2009; Vaca-Pacheco et al. 2010).

Los mecanismos de utilización del hierro de la holoLf por bacterias y hongos son bien conocidos, no así los de protozoarios.

Los organismos amitocondriados *Trichomonas vaginalis*, *G. duodenalis* y *E. histolytica*, reciben gran interés debido a su infectividad. Aunque la posición evolutiva exacta de estos protozoarios permanece incierta, existen evidencias que los ubican en una posición muy cercana en la evolución (Vanacova et al. 2003). Por lo anterior, hemos tomado como modelo de estudio del mecanismo de regulación por hierro a *E. histolytica* y *G. duodenallis*.

a). ***Entamoeba histolytica***

1) Importancia del hierro

E. histolytica necesita del metal para efectuar sus procesos metabólicos y sobrevivir dentro del huésped, la literatura señala que requiere grandes cantidades del metal para crecer en forma óptima, *in vitro* requiere ~100 μm lo que sobrepasa los requerimientos de otros patógenos incluidas bacterias, hongos y eucariontes superiores (<6 μm); se reporta que la concentración de hierro en el parásito está vinculada a la virulencia de éste en el huésped (Reyes-López et al. 2012; Sheldon et al. 2016; Soto-Castro et al. 2017).

El parásito obtiene como fuente de hierro a las proteínas presentes en el huésped, como son la lactoferrina ubicada en las mucosas, la hemoglobina presente en los eritrocitos, la transferrina en el suero hemático y la ferritina, proteína abundante en el hígado, bazo y cerebro (León-Sicairos et al. 2005; López-Soto et al. 2009; Reyes-López et al. 2012; Vaca-Pacheco et al. 2010).

E. histolytica puede fagocitar eritrocitos y obtener hierro a través de hemoglobinasas neutras que actúan frente a la hemoglobina (Serrano-Luna et al. 1998); así como la proteína Ehhmbp45 (Cruz-Castañeda and Olivares-Trejo, 2008) y puede utilizar holoTf para crecer, endocitándola por varias vías; sin embargo, la más usual es a través de vesículas que contiene colesterol y una proteína similar caveolina y recubiertas de clatrina. Así mismo, se ha reportado que *E. histolytica* endocita y degrada ferritina y la usa como fuente de hierro para crecer *in vitro* (López-Soto et al. 2009).

2) Metabolismo del hierro

El genoma de *E. histolytica* revela gran homología en rutas metabólicas con otros protozoarios como *G. duodenalis* y *T. vaginalis* (Loftus et al. 2005) y al igual que ellos, *E. histolytica* no posee mitocondria pero en su lugar presenta un organelo llamado mitosoma en el cual se han encontrado genes que codifican para proteínas chaperonas (cpn60) y Nicotinamina Adenina Dinucleótido/ Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato (NAP/NADP) las cuales son idénticas en secuencia a aquéllas presentes en la mitocondria, lo que apoya la teoría de que este microorganismo experimentó el mismo evento endosimbiótico que llevó al establecimiento de una

mitocondria ancestral más que a aquella que propone que es una célula eucariótica premitocondriada (Ankarklev et al. 2010; Muller, 2000).

A la fecha, a pesar de los avances en el conocimiento de la bioquímica del parásito y de la secuenciación completa de su genoma, las funciones biológicas de los mitosomas permanecen en estudio, sin embargo se ha demostrado que las proteínas presentes en el mitosoma están involucradas en la biosíntesis de los clusters Fe-S, los cuales son cofactores esenciales en la catálisis y transporte de electrones (Ankarklev et al. 2010; Pyrih et al. 2016).

3) Efecto del hierro en la virulencia

Se ha reportado que la concentración de hierro en el medio ambiente influye sobre las proteínas y los genes que participan en la virulencia de algunos protozoarios como *T. vaginalis*. El hierro modula negativamente algunas CPs, ya que a concentraciones altas de hierro en el medio de cultivo se reduce la actividad y expresión de superficie de estas CPs (Álvarez-Sánchez et al. 2000; Hernández-Gutiérrez et al. 2003).

En *E. histolytica*, mediante ensayos de “Northern blot” utilizando cDNA de parásitos crecidos en condiciones normales y de restricción hierro, se observó regulación negativa por hierro de seis diferentes CPs (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 y CP6) (Park et al. 2001). Por otra parte, Lee et al. (2008) reportaron que el hierro es un factor importante en la adherencia y citotoxicidad de *E. histolytica* a las monocapas de células CHO (células de ovario de hámster chino) (Lee et al. 2008). Estos estudios mostraron que la ausencia de hierro en el medio afecta el crecimiento de los parásitos, no así con una concentración elevada de este catión. Sin embargo, la capacidad adhesiva y citotóxica de las amibas aumenta en altas concentraciones de hierro (285 μM) (Lee et al. 2008). Por otro lado, Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo identificaron una proteína de 45 kDa, Ehhmbp45, que se une a hemoglobina como fuente de hierro y encontraron que los niveles de RNAm son regulados negativamente por hierro (Cruz-Castañeda and Olivares-Trejo, 2008).

Los mecanismos por los cuales ocurre esta modulación aún están siendo estudiados, nuestro grupo de trabajo ha reportado la presencia de estructuras similares a los IREs de eucariotes en las UTRs de RNAm's de algunos factores de virulencia modulados por hierro como *Actina* y *Ehhmbp26* y éstos IRE-like se unen a proteínas citoplasmáticas tipo IRP (Soto-Castro, et al. 2017) por lo que suponemos que *E. histolytica* modula la expresión de factores de virulencia a través de

un sistema tipo IRE-IRP. Este mecanismo lo pudiera utilizar para regular diferentes genes, por ejemplo, aquéllos que participan en la virulencia del parásito y no solo aquellos que participan en el metabolismo del hierro como se sabe hoy para eucariontes superiores, lo cual representa una especialización en este sistema de regulación de la homeostasis del hierro.

b). *Giardia duodenalis*

1. Importancia del hierro

La literatura reporta que protozoarios amitocodriados como *T. vaginalis* y *E. histolytica* tienen requerimientos superiores a los organismos eucariotes y que pueden sobrevivir a concentraciones superiores de hierro que otros patógenos incluidos bacterias, hongos y eucariontes superiores, las cuales son $<6 \mu\text{M}$ (López-Soto et al. 2009; Torres-Romero and Arroyo 2009). Sin embargo, no existen reportes que nos indiquen los requerimientos específicos de *G. duodenalis*, no obstante, esto hace suponer que los requerimientos por este parásito son igualmente superiores. Por su parte, Plata et al. (2021, en preparación), analizaron el comportamiento del parásito en distintas concentraciones de hierro, y concluyeron que el trofozoíto de *G. duodenalis* es capaz de crecer y sobrevivir en condiciones muy elevadas de hierro (300 y 500 μM) hasta por 96 h, lo que sugiere que estos parásitos presentan alta adaptabilidad al medio en el que se desarrollan, de igual manera sugiere que este parásito cuenta con mecanismos específicos para el metabolismo de este catión. Dichos estudios, demostraron la necesidad del protozoo por el hierro ya que en condiciones restringidas de este, el parásito fue incapaz de sobrevivir, incluso en periodos de 24 h (Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación).

G. duodenalis, como se ha mencionado anteriormente carece de mitocodrias, las cuales son la maquinaria para la fabricación de energía en las células eucarióticas, en su lugar posee hidrogenosomas o mitosomas, y se denominan de acuerdo a la función que realizan, los hidrogenosomas producen hidrógeno, mientras que, los mitosomas contienen las proteínas de sulfuro de hierro (Fe-S), las cuales presentan una función esencial para el crecimiento y sobrevivencia del parásito (Heinz and Lithgow, 2013).

En *Giardia*, se ha reportado que estas proteínas son expresadas durante el enquistamiento del parásito y están relacionadas con el ciclo de piruvatos, así mismo, las moléculas con centro Fe-S tienen funciones esenciales como la transferencia de electrones y la propiedad de catalizar la

oxidación de dinucleótidos de adenina residuos (NADPH y NADH) así como enzimas que dependen del metal como ferredoxina, entre otras (Ankarklev et al. 2010; Pyrih et al. 2016).

Sin embargo, los estudios acerca de la adquisición, metabolismo y relación con la viruleia del parásito son nulos.

c) Presencia de IREs en protozoarios

Se ha reportado la presencia de estructuras IRE (elementos en *trans*) en protozoarios tanto en las regiones UTR-5' o 3' de algunos RNAm así como proteínas tipo IRP (Calla-Choque et al. 2014; Figueroa-Angulo et al. 2012; Plata-Guzmán et al. 2021; en preparación, Soto-Castro et al. 2017).

Uno de los protozoarios más estudiados es *Trichomonas vaginalis* por su relevancia epidemiológica y clínica; es el agente causal de la tricomoniasis, la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo que no es transmitida por virus. Se han identificado y caracterizado dos IRE-like que regulan factores de virulencia del parásito como son las CPs: TvCP4 y TvCP12, ambas muestran los elementos característicos de los IREs de los mamíferos, ambos con estructura tallo-burbuja compuesto de una burbuja, un tallo superior, una protuberancia y un tallo inferior; sin embargo, no son completamente idénticas. Ensayos en extractos citoplasmáticos sugieren que existe un mecanismo de regulación post-transcripcional paralelo para la homeostasis del hierro en el parásito (Figueroa-Angulo et al. 2015). Por su parte, Tvcp4, es una CP de *T. vaginalis* involucrada con la hemólisis. Tvcp4 contiene un IRE-like localizado en la región 5'-UTR del RNAm y es regulada positivamente por hierro (Figura 12b) (Solano-González et al. 2007), su IRE-like muestra las características de la estructura tallo-burbuja y presenta una secuencia de 6 nt en su burbuja GGCACA (Figura 12a) (Figueroa-Angulo et al. 2015). Además de Tvcp4, se ha reportado un segundo IRE-like en *T. vaginalis* localizado en la región 3-UTR en el RNAm del factor de virulencia TvCP12, el cual es regulado negativamente por hierro (Figura 13) (Figueroa-Angulo et al. 2012; León-Sicairos et al. 2005). La funcionalidad de ambos sitios fue probada por Figueroa-Angulo et al. (2015), por REMSA, usando para su interacción proteínas recombinantes de IRP-1 (hIRP-1), proteínas citoplasmáticas de *T. vaginalis* crecidas en diversas condiciones de hierro (Figueroa-Angulo et al. 2015).

Por otra parte, se reportaron IREs en algunos RNAm que codifican para proteínas hipotéticas del parásito protozoario *Plasmodium falciparum*, así como la IRP lo que sugiere la presencia de este mecanismo de regulación por hierro (Loyevsky et al. 2001; Militello et al. 2004), sin embargo, otros aspectos como su regulación o función permanecen sin estudio.

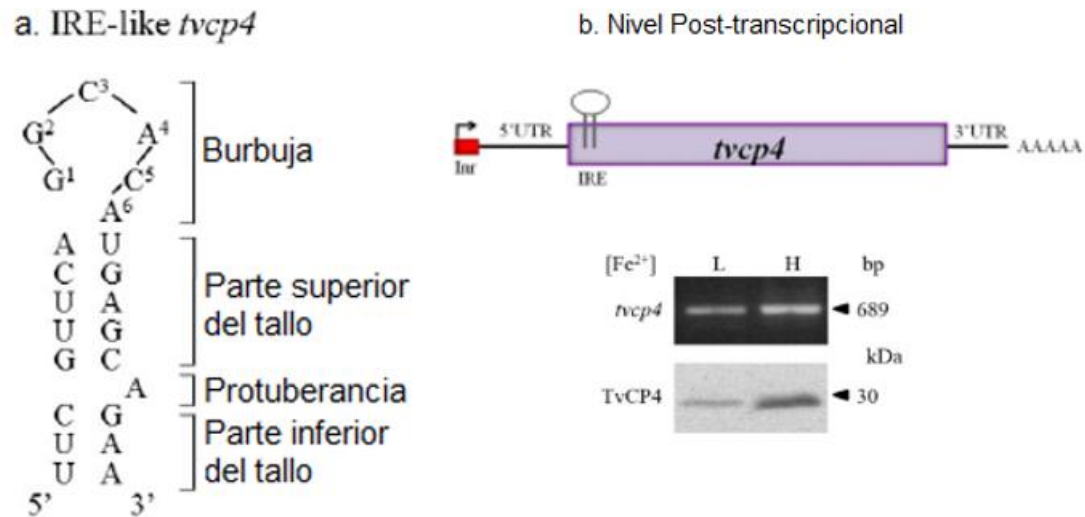


Fig. 12. IRE-like de *Tvcp4* de *T. vaginalis*. a. Estructura tallo–burbuja o IRE-like de *tvcp4*. b. IRE-like de *tvcp4* localizada en la región 5´-UTR del RNAm, en el gen que codifica para TvCP4. El diagrama indica la localización del promotor, IRE-like y región codificante. c. La figura muestra la interacción con IRE-like *tvcp4* y proteínas de unión citoplasmáticas en diferentes condiciones de hierro (Figuroa-Angulo et al. 2015).

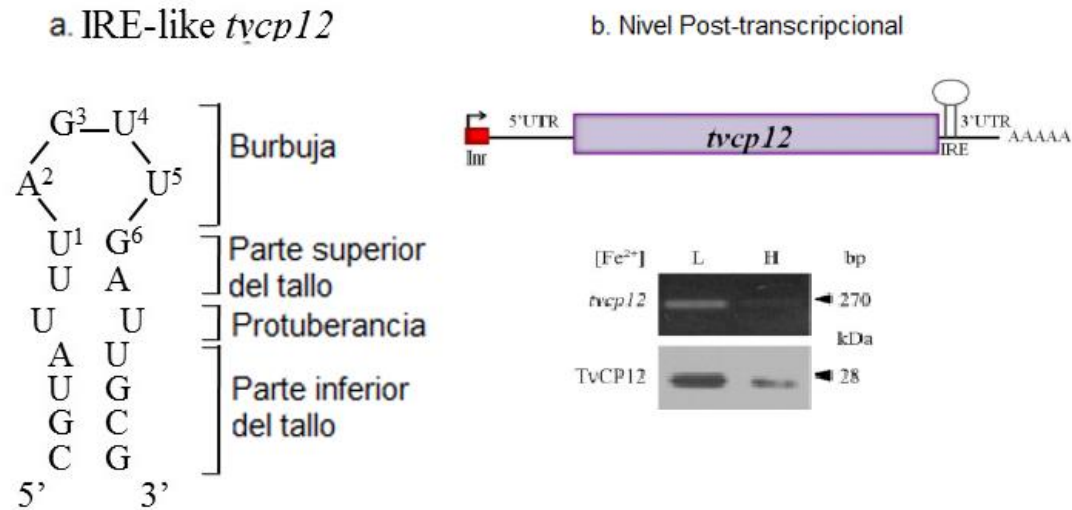


Fig. 13. IRE-like de Tvcp12 de *T. vaginalis*. a. Estructura tallo –burbuja o IRE-like de Tvcp12. b. IRE-like *tvcp12* localizado en la región 3'-UTR del RNAm, en el gen que codifica para TvCP12. El diagrama indica la localización del promotor, IRE-like y región codificante. c. La figura muestra la interacción con IRE-like *tvcp12* y proteínas de unión citoplasmáticas en diferentes condiciones de hierro (Figuroa-Angulo et al. 2015).

d) Presencia de proteínas de unión a RNA en protozoarios (IRPs)

En los últimos años se han reportado estudios del mecanismo de regulación por hierro y aunque es ampliamente estudiado en eucariontes, la investigación en protozoarios es reciente. Las estructuras IRP-like han sido identificadas en parásitos como *Leishmania tarentolae*, *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma*, *Trypanosomas*, *Tritrichomonas* y *Entamoeba* (Figuroa-Angulo et al. 2015). Dentro de estas investigaciones se han descrito que las proteínas IRP son altamente conservadas en esta clase de microorganismos (Volz, 2008); sin embargo, en algunas especies la secuencia de estas proteínas no han sido descritas, a pesar de que muestran regulación post-transcripcional por hierro en alguno de sus genes (Cuadro 1).

Meehan et al. (2000) identificaron la presencia de proteínas en los extractos citoplasmáticos de *Leishmania tarentolae* que interactuaban con el IRE del parásito (IRE de H-ferritina, el IRE nativo, IREs mutantes ΔC [IRE sin nucleótidos C12 y C18] e IRE C+G (IRE con sustitución de C por G en posición 12); sin embargo, la unión no es dependiente de hierro, concluyendo que posiblemente la interacción en *L. tarentolae* pueda no estar relacionada a la homeostasis del hierro, la expresión pudiera ser relevante al crecimiento intracelular del parásito (Meehan and Connell, 2000).

Por su parte, para *Plasmodium falciparum* se identificó en la base de datos GenBank un cDNA similar a la IRP de humano (Muckenthaler et al. 1998). Posteriormente, en el 2001, otro equipo clonó esta secuencia, la expresaron y demostraron la unión de la proteína al IRE consenso de mamíferos en ensayos de movilidad electroforética, a esta proteína la nombraron PfIRPa (Loyevsky et al. 2001). La PfIRPa presenta una similitud del 47 % y del 40% con la IRP1 y IRP2 respectivamente, difiere solamente en 2 aa de los sitios activos en la IRP1, la primera diferencia se encuentra en el aa 88 (fenilalanina), el cual es necesario para el soporte de los enlaces de hidrógeno de los residuos del sitio activo de la aconitasa y es reemplazado por Leucina 101. La segunda discordancia es entre la arginina 699, la cual es sustituida con lisina 711 en PfIRPa. Los aminoácidos que son indispensables para la afinidad del enlace al IRE en la IRP1 Arg536, Arg541 y Arg780 están presentes en las posiciones Arg550, Arg555 y Arg792 en la PfIRPa (Loyevsky et al. 2001).

En *Trichomonas vaginalis*, en 2007 se reportó una proteína de unión al IRE de ferritina de ~98 kDa, la cual fue encontrada en los extractos citoplasmáticos del parásito crecidos en condiciones de hierro restringido, lo que sugiere la presencia del mecanismo de regulación del hierro IRE/IRP en el protozoario (Solano-Gonzalez et al. 2007).

Interesantemente, los análisis *in silico* del genoma de trichomonas coincidían en la ausencia de genes que codifican para IRP, IRP-like o aconitasas; sin embargo, los experimentos (Entrecruzamiento con UV, “Northwestern blot”, REMSA, entre otros) expusieron en sus resultados que la proteína α -Actinin denominada como TvACTN3 es una proteína con capacidad de unirse al IREfer y al IRE atípico de *tvcp4*, y se proponía que ésta podría participar en la regulación post-transcripcional por hierro en un mecanismo paralelo al sistema IRE-IRP. La TVACTN3 tiene un peso molecular de 135 kDa y está conformada por 3 dominios, siendo el dominio II el responsable de la unión al RNA, donde mediante análisis *in silico* se detectaron diversos motivos de unión a RNA en la región 230-662, sin embargo los aminoácidos de unión no se han identificado (Calla-Choque et al. 2014).

Además, se reportó que ambos IRE-like (TvCP4 y TvcP12) de *T. vaginalis*, interactúan con las mismas proteínas citoplasmáticas del parásito que interactúan con el IRE-fer de humano, pero con diferente intensidad, una de las proteínas identificadas con la capacidad de formar complejos proteína-RNA en *T. vaginalis* fue HSP70, la cual tiene un peso de 70 kDa, y tiene funciones asociadas con la síntesis y maduración de proteínas, traslocación transmembranal en organelos, entre otras (Figuroa-Angulo et al. 2015).

La TvHSP70 tiene la capacidad de formar complejos con TvCP4 y TvCP12, y regular su expresión diferencial. En el genoma de *T. vaginalis* se encontraron 11 secuencias que codifican TvHsp70, las cuales mediante análisis de proteómica se sugiere que se expresan de acuerdo con las condiciones en las que el parásito se cultiva, en los parásitos crecidos en condiciones de hierro alto se observó que estas se degradan por actividad proteolítica desconocida, se sospecha que esta pueda ser por una ruta de ubiquinización parecida a la de la IRP2 humana, a través de ensayos de inmunolocalización se logró determinar su presencia de forma más fuerte en parásitos crecidos en condiciones de hierro restringido (Figuroa-Angulo et al. 2015).

Otra proteína con capacidad de unirse al RNA en el parásito es la α -Actinina, la cual pertenece al subgrupo de las espectrinas (ya que presentan repeticiones de espectrina) y su función está asociada a la regulación de la actividad de varios receptores, su unión al citoesqueleto, por lo que se le confieren funciones trans-membranales y a su vez sirven como andamio para conectar vías de señalización, ésta tiene una masa molecular que varía de 94-103 KDa (Figueroa-Angulo et al. 2015). Se han encontrado 5 secuencias en el genoma de *T. vaginalis* que codifican para esta proteína (Carlton et al. 2007). Las α -Actinina expresadas en el parásito presentan diversos pesos moleculares, esto porque varía el número de espectrinas presentes en cada una, de estas cinco, las proteínas TvACTN1, 2 y 3 se sobreexpresaron en condiciones de restricción de hierro; mientras que TvACTN4 y 5 no se expresaron, cuando la condición de hierro fue manipulada (Calla-Choque et al. 2014).

Interesantemente, ensayos de entrecruzamiento con luz U.V. revelaron que TvACTN2 y TvACTN3 forman complejos de RNA-proteína con los IRE-like de TvCP4 y TvCP12 (Figueroa-Angulo et al. 2015).

TvACTN3 es una proteína con peso molecular de 135 KDa, que contiene tres dominios funcionales e interactúa específicamente con el IRE de TvCP4, a través de su tercer dominio, dentro del cual presenta varios sitios de unión al RNA putativo. TvACTN3 se localiza en el citoplasma tanto en condiciones de hierro restringido como alto; sin embargo, presenta un cambio en su distribución de acuerdo a la condición de hierro, cuando las condiciones de hierro se encuentran restringidas estas se dispersan en el citoplasma; mientras que, en condiciones de alto hierro se observan racimos de TvACTN, lo que sugiere que en condiciones de alto hierro esta desempeña funciones en el citoesqueleto, por el contrario, cuando el hierro es restringido adquiere funciones de unión al mRNA (Figueroa-Angulo et al. 2015).

Por su parte, TvACTN2 tiene un peso molecular de 110 kDa, y es capaz de formar complejos RNA-proteína con TvCP4 y 12 en condiciones de hierro restringido, TvACTN2 se sobreexpresa en esta condición de hierro. En el caso de la actina o TvACT, que constituye el 10% de las proteínas totales del parásito, se demostró capacidad de interacción con los IREs de TvCP4 y TvCP12 en condiciones de restricción de hierro (Figueroa-Angulo et al. 2015), sin embargo, faltan estudios para confirmar su funcionalidad en el sistema paralelo al IRE/RP.

Por la cercanía evolutiva de *E. histolytica* y *G. duodenalis* se sospecha de la presencia de un sistema paralelo al sistema de *T. vaginalis*. En nuestro equipo de trabajo han logrado identificar IREs putativos de *E. histolytica* que son capaces de interactuar con proteínas de extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* y *E. histolytica*, formando complejos IRE/IRPlike sin embargo, hacen falta mas estudios para la identificación y caracterización de estas proteínas (Soto-Castro, et al. 2017).

Por su parte para *G. duodenalis* nuestro grupo de trabajo ha logrado identificar estructuras IREs putativas del parásito (Plata-Guzmán, et al.2021, en preparación) así como la presencia de proteínas capaces de reconocer a las proteínas IRP humanas en los extractos citoplasmáticos de *G. duodenalis* (Reyes-Sánchez, 2016). Pese a esto no se han identificado, ni caracterizado proteínas tipo IRPs en el parásito.

Cuadro 1. Características de Proteínas Reguladoras de Hierro IRP de humano y de proteínas tipo IRP en parásitos protozoarios.

ORGANISMO	LONGITUD	KDa	NÚMERO DE ACCESO	BASE DE DATOS
Humano	IRP1	98	NP_001265281.1	GenBank
Humano	IRP2	104	NP_004127.1	GenBank
<i>Leishmania</i> ssp			No identificada	
<i>P. falciparum</i>	PfIRP	104.8	AJ012289	GenBank
<i>T. vaginalis</i>	TvACTN3	135	TVAG_239310	TrichoDB

IV. JUSTIFICACIÓN

E. histolytica y *G. duodenalis* son agentes causales de enfermedades intestinales de alta relevancia epidemiológica, por su elevada prevalencia, patogenicidad y morbilidad a nivel mundial. Estos protozoarios requieren del hierro para su crecimiento, metabolismo, supervivencia y virulencia; sin embargo, el papel del catión es pobremente entendido. El estudio de los factores de virulencia regulados por hierro, así como esclarecer el mecanismo de regulación por dicho catión puede ayudarnos a comprender la biología de estos parásitos, su evolución y sus mecanismos de patogenicidad; además de anticipar el bloqueo de las moléculas que participen en la virulencia, desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico o blancos farmacológicos en un futuro.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar *in silico* factores de virulencia modulados por hierro, así como las proteínas reguladoras de hierro (IRP-like), que sugieran la presencia de mecanismos de regulación post-transcripcional por hierro del tipo IRE/IRP en *E. histolytica* y *G. duodenalis*

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar factores de virulencia que regulen su expresión dependiendo de la concentración de hierro en *E. histolytica*.
2. Identificar factores de virulencia que regulen su expresión dependiendo de la concentración de hierro en *G. duodenalis*.
3. Identificar y caracterizar *in silico* la presencia de proteínas tipo IRP (unión a RNA) en el proteoma de *E. histolytica*.
4. Identificar y caracterizar *in silico* la presencia de proteínas tipo IRP (unión a RNA) en el proteoma de *G. duodenalis*.
5. Estandarizar metodologías de interacción RNA-proteínas sin marcaje radioactivo (REMSA, Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética con RNA) en *G. duodenalis*.
6. Determinar la presencia de un sistema heterólogo tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*.
7. Determinar la presencia de un sistema homólogo tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

a. Cultivo de parásitos

G. duodenalis

Se empleó un cultivo del aislado WB de *G. duodenalis*, el cual fue donado gentilmente por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV- Instituto Politécnico Nacional (IPN) y Dr. Héctor Samuel López Moreno de nuestra Facultad.

b. Reactivos

Los reactivos requeridos para el proyecto se adquirieron principalmente de casas comerciales como Promega, Invitrogen, Bio-Rad y SIGMA.

B. MÉTODOS

1. Búsqueda de FV modulados por hierro en *E. histolytica* y *G. duodenalis*

Se realizó una búsqueda en la literatura sobre genes de FV, es decir, involucrados en los mecanismos de patogenicidad de ambos parásitos que modularan su expresión dependiente de la concentración de hierro en *E. histolytica* y *G. duodenalis*. Además, se consultaron las bases de datos de los genomas de ambos parásitos y se realizaron análisis *in silico* que complementara la información bibliográfica.

2. Identificación de proteínas tipo IRPs

a. Análisis bioinformático del proteoma de los parásitos *E. histolytica* y *G. duodenalis*

Sondeo de proteínas tipo IRP en los proteomas de *E. histolytica* y *G. duodenalis*

Mediante análisis *in silico* se buscaron secuencias aminoacídicas de las proteínas IRP1 e IRP2 de *Homo sapiens* en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), estas secuencias fueron utilizadas como sondas en los programas AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) y GiardiaDB (<http://giardiadb.org/giardiadb/>). Otras secuencias sondas que fueron utilizadas en el análisis *in silico* son las proteínas tipo IRP reportadas en la literatura para los protozoarios *T. vaginalis* y *P. falciparum* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de proteínas IRP o tipo IRP utilizadas para buscar al ortólogo de IRP en el proteoma de *E. histolytica*.

ORGANISMO	NOMBRE	PESO MOLECULAR (KDa)	NÚMERO DE ACCESO	BASE DE DATOS	REFERENCIAS
<i>H. sapiens</i>	IRP-BP1	98	P21399.3	GenBank	(Hentze and Kuhnt, 1996)
	IRP2	106	P48200.3	GenBank	(Hentze and Kuhnt, 1996)
<i>P. falciparum</i>	PfIRP	104.8	AJ012289	GenBank	(Loyevsky et al. 2003)
	TvACTN3	135	TVAG_239310	TrichoDB	(Calla-Choque et al. 2014)
<i>T. vaginalis</i>	TvACT2	931	TVAG_190450	TrichoDB	(Figuroa-Angulo et al. 2015)
	TvHSP70-4	659	TVAG_044510	TrichoDB	(Arroyo et al. 2015)
	TvACT	376	TVAG_054030	TrichoDB	(Figuroa-Angulo et al. 2015)
		376	TVAG_200190	TrichoDB	(Figuroa-Angulo et al. 2015)

Búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos en posibles ortólogos

Una vez sondeadas las secuencias aminoacídicas en el proteoma, se obtuvieron los posibles ortólogos, los cuales se analizaron en el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) ambas bases de datos de dominios, familias y sitios funcionales de proteínas, en los cuales se buscó la presencia de sitios de unión a ácidos nucleicos y RNA.

Modelado en 3D de las secuencias aminoacídicas

Para realizar el modelaje de los posibles ortólogos de RBP's se tomaron en cuenta los siguientes factores de inclusión, que el posible ortólogo presentara sitios de unión y/o presentara un tamaño molecular aproximado a lo obtenido experimentalmente por el grupo de trabajo (Soto-Castro et al. 2017).

El modelaje se realizó en 3D para su representación espacial, en el programa ExPASy: Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) el cual ofrece un resumen de todos los modelos incorporados en el proyecto (secuencia del posible ortólogo introducida), este programa realiza el modelado a través de homologías con proteínas obtenidas experimentalmente, así mismo para aceptar como fiable un modelo utiliza dos estimadores:

1. GMQE el cual realiza una estimación global de la calidad del modelo, que combina propiedades de la alineación objetivo-plantilla y el método de búsqueda de la plantilla.

La puntuación GMQE resultante se expresa como un número entre 0 y 1, lo que refleja la precisión esperada de un modelo creado con esa alineación y plantilla y la cobertura del objetivo. Los números más altos indican una mayor fiabilidad.

2. QMEAN es un estimador compuesto basado en diferentes propiedades geométricas y proporciona estimaciones de calidad absolutas tanto globales (es decir para toda la estructura) como locales (por residuo) sobre la base de un solo modelo. Las puntuaciones de -4.0 o menos son una indicación de modelos con baja calidad. Esto también se destaca por un cambio del símbolo de "aprobación" a un símbolo de "aprobación" al lado del puntaje.

Para la selección del modelo primero obtuvimos todos los posibles modelos tridimensionales de las secuencias candidatas, y de acuerdo con los estimadores del programa se seleccionó el mejor modelo en caso de formarse.

3. Presencia del mecanismo de regulación por hierro a nivel post-transcripcional por interacciones RNA-proteínas en sistema homólogo y heterólogo en *G. duodenalis*

- a. Cultivo de *Giardia duodenalis*.

El cultivo se realizó en medio TYI-S-33 enriquecido con suero fetal bovino al 10%, bilis 1 g/L, pH de 7.0, 50 µg/ml de gentamicina y se pre-filtró con membranas de 0.45µm.

Al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico (sigma) a una concentración de 110 µm para obtener las condiciones de alto hierro, y resina quelex para la condición de hierro restringido (7.7 µM).

Las giardias fueron incubadas a una temperatura constante de 37°C y fueron observadas en microscopio invertido (leica) cada 24 h, para su vigilar su correcto crecimiento. Los parásitos se cosecharon en tubos falcom de 15 ml por enfriamiento a 4°C, se centrifugaron a 1500 rpm durante 8 min (Bagchi et al. 2012), posteriormente se decantó el sobrenadante, luego la pastilla se resuspendió en 1.5 ml de suero fetal bovino; se homogenizó y se resuspendió en 13.5 ml de medio nuevo, finalmente se incubó a 37°C por 24 h (Tasca et al. 2005). El cultivo se observó periódicamente en un microscopio invertido (Leica) para verificar su crecimiento y descartar contaminación, hasta que alcanzaron la fase logarítmica. En el momento que alcanzaron la fase logarítmica, los trofozoítos fueron decantados en tubos falcom de 15 ml, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C posteriormente se decantó el sobrenadante, luego la pastilla se procesó de acuerdo con los ensayos necesarios.

- b. Extractos citoplásmicos de *Giardia duodenalis*

Se utilizaron trofozoítos cultivados en tubos de vidrio con tapón de rosca (3 tubos, por condición de hierro), éstos se encontraban en fase logarítmica con una concentración de $\sim 1 \times 10^6$ a 5×10^6 cel/ml. El cultivo se realizó en las condiciones antes mencionadas, pero se añadió 1x de

antibiótico y antimicótico (150 μ l/15ml) (INVITROGEN). Los parásitos fueron centrifugados a 1500 rpm, durante 8 min a 4°C, se obtuvo una pastilla, se desechó el sobrenadante y se añadieron 15 ml de PBS 1X frío, se homogenizó la muestra y se realizó un lavado, se homogenizó y se colocaron 10 μ L en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de trofozoitos, hasta obtener una concentración ~ 60 a 90 millones de células por ml. Posteriormente, se centrifugaron a 2280 rpm (1000 xg) por 10 min a 4°C, de la cual se obtuvo una pastilla la cual se lavó con PBS 1X frío, ésta se resuspendió y se colocó en un tubo estéril de 50 ml con tapa de rosca. La pastilla se obtuvo por centrifugación (se removió el sobrenadante) y se estimó el volumen de células empaquetadas (PCV, “packed cell volumen”, por sus siglas en inglés). El cálculo de PCV se realizó por observación de volumen en una micropipeta. La pastilla obtenida se resuspendió en 250 μ l de buffer de lisis A (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl) por 100 μ l de PCV. Las células resuspendidas se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, la pastilla se pre-refrigeró y se sometió a congelación a -80°C durante 24h y se procedió a su descongelación, esto con el propósito de ayudar en la lisis de las células. Los trofozoítos se almacenaron a -80°C en buffer de lisis A por periodos menores a una semana. Después, la muestra se removió de los congeladores (-80°C) e inmediatamente se le añadió la mezcla de inhibidores de proteasas 100x (BIOSHOP) a 1X y DTT a una concentración final de 1mM. El descongelamiento de la muestra se realizó a temperatura ambiente e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente, se añadió Nonidet P-40 (NP-40) para obtener una concentración final de 0.2%. Se procedió a romper los cúmulos de células en el lisado con una puntilla estéril, que pudiera insertarse en el tubo de microcentrífuga. Una vez que se lograron deshacer los cúmulos se centrifugó a 3300 xg por 1 min a 4°C. El sobrenadante que contiene las proteínas citoplasmáticas fue removido y se almacenó a -80°C. La integridad de EC se corroboró, por lo que una muestra del lote (una de cada condición) era descongelada, se añadía buffer de corrida 2X, se hervían de 3 a 5 min y se centrifugaban a 10 000 rpm a 4°C durante 1 m, para correr una electroforesis SDS-PAGE a 120V por 90 m. Para teñir los EC se utilizó como colorante a Azul de Coomassie por 40 min, posteriormente se colocaron 20 min en solución decolorante para su observación en luz visible y registro.

c. Obtención de amplicones por PCR

Los amplicones se generaron por PCR, los oligonucleótidos contenían la secuencia de unión de la T7 RNA polimerasa para los ensayos de transcripción *in vitro*. El DNA utilizado para la transcripción *in vitro* fue el de los amplicones Ferritina de humano y Actina de *G. duodenalis*, correspondientes a las estructuras tallo-burbuja encontradas en las 5' ó 3'-UTR en los RNAm analizados de *G. duodenalis* (Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó como indica la casa comercial (INVITROGEN), se añadieron 12 µl de Buffer 10X, 2.4 µl de dNTP's, 3.6 µl de MgCl₂, 2µl de los oligonucleótidos (1 µg/ µl), 0.5 µl de la enzima Taq polimerasa y 97.5 µl de H₂O inyectable; para un volumen final de reacción de 120 µl. La temperatura de alineamiento para Ferritina es 67.7°C y de 82.1°C para Actina. Las condiciones para la PCR fueron: temperatura inicial 95°C por 5 min, desnaturalización 95° por 1 min, se utilizó un gradiente de 67-84°C como temperatura de alineamiento, para la extensión 72°C por 2 min y para la extensión final 72°C por 5 min, durante 30 ciclos. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 3%, en amortiguador de corrida TAE 1X a 80 V por 50 min, teñido con 0.5 µl de Gel Red (BIOTIUM).

d. Transcripción *in vitro* de IREs

Los transcritos se generaron con el kit AMBION® siguiendo la metodología previamente estandarizada en el laboratorio (Plata-Guzmán et al, 2021, en preparación) y el DNA molde que se obtuvo de los productos de PCR de cada amplicón. La reacción de transcripción se llevó a cabo de la siguiente forma; 2 µl buffer (10X), 2 µl ATP (75 mM), 2 µl CTP (75 mM), 2 µl GTP (75 mM), 2 µl UTP (75 mM), 8 µl de DNA templado, 2 µl de la enzima T7, en un volumen final de 20 µl. La reacción se mezcló gentilmente y se incubó 37°C por 3 h. Posterior a la incubación, se le agregó 1 µl de DNAsa Turbo y de nuevo se incubó a 37°C por 20-25 min para degradar el DNA molde. Para precipitar los transcritos se adicionaron 115 µl de H₂O grado inyectable, 15 µl de acetato de sodio 3M y 300 µl de etanol absoluto, se mezcló y se colocaron a -70°C por 24 h. Para empastillar el RNA, los transcritos se centrifugaron a 13,000 rpm por 20 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó a temperatura ambiente en campana sin flujo de aire para evitar la contaminación por RNAsas. La pastilla se resuspendió en 20 µl de H₂O libre de nucleasas

(AMBION), y, para la formación de las horquillas, se calentaron a 65°C durante 15m, para su posterior enfriamiento a temperatura ambiente.

La integridad de los transcritos se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 3%, en amortiguador de corrida TBE 1X a 80 V, 50 min. El almacenaje de los transcritos se realizó a -20°C, solo se congelaban una vez para evitar la degradación del RNA.

- e. Ensayos de cambio de movilidad electroforética de RNA (REMSA, por sus siglas en inglés).

Los REMSA se realizaron sin luz para evitar la posible degradación de RNA por fotosensibilidad. En tubos eppendorf se realizaron las siguientes mezclas e incubaciones: se agregaron 10µl de Binding Buffer 5X, 1 µl de β-mercaptoetanol y 16 µl de los EC (obtenidos de cultivos de parásitos crecidos en condiciones de restricción, normal y alto hierro), esta mezcla se dejó incubar durante 20 min a 4°C en hielo, posteriormente se agregaron 5 µl del RNA (IRE del parásito), esta interacción se llevó a cabo durante 20 min a 4°C en hielo, posteriormente se añadió 3 µl de RNAsa A, una vez añadida se incubó por 60 min a temperatura ambiente, se agregaron 2 µl de buffer 6X EMSA por cada 10 µl de muestra a cada interacción. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% a 80V por 50m.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Identificación de factores de virulencia que modulan su expresión en base a la concentración de hierro en *E. histolytica*

Se realizó una búsqueda bibliográfica de factores de virulencia que se han sido reportados en la literatura dependientes de la concentración de hierro en el parásito, estos estudios han demostrado que *E. histolytica* posee un sistema de respuesta al estrés por hierro (Lee et al. 2008; Park et al. 2001; Soto-Castro et al. 2017).

Diversos investigadores identificaron varios genes implicados en la traducción de factores de virulencia en deficiencia de hierro, incluidos los que codifican el factor de elongación EF-1 α y cinco proteínas ribosómicas, estos datos sugieren que los niveles de restricción de hierro aumentan la necesidad de la maquinaria de traducción. Además, se identificaron diversas proteínas que se modulan positiva o negativamente de acuerdo a la presencia de hierro entre las que podemos encontrar las Cistein Proteinasa (CPs), proteínas de unión a la hemoglobina, proteínas implicadas en las reacciones de óxido-reducción, del citoesqueleto y del metabolismo (Park et al. 2001; Cruz-Castañeda and Olivares-Trejo 2008, Lee et al. 2008; Cruz-Castañeda et al. 2009, López-Soto et al. 2009, Serrano-Luna et al. 2013, Hernández-Cuevas et al. 2014; Soto-Castro et al. 2017) (Figura 14).

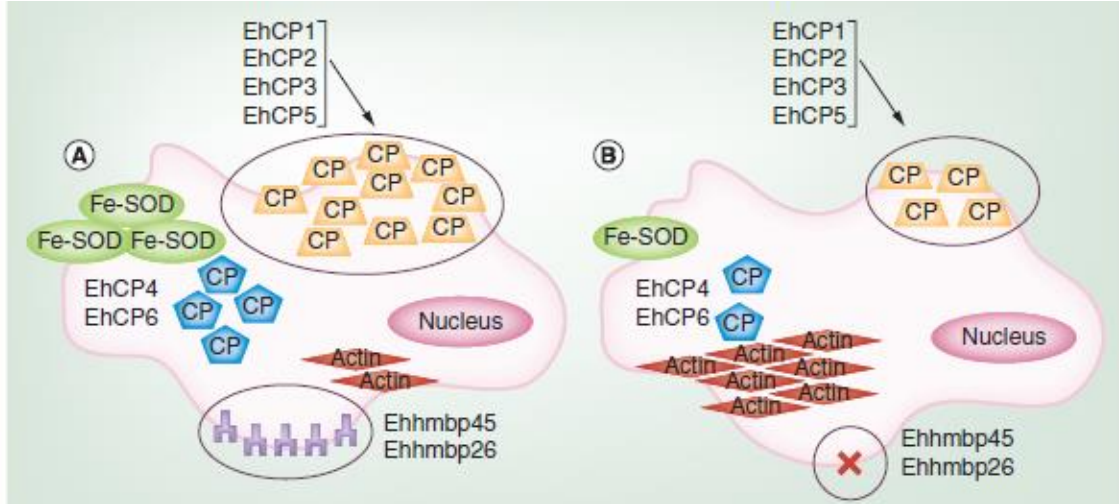


Fig. 14. Regulación de FV dependientes de hierro en *E. histolytica*. A. Medio en restricción de hierro; B: Medio enriquecido con hierro. Cistein Proteinasa: CPs, Proteínas de unión a la hemoglobina: Ehhmbp, proteínas implicadas en las reacciones de óxido-reducción; Fe-SOD, y citoesqueleto: Actinas.

a. Cisteín Proteinasas

Estas proteínas son enzimas involucradas en la adhesión, en la degradación de tejidos y en la defensa contra el hospedero (Levicán et al. 2007; Ning et al. 2012). Las CPs con mayor expresión son *EhCP1*, *EhCP2* y *EhCP5*, que son responsables de aproximadamente el 90% de la actividad enzimática (Serrano-Luna et al. 2013).

EhCP1 puede digerir colágeno y se encuentra en la superficie de la célula y en las vacuolas internas. Lee et al. (2014) demostraron que su inhibición reducía la capacidad del parásito de adherirse al colágeno y laminina de los enterocitos; por lo tanto, se ha demostrado su importancia en la patogenia (Lee et al. 2014).

EhCP2 se encuentra dentro de la membrana interna y en la superficie de la ameba. *EhCP2* puede digerir proteoglicanos, cartílago y colágeno de la membrana renal, funciona como una caspasa-1 contra la pro-IL-1 β y se asocia con membranas (He et al. 2010; Serrano-Luna et al. 2013; Zhang et al. 2000). Recientemente, se demostró que *EhCP2* se sobreexpresa en hámsteres infectados con amebas, lo que indica que *EhCP2* juega un papel importante en la virulencia (Sánchez et al. 2016).

EhCP5 es responsable de degradar la capa de mucina, favoreciendo la invasión del parásito y se sobreexpresa en el proceso de absceso hepático amebiano (ALA, por sus siglas en inglés), el cual es causado por *E. histolytica* cuando esta se transporta por torrente sanguíneo desde los intestinos al hígado, ALA es el resultado de la acumulación de pus en respuesta a la invasión del parásito al hígado. La variabilidad en el gen puede hacer que la cepa sea más virulenta y agresiva (Ackers and Mirelman, 2006; Rostami et al. 2017; Serrano-Luna et al. 2013; Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009). Además, *EhCP5* es altamente expresada en la cepa HM1: IMSS *in vitro* y juega un papel fundamental *in vivo*. *EhCP5* es capaz de adherirse a las células $\alpha\beta3$ que desencadenan la producción de mucina por las células calciformes y tiene un papel clave en la patogenia de amebiasis (Cornick et al. 2016; Marie and Petri, 2014; Sánchez et al. 2016).

Otras proteasas reguladas por el hierro incluyen *EhCP4* y *EhCP6*. *EhCP4* participa en la resistencia al sistema inmune, funciona como una citocina de proIL-18, IgA, IgG y C3 del complemento, mientras que *EhCP6* responde al estrés y se describe como catepsina-L-like (Gosh and Rahab, 2015; Serrano-Luna et al. 2013). La regulación de la CPs por el hierro fue demostrada por Park et

a). quienes compararon patrones de expresión génica en medios bajo concentraciones de hierro normales y restringidas utilizando ensayos de “Northern blot”.

Los genes *EhCP1-6* se sobreexpresan en condiciones limitadas de hierro (Park et al. 2001). En el Cuadro 3, se resumen las EhCP que son reguladas por hierro y se proporciona una descripción de su función durante la patogenia.

b. *Proteínas de unión a Hb*

Entamoeba histolytica utiliza Hb para adquirir hierro del huésped (López-Soto et al. 2009). Cruz-Castañeda et al. (2008,2009) demostraron que la expresión de *Ehhmbp45* y *Ehhmbp26* está modulada por hierro. Estas proteínas se expresan en trofozoítos cultivados en medios privados de hierro pero suplementados con Hb; por lo tanto, es probable que estén regulados negativamente por el hierro (Cruz-Castañeda and Olivares-Trejo, 2008; Cruz-Castañeda et al. 2009) (Cuadro 4).

Cuadro 3. Cistein proteinasas como factores de virulencia modulados por hierro en *E. histolytica*.

FACTOR DE VIRULENCIA	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONCENTRACIÓN DE HIERRO	REFERENCIAS
<i>EhCP1</i>	Involucrada en el mecanismo de adhesión durante el proceso infeccioso de la amebiasis. Es capaz de digerir al colágeno nativo tipo 1, y participar en la degradación de la IgA y villina.	Positiva	360 µg/dl	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Luaces and Barrett, 1988; Park et al. 2001; Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009; Zhang et al. 2000)
<i>EhCP2</i>	Involucrada en el mecanismo de adhesión, el efecto citolítico y de fagocitosis durante el proceso infeccioso de la amebiasis. Capaz de digerir colágeno, proteoglicano y citoquinasa proIL-1β.	Positiva	360 µg/dl	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Li et al. 1995; Luaces and Barrett, 1988; Zhang et al. 2000)
<i>EhCP3</i>	Posiblemente asociada a la digestión de nutrimentos.	Positiva	360 µg/dl	(Serrano-Luna et al. 2013)

<i>EhCP4</i>	Involucrada en el mecanismo de adhesión, el efecto citolítico y de fagocitosis durante el proceso infeccioso de la amebiasis. Capaz de digerir la laminina, IgA, la proteína C3 del complemento, citoquinasa proIL-1 β y villina.	Positiva	360 μ g/dl	(He et al. 2010; Li et al. 1995; Moncada et al. 2006; Park et al. 2001; Thibeaux et al. 2012; Zhang et al. 2000)
<i>EhCP5</i>	Degrada un amplio espectro de sustratos biológicos y sintéticos (mucina, fibrinógeno, colágeno, hemoglobina, albúmina de suero bovino, gelatina, IgG, Z-Arg-Arg-pNA y Z-Ala-Arg-Arg-pNA pero no Z-Phe-Arg-pNA y matriz extracelular).	Positiva	360 μ g/dl	(Ghosh and Raha, 2015; López-Soto et al. 2009; Park et al. 2001)
<i>EhCP6</i>	Involucrada en mecanismos de respuesta al estrés.	Positiva	360 μ g/dl	(Cruz-Castañeda et al. 2009)

Cuadro 4. Proteínas de unión a hemoglobina como factores de virulencia modulados por hierro en *E. histolytica*.

FACTOR DE VIRULENCIA	GENE ID	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONCENTRACIÓN DE HIERRO	REFERENCIAS
<i>Ehhmbp45</i>	EHI_096540	Posiblemente un hemóforo secretado para facilitar la eliminación del grupo hemo del hospedero durante la infección.	Postiva	6.5 μ M	(Cruz-Castañeda and Olivares-Trejo, 2008)
<i>Ehhmbp26</i>	EHI_022250	Posiblemente un hemóforo, que su síntesis se ve activada en presencia de hemoglobina.	Positiva	6.5 μ M	(Cruz-Castañeda et al. 2011; Soto-Castro et al. 2017)

c. *Proteínas de oxidación y reducción*

Entre los factores de virulencia involucrados en las reacciones de oxidación-reducción se (Cuadro 5) encuentra la aldosa reductasa, que puede participar en la biosíntesis de sideróforos y/o la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hernández-Cuevas et al. 2014). También se identificó en este estudio a la enzima FeSOD que contiene hierro y es responsable de la desintoxicación de ROS y la resistencia al metronidazol (Iyer et al. 2014). La sobreexpresión de esta enzima en condiciones de restricción de hierro se evaluó comparando medio normal y medio con un quelante de hierro, revelando que la presencia de hierro ferroso aumenta la expresión de FeSOD. Además, la regulación a nivel transcripcional se demostró mediante análisis de transferencia "Northern blot" y un fragmento de la región 5' del gen *EhFeSOD* mostró un 68% de identidad con la secuencia consenso conocida como la 'caja de hierro' reportada en *Escherichia coli* (Espinosa et al. 2009). Otro factor de virulencia regulado positivamente por el hierro es la enzima EhADH2, que es responsable de internalizar la holo-Tf humana (Reyes-López et al. 2012).

d. *Proteínas de organización del citoesqueleto de actina*

Actina y genes relacionados con la reorganización del citoesqueleto de actina, como los que codifican actobindina y cofilina, se regulan positivamente en condiciones de restricción de hierro. Se propuso que la concentración de hierro puede afectar la citoadherencia de trofozoítos a enterocitos; por tanto, la virulencia y la patogenicidad se verían afectadas (Marie and Petri 2014; Ning et al. 2012). La regulación por hierro de los genes actobindina y cofilina también fue demostrado por Hernández-Cuevas *et al.* (Hernández-Cuevas et al. 2014); además, la regulación positiva de la actina fue demostrada por RT-PCR semicuantitativa por nuestro grupo de trabajo (Soto-Castro, et al. 2017) (Cuadro 6 y ura 15).

Cuadro 5. Proteínas de Oxidación-reducción como factores de virulencia regulados por hierro en *E. histolytica*.

FACTOR DE VIRULENCIA	GENE ID	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONCENTRACIÓN DE HIERRO	REFERENCIAS
Aldosa reductasa	EH_157010, EH_039190, EH_107560	Posiblemente participa en la biosíntesis de sideróforos y/o formación de ROS.	Positiva	90.7µM + 84µM de Hb	(Hernández-Cuevas et al. 2014)
Superóxido dismutasa que contiene hierro (Fe-SOD)	EH_159160	Enzima responsable de la superoxidación del radical (O ₂ N ₂), desintoxicación incluida cuatro favoproteínas de azufre de hierro.	Positiva	123 µM	(Bruchhaus and Tannich 1994; Hernández-Cuevas et al. 2014)
Aldehído/alcohol dehidrogenasa-2 (EhADH2)	ND	Envuelta en la internalización de transferrina humana.	Positiva	Saturado de holo-Tf	(León-Sicairos et al. 2005; Reyes-López et al. 2011)
Aldehído-alcohol dehidrogenasa 2	EHI_024240	Envuelta en la internalización de transferrina humana.	Positiva	90.7µM + 84µM de Hb	(Espinosa et al. 2009; Hernández-Cuevas et al. 2014; Reyes-López et al. 2011)
NADPH-dependiente oxidoreductasa (EhNO ₂)	EHI_045340	Envuelta en la homeostasis Redox a través de la reducción de L-cisteína y hierro	Positiva	90.7µM	(Black and DiRusso 2007; Hernández-Cuevas et al. 2014; Jeelani et al. 2010)

ND. No determinado

Cuadro 6. Actina y proteínas de organización del citoesqueleto como factores de virulencia modulados por hierro en *E. histolytica*.

FACTOR DE VIRULENCIA	GENE ID	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONCENTRACIÓN DE HIERRO	REFERENCIAS
Actobindina	EHI_158570 EHI_039020	Posiblemente involucrada en la reorganización del citoesqueleto, correlacionada con los mecanismos de adherencia.	Negativa	123 μ M	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Lee et al. 2008)
cofilina	EHI_186840	Posiblemente involucrada en la reorganización del citoesqueleto, correlacionada con los mecanismos de adherencia.	Negativa	123 μ M	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Lee et al. 2008)
Actina	EHI_173950	Posiblemente involucrada en la reorganización del citoesqueleto, correlacionada con los mecanismos de adherencia.	Negativa	6.5 μ M	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Lee et al. 2008)
Subunidades del complejo ARP 2/3	EHI_199690 EHI_045000	Posiblemente involucrada en la reorganización del citoesqueleto, correlacionada con los mecanismos de adherencia.	Negativa	123 μ M	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Lee et al. 2008)

S-adenosylmethionina synthetasas (SAMS)	EHI_174250,	Responsable de la biosíntesis de S-	Negativa	90.7 μ M	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Levicán et al. 2007; Sabaty et al. 2010);
	EHI_004920,	adenosylmethionina synthetasas (SAMS),			
	EHI_195110	en muchas vías biosintéticas, incluida la			
	EHI_195110	conversión de metionina-cisteína y biosíntesis de hemo.	Positiva	123 μ M	

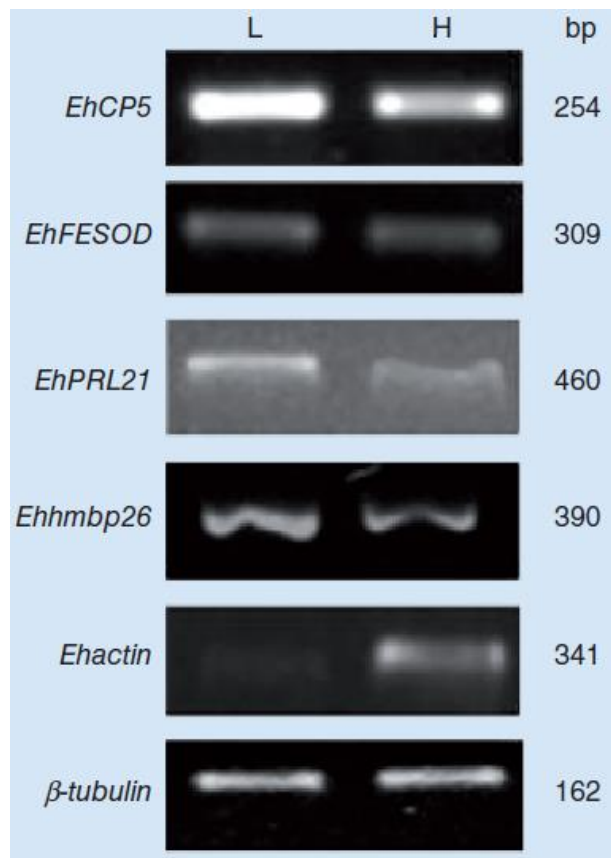


Fig. 15. Ensayos e RT-PCR semicuantitativos con cebadores específicos para *EhCP5*, *EhFeSOD*, *EhPRL21*, *Ehhmbp26* y *EhActin*. Usado DNAc de parásitos cultivados en restricción de hierro (6.5 μ M: Carril L) y condiciones de exceso de hierro (250 μ M: Carril H). El gen de β -tubulina fue utilizado como control interno. Se dan los tamaños de los amplicones en pb: pares de bases (Modificado de Soto-Castro, et al. 2017).

e. *Enzimas metabólicas*

La acil-CoA sintetasa es una enzima metabólica implicada en la virulencia. La acil-CoA sintetasa está involucrada en la síntesis de *novo* de lípidos, catabolismo de ácidos grasos, tráfico vesicular y remodelación de la membrana en *E. histolytica*. La Acil-CoA sintetasa está regulada por el hierro (90,7 μM) en el transcriptoma del parásito (Black and DiRusso, 2007; Hernández-Cuevas et al. 2014) (Cuadro 7). Otro factor de virulencia es S-adenosilmetionina sintetasa SAM, que participa en la biosíntesis de SAM. En muchas vías biosintéticas, incluida la conversión de metionina, de cisteína y biosíntesis de hemo, SAM se regula positivamente en condiciones de restricción de hierro, mientras que se regulan de forma negativa en condiciones de 123 μM de hierro (Hernández-Cuevas et al. 2014; Levicán et al. 2007; Sabaty et al. 2010). Las cisteína sintetas CS1 y CS2 y la cisteína desulfurasa (NifS) están involucradas en el metabolismo de la cisteína y posiblemente sea parte del metabolismo del azufre que contienen aminoácidos en *E. histolytica*. Estas sintetas se regulan positivamente en condiciones bajas en hierro complementadas con Hb (Cuadro 7) (Ali et al. 2004; Hernández-Cuevas et al. 2014; Mishra et al. 2012).

Cuadro 7. Enzimas metabólicas como factores de virulencia regulados por hierro en *E. histolytica*.

FACTOR DE VIRULENCIA	GENE ID	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONDICIONES DE HIERRO	REFERENCIAS
Cisteín sintetasa CS1	EHI_171750	Posiblemente participa en la biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre.	Positiva	90.7µM + 84µM de Hb	(Ali and Nozaki 2007; Hernández-Cuevas et al. 2014; Mishra et al. 2012)
Cisteín sintetasa CS2	EHI_190630	Posiblemente participa en la biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre.	Positiva	90.7µM + 84µM de Hb	(Ali and Nozaki 2007; Hernández-Cuevas et al. 2014; Mishra et al. 2012)
Cisteín desulfurasa NifEH_136380s	EH_136380	Posiblemente participa en la biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre.	Positiva	90.7µM + 84µM de Hb	(Casadevall and Pirofski 2001; Cornick et al. 2016; Marie and Petri 2014)
Acyl-CoA sintetasa	EHI_153060	Enzima involucrada en la síntesis de <i>novo</i> de lípidos, catabolismo de ácidos grasos, tráfico vesicular y remodelación de la membrana en <i>E. histolytica</i> .	Positiva	90.7µM/ 90.7µM + 84µM de Hb	(Black and DiRusso 2007; Hernández-Cuevas et al. 2014)
S-adenosilmetionina sintetasa SAM	EHI_174250 EH_004920 EH_195110	Responsable de la biosíntesis de la S-adenosilmetionina, involucrada en las vías	Negativa	90.7µM	(Hernández-Cuevas et al. 2014; Levicán et al. 2007; Sabaty et al. 2010)

de biosíntesis de la cisteína metionina y
hemo.

EH_195110

Positiva

123 μ M

ND. No determinado

B. Identificación de factores de virulencia que regulan su expresión en base a la concentración de hierro en *G. duodenalis*

Se realizó una búsqueda bibliográfica de FV reportados en la literatura dependientes de la concentración de hierro en el parásito; sin embargo, los estudios reportados de modulación de genes dependiente de hierro en *G. duodenalis* son escasos y las brechas entre el conocimiento de su biología amplias. Sin embargo, diversos reportes señalan la necesidad de altas concentraciones de hierro por el parásito, además de una relación entre este y la anemia en niños y animales, conjuntamente apuntan a que Giardia posee un sistema de respuesta al estrés por hierro (Ansell et al. 2015; De Carvalho et al. 2008; Peirasmaki et al. 2020; Vaca-Pacheco et al. 2010).

Recientemente, diversos investigadores identificaron varios genes implicados en la traducción de FV en deficiencia de hierro, incluidos los que codifican proteínas de respuesta al estrés oxidativo y proteínas de membrana con alto contenido de cisteína, VSP, captosina B y dos proteínas similares a la tenasina (Peirasmaki et al. 2020). En nuestro laboratorio también se encuentran en estudio diferentes genes que codifican factores de virulencia y que son regulados negativamente por hierro como algunas CPs, actinas y proteínas del metabolismo (Plata-Guzmán et al. 2021, en revisión).

a. Proteínas de respuesta al estrés oxidativo (PFOR, por sus siglas en inglés)

Ansell et al. (2015) señalan que la expresión de diversas proteínas del parásito *in vitro* responden específicamente al estrés oxidativo inducido por hierro y oxígeno, entre las que podemos encontrar una proteína similar a la ferritina (Secuestra el hierro) y una superóxido dismutasa, ambas proteínas antioxidantes (Ansell et al. 2015).

Así mismo, Peirasmaki et al. reportaron la regulación negativa de diversos genes por hierro (Cuadro 8). Entre los que podemos encontrar Piruvato-flavodoxina óxidoreductasas, PFOR, esencial en el metabolismo de los carbohidratos del parásito especialmente en la exquistación, y la cual se encuentra asociada a la respuesta del parásito al estrés oxidativo en el hospedero, se encuentran regulados negativamente en agotamiento del hierro (Peirasmaki et al. 2020).

b. Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP, por sus siglas en inglés). Así mismo, se reportó que la expresión de proteínas de membrana con alto contenido de cisteína se ven afectadas por la presencia de hierro *in vitro* (Peirasmaki et al. 2020). Éstas están consideradas FV debido a que la literatura señala que son importantes en la interacción parásito hospedero, esencialmente en el daño a las células epiteliales intestinales. Peimaraski et al. (2020) demostraron que estas proteínas son reguladas positivamente en condiciones de restricción de hierro (Cuadro 9), por lo que se sugiere estas podrían ayudar al parásito a dañar el cepillo epitelial en el hospedero.

Cuadro 8. Proteínas de respuesta al estrés oxidativo (PFOR) como factores de virulencia regulados por hierro en *G. duodenalis*.

FACTOR DE VIRULENCIA	GENE ID	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONDICIONES DE HIERRO	REFERENCIAS
Piruvato-flavodoxina óxidoreductasas, PFOR	ORF 17063	Esencial en el metabolismo de los carbohidratos del parásito, especialmente en la exquistación.	Postiva	Cultivo <i>in vitro</i> en presencia de quelantes	(Niño and Wasserman 2010; Peirasmaki et al. 2020)
Piruvato-flavodoxina óxidoreductasas, PFOR	ORF 114609	Esencial en el metabolismo de los carbohidratos del parásito, especialmente en la exquistación.	Postiva	Cultivo <i>in vitro</i> en presencia de quelantes	(Niño and Wasserman 2010; Peirasmaki et al. 2020)
Transportadores de cationes putativos	ORF 32658 ORF 92246 ORF 96670	Transportadores implicados en la absorción de fármacos en el parásito.	Postiva	Cultivo <i>in vitro</i> en presencia de quelantes	(Peirasmaki et al. 2020; Vivancos 2016)
Ferredoxina óxidodismutasa PFOR	ND	Cataliza la oxidación del piruvato acetil-CoA, activas en las exquistación del parásito.	Postiva	ND	(Ansell et al. 2015)
ND. No disponible					

Cuadro 9. Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP) como factores de virulencia regulados por hierro en *G. duodenalis*.

FACTOR DE VIRULENCIA	GENE ID	FUNCIÓN	REGULACIÓN	CONDICIONES DE HIERRO	REFERENCIAS
Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína	HCMP 24880	Son proteínas ricas en cisteína, importantes en la interacción parásito hospedero, esencialmente en el daño a las células epiteliales intestinales	Positiva	Cultivo <i>in vitro</i> en presencia de quelantes	(Peirasmaki et al. 2020)
Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína	HCMP 11309	Son proteínas ricas en cisteína, importantes en la interacción parásito hospedero, esencialmente en el daño a las células epiteliales intestinales	Positiva	Cultivo <i>in vitro</i> en presencia de quelantes	(Peirasmaki et al. 2020)

C. Búsqueda *in silico* de la proteína tipo IRP (unión a RNA) en el proteoma de *E. histolytica* y *G. duodenalis*

1. *Entamoeba histolytica*

a. Sondeo de proteínas IRP humanas en el proteoma, búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos y modelado en 3D de posibles ortólogos

El análisis *in silico* en búsqueda de ortólogos de las IRP1h e IRP2h en el proteoma de *E. histolytica*, reveló tres productos proteicos que pudiesen actuar como IRP-like en el protozoario. En el análisis de IRP1h se obtuvo solo una posible proteína para la cepa HM1:IMSS (Figura 16), que pudiese ser ortóloga de la proteína sonda, ésta se ha definido como una proteína hipotética (EHI_131110A-p1) con un 39% de identidad; sin embargo, el porcentaje positivo fue de un 67%, lo que quiere decir que entre la IRP1h y el posible ortólogo existen un 37% de coincidencia idéntica pero un 67% de coincidencia conservada (Cuadro 10), es decir que se conservaron aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos, por ejemplo; esto puede conferirle las mismas propiedades, sin embargo, existe una diferencia entre la longitud de ambas proteínas, mientras que la IRP1h tiene una longitud de 889 aa, la proteína hipotética cuenta con tan solo 154 aa, esta diferencia podría significar una dificultad para el ortólogo para establecer la unión con los IREs en el protozoario, esto debido a que los 24 aa involucrados en el ensamble del complejo IRE/IRP se encuentran distribuidos a lo largo de los cuatro dominios de IRP1h, por lo que se realizó la búsqueda de dominios de unión a RNA en la proteína hipotética, en este análisis no se encontró la presencia de dominios que predijeran, dentro de sus funciones en la célula, la unión entre RNA-proteína (Basilion et al. 1994; Dupuy et al. 2006).

A)

5 Genes from Step 1
Strategy: BLAST

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria	
		A.castellanii	E.dispar	E.histolytica (nr Genes: 5)					E.invadens	E.moshkovskii	E.nuttalli	N.fowleri	
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863	
5	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	

B)

9 Genes from Step 1
Strategy: BLAST(2)

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria	
		A.castellanii	E.dispar	E.histolytica (nr Genes: 9)					E.invadens	E.moshkovskii	E.nuttalli	N.fowleri	
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863	
9	2	0	0	2	2	2	2	1	0	0	0	0	

Fig. 16. Resultados de análisis *in silico* de IRPs de *Homo sapiens* en el proteoma de *E. histolytica*. A) Utilizando la sonda IRP1. B) Utilizando la Sonda IRP2 de humano. Resultados del programa Entamoeba Db.

Cuadro 10. Posibles ortólogos de IRP1 e IRP2 de humano en el proteoma de *E. histolytica*.

PROTEÍNA SONDA*	NÚMERO DE ACCESO*	ID*	NOMBRE	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)	IDENTIDAD* (%)	POSITIVOS (%)
IRP-BP1	P21399.3	<u>EHI_131110A-p1</u>	Proteína hipotética	154	16.94	39	67%
IRP2	P48200.3	<u>EHI_050750A-p1</u>	Proteína rica en leucina / Proteína fosfatasa	837	92.07	26	47
		<u>EHI_036510A-p1</u>	Proteína hipotética	440	48.4	29	48

Proteína Sonda: Nombre corto de las proteínas reguladoras de hierro humanas sondeadas en el proteoma de *E. histolytica*, Número de Acceso: El número de identificación genómica (ID) en NCBI, ID: Número de identificación en AmoebaDB y el porcentaje de Identidad (%): el cual nos dice el porcentaje de similitud entre la secuencia sonda y la secuencia detectada en el proteoma de *E. histolytica*.

A pesar de esto, puede ser posible que el ortólogo detectado realice la función de IRP-like en el parásito, esto podría ser posible si la proteína adquiriera en el plegamiento terciario una estructura que permitiera la unión al RNA, además que los programas para la búsqueda de dominios no están especializados en protozoarios.

Los resultados para la IRP2h, arrojaron dos posibles ortólogos (Figura 16), uno de ellos se definió como una proteína hipotética (EHI_036510A-p1) con 48% positivos y 29% de identidad, y una longitud de 440 aa, estos resultados podrían conferirle al ortólogo funciones de IRP-like, el segundo ortólogo detectado fue una proteína que contiene el dominio proteína fosfatasa 2C y repeticiones ricas en leucina (EHI_050750A-p1), ésta presentó 47% positivos y una identidad del 26%, otro factor de similitud entre este ortólogo EHI_050750A-p1 y la IRP2h es la longitud, 837 y 963 aminoácidos respectivamente, por lo que se decidió realizar un alineamiento en el programa bioinformático Biology Workbench entre ellas para vislumbrar la presencia de los aminoácidos detectados como responsables de la unión a RNA en la IRP2h (Figura 17), que son K611, R616, R774 y R855 (Butt et al. 1996), encontrándose conservados únicamente los dos últimos mencionados, sin embargo, en los experimentos realizados por Soto-Castro et al. (2017) se puede observar que al interaccionar los extractos citoplasmáticos de *E. histolytica* y el péptido sintético correspondiente a los residuos N-terminales 1-100 de la IRP2 humana (UnitProt P48200), se observaron interacciones con pesos moleculares de 40 y 120 kDa (Figura 18), los cuales corresponden a los pesos moleculares aproximados de los posibles ortólogos obtenidos en el análisis. Aunado a esto, a los dos posibles ortólogos se les analizó en búsqueda de dominios de unión de ácidos nucleicos, sin embargo, la presencia de estos fue nula por lo que su posible papel como proteína de unión a RNA se ve considerablemente debilitada debido, posiblemente, a que los programas no están diseñados para protozoarios, además que se necesita una mayor cantidad de análisis *in vitro* e *in vivo* para descartar su funcionalidad como proteínas IRP-like, conjuntamente que, las proteínas pueden establecer interacciones dependientes de las estructura terciaria que adquieran.


```

IRP2_homo_sapiens      MDAPKAGYAFEYLIETLNDSSHKKFFDVSKLGTKYDVL PYSIRVLEAAV
EHI_050750_Leucine_rich_repe  -----MSKVNLRGKRLSNIPSNIPROVVSFLDISLNKLD RVPVSDLSMNTN
      .:  : *.: .:  : *** * . . : *      * . :

IRP2_homo_sapiens      RNCDFGLMKKEDVMNILDWKTQSNVEVFFPARVLLQDFTGIPAMVDF
EHI_050750_Leucine_rich_repe  LTKVSIISFNKFTSLTSLYKLSLVNVENNLNPISVIDRGLSKLTNLKVLV
      . .: : ** * . . * .. *** : * * : : : : : . : .:

IRP2_homo_sapiens      AMREAVKTLGG-DPEKVHPACPTDLTVDHSLQIDFSKCAIQNAPNPGGGD
EHI_050750_Leucine_rich_repe  CNKNTINTIQEGTFAPELTTISLEMNFITTIPIISFGLMHHLKQITFAG--
      . : : : : * :      .: . : : . . : : * . * . : . . *

IRP2_homo_sapiens      LQKAGKLSPVKVQPKLPCRQQTTCRGS CDSSGELGRNSGTFSSQIENTPI
EHI_050750_Leucine_rich_repe  ----NCLMSFFVALTNISS-----LSSINLNDNVIKVIPESITN
      . * . . * . : : . . . . . . . . . . * . . . . . * . .

IRP2_homo_sapiens      LCPFHLPQVPEPETVLKNQEVFGRNRERLQFFKWSRVFKNVAVIPPGT
EHI_050750_Leucine_rich_repe  MCSLVKLMNDNELTIIPMELFTMPSLQSIQFNKNRITSLPDIPIFLKECH
      : * . :      : : * . :      * :      . : : ** *      : : : : :

IRP2_homo_sapiens      GMAHQINLEYLSRVVFEEKDLLFPDSVVGTDOSHITMVNGLGILGWVGGI
EHI_050750_Leucine_rich_repe  LEBLILNNHIGSITSSITNLSSLRNFCENNNIS-----
      : * : : . . . . . : *      . . . . : : * :

IRP2_homo_sapiens      ETEAVMLGLPVS LTLPEVVGCEL TGSSNPFVTSIDVVLGITKHLRQVGA
EHI_050750_Leucine_rich_repe  -----TLPCLTTLTALTQNLN SNS-----FSTIVSLPPNLKSLYLP
      ** ** . . : * . . *      . . . . . : : * : : :

IRP2_homo_sapiens      GKFVEFFGSGVSQLSIVDRTTIANMCPEYGAILSFPPVDNVTLKHEHTG
EHI_050750_Leucine_rich_repe  -----FNELVELCLPLPSTLTEL LLDNNKLLSPPLLS--TSLNLRSLN
      . : : * . :      : * : : : : : . : ** . . * . * . .

IRP2_homo_sapiens      FSKAKLES METYLKAVKLF RNDQNSSGEP EYSQVIQINLNSIVPSVSGPK
EHI_050750_Leucine_rich_repe  LSAHQISSFPNEITILTALTALNLTS-----NCLSLLEPVN---
      : * : : * . . . . . : : *      * * : : * .

IRP2_homo_sapiens      RPQDRVAVITDKSDFQACLNEKVGFKGFQIAAEKQKDIVSIHYEGSEYKL
EHI_050750_Leucine_rich_repe  --TEHLHVQKFNASFNHFITL PNSSLLSMTSLTSLLELTDNNLLIIPSNFTV
      : : : * . : : : * : . . . . : . : . :      * : : :

IRP2_homo_sapiens      SHGSVVIAAVISCTNN CNP SVMLAAGLLAKKAVEAGLRVKPYIRTSLSPG
EHI_050750_Leucine_rich_repe  LIHLRYLSLSSNLTTFPIQICNF SKLQALIISNNNLYELPSQLTSLSTL
      : : . . . . : : * * . : * * * ****.

IRP2_homo_sapiens      S--GMVTHYLS SSGVLPYLSKLG--FEIVGYGCSICVGN TAPLSDAVLNAV
EHI_050750_Leucine_rich_repe  TTLDLSPFNHLNSIDVVTHLIHLQCLD VSSNDLVLLPEGLTKLSSLIFLNL
      : . : : * . * . * : : * : : . . : . : ** . : :

IRP2_homo_sapiens      KQGDLVTCGILSGRIFEDR CDCVRANYLASPPLVVAYAIAGTVNIDFQ
EHI_050750_Leucine_rich_repe  SENKIISVNKLLLF-----
      . . . . . : * :

IRP2_homo_sapiens      TEPLGTDPTGKNIYLHDIWPSREEVHRVVEEHVILSMFKALKDKIEMGNK
EHI_050750_Leucine_rich_repe  -----SLFLNL TNQITSIGDIDEDQFVLTNFD CNPFRQHHTTE
      . : * :      . . : : * : : : * : * . . * . . :

IRP2_homo_sapiens      RWNSLEAPDSVLF PWDL KSTYIR--CP SFFDKLTKEPIALQAIENAHVLL
EHI_050750_Leucine_rich_repe  EGRNLSKTNSSLFKITVAHAEMTGLRPT YEDSLELVNPFMDKKGRSFTAV
      . . . * . . * * : : : : * : : * * * : : . . . :

```

```

IRP2_homo_sapiens      YLGDSVTTDDHISPAGSIARNSAAAKYLTRALTPREFNSYGARRGNDAVM
EHI_050750_Leucine_rich_repe  YDG---HSGQICPNYVAKRFHCVIEICINEGLAPVWALKEGFNRMQEEIV
* *   :.:*. *   *   . . :   : * : * :   . * . * : : : :

IRP2_homo_sapiens      TRGTFANIKLFNKFIGKPAKTIHFPSGQTLDVFEAAELYQKEGIPLIIL
EHI_050750_Leucine_rich_repe  QKGIEDGCTAVVVMILDMKMYVAVAGDSRAVLRCRGGKRAIQLSEHKPNGTC
: *   . . . : * .   .   . . : :   . :   . *   *

IRP2_homo_sapiens      AGKKYGSGNSPDWAAKGPYLLGVRVLAESYEKIEKDHLELIGIGIAPLQFL
EHI_050750_Leucine_rich_repe  ERERIIRGGHIFAGR----VNGELAISRSFGDIQNSPIVSAVPEIREYD
: :   : * :   . . :   . . : * : * :   . * : :   . . : :

IRP2_homo_sapiens      PGENADSLGLSGRETFSLTFPEELSPGITLNIQTSTGKVFVSVIASFEDDV
EHI_050750_Leucine_rich_repe  IMANDEFVIVACDGVWDVVSNQKAVDIIKTSKSLSIGSVRLRDFAYSMGS
* : : : :   . . : :   : :   * . . . * * *   . . . .

IRP2_homo_sapiens      EITLYKHGGLLNPFVARKFS
EHI_050750_Leucine_rich_repe  QDNITCAVVTVPFY----

```

Fig. 17. Alineamiento en ClustalW entre la IRP-2 de humano y la secuencia tipo IRP EHI_050750 de *E. histolytica*. Los resultados muestran un asterisco en color azul para indicar los aminoácidos idénticos, en dos puntos verdes se indican los aminoácidos fuertemente conservados y con un punto azul se indican los aminoácidos débilmente conservados. En círculo rojo se encuentran los posibles aminoácidos responsables de la interacción IRE/IRP.

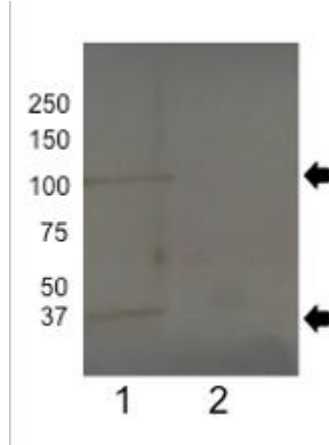


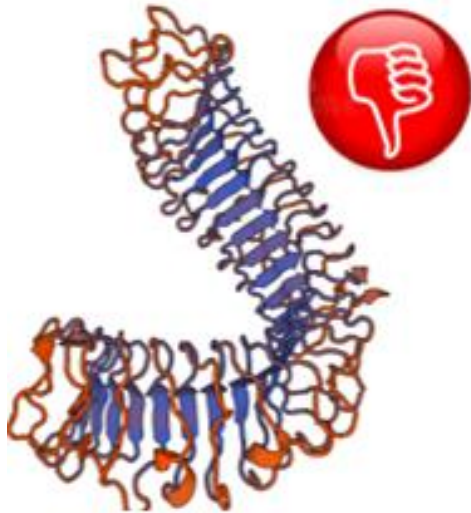
Fig. 18. Posibles IRPs en *E. histolytica*. Ensayo de Western Blot utilizando extractos citoplasmáticos de *E. histolytica* en condiciones bajas de hierro (línea 1) y en condiciones de alto hierro (línea 2). Se utilizó un anti-IRP2 (ThermoFisher Scientific), fabricado a partir de un péptido sintético correspondiente a los residuos N-terminales 1-100 de la IRP2 humana (UnitProt P48200). Adaptada de Reyes-Sánchez, 2016.

Aunque ninguno de los posibles ortólogos de IRPs en *E. histolytica* presentó dominios de unión a ácidos nucleicos (DNA, RNA o ambos), se decidió realizar los modelos en 3D de los posibles ortólogos de IRP2h por su aproximación al tamaño molecular de las bandas obtenidas en los experimentos por Reyes-Sánchez (2016). El posible ortólogo EHI_050750A-p1 tiene un tamaño molecular aproximado a los 92 kDa, cercano a la banda visualizada en un tamaño molecular de 100 kDa; mientras que EHI_036510A-p1 tiene un tamaño molecular aproximado a los 48 kDa, cercano a la banda visualizada en un tamaño molecular entre los 37 y los 50 kDa, sin embargo, es importante resaltar que estas bandas fueron reconocidas por anticuerpos policlonales con una fracción específica de la IRP2 (residuos 1-100 de la región amino terminal de la IRP- 2 de humano), por lo que su reconocimiento podría ser inespecífico o probablemente los tamaños de las IRPs del parásito son diferentes a aquellos de las IRP de humano.

Se obtuvieron tres posibles modelos en 3D para el posible ortólogo de la IRP2 con número de identificación EHI_050750A-p1 (Figura 19), de los cuales ninguno obtuvo estimadores fiables de acuerdo al programa. El segundo posible ortólogo denominado como una proteína hipotética con número de identificación EHI_036510A-p1, arrojó dos posibles modelos (Figura 20), sin embargo, ninguno de los dos consiguió valores fiables de QMEAN y GMQE, por lo que no hay un homólogo experimental de estos posibles modelos.

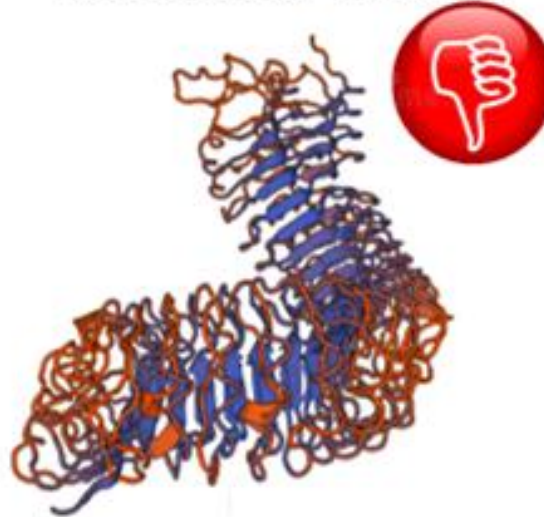
Estos resultados coinciden con lo reportado para *T. vaginalis*, quien tampoco expuso ortólogos de IRP1 e IRP2 de *H. sapiens* en su proteoma (Torres-Romero and Arroyo, 2009), a su vez esto sugiere que como en el caso de *T. vaginalis*, *E. histolytica* podría presentar un sistema paralelo al IRE/IRP de eucariontes superiores, donde sean proteínas multifuncionales las que actúen como RBP's dependiendo de la concentración intracelular de hierro en el protozoario.

1) Brassinosteroide insensible 1



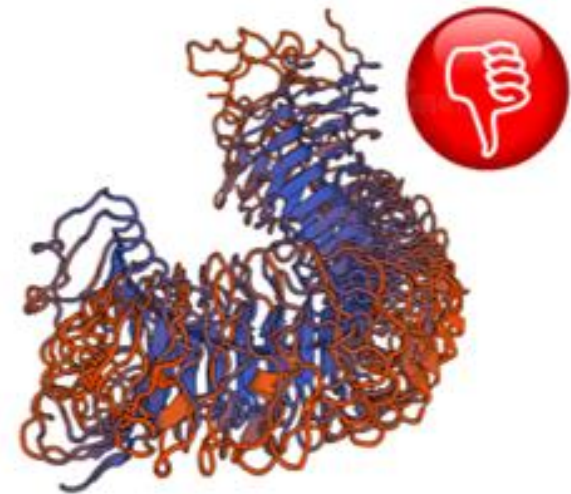
GMQE: 0.43
QMEAN: -6.53

2) Receptor tipo Serina LRR



GMQE: 0.43
QMEAN: -7.45

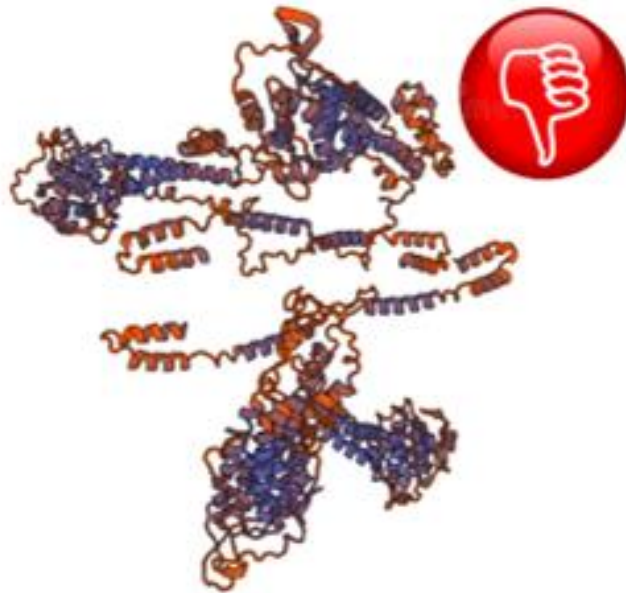
3) Receptor tipo Toll 3



GMQE: 0.43
QMEAN: -4.77

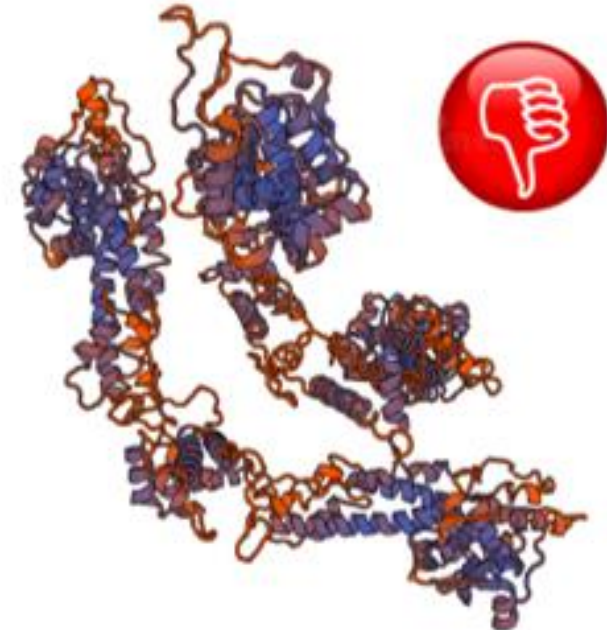
Fig. 19. Modelo 3D del posible ortólogo de IRP2 de *H. sapiens* en *E. histolytica* denominado proteína rica en leucina EHI_050750A-p1). GMQE: “Global Model Quality Estimate”, por sus siglas en inglés (Estimación global de la calidad del modelo) y QMEAN, valor de Q. Manita con pulgar hacia abajo significa que los estimadores no son fiables para el modelo obtenido.

1) Tirosina aminomutasa



GMQE: 0.58
QMEAN: -6.01

2) Fenilalanina Amino-liasa 1



GMQE: 0.57
QMEAN: -5.51

Fig. 20. Modelo 3D del posible ortólogo de IRP2 de *H. sapiens* en *E. histolytica* denominado proteína hipotética (EHI_036510A-p1). GMQE: “Global Model Quality Estimate”, por sus siglas en inglés (Estimación global de la calidad del modelo) y QMEAN, valor de Q. Manita con pulgar hacia abajo significa que los estimadores no son fiables para el modelo obtenido.

b. Sondeo de proteínas tipo IRP de protozoarios en el proteoma y búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos

1. Plasmodium falciparum

En el análisis *in silico* se incluyó a la proteína de unión a RNA reportada para *P. falciparum* denominada PfIRPa (número de acceso CAB41452.1), la cual tiene la capacidad de unirse a IREs putativos del parásito así como a IREs consenso de mamífero (Loyevsky et al. 2003). Al sondearse la secuencia aminoacídica de esta proteína en el proteoma de *E. histolytica* en busca de ortólogos no se obtuvo ningún candidato en el proteoma del parásito (Figura 21).

0 Genes [Revise](#) [Combine with another search](#)

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria	
		<i>A. castellanii</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i> (nr Genes: 0)						<i>E. invadens</i>	<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. nuttalli</i>	<i>N. fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Fig. 21. Resultados de análisis *in silico* de PfIRPa de *Plasmodium falciparum* en el proteoma de *E. histolytica*.

2. *Trichomonas vaginalis*

En el análisis *in silico* se incluyeron las proteínas de unión a RNA reportadas para *Trichomonas vaginalis* como la α -Actina 2 y 3 (TvACTN2: TVAG 190450 y TvACTN3: TVAG 239310; número de identificación), proteínas de choque térmico (HSP70-4: TVAG_044510) y Actinas TVAG_054030, TVAG_200190), las cuales son proteínas multifuncionales que han demostrado actuar en el sistema de regulación por hierro en este microorganismo (Calla-Choque et al. 2014; Figueroa-Angulo et al. 2015). Además, el análisis *in silico* se suplementó con la búsqueda directa de actinas, proteínas de choque térmico 70 (HSP70) y proteínas relacionadas con el hierro, todos los productos se analizaron en búsqueda de sitios de unión a ácidos nucleicos (Cuadro 11).

La proteína α -Actinina 2 (TvACTN2: TVAG_190450) de *T. vaginalis*, que es capaz de unirse a los IREs putativos de TvCP4 y TvCP12 del parásito y participa en el sistema IRE/IRP según lo reportado por Calla-Choque et al (2014), es una proteína anotada en el proteoma del parásito (TrichoDB) como una Kakapo putativa con una longitud aminoacídica de 931 aa, para la cual se obtuvieron 14 posibles ortólogos para la cepa HM-1:IMSS (Figura 22), dentro de los cuales solo uno mostró dominios de unión a ácidos nucleicos.

El posible ortólogo con número de identificación EHI_202460A-p1 (Cuadro 11) se encuentra anotado como una proteína que contiene un dominio homólogo de calpolina, la cual comparte 29% de identidad y 53% de positivos, al analizar su secuencia aminoacídica se detectaron dominios con capacidad de unión a ácidos nucleicos, denominados como TBOX y ProQ, aunque solo este último expone capacidad de unión específica a RNA. TBOX es un dominio que participa en la regulación de la transcripción y es capaz de unirse a DNA durante la transcripción (Watter et al. 1998), mientras que ProQ es un dominio que se encuentra en la región terminal carboxilo y es responsable de unión a RNA, esto detectado en *E. coli*. El dominio de unión consta de 96 aa en el producto obtenido (Ghetu et al. 2000), es importante mencionar que Soto-Castro et al. (2017), demostraron que existen proteínas con un peso molecular entre 20 y 30 kDa en los extractos citoplasmáticos de *E. histolytica* que son capaces de unirse a los IREs putativos de *Actina* y *hemoglobinasa 26* del parásito e IREs de mamíferos, esto concuerda con el peso molecular del producto, colocándola como fuerte candidata para ser proteína IRP-like (Figura 23).

50 Genes from Step 1 [Revise](#)

Strategy: BLAST(8)

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria
		<i>A. castellanii</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i> (nr Genes: 50)					<i>E. invadens</i>	<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. nuttalli</i>	<i>N. fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863
50	12	0	0	8	8	14	9	11	0	0	0	0

Fig. 22. Resultados de sondeo de TvACTN2 de *T. vaginalis* en el proteoma de *E. histolytica*.

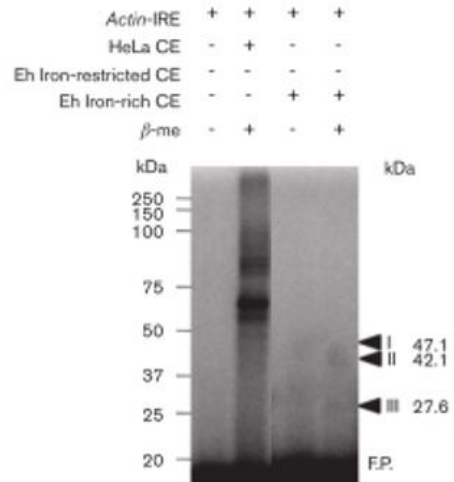
Cuadro 11. Secuencias aminoacídicas obtenidas de las sondas de *T. vaginalis* sondeadas en el proteoma de *E. histolytica* para identificar posibles proteínas de unión a ácidos nucleicos.

PROTEÍNAS SONDA	NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN GENBANK	PRODUCTOS PROTEÍCOS POR SONDA (TOTAL)	PROTEÍNAS CON DOMINIOS DE UNIÓN*	ID (<i>E. histolytica</i>)	NOMBRE DEL PRODUCTO PROTÉICO	LONGITUD	IDENTIDAD (%)	SITIOS DE UNIÓN (TOTAL)	SITIOS DE UNIÓN A RNA	NOMBRE DEL SITIO DE UNIÓN
TvACT3	TVAG 239310	14	1	EHI_202460A-p1	Proteínas que contienen dominios homólogos de Calponina	278	29	2	1	ProQ -
TvACT2	TVAG 190450	14	1	EHI_202460A-p1	Proteínas que contienen dominios homólogos de Calponina	278	29	2	1	ProQ
HSP70-4	TVAG_044510	25	4	EHI_092830.mRNA-p1	Proteína mitocondrial de choque térmico 70, putativa	509	48	3	1	POP4

				EHI_144080.mRNA-p1	Pseudogén de proteína de choque térmico 70, putativa	284	64	1	0	-
				EHI_034960A-p1	Proteína de choque térmico 70, putativa	295	52	3	2	35EXOc* HIRAN*
				EHI_086790.mRNA-p1	Pseudogén de proteína de choque térmico 70, putativa	141	71	1	0	-
ACT	TVAG_054030	15	1	EHI_043640A-p1	actin, putative	332	74	3	1	S4
	TVAG_200190	15	1	EHI_043640A-p1	actin, putative	332	74	3	1	S4
	AAC47679.1	15	2	EHI_043640A-p1	actin, putative	332	74	3	1	S4
				EHI_131230A-p1	actin, putative	876	36	3	1	CAT_RBD

Proteína Sonda: Nombre corto de las proteínas sondeadas en el proteoma de *E. histolytica*, Número de Identificación: El número de identificación genómica (ID) en Gen bank, ID: Número de identificación en AmoebaDB y el porcentaje de Identidad (%): el cual nos dice el porcentaje de similitud entre la secuencia sonda y la secuencia detectada en el proteoma de *E. histolytica*. *Se puede unir a RNA o DNA.

A)



B)

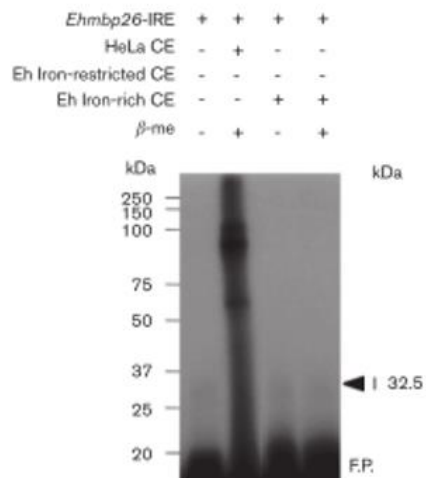


Fig. 23. Sistema homólogo de *E. histolytica*: Interacción entre IREs de *Actina* y *Ehhmbp26* y proteínas citoplásmicas. A). Ensayos de retardamiento en gel con IREs de *Actina*. B) Ensayos de retardamiento en gel con IREs de *Hemoglobinasa 26* (Adaptado de Soto-Castro et al. 2017).

Los resultados obtenidos del análisis para la proteína TvACN3 (TVAG_239310) de *T. vaginalis*, la cual es una proteína con una secuencia aminoacídica de 1129 aa, con dos dominios funcionales de calponinas en la región amino terminal, lo que le confiere la capacidad de unirse a actinas, seguida de un dominio de repeticiones de espectrinas, en el centro dos dominios de manos de EF en la región carboxilo (Calla-Choque et al. 2014), coinciden con los resultados para TvACTN2, se obtuvieron 14 productos que pudiesen ser ortólogos de la proteína TvACTN3 en *E. histolytica* HM-1:IMSS, (Figura 24) (Cuadro 12), sin embargo, es importante mencionar que 13 de los productos obtenidos fueron los mismos que para TvACTN2 con excepción del ortólogo EHI_155290A-p1 la cual se encuentra inscrita en como una proteína tipo Actina putativa, sin embargo; el mismo ortólogo (EHI_202460A-p1) fue el que expuso dominios de unión a ácidos nucleicos y RNA, como se explicó anteriormente (Cuadro 12). Calla-Choque (2014) reporta que la proteína sonda TvACT3 de *T. vaginalis* muestra cinco sitios de unión de ácidos nucleicos, BRIGHT/ARID (motivos de unión a DNA), B5 (motivo de unión a RNA), LA, KH, y Pumilio, ninguno de estos fue detectado en el análisis *in silico* de los posibles ortólogos de la proteína, por otro lado, se destaca la presencia del dominio ProQ específico para RNA.

Es importante señalar que, aunque la interacción en el sistema IRE/IRP es específica para RNA, la afinidad a DNA puede conferir funciones de unión importantes, ya que pueden estar presentes bases nucleicas específicas tales como citosina, adenina y guanina, además que las proteínas de unión experimentan cambios conformacionales de acuerdo con el entorno interno de la célula, tal como el IRP1 humano, dependiendo de la cantidad de hierro disponible.

Para ampliar la búsqueda, la secuencia de aminoácidos de *Trichomonas vaginalis* alfa-actinina-3 (GenBank: AHW84749.1) se investigó directamente en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ésta se sondeó en el proteoma de *E. histolytica* a través del programa Amoeba db. Los resultados obtenidos fueron los mismos que para TvACT2 y TvACT3, 14 productos protéicos, de los cuales sólo uno (EHI_202460A-p1) mostró sitios de unión a ácidos nucleicos y mostró un solo dominio específico para RNA.

50 Genes from Step 1 [Revise](#)
 Strategy: BLAST(8)

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba							Naegleria	
		<i>A.castellanii</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i> (nr Genes: 50)					<i>E.invadens</i>	<i>E.moshkovskii</i>	<i>E.nuttalli</i>	<i>N.fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863
50	12	0	0	8	8	14	9	11	0	0	0	0

Fig. 24. Resultados de sondeo de TvACTN3 de *T. vaginalis* en el proteoma de *E. histolytica*.

El análisis también se realizó para la proteína HSP70-4 (TVAG_044510) reportada por Figueroa-Angulo et al. (2015), como una RBP del sistema IRE/IRP en *T. vaginalis*, al utilizar esta sonda se obtuvieron 25 posibles productos protéicos ortólogos de la proteína en el aislado HM-1: IMSS (Figura 25), en su mayoría anotadas como proteínas de choque térmico, putativas o mitocondriales. Estos 25 ortólogos fueron analizados en busca de dominios de unión a ácidos nucleicos y específicamente a RNA, dentro de los candidatos obtenidos cuatro mostraron sitios de unión a ácidos nucleicos (EHI_092830.mRNA-p1, EHI_086790.mRNA-p1, EHI_144080.mRNA-p1 y EHI_034960A-p1) y solo dos de los posibles ortólogos exhibieron dominios de unión a RNA (EHI_092830.mRNA-p1 y EHI_034960A-p1), mismo que se describen más adelante (Figueroa-Angulo et al. 2015).

EHI_092830.mRNA-p1, está anotada como una proteína de choque térmico mitocondrial, putativa con una longitud de 509 aa, y con una identidad del 48% y positivos del 66%, es importante destacar que el porcentaje de identidad y de positivos resulta muy alto y prometedor ya que es muy cercano al 50% y se trata de distintas especies, así mismo, es necesario recalcar que *E. histolytica* es un parásito amitochondriado, por lo que el nombre podría derivarse de sus homólogos en otras especies. Los dominios encontrados en EHI_092830.mRNA-p1 fueron TOP1Ac con una secuencia de 153 aa (Wang, 2002), LytTR con una secuencia de 105 aa ambas con función de unión a DNA y el dominio POP4 compuesto de 96 aa y que presenta funciones de ribonucleasa y de unión a RNA (McGowan et al. 2002), éste último dominio le confiere una característica fundamental para desempeñar un posible papel como IRP-like; el peso molecular aproximado de esta proteína es de 48 kDa, lo cual concide con el peso molecular de la proteína detectada por la interacción con el anti-IRP2 de Reyes-Sánchez (Reyes-Sánchez, 2016). La secuencia EHI_086790.mRNA-p1 al igual que EHI_092830.mRNA-p1 exhibió el dominio TOP1Ac el cual se describe anteriormente pero solo que en este ortólogo tiene una longitud de 152 aa, además es importante mencionar que tiene funciones de isomerasa (Perry and Mondragón, 2003). El ortólogo EHI_086790.mRNA-p1 mostró una identidad de 47% y 66% de positivos y se encuentra anotada como un pseudogén de proteína de choque térmico 70 putativa de *E. histolytica*.

50 Genes from Step 1 [Revise](#)

Strategy: BLAST

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria
		<i>A. castellanii</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i> (nr Genes: 47)					<i>E. invadens</i>	<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. nuttalli</i>	<i>N. fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863
50	6	0	0	4	3	25	6	9	0	0	3	0

Fig. 25. Resultados de sondeo de HSP70-4 de *T. vaginalis* en el proteoma de *E. histolytica*.

Otro de los productos obtenidos que exhibió dominios de interacción proteína-ácidos nucleicos fue EHI_144080.mRNA-p1, el cual se encuentra anotado en el proteoma de *E. histolytica* como proteína de choque térmico 70 putativa. El posible ortólogo cuenta con un porcentaje de identidad del 64% y 84 % de positivos, algo a realzar es que tiene 0% de “Gaps”; sin embargo, existe amplia diferencia entre las longitudes de las proteínas, mientras que TvHsp70-4 tiene una longitud de 659 aa y el posible ortólogo de 284 aa; sin embargo, mostró un motivo de unión a ácidos nucleicos denominado ERCC4, el cual es un dominio con actividad de nucleasa y con capacidad de unirse al DNA (Nishino et al. 2003). La longitud en el ortólogo es de 92 aa.

Por su parte, EHI_034960A-p1 es un posible ortólogo de 295 aa anotado como proteína putativa de choque térmico 70, con una identidad de 52% y 70% de positivos; mostró algunos motivos de unión a ácidos nucleicos como 35EXOc, el cual es un dominio con actividad de exonucleasa 3'-5' lo que podría sugerir actividad de IRP-like en el parásito (Yang et al. 1998). Otro de los dominios que mostró el posible ortólogo fue el motivo HIRAN, el cual tiene actividad de hidrolasa y tiene la capacidad de unirse a iones de Zinc y a ácidos nucleicos, este dominio tiene una longitud de 100 aa en el ortólogo (Iyer et al. 2002), otros de los motivos encontrados fue Saint el cual tiene la capacidad de unirse a cadenas de DNA (Boyer et al. 2004).

Este análisis se complementó con la búsqueda directa de la proteína de choque HSP70 en el proteoma de *T. vaginalis*. Los resultados arrojaron 20 proteínas, de las cuales se seleccionó la proteína con el número de identificación AAB52423.1 (Genebank), es una proteína citoplasmática de choque térmico de 659 aminoácidos. Ésta proteína se sondeó en el proteoma del aislado HM-1: IMSS de *E. histolytica* y mostró 26 posibles ortólogos de la proteína, los mismos posibles ortólogos arrojados por la proteína HSP70-4 de *T. vaginalis*.

El análisis *in silico* de la actina se realizó a partir de proteínas con los números de identificación TVAG_054030 y TVAG_200190, que son actinas de *T. vaginalis* y, según lo reportado por Figueroa-Angulo et al. 2015, podrían actuar como proteínas tipo IRP en *T. vaginalis*. Estas proteínas se utilizaron como sondas en el proteoma de *E. histolytica* para reconocer si poseían ortólogos en el parásito. El análisis arrojó 15 posibles ortólogos (Figura 26), que eran los mismos productos proteicos para ambas sondas (TVAG_054030 y TVAG_200190) y sólo un producto de los 15 posibles ortólogos mostró un sitio de unión de RNA con el número de identificación

EHI_043640A-p1, el cual tiene una longitud de 332 aa y comparte una identidad del 74% con las proteínas sondas de *T. vaginalis*; el sitio de unión encontrado se encuentra anotado como S4 y le podría conferir la función de unión a RNA según lo reportado por la literatura (Davies et al. 1998), característica que lo colocan como un candidato para ser proteína de unión a RNA en *E. histolytica* y participar en el sistema de regulación post-transcripcional por hierro.

El análisis se complementó con la búsqueda de actina en general. Se eligió como sonda a AAC47679.1 (número de identificación en el banco de genes), ésta produjo un resultado de 15 productos posibles ortólogos (Figura 27) de los cuales solo dos mostraron sitios de unión a RNA, uno de ellos es el mismo producto encontrado para las proteínas sondas utilizadas anteriormente (EHI_043640A-p1); mientras que, el otro producto que mostró dominios de unión a ácidos nucleicos se encuentra marcado como actina putativa del parásito, con número de identificación EHI_131230A-p1, el cual tiene una longitud de 876 aa y una identidad del 36%. Éste posible ortólogo presentó tres dominios de unión a ácidos nucleicos pero solo uno de unión a RNA el cual se encuentra anotado como CAT_RBD (Tilbeurgh et al. 1997). Estos resultados sugieren que pudiese existir alguna actina en *E. histolytica* con doble función en el parásito y participar en un sistema IRE/IRP-like, similar a lo encontrado en *T. vaginalis* (Solano-González et al. 2007; Torres-Romero and Arroyo, 2009; Figueroa-Angulo et al. 2015).

A)

50 Genes from Step 1 [Revise](#)
 Strategy: BLAST

☐ Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria	
		<i>A.castellanii</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i> (nr Genes: 50)						<i>E.invadens</i>	<i>E.moshkovskii</i>	<i>E.nuttalli</i>	<i>N.fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863	
50	8	0	0	6	7	15	7	15	0	0	0	0	

B)

☐ Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria	
		<i>A.castellanii</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i> (nr Genes: 50)						<i>E.invadens</i>	<i>E.moshkovskii</i>	<i>E.nuttalli</i>	<i>N.fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863	
50	8	0	0	6	7	15	7	15	0	0	0	0	

C)

50 Genes from Step 1
 Strategy: BLAST(3)

☐ Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Acanthamoeba		Entamoeba								Naegleria	
		<i>A.castellanii</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E.histolytica</i> (nr Genes: 50)						<i>E.invadens</i>	<i>E.moshkovskii</i>	<i>E.nuttalli</i>	<i>N.fowleri</i>
		str. Neff	SAW760	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo	P19	ATCC 30863	
50	8	0	0	6	7	15	7	15	0	0	0	0	

Fig. 26. Resultados de análisis *in silico* de Actina (TvAC_054030 y de *T. vaginalis* en el proteoma de *E. histolytica*. A) Sonda TVAG_054030. B) Sonda TVAG_200190. C) AC47679.1 Sonda
 *Resultados del programa Entamoebadb.

El análisis *in silico* en busca de proteínas de unión a RNA en el aislado HM-1: IMSS de *E. histolytica* se complementó con la búsqueda directa en el programa Amoeba DB de las proteínas relacionadas con el hierro, de este sondeo se obtuvieron de 454 productos proteicos (Figura 27) que pudiesen tener un papel como IRP-like en el sistema post-transcripcional por hierro en *E. histolytica*, esto se realizó tomando en cuenta lo reportado en *T. vaginalis* donde las proteínas del parásito pueden ser multifuncionales (Figuroa-Angulo et al. 2015).

Las 454 secuencias de aminoácidos fueron analizadas en búsqueda de sitios de unión a ácidos nucleicos, donde 61 productos mostraron dominios de unión a ácidos nucleicos y 30 productos mostraron dominios de unión RNA dentro de la proteína (Cuadro 12).

3533 Genes from Step 1 Revise

Strategy: Text

Click on a number in this table to limit/filter your results

All Results	Ortholog Groups	Entamoeba										Naegleria	
		Acanthamoeba		E. histolytica (1571)						E. invadens	E. moshkovskii	E. nuttalli	N. fowleri
		A. castellanii	E. dispar	str. Neff		SAW780	HM-1:IMSS-A	HM-1:IMSS-B	HM-1:IMSS	HM-3:IMSS	KU27	IP1	Laredo
3533	661	433	326	260	262	454	276	319	367	318	254	264	

Fig. 27. Resultados de análisis *in silico* de búsqueda directa de "iron-related proteins" en el proteoma de *E. histolytica*. A) Sonda TVAG_054030. B) Sonda TVAG_200190. C) AAC47679.1 Sonda. *Resultados del programa Entamoebadb.

Cuadro 12. Resultados de análisis *in silico* de búsqueda directa de "iron-related proteins" en el proteoma de *E. histolytica*.

NÚMERO DE ID	NOMBRE	# PROTEÍNAS CON DOMINIOS DE UNIÓN A AN	LONGITUD	PESO MOLECULAR KDa	# DOMINIOS DE UNIÓN A RNA	NOMBRE DEL DOMINIO
EHI_163510	Complejo exonucleasa, putativo	1	263	29	1	S1
EHI_077270	Proteína que contiene el dominio de unión al RNA S1	11	1701	187	11	S1
EHI_169690	Ribonucleasa, putativa	1	278	31	1	Ribonucleasa_T2
EHI_017610	Proteína hipotética conservada		2566	282	3	S1 ADEAMc PolyA
EHI_131150	Subunidad II de la RNA polimerasa, putativa	1	180	19.8	1	S1
EHI_160440	RNAr de la proteína de la biogenesis RRP5, putativa	2	517	56.87	2	S1
EHI_170340	Subunidad 60S de la Proteína ribosomal L40, putativa	1	56	6.16	1	Ribosomal_L40e

EHI_181180	Subunidad 60S de la Proteína ribosomal L2/L8, putativa	1	257	28.27	1	Ribosomal_L2
EHI_167520	Subunidad 60S de la Proteína ribosomal L3, putativa	1	350	38.5	1	PolyA
EHI_004770	Proteína hipotética conservada	1	233	25.63	1	S1
EHI_078850	Proteína hipotética conservada	1	166	18.26	1	S1
EHI_004750	Proteína SRP54, putativa	1	487	53.57	1	SRP_SPB
EHI_124060	Producto inespecífico	3	779	85.69	3	S1 S1 S1
EHI_192090	Proteína ribosomal L27a, putativa	1	149	16.39	1	Ribosomal_L18e
EHI_179020	Proteína hipotética	7	481	52.91	1	PWI

EHI_005100	Subunidad alfa del factor 2 de iniciación de la traducción de eucariontes putativo	3	299	33	3	S1 EIF_2 S1
EHI_151250	Proteína hipotética	18	2537	279.07	2	MIF4G PolyA
EHI_129750	Familia Rho GTPasa		201	22.11	1	
EHI_163470	Proteína hipotética	1	478	52.58	1	FDX-ABC
EHI_156910	Proteína hipotética	4	137	15.07	3	S1 S1 S1
EHI_079860	methionyl-tRNA synthetasa, putativa	3	754	82.94	1	Unión a RNAt

EHI_120630	Proteína hipotética conservada	12	2524	277.64	2	ADEMc MIF4G MIF4G
EHI_092930	Proteína hipotética	2	116	12.76	1	tRNA_bind
EHI_125760	Proteína hipotética	8	534	58.74	1	CAT_RBD
EHI_127200	Subunidad 60 de la proteína ribosomal L2/L8, putativa	1	257	28.27	1	Ribosomal_L2
EHI_177460	Factor de inicio de la traducción eIF-5A, putativo	1	155	17.05	1	eIF_5a
EHI_119590	Subunidad 60 de la proteína ribosomal L40, putativa	1	56	6.16	1	Ribosomal_L40e
EHI_033670	Proteína con dominio S1 de unión a RNA	3	799	87.89	3	S1 S1 S1
EHI_020370	Proteína ribosomal L27a, putativa	1	133	14.63	1	Ribosomal_L18e
EHI_164820	Proteína hipotética	21	1201	132.11	3	B5 Ribosomal_L2 RIBOc

EHI_140870	Proteína hipotética	2	128	14.08	1	S1
EHI_002150	Proteína hipotética	10	10016	1101.76	1	B3_4
EHI_047810	Proteína hipotética	3	769	84.59	1	Unión a RNAt
						Zalpha
EHI_174140	Proteína hipotética	17	1231	135.41	4	RIBOc MIF4G PUR
EHI_103300	Factor de inicio de la traducción eIF-1A, putativo	1	171	18.81	1	eIF-1a
EHI_151810	Factor de inicio de la traducción eIF-5A, putativo	1	155	17.05	1	eIF-5a
EHI_184500	Proteína hipotética conservada	14	2505	275.55	1	MIF4G

ID: Número de identificación genómico (ID) en AmoebaDB. *Se puede unir a RNA o DNA. AN: ácidos nucleicos.

2. *G. duodenalis*

a. Sondeo de proteínas IRP de humano en el proteoma y búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos y RNA

La presencia de estructuras tallo-burbuja en algunos RNAm de *G. duodenalis* reportados por nuestro grupo de trabajo (Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación), representan los elementos en *cis* del sistema de regulación tipo IRE/IRP en este protozoario; por lo anterior, se realizó un análisis *in silico* sobre el proteoma de *G. duodenalis*, en busca de proteínas tipo IRP en el protozoario, los cuales representarían los elementos *trans* de dicho sistema.

El análisis se inició con la búsqueda de ortólogos de las proteínas IRP1 e IRP2 de humano (IRP1h e IRP2h), en el caso de la proteína IRP2h no se obtuvo ningún posible ortólogo, por otra parte, para la IRP1h (P21399.3) se obtuvo un único producto proteico con número de acceso: GL50803_14790-t26_1-p1 (Figura 28), el cual presenta una identidad de 32% y 45% de positivos con la IRP1h, su longitud fue 420 aa (46.2 kDa aproximadamente), es importante mencionar que aunque el porcentaje de identidad se considere bueno por la divergencia entre los organismos, la longitud de dicho producto es casi la mitad que la de IRP1h. Así mismo, en el análisis donde se buscaron motivos de unión a ácidos nucleicos en el posible ortólogo no mostró dominios con esta función por lo que posiblemente no se desempeñe como proteína de unión a RNAm, sin embargo, es necesario destacar que las herramientas de análisis no se encuentran especializadas en protozoos, además que, la función se encuentra dictaminada una vez que los polipéptidos adquieren su conformación terciaria. Es importante mencionar que *Giardia* es un protozoario amitocondriado por lo que no se esperaría que posea proteínas aconitasas.

A)

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G.Assemblage A2</i>	<i>G.Assemblage A</i>	<i>G.Assemblage B</i>		<i>G.Assemblage E</i>	<i>S.salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
3	2	0	1	1	1	0	0

B)

```
> GL50803_14790-t26_1-p1 | transcript=GL50803_14790-t26_1 | gene=GL50803_14790
| organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
gene_product=hypothetical protein | transcript_product=hypothetical
protein | location=GLCHR01:466729-467991(-) | protein_length=420
| sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=420

Score = 32.0 bits (71), Expect = 2.3, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 24/74 (32%), Positives = 33/74 (45%), Gaps = 2/74 (3%)
```

Fig. 28. Resultados de análisis *in silico* de IRP1 de *H. sapiens* en el proteoma de *G. duodenalis*. A) Sondeo con secuencia de IRP1 de *Homo sapiens* en el proteoma de *G. duodenalis*. B) Descripción de la secuencia obtenida del proteoma de *G. duodenalis* utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1 de humano.

b. Sondeo de proteínas tipo IRP de protozoarios en el proteoma y búsqueda de motivos de unión a ácidos nucleicos y RNA

1. Plasmodium falciparum

En el análisis *in silico* se incluyó a la proteína de unión a RNA reportada para *P. falciparum* denominada PfIRPa (número de acceso CAB41452.1), la cual tiene la capacidad de unirse a IREs putativos del parásito así como a IREs consenso de mamífero (Loyevsky et al. 2003). Al sondearse la secuencia aminoacídica de esta proteína en el proteoma de *G. duodenalis* se obtuvieron 2 posibles ortólogos (Figura 29).

Ambos fueron analizados en búsqueda de sitios de unión a ácidos nucleicos y ninguno mostro motivos de reconocimiento específicos para ARN o DNA (Cuadro 13), por lo que fueron descartados como posibles proteínas tipo IRP en el protozoario.

Query= MySeq1

Length=909

	Score	E
GMRT_13612-t45_1-p1 transcript=GMRT_13612-t45_1 gene=GMRT_1...	32.7	1.8
SS50377_16757-t26_1-p1 transcript=SS50377_16757-t26_1 gene=...	31.2	3.2

Fig. 29. Resultados de análisis *in silico* de la sonda PfIRPa de *P. falciparum* en el proteoma de *G. duodenalis* para el aislado WB.

Cuadro 13. Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de fIRPa de *P. falciparum* en el proteoma de *G. duodenalis*.

NÚMERO DE ACCESO*	NOMBRE DEL PRODUCTO	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)	IDENTIDAD (%)	# SITIOS DE UNIÓN*
<u>GMRT_13612-t45_1-p1</u>	Proteína hipotética	776	86.14	38	0
<u>SS50377_16757-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	163	18.09	46	0

3.

5. *Trichomonas vaginalis*

También se realizó un análisis *in silico* para las proteínas de unión a RNA que participan en el sistema IRE/IRP-like en *Trichomonas vaginalis*. Las proteínas que reporta la literatura son: α -Actina 3 (TvACT3: TVAG 239310) (Calla-Choque et al. 2014) proteínas de choque térmico (HSP70-4: TVAG_044510) y actinas (TVAG_054030, TVAG_200190) (Figuroa-Angulo et al. 2015), las cuales son proteínas con interacción a RNAm, citoplasmáticas, con pesos moleculares de 135, 70 y 45 kDa respectivamente, a las cuales se le ha demostrado una multifuncionalidad ya que además de desempeñar las funciones propias de su grupo participan en el sistema de regulación post-transcripcional por hierro en este protozoario (Figuroa-Angulo et al. 2015).

El análisis *in silico* en busca de proteínas de unión a RNA (RBP, por sus siglas en inglés, “RNA-binding proteins”) en *G. duodenalis* para ortólogos de TvACT3 en el aislado WB (Figura 30 y Cuadro 14), arrojó 4 productos proteicos, llamando la atención que ninguno de los posibles ortólogos superó el 30% de identidad, esto aunado a que la longitud en aminoácidos es mayor, además de que ninguno de estos productos proteicos presentó dominios de unión a ácidos nucleicos, lo que dificultaría su acción como proteínas de unión a RNA o RBPs y su participación en un sistema de regulación por hierro en el protozoario.

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G. Assemblage A2</i>	<i>G. Assemblage A</i>	<i>G. Assemblage B</i>		<i>G. Assemblage E</i>	<i>S. salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
20	6	4	4	4	3	5	0

Fig. 30. Resultados de análisis *in silico* de la sonda TvACT3 de *T. vaginalis* en el proteoma de *G. duodenalis* para el aislado WB.

Cuadro 14. Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de TvACT3 en el proteoma de *G. duodenalis*.

NÚMERO DE ACCESO*	NOMBRE DEL PRODUCTO	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)	IDENTIDAD (%)	# SITIOS DE UNIÓN*
<u>GL50803_104685-t26_1-p1</u>	Calcitrina	176	19.36	26	0
<u>GL50803_5333-t26_1-p1</u>	Calmodulina	153	16.83	23	0
<u>GL50803_6744-t26_1-p1</u>	Centrina	161	17.71	24	0
<u>GL50803_7599-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	641	70.51	27	0

*Motivos de interacción con ácidos nucleicos.

El análisis también incluyó dos actinas (TVAG_054030, TVAG_200190) por su acción como IRP-like en *T. vaginalis*, las cuales adquieren función de RBPs en condiciones de restricción de hierro, la búsqueda de ortólogos para las sondas TVAG_054030 y TVAG_200190 (ambos actina) (Figura 31), arrojó para TVAG_054030 Actina putativa de *T. vaginalis* 7 productos proteicos, mientras que, para TVAG_200190, también arrojó 7 productos proteicos. Es importante destacar que eran los mismos 7 productos para ambas sondas de actina (Cuadro 15). El análisis en busca de sitios de unión a ácidos nucleicos evidenció que ninguno de los posibles ortólogos poseía sitios reportados que pudiesen interactuar con el RNAm, por lo que se hipotetiza que las proteínas que actúen como elementos *trans* e interactúen con los elementos *cis* reportados para el parásito, son proteínas con naturaleza multifuncional como las proteínas IRP-like de *Trichomonas vaginalis*.

A)

All Results	Ortholog Groups	Giardia					Spironucleus
		G.Assemblage A2	G.Assemblage A	G.Assemblage B		G.Assemblage E	S.salmonicida
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
7	7	0	7	0	0	0	0

B)

All Results	Ortholog Groups	Giardia					Spironucleu	Re
		G.Assemblage A2	G.Assemblage A	G.Assemblage B		G.Assemblage E	S.salmonicida	
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377	
7	7	0	7	0	0	0	0	

Fig. 31. Resultados de análisis *in silico* de las sondas de Actina TVAG_054030, TVAG_200190 de *T. vaginalis* en el proteoma de *G. duodenalis* para el aislado WB. A) TVAG_054030, B) TVAG_200190.

Cuadro 15. Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de sondas de actina en el proteoma de *G. duodenalis*.

NÚMERO DE ACCESO*	NOMBRE DEL PRODUCTO	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)	IDENTIDAD (%)	# SITIOS DE UNIÓN*
<u>GL50803_40817-t26_1-p1</u>	Proteína relacionada con Actina	375	41.25	58	0
<u>GL50803_15113-t26_1-p1</u>	Actina	467	51.37	26	0
<u>GL50803_16172-t26_1-p1</u>	Proteína relacionada con Actina	344	37.84	20	0
<u>GL50803_11039-t26_1-p1</u>	Actina	870	95.7	21	0
<u>GL50803_94510-t26_1-p1</u>	Precursor de Tenacina-X	1063	116.93	26	0
<u>GL50803_21362-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	36	3.96	72	0
<u>GL50803_35180-t26_1-p1</u>	GTOR	3277	360.47	38	0

*Motivos de interacción con ácidos nucleicos

Se decidió ampliar el análisis *in silico* y hacer una búsqueda generalizada de actinas en el protozoo directamente en el programa GiardiaDb, para el que se obtuvieron 21 proteínas en el aislado WB (Figura 32, Cuadro 16) que pudiesen ser ortólogos de la actina, estos productos proteicos se analizaron en búsqueda de dominios de unión a ácidos nucleicos, para los cuales solo el producto identificado como una glicerol quinasa (GL50803_8173) en *Giardia* expuso cuatro dominios, los cuales son motivos de reconocimiento a ácidos nucleicos RRM, BHD_3, Bac_DnaA_C y HRDC dominios de unión a ácidos nucleicos. Es importante mencionar que estos se encuentran reportados anteriormente en otros microorganismos y están específicamente relacionados con su interacción con ácidos nucleicos según la base de datos de SMART.

RRM se encuentra definido como un motivo de reconocimiento del RNA, y se encuentra conformado por aproximadamente 90 aa que se unen a la cadena de RNA, así mismo se ha encontrado su presencia y acción en algunos eucariotes. BHD_3 es un motivo corto reportado como parte de la proteína Rad4 la cual participa en la reparación de errores del DNA, la función específica de este dominio se encuentra definida como de unión a DNA. El dominio Bac_DnaA_C se encuentra reportado en proteínas bacterianas con una función de regulación de la replicación y con unión a secuencias específicas de DNA. Por último, el dominio HRDC se ha definido como una helicasa y RNasa y se encuentra relacionado con la unión a ácidos nucleicos (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>). La presencia de estos dominios de unión y su tamaño molecular de 540 aa (59.4 kDa) lo colocan como fuerte candidato a tener una multifuncionalidad y participar como una RBP en un sistema de regulación por hierro tipo IRE/IRP de células eucariotas.

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G.Assemblage A2</i>	<i>G.Assemblage A</i>	<i>G.Assemblage B</i>		<i>G.Assemblage E</i>	<i>S.salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
140	37	16	21	17	19	21	46

Fig. 322. Resultados de análisis *in silico* de la búsqueda directa de Actina en el proteoma de *G. duodenalis*.

Cuadro 16. Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de la búsqueda directa de actina en el proteoma de *G. duodenalis*.

NUMERO DE ACCESO*	NOMBRE DEL PRODUCTO	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)	# SITIOS DE UNIÓN*
GL50803_11039	Proteína relacionada con Actina	870	95.7	0
GL50803_13273	Cadena Ligera Intermedia de Dineína	235	25.85	0
GL50803_14581	Proteína chaperona de DnaK HSP70	640	70.4	0
GL50803_15113	Actina	467	51.37	0
GL50803_16172	Proteína relacionada con Actina	344	37.84	0
GL50803_16299	Sda1- Despolimeración severa de actina	863	94.93	0
GL50803_16356	Supresor de Actina 1	582	64.02	0
GL50803_16412	Proteína de Choque térmico, putativa	845	92.95	0
GL50803_1695	Rab 11	216	23.76	0
GL50803_17121	Bip	677	74.47	0
GL50803_17420	O-Sialoglicoproteína endopeptidasa	396	43.56	0
GL50803_17432	HSP70	1243	136.73	0
GL50803_17591	Proteína hipotética	381	41.91	0
GL50803_2285	Proteína hipotética	618	67.98	0
GL50803_40817	Proteína relacionada con Actina	375	41.25	0

GL50803_5857	Pantotenato Quinasa 4	359	39.49	0
GL50803_8173	Glicerol Quinasa	540	59.4	4
GL50803_8589	Supresor de Actina 1	702	77.22	0
GL50803_8726	Proteína relacionada con Actina	968	106.48	0
GL50803_8826	Glucoquinasa	346	38.06	0
GL50803_88765	HSP70 Citosólica	664	73.04	0

*Motivos de interacción con ácidos nucleicos

Otro de los candidatos sondeados dentro del proteoma de *Giardia* fue la proteína HSP70-4 de *T. vaginalis* con número de acceso TVAG_044510, la cual es una proteína putativa del protozoo con una extensión de 659 aa, para la cual se obtuvieron 10 posibles ortólogos en el proteoma del aislado WB (Figura 33, Cuadro 17), y aunque no se descarta su posible función como RBP, en el análisis en búsqueda de dominios de interacción con ácidos nucleicos no se obtuvo ningún resultado.

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G.Assemblage A2</i>	<i>G.Assemblage A</i>	<i>G.Assemblage B</i>		<i>G.Assemblage E</i>	<i>S.salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
10	9	0	10	0	0	0	0

Fig. 33. Resultados de análisis *in silico* del sondeo de HSP70-4 de *T. vaginalis* en el proteoma de *G. duodenalis*.

Cuadro 1. Secuencias aminoacídicas obtenidas del sondeo de HSP70-4 de *T. vaginalis* en el proteoma de *G. duodenalis*.

NÚMERO DE ACCESO*	NOMBRE DEL PRODUCTO	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)	IDENTIDAD (%)	# SITIOS DE UNIÓN*
<u>GL50803_88765-t26_1-p1</u>	HSP70 Citosólica	664	73.04	59	0
<u>GL50803_17121-t26_1-p1</u>	BIP	677	74.47	52	0
<u>GL50803_17121-t26_1-p1</u>	Proteína Chaperona DnaK HS70	340	37.4	38	0
<u>GL50803_16412-t26_1-p1</u>	Proteína de Choque Térmico, putativa	845	92.95	25	0
<u>GL50803_17432-t26_1-p1</u>	HSP70	1243	136.73	26	0
<u>GL50803_2285-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	618	67.98	25	0
<u>GL50803_11640-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	909	99.99	26	0
<u>GL50803_113673-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	1649	181.39	29	0
<u>GL50803_35332-t26_1-p1</u>	Proteína hipotética	1577	173.47	22	0
<u>GL50803_99108-t26_1-p1</u>	Inespcífico	87	9.57	34	0

*Motivos de interacción con ácidos nucleicos

Asimismo, se realizó una búsqueda general *in silico* en GiardiaDB, buscando directamente proteínas relacionadas con el hierro, a partir del cual se obtuvieron 297 productos proteicos para el aislado WB (Figura 34), estas 297 secuencias de aminoácidos se sometieron a un análisis para el sondeo en busca de dominios de unión a ácidos nucleicos, es decir que tengan funcionalidad como RBPs, donde sólo once productos proteicos mostraron sitios de unión (Cuadro 18).

Es importante resaltar que entre ellas destacan las proteínas de superficie variante-específicas (VSP, “Variant-Specific Surface Proteins”; por sus siglas en inglés), las proteínas hipotéticas y una proteína Piwi, que se pensaba no estar presente en este protozooario. Piwi es uno de los dominios mayor caracterizados en las RBPs.

Es importante recalcar que de estas 11 proteínas solo 5 mostraron capacidad de unión tanto a DNA como RNA y solo uno de estos productos ortólogos resultó específico para RNA, el cual es una proteína hipotética de aproximadamente 80 KDa, por lo que se puede suponer que, como en *G. duodenalis*, las proteínas reguladoras por hierro podrían ser multifuncionales al igual que en *T. vaginalis*.

All Results	Ortholog Groups	<i>Giardia</i>					<i>Spironucleus</i>
		<i>G.Assemblage A2</i>	<i>G.Assemblage A</i>	<i>G.Assemblage B</i>		<i>G.Assemblage E</i>	<i>S.salmonicida</i>
		isolate DH	isolate WB	isolate GS_B	isolate GS	isolate P15	ATCC50377
1492	193	218	297	611	78	221	67

Fig. 34. Resultados de análisis *in silico* de la búsqueda directa de proteínas relacionadas con hierro en el proteoma de *G. duodenalis*.

Cuadro18. Secuencias aminoacídicas obtenidas de la búsqueda de proteínas relacionadas con el hierro en el proteoma de *G. duodenalis* que mostraron motivos de unión a ácidos nucleicos.

GEN ID	NOMBRE	FUNCIÓN **	# SITIOS DE UNIÓN TOTAL	NOMBRE DEL DOMINIO DE UNIÓN	UNIÓN ESPECÍFICA	LONGITUD (aa)	PESO MOLECULAR (KDa)
GL50803_2902	Proteína-Piwi, putativa	Unión a Ácidos Nucleicos	1	Piwi	Ácidos Nucleicos	900	99
GL50803_2732	Proteína hipotética	ND ²	1	helix-tum-helix XRE de unión a DNA	DNA	107	11.77
GL50803_103001	VSP ¹	ND ²	1	RPOL9 RNA Polimerase subunit 9	DNA	615	67.65
GL50803_114674	Proteína hipotética	Proteína de Unión	1	Doble cadena de unión a RNA	RNA	720	79.2
GL50803_115796	VSP ¹	ND ²	1	ZnF_C2H2 dominio	Ácidos Nucleicos	188	20.68
GL50803_137761	VSP ¹	ND ²	1	ZnF_A20 tipo dedos de zinc	DNA	164	18.04
GL50803_124980	VSP ¹	ND ²	1	Tipo GAL4	DNA	98	10.78
GL50803_105759	VSP ¹	ND ²	1	Tipo GAL4	DNA	183	20.13
GL50803_134711	VSP ¹ , putativa	ND ²	1	ZnF_A20 Dedos de zinc	DNA	137	15.07
GL50803_221693	Proteína hipotética	ND ²	1	ZnF_C2H2	Ácidos Nucleicos	2259	248.49
GL50803_137714	VSP	ND ²	7	ZnF_C4 C4 Dedos de zinc en hormona nuclear	DNA	524	57.64

ZnF_C2H2 dominio	Ácidos Nucleicos
RPOL9 RNA Polimerase subunit 9	DNA
Zn_GATA Dedos de Zinc,	DNA
ZnF_C2H2	Ácidos Nucleicos
ZnF_A20 Dedos de Zinc	DNA
GAL4 GAL 4like Zn	DNA

¹ VSP, por sus siglas en inglés, "Variant-specific surface proteins", ² ND: No disponible, *Sitios de unión a ácidos nucleicos (DNA y RNA).

Estos resultados ofrecen una gama de 340 posibles ortólogos de proteínas tipo IRP en *G. duodenalis*, de los cuales 12 mostraron tener la capacidad de interactuar con ácidos nucleicos y solo 2 tener la capacidad de interactuar con RNA específicamente. Las proteínas capaces de interactuar con el RNA, según estos resultados, son una proteína hipotética de aproximadamente 80 kDa y una proteína glicerol quinasa con un peso molecular aproximado de 60 kDa.

Es importante recalcar que se obtuvieron dos posibles ortólogos a IRP-like con dominios de interacción a RNA y que además no se puede descartar por completo ninguna de las secuencias analizadas *in silico* ya que faltarían ensayos experimentales para descartar dicha función.

Los resultados mostrados en este trabajo coinciden con los experimentos realizados por Reyes-Sánchez en 2016, donde interactuó extractos citoplasmáticos del protozooario con anticuerpos anti-IRP1 y anti-IRP2 de humano (Figura 35) y observó reconocimiento solo con el anti-IRP1h de una banda de aproximadamente 90 kDa en condiciones de restricción de hierro, esta proteína coincide con el peso molecular aproximado de la proteína hipotética reportada en este análisis, además de apoyar el supuesto de que ésta puede actuar como proteína regulada por hierro, ya que la interacción se observa solo en condiciones de restricción de hierro, que es en la condición donde las proteínas IRP se encuentran activas en el sistema IRE/IRP en mamíferos (Pérez et al. 2005).

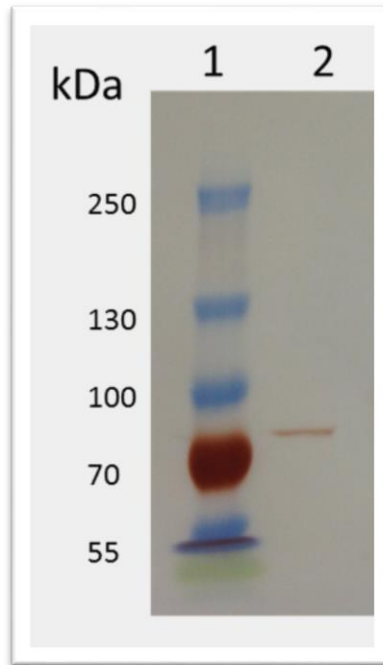


Fig. 35. Posibles IRPs en *G. duodenalis*. Ensayo de Western Blot utilizando extractos citoplasmáticos de *G. duodenalis* en condiciones de restricción de hierro. Línea 1, marcadores de tamaño molecular. Línea 2, Extractos citoplasmáticos obtenidos de parásitos crecidos en restricción de hierro e interaccionando con el anti-IRP2. Se utilizó un anti-IRP2 (ThermoFisher Scientific), producido a partir de un péptido sintético correspondiente a los residuos N-terminales 1-100 de la IRP2 humana (UnitProt P48200). (Adaptada de Reyes-Sánchez, 2016).

D. Estandarización de técnicas de Extractos Citoplasmáticos, Transcripción *in vitro* y Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética con RNA (REMSA, por sus siglas en inglés).

1. Obtención de Proteínas Citoplasmáticas de *G. duodenalis*

La obtención de las proteínas citoplasmáticas del parásito fue el primer paso experimental realizado para establecer si en *G. duodenalis* existe algún sistema homólogo parecido al sistema IRE/IRP de las células eucariotes; por lo que se extrajo la fracción citoplasmática celular del parásito, esto porque las proteínas IRP1 y IRP2 que participan en el sistema anteriormente mencionado se localizan en el citoplasma de las células (Pérez et al. 2005; Rouault, 2006).

Las proteínas citoplasmáticas fueron extraídas y visualizadas a través de la técnica de extractos citoplásmicos y electroforesis en SDS-PAGE descritas anteriormente en materiales y métodos. Las proteínas se interaccionaron con el IRE de ferritina de humano (Feh) y con el IRE de Actina de *G. duodenalis* (Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación). Los resultados de integridad de los extractos citoplasmáticos de *G. duodenalis* se muestran en la Figura 36, donde se puede observar un patrón de bandeo de proteínas citoplásmicas dependiente de la condición de hierro en la que se crecieron los trofozoitos.

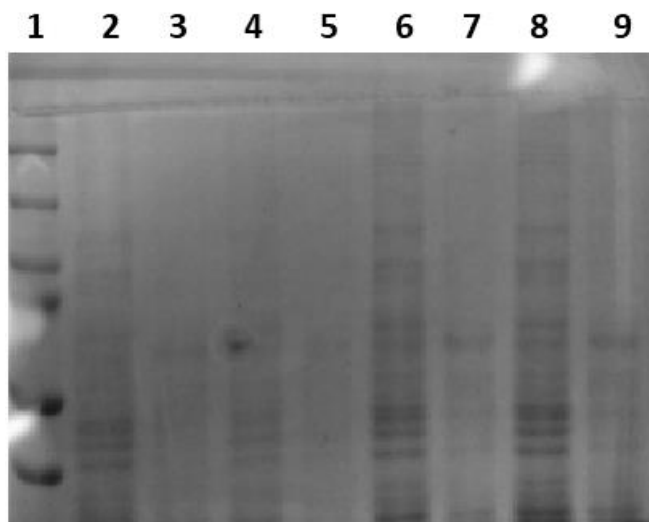


Fig. 36. Extractos Citoplasmáticos de *G. duodenalis*. Gel SDS-PAGE. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular, Carriles 2, 5 y 8: Extractos Citoplasmáticos de parásitos crecidos en restricción de hierro; Carriles 3, 6 y 9: Extractos citoplasmáticos de parásitos crecidos en condición normal de hierro; Carriles 4,7 y 10: Extractos citoplasmáticos de parásitos crecidos en condiciones altas de hierro.

2. Obtención de amplicones para construcción de IREs *in vitro*

El segundo paso para dilucidar la presencia del sistema homólogo en *G. duodenalis* fue obtener IREs de RNAm de humano y del parásito, estos fueron sintetizados a través de la técnica de PCR, los templados utilizados contienen la secuencia de unión de la T7 RNA polimerasa como se describe a profundidad en la sección de materiales y métodos, estos amplicones se basaron en secuencias nucleotídicas reportadas anteriormente (Soto-Castro et al. 2017), los oligonucleótidos fueron diseñados en base a las estructuras tallo-burbuja en RNAm's reportadas por Plata-Guzman et al. (2021, en preparación) en *G. duodenalis*, estas codifican para diversas proteínas, entre las que se seleccionó una proteína del citoesqueleto (Actina), esto a partir de la evidencia experimental lograda por nuestro equipo de trabajo, donde se demostró que la expresión de este gen es afectada por la ausencia de hierro en el microambiente donde se desarrolla (Quintero-Gallegos, 2016), además que esta proteína es de vital importancia en el proceso de virulencia del parásito, específicamente en la acción de unión del disco ventral a las células epiteliales del intestino (Vázquez and Campos, 2009).

Los diversos amplicones fueron utilizados para la transcripción *in vitro*, la integridad de los amplicones se observó en geles de agarosa al 3% (Figura 37).

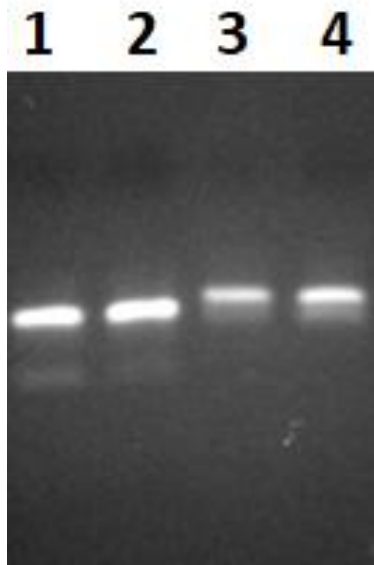


Fig. 37. Gel de integridad de amplicones de PCR. Carriles 1 y 2: Amplicones de Ferritina humana. Carriles 3 y 4: Amplicones de Actina de *G. duodenalis*.

3. Transcripción *in vitro* de IREs

Los transcritos se generaron con el kit AMBION® y el DNA molde que se obtuvo de los productos de PCR de cada amplicón, como se describe ampliamente en la sección de materiales y métodos. La integridad de los transcritos obtenidos se observó en geles de agarosa al 3%, ya que observar la integridad del RNA es vital para la obtención de complejos en los ensayos REMSA, pues si la calidad del RNA es dudosa no se podrá observar la interacción RNA-proteína (Figura 38).

Así mismo, una vez sintetizado el RNA *in vitro* se procedió a la formación de las horquillas la cual era fundamental para nuestro propósito, ya que esta conformación es la que permite a los IREs la unión a las proteínas (Hentze et al. 1998).

E. Presencia de un sistema heterólogo y homólogo tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*.

1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética REMSA

El primer paso para obtener los resultados en los REMSA, fue estandarizar la técnica, esto se logró a través del seguimiento de la metodología anteriormente descrita con algunas modificaciones descritas ampliamente en la sección de materiales y métodos. El primer experimento realizado fue la interacción entre los extractos citoplasmáticos de *G. duodenalis* en condiciones normales de crecimiento (normales: 90mM) y el IRE_{feh}, en donde se observó la formación de complejos que demuestran la existencia de un sistema heterólogo tipo IRE/IRP en el parásito, es decir, que el IRE_{feh} se une de manera exitosa a alguna proteína o proteínas presentes en la fracción citoplasmática de *G. duodenalis*, lo cual coincide con lo reportado para otros parásitos amitocondriados como lo son *E. histolytica* y *T. vaginalis* (León-Sicairos, 2007; Solano-González et al. 2007; Soto-Castro et al. 2017).

La formación de estos complejos se puede observar en la Figura 38 descrita a continuación, en el carril 1 se corrió la sonda libre, es decir el IRE_{feh} solo, en este carril no podemos observar complejos ya que no existe la unión del IRE con proteínas tipo IRP, en el carril 3 se interaccionaron

los EC e IREfeh adicionando β -mercaptoetanol, esto por que el β -mercaptoetanol es un agente reductor que permite desplegar completamente las subunidades de las proteínas a través del rompimiento de los enlaces disulfuro (Young-Jin et al. 2008), lo que tendría como consecuencia una unión RNA-proteína mas específica entre el EC y el IREfeh, esto se ve apoyado en la capacidad de las proteínas de cambiar su estructura terciaria y cuaternaria de acuerdo a los microambientes de la célula, como es el caso de la IRP1 en células eucariotas, la cual cambia su conformación y por ende su función dependiendo de la concentración de hierro en la ambiente intracelular (Wilkinson and Pantopoulos, 2014). Por su parte en el carril 5 se interaccionó la fracción citoplasmática con el IREfeh adicionando además de β -mercaptoetanol con RNAsa, esto con el fin de desnaturalizar el RNA libre o que no se haya unido a ninguna proteína. La importancia de adicionar RNAsas al complejo es que en esta interacción solo veremos complejos RNA-proteína dejando de lado RNA transcrito *in vitro* que no se haya unido (Lee and Schedl, 2006; Ullu et al. 2004). En el carril 7 se interaccionaron directamente los EC y los IREfeh, sin ningun aditivo, como podemos observar en el gel los complejos formados se observan de manera más intensa, esto podría ser ocasionado por la presencia de algún resto de IREfh no unido.

Algo a resaltar en esta figura es que la presencia del complejo IREfeh-EC que confirma la presencia de alguna proteína o proteínas con capacidad de unión al IRE consenso, además que nuestros resultados coinciden con lo reportado anteriormente por nuestro equipo de trabajo en 2016 por Reyes-Sánchez, quien reportó que en los EC de *G. duodenalis* existían proteínas con la capacidad de unirse a anticuerpo de IRP1 e IRP2 de humano, es decir que existían proteínas similares a estas en la fracción citoplasmática del parásito; así mismo esto coincide con los reportado por Burrola-Barraza en 2001, quien reportó el reconocimiento de proteínas por los anticuerpos anti-IRP en *T. vaginalis*, donde después se confirmó un sistema homólogo tipo IRE/IRP (Burrola-Barraza, 2001; León-Sicairos, 2007; Solano-González et al. 2007; Reyes-Sánchez, 2016).

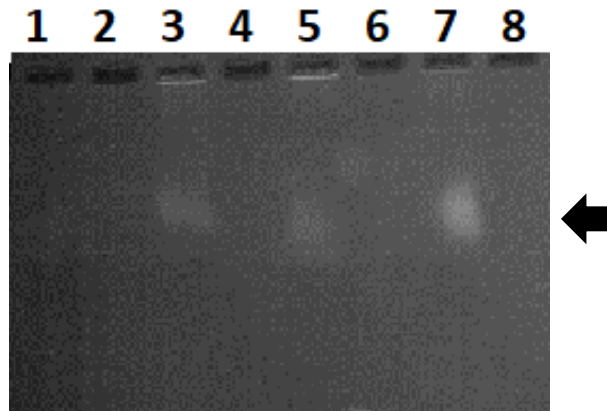


Fig. 38. Gel de interacción de extractos citoplasmáticos (EC) en condiciones normales de cultivo del parásito con el IRE de ferritina de humano (IREfeh). Carril 1: Sonda libre de IREfeh. Carril 2,4,6 y 8 libres. Carril 3: Interacción entre EC e IREfeh adicionando β -mercaptoetanol, Carril 5: Interacción entre EC e IREfeh de humano adicionando β -mercaptoetanol y ribonucleasas. Carril 7: Interacción entre EC e IREfeh.

El siguiente paso fue interaccionar las diversas condiciones de hierro (restricción y alto) con el IREfeh, esto para tratar de imitar las condiciones intracelulares en donde se observa la formación de complejos en las células eucariotas y amitocondriadas reportadas en la literatura (Pérez et al. 2005; Wang and Pantopoulos, 2011). En la Figura 39, se puede observar la interacción en ambas condiciones, lo que sugiere la presencia de un sistema heterólogo tipo IRE/IRP (Carril 2, 4, 6 y 8) con un comportamiento análogo en el parásito, así mismo es importante destacar que la formación de complejos se acentúa en condiciones de restricción de hierro, lo que coincide con la activación de las proteínas tipo IRP en humanos y los resultados experimentales obtenidos en nuestro laboratorio (Plata-Guzmán et al. 2021; en preparación, Reyes-Sánchez 2016).

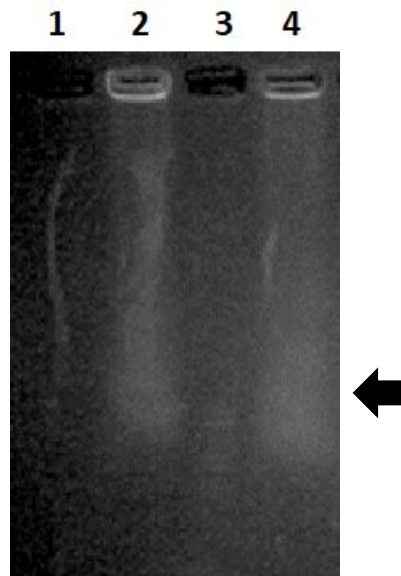


Fig. 39. Formación de complejos IREfeh con EC en *G. duodenalis*. Gel de Interacción entre los Extractos Citoplasmáticos en condiciones de cultivo de Restricción y Alto hierro del parásito con IREfeh. Carril 1: Sonda Libre IREfeh, Carril 2: Extractos citoplásmicos en restricción de hierro interaccionando con el REfeh, Carril 3: sin muestra, Carril 4: Extractos citoplásmicos en alto hierro interaccionando con el REfeh, los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para demostrar la presencia de un sistema homólogo tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*, primeramente, se interaccionaron los EC en crecimiento normal con un IRE de *G. duodenalis*. El IRE utilizado en este trabajo fue el de actina. El RNAm de Actina presenta una estructura IRE-like localizado en el extremo 5' de la región UTR (Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación). Actina es una proteína del citoesqueleto celular que al exponerse a ambientes de estrés sufre alteraciones morfológicas como lo reporta Iñigo-Figueroa en 2016, quien expuso al parásito a altas concentraciones de Zinc y observó alteraciones topológicas. Por otra parte, se ha demostrado que Actina tiene suma importancia en la unión del disco ventral a la células epiteliales del intestino en conjunto con los microtúbulos de tubulina (Trejos-Suárez and Castaño-Osorio, 2009). Interesantemente, en nuestro grupo de trabajo se ha observado que la expresión del RNAm de Actina se ve afectada por la concentración de hierro en el medio; en condiciones de alto hierro la expresión de actina se ve aumentada (Quintero-Gallegos, 2016) lo que correlaciona con la posición del IRE-like presente en su región 5'UTR (Plata-Guzmán et al. 2021, en preparación).

En la Figura 40, se puede observar la interacción entre los EC crecidos en condiciones normales con el IREfeh y el IRE de Actina de *G. duodenalis*. En la imagen se aprecia la formación de complejos con ambos IREs, con el IREAct en el carril 4 y con IREde Feh en el carril 8, ambos señalados por flechas de color negro. Estos resultados sugieren la presencia de un sistema homólogo en el parásito, sin embargo, es necesario interaccionar los EC en restricción y alto hierro para complementar estos estudios.

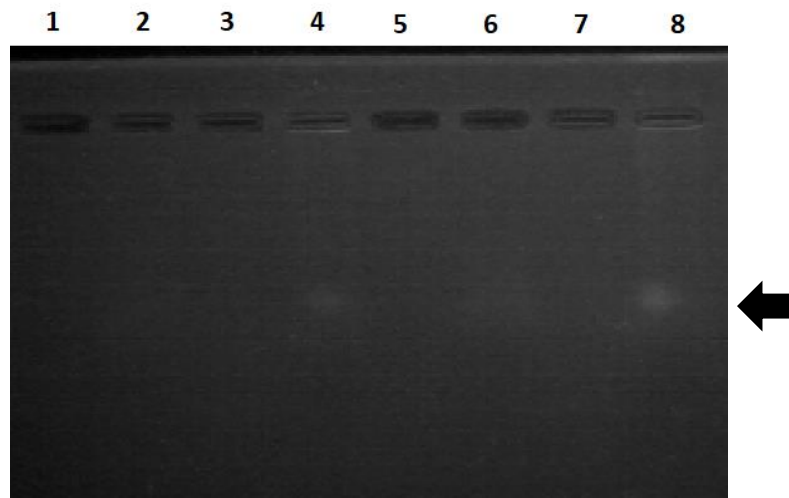


Fig. 40. Formación de complejos entre IREs y proteínas citoplasmáticas de *G. duodenalis*. Interacción entre los extractos citoplasmáticos del parásito con el IREfeh y el IRE de Actina de *G. duodenalis*. Carril 1: Sin muestra, Carril 2: Sonda Libre de IREAct, Carril 3: sin muestra, Carril 4: Extractos citoplasmáticos del parásito interaccionando con el IRE-like de Actina del parásito. Carril 5: sin muestra, Carril 6: Sonda Libre IREfeh, Carril 7: sin muestra, Carril 8: Extractos citoplasmáticos del parásito interaccionando con el IRE de ferritina de humano (IRE Feh).

Para demostrar la presencia de un sistema homólogo tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*, se interaccionaron las proteínas citoplasmáticas del parásito con el IRE-like de Actina de Giardia. En la Figura 41, se puede observar la interacción entre los EC de trofozoítos crecidos en condiciones de restricción y alto hierro con el IREfeh y el IRE de Actina de *G. duodenalis*.

En la Figura 41, se puede observar la formación de complejos con ambos IREs, como era de esperarse se da la formación de complejos con el IRE de Ferritina de humano, mismos que también se formaron en interacción con el IRE de Actina de *G. duodenalis*, sugiriendo la existencia de un sistema homólogo tipo IRE/IRP en el parásito. Como se puede observar en el apartado B de la figura 41, se forman dos complejos al interaccionar el IRE de *Actina* de Giardia con los extractos del parásito, los cuales se encuentran señalados con flechas de color rojo. Algo que llama la atención en estos complejos es que se forman en todas las condiciones de hierro. Como perspectiva sería necesario realizar dichos ensayos con los extractos de proteínas citoplasmáticas cuantificadas y posteriormente interaccionar con competidores para demostrar tanto la cantidad como la especificidad de la unión.

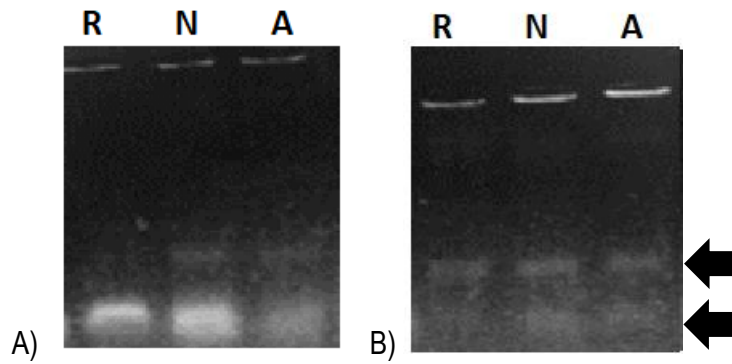


Fig 41. Formación de complejos RNA-proteínas en cultivos de *G. duodenalis* en diferentes condiciones de hierro. Interacción entre los EC en diferentes condiciones de hierro con IRE de ferritina de humano y con IRE-like de Actina de *G. duodenalis*. A) EC en R: Restricción, N: Normales, y A: Alto hierro en interacción con IREfeh. B) EC en R: Restricción, N: Normales, y A: Alto hierro en interacción con IRE-Act.

VII. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se identificaron factores de virulencia regulados por hierro en *E. histolytica*. Se identificaron CPs (EhCP1, 2, 3, 4, 5 y 6), proteínas de unión a Hb (Ehhmbp 26 y 45), proteínas de oxidación reducción (Fe-SOD, Aldosa reductasa, EhADH2 y EhNO₂) y proteínas de organización del citoesqueleto (Actina y Actobindina).
2. Por otra parte, se identificaron factores de virulencia regulados por hierro en *G. duodenalis*. Se identificaron proteínas de membrana con alto contenido de cisteína y proteínas de respuesta al estrés oxidativo sugiriendo la presencia de un sistema de respuesta al estrés por hierro.
3. Se identificaron y caracterizaron *in silico* proteínas tipo IRP en *E. histolytica*. Los estudios del presente trabajo sugieren que las proteínas actininas, actinas o chaperonas de DNAK podrían tener la función reguladora de hierro.
4. Se identificaron y caracterizaron *in silico* proteínas tipo IRP en *G. duodenalis* y se sugiere que las proteínas variantes de superficie (VSP) podrían tener dicha función.
5. Se estandarizaron metodologías para ensayos de interacción RNA-proteínas sin marcaje radiactivo.
6. El IRE de *Ferritina* de humano (IREfeh) se une a proteínas citoplasmáticas de *G. duodenalis* sugiriendo la presencia de un sistema heterólogo tipo IRE/IRP en dicho parásito.
7. El IRE-like de *Actina* de *G. duodenalis* se une a proteínas citoplasmáticas del parásito sugiriendo la presencia de un sistema IRE/IRP homólogo. Es decir, que en el citoplasma del parásito existe una o varias proteínas capaces de interactuar con los IREs propios del parásito.

VIII. ABREVIATURAS

°C	Centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
A	Adenina
aa	Aminoácidos
Apo-Tf	Apotransferrina
ATP	Adenosin trifosfato
C	Citosina
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CP	Cistein proteinasa
CTP	Citidina trifosfato
d	Día
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMT1	(Transportador de Dimetales 1)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
Fe	Hierro
g	Gramos
G	Guanina
GTP	Guanosin trifosfato
h	Hora
Hb	Hemoglobina
Hgl	Subunidad pesada de la proteína
Hirp-1	Proteína regulada por hierro 1 de humano
Holo-Tf	Holotransferrina
Ig	Inmunoglobulinas
Inr	Elemento iniciador de transcripción

IPN	Instituto Politécnico Nacional
IRE	“Iron responsive element” (Elemento de respuesta al hierro)
IRP	“Iron regulatory protein” (Proteínas Reguladoras de Hierro)
K	Kilogramo
K	Potasio
KDa	Unidad de masa atómica o kilo Daltones
L	Litros
Lf	Lactoferrina
Lgl	Subunidad ligera de la proteína
M	Molar
m	Minuto
Mb	Millón de bases
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mM	Milimolar
mRNA	“Messenger Ribonucleic acid” (Ácido Ribonucleico Mensajero)
Na	Sodio
NAD	Nicotianamida Adeninda Dinucleótido
NADP	Nicotianamida Adeninda Dinucleótido Fosfato
NC	Nitrocelulosa
ng	nanogramo
nM	nanoMolar
nt	Nucleótidos
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/ “World Health Organization”
P ³²	Fosforo 32
pb	Pares de bases
PBS	“Phosphate Buffered Saline” (Solución amortiguadora de fosfatos)
PCR	“Polymerase chain reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)
pg	Picogramo

pH	Potencial de Hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
Poli(A)	Cola de poliadeninas
rDNA	“Ribosomal Deoxyribonucleic acid” (Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal)
RNA	“Ribonucleic acid” (Ácido Ribonucleico)
RNAse	Nucleasa degradadora de RNA.
RTf	Receptor de transferrina
RTf	Receptor de Trasnferrina
SC	Suero de caballo
SDS	“Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide” (Dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	“Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio)
T	Timina
TAE	Amortiguador de Tris-Acetato
Tf	Transferrina
tRNA	“Transfer Ribonucleic acid” (Ácido Ribonucleico de transferencia)
U	Uracilo
UTP-biotina	Uridina trifosfato marcada con biotina
UTR	Untranslated Region (Regiones no traducidas)
UV	Ultravioleta
VCE	Volumen de Células Empaquetadas
TvACT3	α -Actinina 3 en <i>T. vaginalis</i>
TvHSP70-4	Proteína de Choque Térmico 70-4 en <i>T. vaginalis</i>
TvACT	Actina en <i>T. vaginalis</i>
HSP70	Proteína de Choque Térmico 70 en <i>T. vaginalis</i>
TvACT2	α -Actinina 2 en <i>T. vaginalis</i>
<i>Tvcp4</i>	Cisteín proteinasa 4 en <i>T. vaginalis</i>
<i>Tvcp12</i>	Cisteín proteinasa 12 en <i>T. vaginalis</i>
RBPs	“RNA-Binding proteis” (Proteínas de Unión al RNA)

EhCP5	Cistein Proteinasa 5 en <i>E. histolytica</i>
EhPRL21	Proteína Ribosomal 21 en <i>E. histolytica</i>
EhFESOD	Superóxido Dismutasa de Hierro en <i>E. histolytica</i>
Ehhmbbp26	Hemoglobinas 26 en <i>E. histolytica</i>

IX. LITERATURA CITADA

- Ackers, John P. and David Mirelman. 2006. "Progress in Research on *Entamoeba histolytica* Pathogenesis." *Current Opinion in Microbiology* 9:367–73.
- Adam, Rodney D. 2001. "Biology of *Giardia Lamblia*." *Clinical Microbiology Reviews* 14(3):447–75.
- Ali, Vahab, Tetsuo Hashimoto, Yasuo Shigeta, and Tomoyoshi Nozaki. 2004. "Molecular and Biochemical Characterization of D-Phosphoglycerate Dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: A Unique Enteric Protozoan Parasite That Possesses Both Phosphorylated and Nonphosphorylated Serine Metabolic Pathways." *European Journal of Biochemistry*.
- Ali, Vahab and Tomoyoshi Nozaki. 2007. "Current Therapeutics , Their Problems , and Sulfur-Containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by ' Amitochondriate ' Protozoan Parasites." *Clinical Microbiology Reviews* 20(1):164–87.
- Alparo Herrera, Indira. 2005. "Giardiasis y Desnutrición." *Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría* 44(3):166–73.
- Alvarado-Esquivel, Cosme, Luis Francisco Sánchez-Anguiano, and Jesús Hernández-Tinoco. 2015. "Seroepidemiology of *Leptospira* Exposure in General Population in Rural Durango, Mexico." *BioMed Research International* 2015(6):435–39.
- Alvarez-Sánchez, María Elizabeth, Leticia Avila-González, Cecilia Becerril-García, Loriz Viridiana Fattel-Facenda, Jaime Ortega-López, and Rossana Arroyo. 2000. "A Novel Cystein Proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* Involved in Cytotoxicity." *Microbial Pathogenesis*.
- AMSE, Asociación de Médicos de Sanianda Exterior. 2016. "Giardiasis. Epidemiología y Situación Mundial." <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/187>.
- Anaya-Velázquez, Fernando and Felipe Padilla-vaca. 2011. "Virulence of *Entamoeba histolytica*: A Challenge for Human Health Research." *Future Microbiology* 6(3):255–58.
- Ankarklev, Johan, Jon Jerlström-Hultqvist, Emma Ringqvist, Karin Troell, and Staffan G. Svärd. 2010. "Behind the Smile: Cell Biology and Disease Mechanisms of *Giardia* Species." *Nature Reviews Microbiology* 8(6):413–22.
- Ansell, Brendan R. E. Malcolm J. McConville, Louise Baker, Pasi K. Korhonen, Neil D. Young,

- Ross S. Hall, Cristian A. A. Rojas, Staffan G. Sv??rd, Robin B. Gasser, and Aaron R. Jex. 2015. "Time-Dependent Transcriptional Changes in Axenic *Giardia duodenalis* Trophozoites." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(12):1–24.
- Arguello-Garcia, R. C. Arguello-Lopez, A. Gonzalez-Robles, A. M. Castillo-Figueroa, and M. G. Ortega-Pierres. 2002. "Sequential Exposure and Assembly of Cyst Wall Filaments on the Surface of Encysting *Giardia duodenalis*." *Parasitology*.
- Arroyo, Rossana, Theresa Ochoa, Jung Hsiang Tai, and Mireya De La Garza. 2015. "Iron and Parasites." *BioMed Research International* 2015.
- Arroyo, Rossana and Esther Orozco. 1987. "Localization and Identification of an *Entamoeba histolytica* Adhesin." *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Bagchi, Susmita, Abraham E. Oniku, Kate Topping, Zahra N. Mamhoud, and Timothy A. Paget. 2012. "Programmed Cell Death in *Giardia*." *Parasitology*.
- Barros, P. A. Bussalleu, R. Tello, and J. Berrios. 1994. "[The Prevalence of Giardiasis in Patients Who Undergo Gastroduodenoscopy]." *Revista de Gastroenterologia Del Peru : Organo Oficial de La Sociedad de Gastroenterologia Del Peru*.
- Bartelt, Luther A. and R. Balfour Sartor. 2015. "Advances in Understanding *Giardia*: Determinants and Mechanisms of Chronic Sequelae." *F1000Prime Reports* 7(May):1–14.
- Basilion, James P. Tracey A. Rouault, Christina M. Massinople, and Richard D. Klausner. 1994. "The Iron-Responsive Element-Binding Protein : Localization of the RNA-Binding Site to the Aconitase Active-Site Cleft." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(January):574–78.
- Becerril Flores, Marco A. Hilda Lizbeth Pérez Herrera, and Andrés Salas Casas. 2014. "Amibiosis." P. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?> in *Parasitología Médica*.
- Bernal, G. 1997. "Disentería Amebiana." *Cirugía y Cirujanos* 65:151–56.
- Black, Paul N. and Concetta C. DiRusso. 2007. "Yeast Acyl-CoA Synthetases at the Crossroads of Fatty Acid Metabolism and Regulation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771:286–298.
- Botero, D. and M. Restrepo. 1992. *Parasitosis Humanas*. 2da ed. edited by C. para investigaciones biológicas Edición Colombia.

- Bouزيد, M. D. Steverding, and KM Tyler. 2008. "Detection and Surveillance of Waterborne Protozoan Parasites." *Current Opinion in Biotechnology* 19(3):302–6.
- Boyer, Laurie A. Robert R. Latek, and Craig L. Peterson. 2004. "The SANT Domain: A Unique Histone-Tail-Binding Module?" *Nature Publishing Group* 5(February):1–6.
- Bracha, R. and D. Mirelman. 1983. "Adherence and Ingestion of Escherichia Coli Serotype 055 by Trophozoites of Entamoeba Histolytica." *Infection and Immunity*.
- Bracha, Rivka, Yael Nuchamowitz, and David Mirelman. 2002. "Amoebapore Is an Important Virulence Factor of Entamoeba histolytica." *J. Biosci.*
- Bruchhaus, Iris and Egbert Tannich. 1994. "Induction of the Iron-Containing Superoxide Dismutase in Entamoeba histolytica by a Superoxide Anion-Generating System or by Iron Chelation." *Molecular and Biochemical Parasitology* 67:281–88.
- Burrola-Barraza, ME. 2001. "¿Existen IREs En Trichomonas vaginalis?" Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Busatti, HG, RJ Alves, KG Santana-Anjos, FF Gil, MC Cury, and MA Vannier-Santos, MA y Gomes. 2013. "Effects of Metronidazole Analogues on Giardia duodenalis: Experimental Infection y Cell Organization." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75(2):160–64.
- Butt, J, H. Y. Kim, J. P. Basilion, S. Cohen, K. Iwai, C. C. Philpott, S. Altschul, R. D. Klausner, and T. a Rouault. 1996. "Differences in the RNA Binding Sites of Iron Regulatory Proteins and Potential Target Diversity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(9):4345–49.
- Butt, Julea, Hae-Yeong Kim, James P. Basilion, Seth Cohen, Kazuhiro Iwai, Caroline C. Philpott, Stephen Altschult, Richard D. Klausner, and Tracey A. Rouault. 1996. "Differences in the RNA Binding Sites of Iron Regulatory Proteins and Potential Target Diversity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(9):4345–49.
- Cabrera-Licona, Ariana, Raul Arguello-Garcia, and Maria Guadalupe Ortega Pierres. 2020. "Giardiasis." *Parasitología*. Retrieved November 12, 2020 (<https://www.asieslamedicina.org.mx/giardiasis/>).
- Calla-Choque, Jaeson Santos, Elisa Elvira Figueroa-Angulo, Leticia Ávila-González, and Rossana Arroyo. 2014. "Actinin TvACTN3 of Trichomonas vaginalis Is an RNA-Binding Protein

- That Could Participate in Its Posttranscriptional Iron Regulatory Mechanism.” *BioMed Research International* 2014.
- Campos-Peralta, J. V. Sánchez-Monroy, and JD Villalba-Magdaleno. 2011. “*Entamoeba histolytica* y Su Relación Huésped-Parásito.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 31:63–70.
- Carlton, J. M.; Hirt, R. P.; Silva, J. C.; Delcher, A. L.; Schatz, M.; Zhao, Q.; Wortman, J. R.; Bidwell, S. L. et al. 2007. “DRAFT GENOME SEQUENCE OF THE SEXUALLY TRANSMITTED PATHOGEN *TRICHOMONAS VAGINALIS*.” *Science* 315:207–12.
- De Carvalho, Thaís Batista, Érica Boarato David, Silvana Torossian Coradi, and Semíramis Guimarães. 2008. “Protease Activity in Extracellular Products Secreted *in Vitro* by Trophozoites of *Giardia duodenalis*.” *Parasitology Research* 104(1):185–90.
- Casadevall, Arturo and Liise-anne Pirofski. 2001. “Host-Pathogen Interactions : The Attributes of Virulence.” *The Journal of Infectious Diseases* 184:337–44.
- del Castillo-Rueda, Alejandro and Parham Khosravi-Shahi. 2010. “Papel Del Hierro En La Interacción Entre El Huésped y El Patógeno.” *Medicina Clínica* 134(10):452–56.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2015. “Parasites-Amebiasis-*Entamoeba histolytica* Infection.” *Pathogen & Environment* CDC.gov.
- CDC, Centers of Disease Control and Prevention. 2020. “Parasites-Giardia.” *Pathogen & Environment* General information. Retrieved (<https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>).
- Chacín-Bonilla, Leonor. 2013. “Amebiasis: Aspectos Clínicos, Terapéuticos y de Diagnóstico de La Infección.” *Revista Médica de Chile* 141:609–15.
- Le Chavelier, MW, WD Norton, and RG Lee. 1991. “No Title.” *Applied and Environmental Microbiology* 57(9):2610–16.
- Cheng, X. J. M. A. Hughes, C. D. Huston, B. Loftus, C. A. Gilchrist, L. A. Lockhart, S. Ghosh, V. Miller-Sims, B. J. Mann, Jr Petri, and H. Tachibana. 2001. “Intermediate Subunit of the Gal/GalNAc Lectin of *Entamoeba histolytica* Is a Member of a Gene Family Containing Multiple CXXC Sequence Motifs.” *Infection and Immunity*.
- Conrad, M. E. J. N. Umbreit, R. D. Peterson, E. G. Moore, and K. P. Harper. 1993. “Function of

- Integrin in Duodenal Mucosal Uptake of Iron." *Blood*.
- Cordingley, F. T. and G. P. Crawford. 1986. "Giardia Infection Causes Vitamin B12 Deficiency." *Australian and New Zealand Journal of Medicine*.
- Cornick, Steve, France Moreau, and Kris Chadee. 2016. "Entamoeba histolytica Cysteine Proteinase 5 Evokes Mucin Exocytosis from Colonic Goblet Cells via Av β 3 Integrin." *PLoS Pathogens* 12(4):1–24.
- Crichton, Robert R. Stephanie Wilmet, Rachida Legssyer, and Roberta J. Ward. 2002. "Molecular and Cellular Mechanisms of Iron Homeostasis and Toxicity in Mammalian Cells." *Journal of Inorganic Biochemistry* 91:9–18.
- Cruz-Castañeda, Areli and José J. Olivares-Trejo. 2008. "Ehhmbp45 Is a Novel Hemoglobin-Binding Protein Identified in Entamoeba histolytica." *FEBS Letters* 582(18):2806–10.
- Cruz-Castañeda, Areli, Javier Hernández-Sánchez, and José J. Olivares-Trejo. 2009. "Cloning and Identification of a Gene Coding for a 26-KDa Hemoglobin-Binding Protein from Entamoeba histolytica." *Biochimie* 91(3):383–89.
- Cruz-Castañeda, Areli, Mavil López-Casamichana, and José J. Olivares-Trejo. 2011. "Entamoeba histolytica Secretes Two Haem-Binding Proteins to Scavenge Haem." *Biochemical Journal* 434(1):105–11.
- Davies, Christopher, Resi B. Gerstner, David E. Draper, V. Ramakrishnan, and Stephen W. White. 1998. "The Crystal Structure of Ribosomal Protein S4 Reveals a Two-Domain Molecule with an Extensive RNA-Binding Surface : One Domain Shows Structural Homology to the ETS DNA-Binding Motif." *The EMBO Journal* 17(16):4545–58.
- Díaz, J. V. and Fernández-Alonso Borrajo. 1996. "Giardiasis : Una Breve Revisión. Perspectivas Diagnósticas En El Laboratorio Clínico." *An Esp Pediatr* 44(15):87–91.
- Domínguez, María Isabel. 2018. "Amebiasis Intestinal y Hepática." *Gastroenterología Latinoamericana* 29(1):50–53.
- Dunn, Noel and Andrew Juergens. 2020. "Giardiasis." *StatPearls*.
- Dupuy, Jeronime, Anne Volbeda, Philippe Carpentier, Claudine Darnault, Jean-Marc Moulis, and Juan Carlos Fontella-Camps. 2006. "Crystal Structure of Human Iron Regulatory Protein 1 as Cytosolic Aconitase." *Structure* 14:129–39.

- Escobedo, Angel A. and Sergio Cimerman. 2007. "Giardiasis: A Pharmacotherapy Review." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 8(12):1885–1902.
- Espinosa, Avelina, George Perdrizet, Guillermo Paz-y-Miño C. Regine Lanfranchi, and Monichan Phay. 2009. "Effects of Iron Depletion on *Entamoeba histolytica* Alcohol Dehydrogenase 2 (EhADH2) and Trophozoite Growth: Implications for Antiamoebic Therapy." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63(4):675–78.
- Espinosa, Avelina, George Perdrizet, Guillermo Paz-y-Miño, Regine Lanfranchi, and Monichan Phay. 2009. "Effects of Iron Depletion on Entamoeba Histolytica Alcohol Dehydrogenase 2 (EhADH2) and Trophozoite Growth : Implications for Antiamoebic Therapy." *Journal of Antimicrobia Chemotherapy* 63(4):675–78.
- Figuroa-Angulo, Elisa E. Jaeson S. Calla-Choque, Maria Inocente Mancilla-Olea, and Rossana Arroyo. 2015. "RNA-Binding Proteins in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins Involved in a Posttranscriptional Iron Regulatory Mechanism." *Biomolecules* 5(4):3354–95.
- Figuroa-Angulo, Elisa E. Francisco J. Rendón-Gandarilla, Jonathan Puente-Rivera, Jaeson S. Calla-Choque, Rosa E. Cárdenas-Guerra, Jaime Ortega-López, Laura I. Quintas-Granados, M. Elizabeth Alvarez-Sánchez, and Rossana Arroyo. 2012. "The Effects of Environmental Factors on the Virulence of *Trichomonas vaginalis*." *Microbes and Infection* 14(15):1411–27.
- Fink, Marc Y. and Steven M. Singer. 2017. "The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis." *Trends in Parasitology* 33(11):901–13.
- Flores-Cuevas, Olivia. 2012. "Identificación de Antígenos de *Entamoeba histolytica* Virulenta." Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Fonte, GL. 2009. "*Giardia lamblia*. Aspectos de Su Biología." in *Giardiasis: Entre realidades y mitos*. La Habana.
- García-Cervantes, Patricia Catalina, María Elena Báez-Flores, Francisco Delgado-Vargas, Martha Ponce-Macotela, Yukifumi Nawa, María Del Carmen De-La-Cruz-Otero, Mario N. Martínez-Gordillo, and Sylvia Páz Díaz-Camacho. 2017. "*Giardia duodenalis* Genotypes among Schoolchildren and Their Families and Pets in Urban and Rural Areas of Sinaloa, Mexico." *Journal of Infection in Developing Countries* 11(2):180–87.

- García-Rosolen, N. S. Eandi-Eberle, A. Feliu-Torres, and A. M. Musso. 2010. "Conceptos Actuales Sobre La Fisiología y Patología Del Hierro." *Hematología Argentina* 109(4):354–57.
- Ghetu, Alexandru F. Michael J. Gubbins, Laura S. Frost, and J. N. Mark Glover. 2000. "Crystal Structure of the Bacterial Conjugation Repressor FinO." *Nature America Inc* 7(7):565–69.
- Ghosh, Anupama and Sanghamitra Raha. 2015. "Molecular and Functional Characterisation of a Stress Responsive Cysteine Protease , EhCP6 from *Entamoeba histolytica*." *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* 109:55–61.
- Ghosh, S. A. Debnath, A. Sil, S. De, D. J. Chattopadhyay, and P. Das. 2000. "PCR Detection of Giardia Lamblia in Stool: Targeting Intergenic Spacer Region of Multicopy RRNA Gene." *Molecular and Cellular Probes* 14(3):181–89.
- Ghosh, Swagata, Jay Padalia, and Shannon Moonah. 2019. "Tissue Destruction Caused by *Entamoeba histolytica* Parasite: Cell Death, Inflammation, Invasion, and the Gut Microbiome." *Current Clinical Microbiology Reports* 6(1):51–57.
- Gómez, Julio Cesar, Jorge Alberto Cortés, Sonia Isabel Cuervo, and Myriam Consuelo López. 2007. "Amebiasis Intestinal." *Asociación Colombiana de Infectología* 11(1):36–45.
- Gómez, Julio César, Jorge Alberto Cortés, Sonia Isabel Cuervo, and Myriam Consuelo López. 2007. "REVISIÓN DE TEMA: Amebiasis Intestinal." *Asociación Colombiana De Infectología* 11(1):36–45.
- Gomollón, Fernando. 2010. "Síndrome de Malabsorción: Fisiología y Fisiopatología." *Gastroenterología y Hepatología. Problemas Comunes En La Práctica Clínica* 323–24.
- Gosh, Anupama and Sanghamitr Rahab. 2015. "Molecular and Functional Characterisation of a Stress Responsive Cysteine Protease, EhCP6 from *Entamoeba histolytica*." *Protein Expression and Purification* 109:55–61.
- Goyal, Nisha, Praveen Rishi, and Geeta Shukla. 2013. "*Lactobacillus rhamnosus* GG Antagonizes *Giardia intestinalis* Induced Oxidative Stress and Intestinal Disaccharidases: An Experimental Study." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29(6):1049–57.
- Guevara, Martin. 2020. "Anemia y Hierro." *Contactos, Revista de Educación En Ciencias e Ingeniería* (116):19–20.
- Guo, Bing, John D. Phillips, Yang Yu, and Elizabeth A. Leibold. 1995. "Iron Regulates the

- Intracellular Degradation of Iron Regulatory Protein 2 by the Proteasome *." *The Journal of Biological Chemistry* 270(37):21645–51.
- Gutiérrez-Jiménez, Javier, Lorena Mercedes Luna-cazárez, and Jorge E. Vidal. 2017. "Malnutricion and Intestinal Parasites: Mexico Perspectives." *Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation* 1–18.
- Hantke, Klaus. 2001. "Iron and Metal Regulation_Rev.Pdf." 4(2):172–77.
- He, Chen, George P. Nora, Eric L. Schneider, Iain D. Kerr, Elizabeth Hansell, Ken Hirata, David Gonzalez, Mohammed Sajid, Sarah E. Boyd, Petr Hruz, Eduardo R. Cobo, Christine Le, Wei Ting Liu, Lars Eckmann, Pieter C. Dorrestein, Eric R. Houpt, Linda S. Brinen, Charles S. Craik, William R. Roush, James McKerrow, and Sharon L. Reeda. 2010. "A Novel *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase, EhCP4, Is Key for Invasive Amebiasis and a Therapeutic Target." *Journal of Biological Chemistry* 285(24):18516–18527.
- Heinz, Eva and Trevor Lithgow. 2013. "Back to Basics: A Revealing Secondary Reduction of the Mitochondrial Protein Import Pathway in Diverse Intracellular Parasites." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833(2):295–303.
- Hentze, M. S. Caughman, J. Casey, D. Koeller, T. Rouault, Harford, and R. Klausner. 1998. "A Model for the Structure and Functional of Iron-Responsive Elements." *Gene* 72:201–8.
- Hentze, Matthias W. and Lukas C. Kuhnt. 1996. "Molecular Control of Vertebrate Iron Metabolism : mRNA-Based Regulatory Circuits Operated by Iron , Nitric Oxide , and Oxidative Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(August):8175–82.
- Hentze, Matthias W. Martina U. Muckenthaler, and Nancy C. Andrews. 2004. "Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism." *Cell* 117:285–97.
- Hernández-Cuevas, Nora Adriana, Christian Weber, Chung-Chau Hon, and Nancy Guillen. 2014. "Gene Expression Profiling in *Entamoeba histolytica* Identifies Key Components in Iron Uptake and Metabolism." *PLoS ONE* 9(9):e107102.
- Hernandez-Gutierrez, Rodolfo, Jaime Ortega-López, and Rossana Arroyo. 2003. "A 39-KDa Cysteine Proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, Which Is Negatively Affected by Iron May Be Involved in Trichomonal Cytotoxicity." *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 50

Suppl:696–98.

- INSHT, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2015. *Giardia lamblia*. Vol. Fichas de.
- Iwai, Kazuhiro, Richard D. Klausner, and Tracey A. Rouault. 1995. "Requirements for Iron-Regulated Degradation of the RNA Binding Protein , Iron Regulatory Protein 2." *The EMBO Journal* 14(21):5350–57.
- Iyer, Lakshmi Rani, Nishant Singh, Anil Kumar Verma, and Jaishree Paul. 2014. "Differential Expression and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in *Entamoeba histolytica* Isolates during Metronidazole Stress." *BioMed Research International* 2014:1–11.
- Iyer, Lakshminarayan M. Eugene V Koonin, and L. Aravind. 2002. "Extensive Domain Shuffling in Transcription Regulators of DNA Viruses and Implications for the Origin of Fungal APSES Transcription Factors." *Genome Biology* 3(3):1–11.
- Jackson, T. F. H. G. 1998. "*Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Are Distinct Species; Clinical, Epidemiological and Serological Evidence." *International Journal for Parasitology* 28(1):181–86.
- Jeelani, Ghulam, Afzal Husain, Dan Sato, Vahab Ali, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Soga, and Tomoyoshi Nozaki. 2010. "Two Atypical L-Cysteine-Regulated NADPH-Dependent Oxidoreductases Involved in Redox Maintenance, L-Cystine and Iron Reduction, and Metronidazole Activation in the Enteric Protozoan *Entamoeba histolytica*." *Journal of Biological Chemistry* 285:26889–26899.
- Jiao, Qian, Xixun Du, Jie Wei, Yong Li, and Hong Jiang. 2019. "Oxidative Stress Regulated Iron Regulatory Protein IRP2 through FBxL5-Mediated Ubiquitination-Proteasome Way in SH-SY5Y Cells." *Frontiers in Neuroscience* 13(JAN):1–8.
- Joshi, Ricky S. Erica Morán, and Mayka Sánchez. 2012. "Cellular Iron Metabolism – The IRP / IRE Regulatory Network." *InTech*.
- Kantor, Micaella, Anarella Abrantes, Andrea Estevez, Alan Schiller, Jose Torrent, Jose Gascon, Robert Hernandez, and Christopher Ochner. 2018. "Shrook." *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2018:6.
- Kaur, U. A. K. Sharma, M. Sharma, and H. Vohra. 2004. "Distribution of *Entamoeba histolytica*

- Gal/GalNAc Lectin-Specific Antibody Response in an Endemic Area.” *Scandinavian Journal of Immunology* 60(5):524–28.
- Keene, W. E. M. E. Hidalgo, E. Orozco, and J. H. McKerrow. 1990. “*Entamoeba histolytica*: Correlation of the Cytopathic Effect of Virulent Trophozoites with Secretion of a Cysteine Proteinase.” *Experimental Parasitology* 71(2):199–206.
- Khan, Mateen A. William E. Walden, Elizabeth C. Theil, and Dixie J. Goss. 2017. “Thermodynamic and Kinetic Analyses of Iron Response Element (IRE)-mRNA Binding to Iron Regulatory Protein, IRP1.” *Scientific Reports* 7(1):1–11.
- Korman, SH and JR Deckelbaum. 1993. “Pediatric Gastrointestinal Disease.” Pp. 652–69 in *Enteric Parasites*. Philadelphia.
- Lane, Samantha and David Lloyd. 2002. “Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*.” *Critical Reviews in Microbiology* 28(2):123–47.
- Latunde-Dada, G. O. J. van der Westhuizen, C. D. Vulpe, G. J. Anderson, R. J. Simpson, and A. T. McKie. 2002. “Molecular and Functional Roles of Duodenal Cytochrome B (Dcytb) in Iron Metabolism.” *Blood Cells, Molecules & Diseases* 29(3):356–60.
- Lee, Jongweon, Soon-jung Park, and Tai-soon Yong. 2008. “Effect of Iron on Adherence and Cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO Cell Monolayers.” *Korean Journal Parasitology* 46(1):37–40.
- Lee, Min Ho and Tim Schedl. 2006. “RNA-Binding Proteins.” *WormBook* 1–13.
- Lee, Young Ah, Young Hee Nam, Arim Min, Kyeong Ah Kim, Tomoyoshi Nozaki, Yumiko Saito-Nakano, David Mirelman, and Myeong Heon Shin. 2014. “*Entamoeba histolytica* -Secreted Cysteine Proteases Induce IL-8 Production in Human Mast Cells via a PAR2-Independent Mechanism.” *Parasite* 21:1.
- Lenaghan, Scott C. Corinne A. Davis, William R. Henson, Zhili Zhang, and Mingjun Zhang. 2011. “High-Speed Microscopic Imaging of Flagella Motility and Swimming in *Giardia lamblia* Trophozoites.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(34):E550-8.
- León-Sicairos, Nidia, José de Jesús Ordaz-Pichardo, Cynthia Serrano-Luna, Magda Reyes-López, Fernando López-Soto, and Mireya de la Garza. 2010. “*Entamoeba histolytica* Puede

- Usar El Hierro de Los Órganos Que Invade.” Pp. 396–424 in *La lucha por el hierro*, edited by Cinvestav. México, D.F.
- León-Sicairos, Nidia, Cynthia Ordaz-Pichardo, Julio Cesar Carrero, and Mireya de la Garza. 2017. “Lactoferrin in the Battle against Intestinal Parasites: A Review.” Pp. 155–85 in *Natural Remedies in the fight Against Parasites*, edited by M. Khater and G. and G. Gi. Immunology and Microbiology.
- León-Sicairos, Nidia, Ruth Reyes-Cortes, Alma M. Guadrón-Llanos, Jesús Madueña-Molina, Claudia León-Sicairos, and Adrian Canizalez-Román. 2015. “Strategies of Intracellular Pathogens for Obtaining Iron from the Environment.” *BioMed Research International* 2015.
- León-Sicairos, Nidia, Magda Reyes-lópez, Adrián Canizalez-Román, Rosa María Bermúdez-Cruz, José de Jesus Serrano-Luna, Rossana Arroyo, and Mireya de la Garza. 2005. “Human Hololactoferrin : Endocytosis and Use as an Iron Source by the Parasite *Entamoeba histolytica*.” *Microbiology* 151:3859–71.
- Levicán, Gloria, Assaf Katz, Merly de Armas, Harold Núñez, and Omar Orellana. 2007. “Regulation of a Glutamyl-TRNA Synthetase by the Heme Status.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Li, E. W. G. Yang, T. Zhang, and S. L. Stanley. 1995. “Interaction of Laminin with *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinases and Its Effect on Amebic Pathogenesis.” *Infection and Immunity*.
- Liu, L. X. and P. F. Weller. 1996. “Drug Therapy: Antiparasitic Drugs.” *New England Journal of Medicine* 334(18):1178–84.
- Loftus, Brendan, Iain Anderson, Rob Davies, U. Cecilia M. Alsmark, John Samuelson, Paolo Amedeo, Paola Roncaglia, Matt Berriman, Robert P. Hirt, Barbara J. Mann, Tomo Nozaki, Bernard Suh, Mihai Pop, Michael Duchene, John Ackers, Egbert Tannich, Matthias Leippe, Margit Hofer, Iris Bruchhaus, Ute Willhoeft, Alok Bhattacharya, Tracey Chillingworth, Carol Churcher, Zahra Hance, Barbara Harris, David Harris, Kay Jagels, Sharon Moule, Karen Mungall, Doug Ormond, Rob Squares, Sally Whitehead, Michael A. Quail, Ester Rabbinowitsch, Halina Norbertczak, Claire Price, Zheng Wang, Nancy Guillén, Carol Gilchrist, Suzanne E. Stroup, Sudha Bhattacharya, Anuradha Lohia, Peter G. Foster,

- Thomas Sicheritz-Ponten, Christian Weber, Upinder Singh, Chandrama Mukherjee, Najib M. El-Sayed, William A. Petri, C. Graham Clark, T. Martin Embley, Bart Barrell, Claire M. Fraser, and Neil Hall. 2005. "The Genome of the Protist Parasite *Entamoeba histolytica*." *Nature* 433(7028):865–68.
- López-Soto, Fernando, Arturo González-Robles, Lizbeth Salazar-Villatoro, Nidia León-Sicairos, Carolina Piña-Vázquez, Eduardo Pérez Salazar, and Mireya de la Garza. 2009. "Entamoeba histolytica Uses Ferritin as an Iron Source and Internalises This Protein by Means of Clathrin-Coated Vesicles." *International Journal for Parasitology*.
- López-Soto, Fernando, Nidia León-Sicairos, Magda Reyes-López, Jesús Serrano-Luna, Cynthia Ordaz-Pichardo, Carolina Piña-Vázquez, Guillermo Ortiz-Estrada, and Mireya de la Garza. 2009. "Use and Endocytosis of Iron-Containing Proteins by *Entamoeba histolytica* Trophozoites." *Infection, Genetics and Evolution* 9(6):1038–50.
- López Romero, Gloria Carolina. 2016. "Caracterización Inmunoquímica y Molecular de Antígenos Inmunodominantes de *Giardia lamblia* En Un Modelo Murino de Giardiasis." *Centro de Investigación En Alimentación y Desarrollo, A.C. Para Obtener El Grado de Doctor En Ciencias* (662):83304.
- Loyevsky, Mark, Timothy LaVaute, Charles R. Allerson, Robert Stearman, Olakunle O. Kassim, Sharon Cooperman, Victor R. Gordeuk, and Tracey A. Rouault. 2001. "An IRP-like Protein from *Plasmodium falciparum* Binds to a Mammalian Iron-Responsive Element." *Blood* 98(8):2555–62.
- Loyevsky, Mark, Farah Mompoin, Emine Yikilmaz, Stephen F. Altschul, Thomas Madden, John C. Wootton, Joseph Kurantsin-Mills, Olakunle O. Kassim, Victor R. Gordeuk, and Tracey A. Rouault. 2003. "Expression of a Recombinant IRP-like *Plasmodium falciparum* Protein That Specifically Binds Putative Plasmodial IREs." *Molecular and Biochemical Parasitology* 126(2):231–38.
- Luaces, A. L. and A. J. Barrett. 1988. "Affinity Purification and Biochemical Characterization of Histolysin, the Major Cysteine Proteinase of *Entamoeba histolytica*." *Biochemical Journal* 250(3):903–909.
- Makiuchi, Takashi and Tomoyoshi Nozaki. 2014. "Highly Divergent Mitochondrion-Related

- Organelles in Anaerobic Parasitic Protozoa." *Biochimie* 100(1):3–17.
- Mann, Barbara J. and L. A. Lockhart. 1998. "Molecular Analysis of the Gal/GalNAc Adhesin of *Entamoeba histolytica*." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45(2):13S-16S.
- Marie, Chelsea and William A. Petri. 2014. "Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica*." *Annual Review of Microbiology* 68(1):493–520.
- Mark-Carew, MP, AA Adesiyun, A. Basu, KA Georges, T. Pierre, S. Tilitz, SE Wade, and HO Mohammed. 2013. "Characterization of *Giardia duodenalis* Infections in Dogs in Trinidad y Tobago." *Veterinary Parasitology* 196(1–2):199–202.
- McGowan, S. IS Lucet, JK Cheung, MM Awar, JC Whisstock, and JL Rood. 2002. "The FxRxHrS Motif: A Conserved Region Essential for DNA Binding of the VirR Response Regulator from *Clostridium Perfringens*." *Journal of Molecular Biology* 322(5):997–1011.
- Meehan, Heather A. and Gregory J. Connell. 2000. "A Trypanosomatid Protein Speci @ Cally Interacts with a Mammalian Iron-Responsive Element." *Parasitology Research* 86:109–14.
- Meloni, BP, AJ Lymbery, and RCA Thompson. 1995. "Genetic Characterization of Isolates of *Giardia duodenalis* by Enzyme Electrophoresis: Implications for Reproductive Biology, Population, Structure, Taxonomy and Epidemiology." *Journal of Parasitology* 81:968–383.
- Meyer, EA and S. Radulescu. 1979. "Giardia and Giardiasis." *Advances in Parasitology* 17:1–32.
- Meyron-Holtz, Esther G... Manik C. Ghosh, and Tracey A. Rouault. 2004. "Mammalian Tissue Oxygen Levels Modulate Iron-Regulatory Protein Activities in Vivo." *Science* 306(5704):2087–90.
- Militello, KT, M. Dodge, L. Bethke, and DF Wirth. 2004. "Identification of Regulatory Elements in the *Plasmodium falciparum* Genome." *Mol Biochem Parasitol* 134:75–88.
- Mishra, Vibhor, Ashutosh Kumar, Vahab Ali, Tomoyoshi Nozaki, Kam Y. J. Zhang, and Vinod Bhakuni. 2012. "Glu-108 Is Essential for Subunit Assembly and Dimer Stability of d-Phosphoglycerate Dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*." *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Moncada, Darcym, Kathy Keller, Serge Ankri, David Mirelman, and Kris Chadee. 2006. "Antisense Inhibition of *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteases Inhibits Colonic Mucus Degradation." *Gastroenterology* 130(3):721–730.

- Muckenthaler, M. N. Gunkel, D. Frishman, A. Cyrklaff, P. Tomancak, and Hentze, MW. 1998. "Iron-Regulatory Protein-1 (IRP-1) Is Highly Conserved in Two Invertebrate Species-- Characterization of IRP-1 Homologues in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*." *European Journal of Biochemistry* 254:230–37.
- Muller, M. 2000. "A Mitochondrion in *Entamoeba histolytica*." *Parasitology Today* 16:368–69.
- Ning, Tan Zi, Wong Weng Kin, Shaymoli Mustafa, Arefuddin Ahmed, Rahmah Noordin, Tan Gim Cheong, Olivos Garcia Alfonso, and Lim Boon Huat. 2012. "Detection of *Entamoeba histolytica* in Experimentally Induced Amoebic Liver Abscess: Comparison of Three Staining Methods." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.
- Niño, Carlos Alberto and Moisés Wasserman. 2010. "Synthesis of Pyruvate: Ferredoxin Oxidoreductase and Alcohol Dehydrogenase E Enzymes during *Giardia intestinalis* Excystation." *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud* 30(1):32–38.
- Nishino, Tatsuya, Kayoko Komori, Yoshizumi Ishino, and Kosuke Morikawa. 2003. "X-Ray and Biochemical Anatomy of an Archaeal XPF / Rad1 / Mus81 Family Nuclease : Similarity between Its Endonuclease Domain and Restriction Enzymes." *Structure* 11(03):445–57.
- Nowak, Piotr, Katarzyna Mastalska, and Jakub Loster. 2015. "*Entamoeba histolytica* - Pathogenic Protozoan of the Large Intestine in Humans." *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology* 1(1):10–17.
- Olivos-García, Alfonso, Emma Saavedra, Mario Nequiz Avendaño, and Ruy Pérez-Tamayo. 2011. "Amibiasis: Mecanismos Moleculares de La Patogenicidad de *Entamoeba histolytica*." *Rev. Fac. Med. UNAM* 54(2):10–20.
- Olivos-garcía, Alfonso, Emma Saavedra, Ernesto Ramos-Martínez, Mario Nequiz, and Ruy Pérez-Tamayo. 2009. "Molecular Nature of Virulence in *Entamoeba histolytica*." *Infection, Genetics and Evolution* 9(6):1033–37.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 2020. *Medios Auxiliares Para El Diagnóstico de Las Parasitosis Intestinales*. Washington, D.C.
- Organización Panamericana de la Salud. 2003. "ZONOSIS Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES COMUNES AL HOMBRE Y ANIMALES Volumen III." in *ZONOSIS Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES COMUNES AL HOMBRE Y ANIMALES*. Washington,

DC.

- Orozco, Esther, A. Martín-Palomo, and González-Robles A. 1982. "Las Interacciones Lectina-Receptor Median La Adhesion de *Entamoeba histolytica* a Sus Células Epiteliales." *Archivos de Investigación Médica* 13:153–57.
- Ortiz, Diego E. 2019. "Metabolismo Normal Del Hierro." (December).
- Pantopoulos, Kostas. 2004. "Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012:1–13.
- Park, Soon-jung, Sang-mi Lee, Jongweon Lee, and Tai-soon Yong. 2001. "Differential Gene Expression by Iron-Limitation in *Entamoeba histolytica*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 114(2):257–60.
- Peirasmaki, Dimitra, Showgy Y. Ma'ayeh, Feifei Xu, Marcela Ferella, Sara Campos, Jingyi Liu, and Staffan G. Svärd. 2020. "High Cysteine Membrane Proteins (HCMPs) Are Up-Regulated During Giardia-Host Cell Interactions." *Frontiers in Genetics* 11(August):1–17.
- Pérez, Gladys, Daniela Vittori, Nicolás Pregi, Graciela Garbossa, and Alcira Nesse. 2005. "Homeostasis Del Hierro. Mecanismos de Absorción, Captación Celular y Regulación*." *Hematología* 39(3):301–14.
- Perry, Kay and Alfonso Mondragón. 2003. "Structure of a Complex between *E. coli* DNA Topoisomerase I and Single-Stranded DNA." *Structure* 11(11):1349–58.
- Petri, WA, D. Jr Mondal, P. Duggal, and Haque R. 2009. "Association of Malnutrition with Amebiasis." *Nutrition Reviewa* 6.
- Petri, William A. 2009. "Intestinal Invasion by *Entamoeba histolytica*." *Sub-Cellular Biochemistry* 47:221–32.
- Petri, William A. MP Joyce, J. Broman, RD Smith, CF Murphy, and J. Ravdin. 1987. "Recognition of the Galactose-or N-Acetylgalactosaminebinding Lectin of *Entamoeba histolytica* by Human Immune Sera." *Infection and Immunity* 55(10):2327–31.
- Petter, R. S. Moshitch, S. Rozenblatt, Y. Nuchamowitz, and D. Mirelman. 1994. "Characterization of Two Distinct Gene Transcripts for Ribosomal Protein L21 from Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Entamoeba histolytica*." *Gene* 150(1):181–86.
- Plata-Guzmán, Laura, Rossana Arroyo, Nidia León-Sicairos, Adrián Canizalez-Román, Luz A.

- Reyes-Sánchez, Hector S. López-Moreno, Jeanett Chávez-Ontiveros, José A. Garzón-Tiznado, Claudia León-Sicairos. 2021. "Iron Effect in *Giardia duodenalis* Growth and Gene Expression, a Possible Iron Regulatory Mechanism Via Stem Loop Structures. En preparación.
- PMFarma, México. 2015. "Giardiasis' Una Enfermedad y Un Problema de Salud Pública En México." 1–2.
- Pyrih, Jan, Eva Pyrihová, Martin Kolísko, Darja Stojanovová, Somsuvro Basu, Karel Harant, Alexander C. Haindrich, Pavel Doležal, Julius Lukeš, Andrew Roger, and Jan Tachezy. 2016. "Minimal Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Machinery of *Giardia intestinalis* Is Partially Associated with Mitosomes." *Molecular Microbiology* 102(4):701–14.
- Quintero-Gallegos, Juan Carlos. 2016. "Expresión Diferencial Por Hierro de Genes Que Codifican Para Factores de Virulencia En *Entamoeba histolytica* y *Giardia duodenalis*." Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Radvin, JL. 1986. "Pathogenesis of Disease Caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of Adherence, Secreted Toxins and Contact-Dependent Cytolysis." *Reviews of Infectious Diseases* 8:247–60.
- Ralston, Katherine S. Michael D. Solga, Nicole M. MacKey-Lawrence, Somlata, Alok Bhattacharya, and William A. Petri. 2014. "Trocytosis by *Entamoeba histolytica* Contributes to Cell Killing and Tissue Invasion." *Nature* 508(7497):526–30.
- Rascón, A. A. and J. H. Mckerrow. 2013. "Synthetic and Natural Protease Inhibitors Provide Insights into Parasite Development, Virulence and Pathogenesis." *Current Medicinal Chemistry* 20:3078–3102.
- Reyes-López, Magda, Rosa María Bermúdez-Cruz, Eva E. Avila, and Mireya De La Garza. 2011. "Acetaldehyde/Alcohol Dehydrogenase-2 (EhADH2) and Clathrin Are Involved in Internalization of Human Transferrin by *Entamoeba histolytica*." *Microbiology* 157(1):209–19.
- Reyes-lópez, Magda, Jesús Serrano-luna, Carolina Piña-vázquez, Mireya De Garza, R. John Aitken, Brett Nixon, Kotb Abdelmohsen, Monde Ntwasa, and Minoru Takahashi. 2012. "Transferrin Binding Protein as a Means to Obtain Iron Parasitic Protozoa." P. 202 in *Binding Protein*, edited by Kotb Abdelmohsen. Rijeka, Croatia.

- Reyes-Sánchez, Luz Adriana. 2016. "Inmunodetección de Una Proteína Reguladora de Hierro En *Giardia duodenalis*." Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Rivera, María, María la Parte, Pilar Hurtado, Luis Magaldi, and María Collazo. 2002. "Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión." *Investigación Clínica* 43(2):119–28.
- Robertson, LJ, K. Hanevik, AA Escobedo, K. Morch, and N. Langeland. 2010. "Giardiasis- Why Do the Symptoms Sometimes Never Stop?" *Trends in Parasitology* 26(2):72–85.
- Rodas, Beatriz. 2014. *Prevalencia de Giardiasis Intestinal En Niños Comprendidos Entre 2- 5 Años de Edad En El Hospital San Juan de Dios de Redencion Pampa Del Municipio de Mojocoya 2010*. 1ra ed. edited by M. Ramos and J. Serrudo. Sucre, Bolivia: Ciencias de la Salud, handbooks ECORFAN.
- Romero C. 2007. *Bases Etiológicas de Las Enfermedades Infecciosas y Parasitarias*. 3ra ed. edited by Médica Panamericana. Mexico.
- Rostami, Sima, Mostafa Rezaeian, Rasool Jamali, Sassan Rezaie, Zahra Babaei, and Hossein Hooshyar. 2017. "Differences in *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinase 5 Gene Isolated From Bandar Abbas and Tabriz, Iran." *International Journal of Enteric Pathogens* 5(2):49–53.
- Rouault, Tracey A. 2006. "The Role of Iron Regulatory Proteins in Mammalian Iron Homeostasis and Disease." *Nature Chemical Biology* 2(8):406–14.
- Saavedra, Emma and Alfonso Olivos García. 2017. "Amibiasis." *Ciencia* 68(1):14–17.
- Sabaty, Monique, Geraldine Adryanczyk, Chloé Roustan, Stephan Cuin, Christine Lamouroux, and David Pignol. 2010. "Coproporphyrin Excretion and Low Thiol Levels Caused by Point Mutation in the Rhodobacter Sphaeroides S-Adenosylmethionine Synthetase Gene." *Journal of Bacteriology*.
- Salud, Organización Panamericana de la. 2008. *Tratamiento de La Diarrea: Manual Clínico Para Los Servicios de Salud*. Washington, D.C.
- Samaniego, F. J. Chin, K. Iwai, T. A. Rouault, and R. D. Klausner. 1994. "Molecular Characterization of a Second Iron-Responsive Element Binding Protein, Iron Regulatory Protein 2. Structure, Function, and Post-Translational Regulation." *Journal of Biological Chemistry* 269(49):30904–10.

- Sánchez, Virginia, Jesús Serrano-Luna, Esther Ramírez-Moreno, Víctor Tsutsumi, and Mineko Shibayama. 2016. "Parasitology International *Entamoeba histolytica* : Overexpression of the Gal / Galnac Lectin , Ehcp2 and Ehcp5 Genes in an *in Vivo* Model of Amebiasis." *Parasitology International* 65(6):665–67.
- Scott, KG, MR Logan, GM Klammer, DA Theoh, and AG. Buret. 2000. "Jejunal Brush Border Microvillous Alterations in G. Muris -Infected Mice: Role of T Lymphocytes and Interleukin-6." *Infection and Immunity* 68:3412–2418.
- Secretaría de Salud. 2009. "Cerca de 50 Millones de Personas En El Mundo Presentan Amebiasis."
- Seleznova, Anna I. William E. Walden, and Karl W. Volz. 2013. "Nucleotide-Specific Recognition of Iron-Responsive Elements by Iron Regulatory Protein 1." *Journal of Molecular Biology* 425(18):3301–10.
- Sermeni, Carmen Gloria, María José Acevedo, and Miguel Arredondo. 2017. "Biomarkers of Metabolism and Iron Nutrition." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 34(4):690–98.
- Serrano-Luna, J. J. E. Negrete, M. Reyes, and M. de la Garza. 1998. "*Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: Hemoglobin-Degrading Neutral Cysteine Proteases." *Experimental Parasitology* 89(89):71–77.
- Serrano-Luna, Jesús, Carolina Piña-Vázquez, Magda Reyes-López, Guillermo Ortiz-Estrada, and Mireya De La Garza. 2013. "Proteases from *Entamoeba Spp.* and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors." *Journal of Tropical Medicine*.
- Sheldon, Jessica R. Holly A. Laakso, and David E. Heinrichs. 2016. "Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogens." *Microbiology Spectrum* 4(2):1–32.
- Shirley, Debbie Ann T. Laura Farr, Koji Watanabe, and Shannon Moonah. 2018. "A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis." *Open Forum Infectious Diseases* 5(7):1–9.
- Shirley, Debbie Ann T. Koji Watanabe, and Shannon Moonah. 2019. "Significance of Amebiasis: 10 Reasons Why Neglecting Amebiasis Might Come Back to Bite Us in the Gut." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(11):e0007744.

- Solano-Gonzalez, Eduardo, Burrola-Barraza Eduvigis, León Sicairos Claudia, Avila-Gonzalez Leticia, Gutierrez-Escolano Lorena, Ortega-Lopez Jaime, and Arroyo Rossana. 2007. "The Trichomonad Cysteine Proteinase TVCP4 Transcript Contains an Iron-Responsive Element." *FEBS Letters* 581:2919–28.
- Soriano Alcaraz, María Jesús. 2005. "Giardia y Giardiosis." *Control Calidad SEIMC* 1–9.
- Soto-Castro, Liliana, Laura Yuliana Plata-Guzmán, Elisa E. Figueroa-Angulo, Jaeson Santos Calla-Choque, Magda Reyes-López, Mireya de la Garza, Nidia León-Sicairos, José Antonio Garzón-Tiznado, Rossana Arroyo, and Claudia León-Sicairos. 2017. "Iron-Responsive-like Elements in the Parasite *Entamoeba histolytica*." *Microbiology* (2508):1329–42.
- Tachibana, Hiroshi, X. J. Cheng, G. Masuda, N. Horiki, and T. Takeuchi. 2004. "Evaluation of Recombinant Fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin Intermediate Subunit for Serodiagnosis of Amebiasis." *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology* 42(3):1069–74.
- Tasca, T. C. D. Bonan, G. A. De Carli, J. J. Sarkis, and J. F. Alderete. 2005. "Heterogeneity in Extracellular Nucleotide Hydrolysis among Clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis*." *Parasitology* 131(1):71–78.
- Tay-Zavala, J. 2010. *Parasitología Médica*. 8va ed. edited by Méndez. México.
- Thibeaux, Roman, Alexandre Dufour, Pascal Roux, Michèle Bernier, Anne Catherine Baglin, Pascal Frileux, Jean Chrisophe Olivo-Marin, Nancy Guillén, and Elisabeth Labruyère. 2012. "Newly Visualized Fibrillar Collagen Scaffolds Dictate *Entamoeba histolytica* Invasion Route in the Human Colon." *Cellular Microbiology* 14(5):609–621.
- Thompson, R. C. Andrew. 2008. "Giardiasis: Conceptos Modernos Sobre Su Control y Tratamiento." *Annales Nestlé (Ed. Española)* 66(1):23–29.
- Tilbeurgh, Herman Van, Xavier Manival, Jean-marc Lhoste, Christian Dumas, and Michel Kochoyan. 1997. "Crystal Structure of a New RNA-Binding Domain from the Antiterminator Protein SacY of *Bacillus subtilis*." *The EMBO Journal* 16(16):5030–36.
- Torres-Guerrero, H. D. Peattie, and I. Meza. 1991. "Chromatin Organization in *Entamoeba histolytica*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 45:121–30.
- Trejos-Suárez, Juanita and Jhon Carlos Castaño-Osorio. 2009. "Factores de Virulencia Del

- Patógeno Intestinal *Entamoeba histolytica*." *Infectio* 13(2):100–110.
- Ullu, Elisabetta, Christian Tschudi, and Tirtha Chakraborty. 2004. "Microreview RNA Interference in Protozoan Parasites." 6:509–19.
- Uribarren-Berrueta, Teresa. 2015. "Giardiasis o Giardiosis." Retrieved August 3, 2017 (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html>).
- Uribarren-Berrueta, Teresa. 2017. "ENTAMOEBOSIS o AMIBIASIS". Retrieved (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>).
- Uzel, C. and ME Conrad. 1998. "Absorption of Heme Iron." *Seminars of Hematology* 35:27–34.
- Vaca-Pacheco, Sergio, Rossana Arroyo, Adrián Canizalez-Román, Isaac Cervantes-Sandoval, Yolanda Irasema Chirino-López, Mireya de la Garza, José Alfredo Díaz-Gandarilla, Francisco J. Fernández, Héctor Flores Villaseñor, Manuel Gonzáles del Carmen, Cynthia González-Ruiz, V. I. Hernández-Ramírez, Nidia León-Sicairos, Fernando López-Soto, Ricardo Mondragón-Flores, Ernesto Negrete, Cynthia Ordaz-Pichardo, Jaime Ortega-López, Ignacio Peñalosa-Castro, Sandra Pérez-Miranda, Verónica Picos Cárdenas, Carolina Piña-Vázquez, Ruth Reyes-Cortes, Magda Reyes-López, Norma Rivera-Fernández, Adrián Sandoval-Montiel, José de Jesus Serrano-Luna, Mineko Shibayama-Salas, Patricia Talamás-Rohana, and Sergio Vaca-Pacheco. 2010. *La Lucha Por El Hierro: Patógeno vs. Hospedero*.
- Vanacova, Stepanka, David R. Liston, Jan Tachezy, and Patricia J. Johnson. 2003. "Molecular Biology of the Mitochondriate Parasites *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*." *International Journal for Parasitology* 33:235–55.
- Vázquez, Oscar and Teresita Campos. 2009. "Giardiasis. La Parasitosis Más Frecuente a Nivel Mundial." *Revista Del Centro de Investigación Universidad La Salle* 8(31):75–90.
- Vázquez, T. O. 2001. *Antiparasitarios Giardiasis En Antimicrobianos, Antivirales, Antiparasitarios, Antimicóticos e Inmunomoduladores*. 5a ed. edited by S. N. González and S.. Saltigeral. México: McGraw Hill.
- Vázquez, T. O. and R. T. Campos. 2009. "Giardiasis. La Parasitosis Más Frecuente a Nivel Mundial." *Revista Del Centro de Investigación Universidad La Salle* 8(31):75–90.
- Villegas-Martínez, Ana. 2018. "Iron Overload, Why to Treat?" *ANALES RANM* 135(01):20–27.

- Vivancos, V. I. González-Alvarez, M. Bermejo, and M. Gonzalez-Alvarez. 2018. "Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18(15):1287–1303.
- Vivancos, Veronica. 2016. "Estudio de La Modificación En La Absorción de Fármacos En Giardiasis y Nuevas Estrategias de Formulación."
- Volz, Karl W. 2008. "The Functional Duality of Iron Regulatory Protein 1 Karl." *Curr Opin Struct Biol* 18(1):106–11.
- Walsh, JA. 1986. "Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality." *Reviews of Infectious Diseases* 8:228–38.
- Wang, JC. 2002. "Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(6):430–40.
- Wang, Jian and Kostas Pantopoulos. 2011. "Regulation of Cellular Iron Metabolism." *Biochemical Journal* 434(3):365–81.
- Watter, S. A. Russ, M. Evans, and Nehls. 1998. "A Combined Analysis and Primary Protein Structure Defines the Phylogenetic Relationship of New Members of the T-Box Family." *Genomics* 48(1):24–33.
- Wessling-Resnick, Marianne. 2020. "Iron." *Linus Pauling Institute*. Retrieved November 16, 2020 (<https://lpi.oregonstate.edu/mic/minerals/iron>).
- Wilkinson, Nicole and Kostas Pantopoulos. 2014. "The IRP/IRE System *in vivo*: Insights from Mouse Models." *Frontiers in Pharmacology* 5 JUL:1–15.
- Wolfe, M. S. 1992. "Giardiasis." *Clinical Microbiology Reviews* 5(1):93–100.
- Worthington, MT, SM Cohn, SK Miller, RQ Luo, and CL. Berg. 2001. "Characterization of a Human Plasma Membrane Heme Transporter in Intestinal and Hepatocyte Cell Lines." *American Journal of Physiological Gastrointestinal* 32:256–63.
- Yang, Hong, Chen Ching-Yi, Ryuji Kobayashi, and John Newport. 1998. "Replication Focus-Forming Activity 1 and the Werner Syndrome Gene Product." *Nature Genetics* 19:375–78.
- Ynfantes Almeyda, María Isabel. 2018. "PARASITOSIS INTESTINAL RELACIONADO CON LOS FACTORES SOCIOECONÓMICOS Y AMBIENTALES EN NIÑOS DE 1 A 12 AÑOS DE LOS ALBERGUES PROVISIONALES DE LA ASOCIACIÓN DE CARAPONGO EN

LURIGANCHO-CHOSICA, DURANTE LOS DESASTRES NATURALES OCURRIDOS EN MARZO, 2017.” Universidad Norbert Wiener.

- Yoshida, Nobuko, Kevin M. Tyler, and Martin S. Llewellyn. 2011. “Invasion Mechanisms among Emerging Food-Borne Protozoan Parasites.” *Trends in Parasitology* 27(10):459–66.
- Young-Jin, Son, Kim Chang-Kyu, Choi Byoung-Taek, and YD Park. 2008. “Effects of Beta-Mercaptoethanol and Hydrogen Peroxide on Enzymatic Conversion of Human Proinsuline to Insuline.” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(5):983–89.
- Young, J. D. T. M. Cohn, J. C. Unkeless, and Z. A. Cohn. 1992. “Characterization of a Membrane Pore-Forming Protein from *Entamoeba histolytica*.” *Journal of Experimental Medicine* 156:1677–90.
- Zhang, Zhi, Le Yan, Lei Wang, Karl B. Seydel, Ellen Li, Serge Ankri, David Mirelman, and Samuel L. Stanley. 2000. “*Entamoeba histolytica* Cystein Proteinases with Interleukin-1 Beta Converting Enzyme (ICE) Activity Cause Intestinal Inflammation and Tissue Damage in Amoebiasis.” *Molecular Microbiology* 37(3):542– 548.
- Zhou, Zhi Dong and Eng King Tan. 2017. “Iron Regulatory Protein (IRP)-Iron Responsive Element (IRE) Signaling Pathway in Human Neurodegenerative Diseases.” *Molecular Neurodegeneration* 12(1):1–12.

X. ANEXOS

A. Articulos Cientificos publicados

1. Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*.

Review

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com



Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*

Aurora Gastelum-Martínez¹, Claudia León-Sicaïros^{*†,1}, Laura Plata-Guzmán¹, Liliana Soto-Castro¹, Nidia León-Sicaïros² & Mireya de la Garza^{**†,1,3}

¹Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria) Culiacán 80030, Sinaloa, Mexico

²CJASaP Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa, Cedros y Sauces Frac. Fresnos, Culiacán 80246, Sinaloa, México; Departamento de Investigación, Hospital Pediátrico de Sinaloa, Boulevard Constitución S/N, Col. Jorge Almada, Culiacán 80200, Sinaloa, Mexico

³Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatelco 07360, CdMx, Mexico

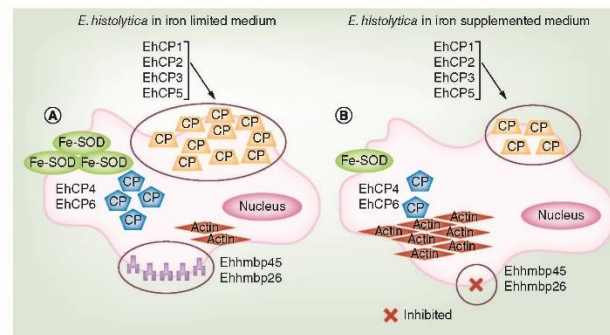
*Author for correspondence: claudialeonsicairos@uas.edu.mx

**Author for correspondence: mireya@cell.cinvestav.mx

†Authors contributed equally

Entamoeba histolytica is a human parasite that causes amoebiasis, a disease that affects the colon and liver and is prevalent worldwide. This protozoan requires a high concentration of iron to survive and reproduce. Iron modulates the expression of parasite virulence factors, including hemoglobins, hemoglobin-binding proteins and cysteine proteases, as well as proteins related to the amoebic cytoskeleton. This review summarizes the virulence factors that are affected by iron, resulting in upregulation or downregulation of *E. histolytica* genes. This review also discusses the functionality of iron in the mechanisms of pathogenesis.

Graphical abstract:



First draft submitted: 28 February 2018; Accepted for publication: 13 June 2018; Published online: 21 September 2018

Keywords: binding proteins • cysteine proteases • *Entamoeba histolytica* • hemoglobinase • IREs • IRPs • iron • oxidation-reduction proteins • virulence factors • virulence

Parasites are organisms that feed, multiply and survive in other living organisms, in many cases without compromising their host's life. Parasites cause infections and utilize resources for the continuity of their life cycle [1]. In some

Future
Medicine

circumstances, parasites become pathogens and cause disease, which is directly linked to the production of virulence factors. Virulence depends on the inherent characteristics of the microorganism as well as the susceptibility of the host [2,3].

Iron is vital for virtually all living organisms, including parasites and their hosts. Due to its toxicity, iron is not soluble inside host cells, and it is not free in extracellular fluids. In general, mammalian cells avoid iron toxicity through sequestration in specific proteins, such as serum transferrin (Tf) and mucosal lactoferrin (Lf), as a part of the prosthetic haem group in hemoglobin (Hb) and cytochromes, and in the iron storage protein ferritin (Ft). This strategy also inhibits parasite growth. Because parasites require iron to survive, continue their life cycle and cause disease in their hosts, they must overcome the inaccessibility of this cation at the site of infection; therefore, they develop various mechanisms to acquire iron [4,5]. Parasites obtain iron using the following mechanisms: reduction of the Fe^{+3} to Fe^{+2} complex by ferrireductases, which release iron; generation of specific receptors for host proteins that contain iron; and secretion of proteases that separate iron from proteins when cleaved [4,6–8]. Amitochondriate protozoa such as *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia duodenalis* cause disease when the host has a weak immune response as well as under normal conditions of the immune system [3]. To maintain infection, they must express virulence factors which are tightly regulated. In protozoa such as *T. vaginalis*, virulence is affected by changes in the environment, such as temperature, pH, zinc, host factors and the iron concentration [9]. *Entamoeba histolytica* and *G. duodenalis* are less studied, but also employ virulence gene regulation.

Entamoeba histolytica & amoebiasis

Amoebiasis is a human parasitic infectious disease primarily caused by *E. histolytica* and is the third most common cause of death due to parasites, following malaria and schistosomiasis. According to the WHO, 500 million people are infected with *E. histolytica*. The life cycle of *E. histolytica* is simple, consisting of two main stages: the trophozoite (amoeba) or invasive stage and the cyst or infective stage. Cysts can tolerate the acidic pH of the stomach and excyst in the terminal ileum. Cysts are transmitted via the fecal-oral route through contaminated water, food and fomites. Destruction of host tissues by amoebae leads to invasive disease pathologies, such as intestinal amoebiasis characterized by lesions in the colon that produce fever, abdominal pain, dysentery and ulcerative colitis with mucous and blood. In some cases, trophozoites can spread through the portal vein to the liver, and in rare cases, infect the lungs, kidneys and brain. Hepatic amoebiasis is characterized by liver abscesses that can be fatal if not treated [10–13]. Amoebae colonize the large intestine and invade the epithelial mucosa. In response to unknown stimuli, amoebae undergo morphological and biochemical changes that lead to the formation of new cysts, which are eliminated in the feces, thereby completing their lifecycle [10,12,13].

Iron in the biology of *E. histolytica*

Entamoeba histolytica trophozoites depend on iron for their metabolism, reproduction and survival inside the host [14]; however, the manner by which iron is acquired and metabolized by *E. histolytica* in different host organs is unknown, as are the serum iron levels in the stages of amoebiasis. There is no evidence indicating that *E. histolytica* alone is capable of reducing Hb levels or producing anemia [15–17]; however, coparasitism can increase the prevalence of anemia or decrease the levels of Hb in the blood [17]. Likewise, *E. histolytica* was the only intestinal parasite capable of aggravating the symptoms of children infected with concomitant hookworm and *Trichuris trichiura* infections that maintain low Hb levels in the blood [18].

Entamoeba histolytica requires approximately 80–100 μM iron for optimal growth in axenic culture media [19,20]. In general, iron is added to the media with the compound ammonium ferric citrate. This amount far exceeds the iron requirements of other pathogenic bacteria and fungi. This phenomenon is a consequence of amoeba metabolism in which metal-dependent proteins, such as acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2, and proteins for cellular detoxification, such as superoxide dismutase (FeSOD) [10,21,22], are crucial. Interestingly, axenic amoebae cultures can reproduce in very high concentrations of iron (up to 630 μM) without showing signs of intoxication [23,24].

Entamoeba histolytica is a primitive eukaryote lacking mitochondria. This anaerobic parasite possesses mitosomes (mitochondrion-related organelles) that lack genomes [25,26]. In mammals, mitochondria are important for haem synthesis and the conformation of proteins with Fe-S centers. Thus, mitochondrial metabolic pathways have undergone several adaptations. However, in *E. histolytica*, the Fe-S cluster system is replaced with the nitrogen fixation (NIF) system and does not appear to be specifically localized to mitosomes [26].

What is Holo-transferrin and what is Apo-transferrin?

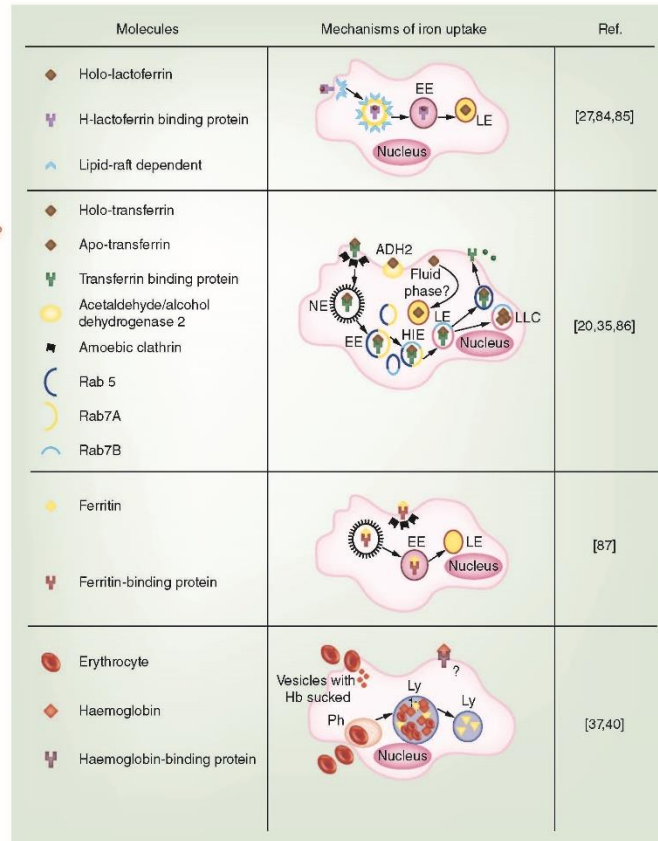


Figure 1. Host proteins containing iron used *in vitro* as an iron source by *Entamoeba histolytica*.

EE: Early endosome; HIE: Hybrid intermediate endosome; LE: Late endosome; LLC: Lysosome like compartment; Ly: Lysosome; Ph: Phagocytic vacuole; RE: Recycling endosome.

Modified with permission from Serrano-Luna *et al.*, 2013 [30].

Entamoeba histolytica obtains iron from host proteins

The mechanisms by which *E. histolytica* can capture iron from culture media are only partially understood (Figure 1). *In vitro*, the parasite obtains iron from various proteins (such as Lf, Tf, Ft and Hb) and locations within the host [23,27–31]. Several iron acquisition mechanisms involving host iron-containing proteins have been reported. For example, one mechanism involves human Lf as an iron source. A 90 kDa protein located on the cell surface specifically binds to human holo-Lf. This ferric protein was endocytosed by filipin-sensitive vesicles, which were recognized by anticaveolin monoclonal antibody [27,32]. Human Tf is captured by amoebae in its holo-Tf form through a binding protein on the amoebic cell surface, acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2, or EhADH2 (accession number: ADH2_ENTHI Q24803), which was previously described by Yang *et al.* and Bruchhaus and Tannich [21,33]. This enzyme recognizes, binds and internalizes holo-Tf [34]. Tf endocytosis is performed by an endosome that, during its biogenesis and early stages, is formed by amoebic homologs of Rab5 and Rab7A. During the middle phase, it incorporates Rab7B, which constitutes the late phase and where lysosomal enzymes

are active [35]. In addition, two proteins that bind Tf have been reported. These proteins are 70 and 140 kDa, respectively, and their sequence and structure suggest that they are homologs of human TfR [20]. Another source of iron for *E. histolytica* is Ft, which is endocytosed through the clathrin-coated vesicle mediated pathway and then reaches lysosomes. Similar to the endocytosis of Tf, Lf has been linked to the endolysosomal system of the amoeba for iron acquisition [27,30]. In addition, amoeba can cleave Ft using neutral and acidic cysteine proteases (CPs). This suggests that there is a protein that can bind to Ft [20].

Importantly, *E. histolytica* is capable of using Hb as an iron source and internalizes this protein via the cell membrane disruption of erythrocytes by hemolysins and phospholipases. In addition, it has been reported that trophozoites possess two haem-binding proteins, Ehhmbp45 (EHL_096540) and Ehhmbp26 (EHL_022250); these proteins are expressed under iron starvation and are capable of binding to the protoporphyrin ring in haem, suggesting that they function as hemophores [36–38]. The mechanism of Hb endocytosis is unknown; moreover, *E. histolytica* is able to phagocytose red blood cells and obtain Hb through hemoglobinases that have optimal proteolytic activity at acidic pH values [23,37,39–41].

Iron-modulated virulence factors of *E. histolytica*

Entamoeba histolytica has evolved several strategies to utilize the resources within human hosts and to evade their defenses. *E. histolytica* acquires diverse nutrients from the host and must successfully enter, adapt, replicate and establish infection for survival [42,43]. The gene expression of virulence factors depends on the parasite as well as variables in the host environment, including iron [44,45].

Genes regulated by iron in *E. histolytica*

Human hepatic amoebiasis, a disease characterized by the production of amoebic liver abscess (ALA), can be reproduced in the liver of Syrian golden hamster via the inoculation of amoebae through the portal vein or directly into the liver [46]. The first analysis indicating that iron was an important nutrient for *E. histolytica* was performed in 1978 by L. Diamond, who showed that hamsters that were fed ferrous gluconate exhibited a high incidence and severity of liver lesions. In addition, he observed that patients suffering from ALA showed hypoferrremia in the serum, similar to that during bacterial infections, and concluded that nutritional immunity by iron is also present in amoebiasis [47].

Iron regulation by *E. histolytica* has been studied by assessing the expression of different genes in medium with either an iron deficiency or an excess of iron. These studies have shown that *E. histolytica* possesses an iron stress response [44,48]. Using the mRNA differential display technique from cultures grown under iron-deficient conditions, researchers identified several genes involved in translation, including those encoding the elongation factor EF-1 α and five ribosomal proteins. These data suggest that low levels of iron increases the requirement for translation machinery. Additionally, a gene encoding a CP was found [49]. Similarly, under restricted iron conditions, the expression of six CPs (*EhCP1–EhCP6*) was significantly increased [44]. These CPs participated in the adherence of amoebae to enterocytes, which are important for combating host defenses, and favors the infection process [44,50] (Table 1). In addition, Cruz-Castañeda *et al.* identified two *E. histolytica* Hb-binding proteins of 45 and 26 kDa (Ehhmbp45 and Ehhmbp26, respectively), which are both involved in obtaining iron from haem. These proteins are possibly hemophores that scavenge haem from Hb or other haem proteins, and thus would be considered virulence factors [36–38] (Table 2).

Hernández-Cuevas *et al.* studied the transcriptome of *E. histolytica* trophozoites under different iron conditions (iron deficiency, low iron and iron deficiency plus Hb). They detected the modulation of 224 genes, among which were those involving oxidoreductases, sulphur-containing amino acid metabolism, stress response molecules, DNA repair, RNA synthesis, CPs and actin-related cytoskeleton proteins. Under iron deficiency, only nine genes were upregulated and 11 were downregulated, suggesting that parasites can adapt successfully to this condition. Interestingly, when Hb was added, 157 genes were modulated, of which 107 were upregulated and 50 were downregulated. This result could be a consequence of the cell's iron requirement. Under low iron concentrations, 126 genes were modulated, 34 positively and 46 negatively, suggesting that the trophozoite could modify its transcriptome to capture and utilize the available iron in the medium [49].

Recently, we reported (Soto-Castro *et al.*) that under iron-restricted conditions, trophozoites negatively regulated the expression of Ehhmbp26, whereas the actin gene was positively regulated. To detect other genes regulated by iron, we performed semi-quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) on mRNA from parasites grown with different iron concentrations [24]. Figure 2 shows the iron-regulated gene expression of *EhCP5*,

Virulence factor	Gene ID	Function	Iron condition	Ref.
<i>EhCP1</i>	ND	Involved in the mechanism of adhesion during the infectious process of amoebiasis. The protease was able to digest native collagen type-I, with an initial cleavage at the α 2-chain, IgA and villin	360 μ g/dl	[44,49-54]
<i>EhCP2</i>	ND	Involved in the mechanism of adhesion, cytopathic effects and phagocytosis during the infectious process of amoebiasis. The protease was able to digest native collagen, proteoglycan and cytokine proIL-1 β	360 μ g/dl	[44,51,53,54]
<i>EhCP3</i>	ND	May be associated with the digestion of nutrients rather than virulence	360 μ g/dl	[30,44]
<i>EhCP4</i>	ND	Involved in the mechanism of adhesion, cytopathic effects and phagocytosis during the infectious process of amoebiasis. The protease was able to digest native laminin, IgA, complement C3, cytokine proIL-1 β and villin	360 μ g/dl	[44,51,54,55]
<i>EhCP5</i>	ND	Degrades a broad spectrum of biological and synthetic substrates, such as mudin, fibrinogen, collagen, hemoglobin, bovine serum albumin, gelatine, IgG, Z-Arg-Arg-pNA and Z-Ala-Arg-Arg-pNA, but not Z-Phe-Arg-pNA. Also involved in degradation of the extracellular matrix	360 μ g/dl	[56-59]
<i>EhCP6</i>	ND	Involved in the mechanism of stress response.	360 μ g/dl	[20,44,60]

ND; Not determined.

Virulence factor	Gene ID	Function	Iron condition	Ref.
<i>Ehhmbp45</i>	EHL_096540	Possibly a hemophore secreted to facilitate the scavenging of haem from the host environment during infection	6.5 μ M	[38]
<i>Ehhmbp26</i>	EHL_022250	Possibly a hemophore; cluster synthesis is activated in the presence of hemoglobin as an iron source	6.5 μ M	[24,37]

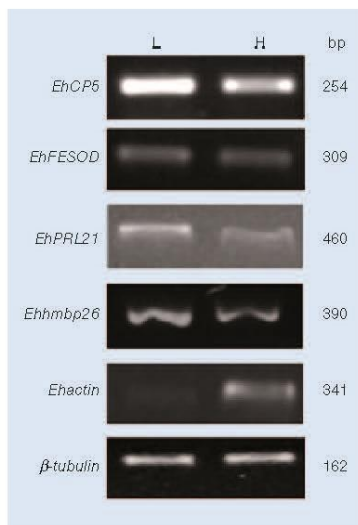


Figure 2. Iron modulated mRNAs in *Entamoeba histolytica*. Semiquantitative RT-PCR assays with specific primers for *EhCP5*, *EhFeSOD*, *EhPRL21*, *Ehhmbp26* and *Ehactin* using cDNA from parasites grown under iron-restricted (6.5 μ M; lane L) and iron-rich (250 μ M; lane H) conditions. The β -*tubulin* gene was used as an internal control. The sizes of the amplicons are given in base pairs. RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.

ribosomal protein 21 (*EhPRL21*) and superoxide dismutase (*EhFeSOD*). In addition, we performed a direct search of putative iron-regulated proteins in *E. histolytica* using the AmoebaDb program Amoeba Genomics Resource (<http://amoebadb.org/amoeba/showApplication.do>). This analysis produced 476 genes for the strain HMI:IMSS, among which we identified hypothetical proteins, putative ribosomal proteins, synthesis and repair of DNA and RNA enzymes, proteins related to the cytoskeleton and kinases. However, only few genes that are modulated by

Table 3. Iron-modulated oxidation-reduction proteins as virulence factors in *Entamoeba histolytica* (upregulated).

Virulence factor	Gene ID	Function	Iron condition	Ref.
Aldose reductase	EHL157010, EHL039190, EHL107560	Possibly participates in siderophore biosynthesis and/or ROS formation	90.7 + 84 μ M of Hb	[49]
Iron-containing superoxide dismutase (Fe-SOD)	EHL159160	Responsible for superoxide radical (O_2N_2) detoxification and includes four iron sulphur flavoproteins	123 μ M	[49,63]
Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2)	ND	Involved in the internalization of human transferrin	Saturated (holo-Tf)	[27,64]
Aldehyde-alcohol dehydrogenase 2	EHL024240	Involved in the internalization of human transferrin	90.7 + 84 μ M of Hb	[49,64,65]
NADPH-dependent oxidoreductase (EhNO ₂)	EHL045340	Involved in redox homeostasis through L-cysteine and iron reduction	90.7 μ M	[49,66,67]

Hb: Hemoglobin; ND: Not determined; ROS: Reactive Oxygen Species; Tf: Transferrin.

Table 4. Actin and cytoskeleton organization proteins as iron-modulated virulence factors in *Entamoeba histolytica* (downregulated).

Virulence factor	Gene ID	Function	Iron condition	Ref.
Actobindin	EHL158570 EHL039020	Possibly involved in the reorganization of the cytoskeleton; reorganization is correlated with the mechanism of adherence	123 μ M	[48,49]
Cofilin	EHL186840	Possibly involved in the reorganization of the cytoskeleton; reorganization is correlated with the mechanism of adherence	123 μ M	[48,49]
Actin	EHL173950	Possibly involved in the reorganization of the cytoskeleton; reorganization is correlated with the mechanism of adherence	6.5 μ M	[48,49]
ARP 2/3 complex subunits	EHL199690 EHL045000	Possibly involved in the reorganization of the cytoskeleton; reorganization is correlated with the mechanism of adherence	123 μ M	[48,49]
S-adenosylmethionine synthetases	EHL174250, EHL004920, EHL195110	Responsible for the biosynthesis of S-adenosylmethionine and is involved in many biosynthetic pathways, including methionine-cysteine conversion and haem biosynthesis	90.7 μ M	[49,61,62]
	EHL195110		123 μ M	

iron had annotated functions. Supplementary Table 1 shows the known functions of virulence factors described in the literature. Data have shown that the same transcript can be overexpressed under one iron condition and not expressed under another. For example, S-adenosylmethionine synthetases (*SAMs*) are upregulated under conditions of 90.7 μ M iron but are negatively regulated at increasing iron concentrations [61,62].

Molecular function of virulence factors up- and downregulated by iron in *E. histolytica*

Within the *E. histolytica* iron-regulated virulence factors, we identified various functions that were classified as CPs (Table 1), Hb-binding proteins (Table 2), oxidation-reduction proteins (Table 3), actin cytoskeleton organization proteins (Table 4) and metabolic enzymes (Table 5).

Cysteine proteases

CPs are proteolytic enzymes involved in adhesion and tissue degradation, as well as in defense against the host immune system; thus, their role in virulence is fundamental [46,61]. The most highly expressed CPs are *EhCP1*, *EhCP2* and *EhCP5*, which are responsible for approximately 90% of enzymatic activity [30].

EhCP1 can digest collagen and is located on the surface of the cell as well as in internal vacuoles. Lee *et al.* showed that its inhibition reduced the ability of the parasite to adhere to the collagen and laminin of enterocytes; therefore, its importance in pathogenesis has been demonstrated [72].

EhCP2 is located both within the inner membrane and on the amoeba surface. *EhCP2* can digest proteoglycan cartilage and collagen of the kidney membrane, functions as a caspase-1 against pro-IL-1 β and is associated with membranes [30,51,55]. Recently, it was demonstrated that *EhCP2* is overexpressed in hamsters infected with amoebae, indicating that *EhCP2* plays an important role in virulence [73].

EhCP5 is responsible for degrading the mucin layer, favoring invasion and is overexpressed in the ALA process. Variability in the gene can make the strain more virulent and aggressive [30,50,74,75]. In addition, *EhCP5* is the most highly expressed CP in the HM1:IMSS strain *in vitro* and plays a fundamental role *in vivo*. *EhCP5* is capable of



Virulence factor	Gene ID	Function	Regulated	Iron condition	Ref.
Cysteine synthase CS1	EHL_171750	Possibly involved with the metabolism of sulphur-containing amino acids	Up	90.7 + 84 μ M of Hb	[49,68,69]
Cysteine synthase CS2	EHL_190630	Possibly involved with the metabolism of sulphur-containing amino acids	Up	90.7 + 84 μ M of Hb	[49,68,69]
Cysteine desulphurase NifS	EHL_136380	Possibly involved with the metabolism of sulphur-containing amino acids	Up	90.7 + 84 μ M of Hb	[2,70,71]
Acyl-CoA synthetase	EHL_153060	Enzyme for <i>de novo</i> lipid synthesis, fatty acid catabolism, vesicular trafficking and membrane remodeling	Up	90.7 μ M and / 90.7 + 84 μ M of Hb	[49,66]
S-adenosylmethionine synthetases	EHL_174250, EHL_004920, EHL_195110	Responsible for the biosynthesis of S-adenosylmethionine and is involved in many biosynthetic pathways including methionine-cysteine conversion and haem-biosynthesis	Down	90.7 μ M	[49,61,62]
	EHL_195110		Up	123 μ M	

adhering to α v β 3 cells that trigger the production of mucin by calciform cells and has a key role in the pathogenesis of amoebiasis [70,71,73].

Other proteases regulated by iron include *EhCP4* and *EhCP6*. *EhCP4* participates in resisting the immune system, functioning as a cytokine of proIL-18, IgA, IgG and C3 of complement, whereas *EhCP6* responds to stress and is described as cathepsin-L like [30,60]. CP regulation by iron was demonstrated by Park *et al.*, who compared patterns of gene expression in media under limited and normal iron concentrations using Northern blot analysis. The genes *EhCP1-6* are overexpressed in limited iron conditions [44]. In Table 1, we summarize the EhCPs that are regulated by iron in the trophozoite and provide a description of their function during pathogenesis.

Hb-binding proteins

Entamoeba histolytica uses Hb to acquire iron from the host [20]. Cruz-Castañeda *et al.* showed that the expression of Ehhmbp45 and Ehhmbp26 is modulated by iron. These proteins are expressed in trophozoites grown in iron-depleted media supplemented with Hb; therefore, they are likely to be negatively regulated by iron [36,38] (Table 2). This was demonstrated through semiquantitative experiments using RT-PCR.

Oxidation reduction proteins

Among the virulence factors involved in oxidation reduction reactions is aldose reductase, which may participate in siderophore biosynthesis and/or Reactive Oxygen Species (ROS) formation [49]. We also identified the iron-containing FeSOD enzyme responsible for the detoxification of ROS and resistance to metronidazole [76]. Overexpression of this enzyme under conditions of iron depletion was assessed by comparing normal medium and medium with an iron chelator, revealing that the presence of ferrous iron increases *FeSOD* expression. Moreover, regulation at the transcriptional level was demonstrated by Northern blot analysis, and a fragment of the 5' region of the *EhFeSOD* gene showed 68% identity with the consensus sequence known as the 'iron box' reported in *Escherichia coli* [21]. Another virulence factor upregulated by iron is the enzyme EhADH2, which is responsible for internalizing human holo-Tf, the main iron transport protein in the host circulatory system [34,64].

Actin cytoskeleton organization proteins

Actin and genes related to the reorganization of the actin cytoskeleton, such as those encoding actobindin and cofilin, are downregulated under low iron conditions. It was proposed that the iron concentration can affect the cytoadherence of trophozoites to enterocytes; thus, virulence and pathogenicity would be affected [46,70]. Regulation of actobindin and cofilin genes by iron was also demonstrated by Hernández-Cuevas *et al.* [49]. In addition, the positive regulation of actin was demonstrated by semi-quantitative RT-PCR by our group [24] (Table 4 & Figure 2).

Metabolic enzymes

Acyl-CoA synthetase is a metabolic enzyme implicated in virulence. Acyl-CoA synthetase is involved in *de novo* lipid synthesis, catabolism of fatty acids, vesicular trafficking and remodeling of the membrane in *E. histolytica*. Acyl-CoA

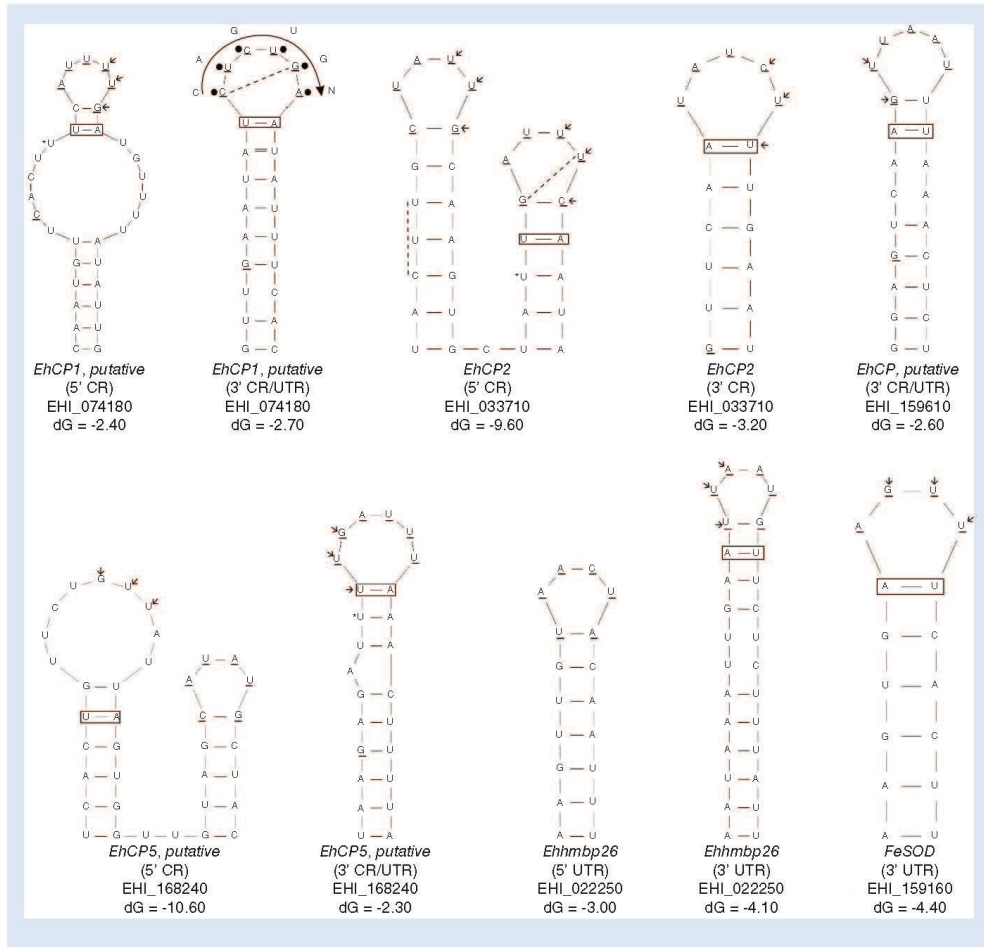


Figure 3. Prediction of stem-loop structures of *Entamoeba histolytica* mRNAs encoding the EhCPs, Ehmbp26 and FeSOD proteins. The six nucleotides that form the apical loop of the canonical IREs are underlined. Nucleotides U-A/A-U in rectangles indicate conserved nucleotides in the upper stem. Filled black circles indicate similar nucleotides to the CAGUGN consensus human motif and a large curved arrow indicates the 5'-to-3' or 3'-to-5' orientation of the sequence. The GUU/UUG protozoan-specific motif is indicated with small arrows. The underlined residue C or G indicates an unpaired residue at position 8. dG, Gibbs free energy or free enthalpy; in this case, a reduction in dG (negative dG) is a necessary condition for spontaneous structure formation. IRE: Iron responsive element.

synthetase is regulated by iron (90.7 μM) in the parasite transcriptome [49,66] (Table 5). Another virulence factor is SAM, which is involved in the biosynthesis of SAM. In many biosynthetic pathways, including methionine-cysteine conversion and haem-biosynthesis, SAM is downregulated under conditions of low iron, whereas it is upregulated under conditions of 123 μM of iron [49,61,62] (Table 5). The cysteine synthases CS1 and CS2 and cysteine desulphurase (NifS) are involved in cysteine metabolism and are possibly part of the metabolism of sulphur-

containing amino acids in *E. histolytica*. These synthases are upregulated under low iron conditions supplemented with Hb [49,68,69] (Table 5).

Identification of a possible iron responsive element/iron regulatory protein mechanism in *E. histolytica*

The expression of key proteins involved in iron metabolism and homeostasis in the cell is controlled post-transcriptionally by the intracellular levels of iron. The regulatory mechanism is mediated by specific interactions between iron responsive element (IRE) sequences located in the mRNA and cytoplasmic proteins called iron regulatory proteins (IRPs) [77,78]. Post-transcriptional regulation by the IRE/IRP system in mammals is well studied, and the iron regulatory cytoplasmic proteins IRP-1 and IRP-2 interact with IREs. IREs contain two regions necessary for IRP binding: the consensus CAGUGN loop sequence (which is more common) and UAGUGN (which is less common). The contiguous stem sequences contain either a conserved C nucleotide five bases upstream of the CAGUGN sequence, which creates a bulge in the hairpin, or a UGC/C loop bulge. Numerous studies have reported RNAs with noncanonical loop sequences that still interact with IRPs. Under low iron conditions, IRPs modulate the expression of proteins involved in iron metabolism by binding to conserved IREs. The regulatory outcome depends on the position and context of the IRE in the mRNA: an IRP bound to a 5'-UTR IRE represses translation, whereas an IRP bound to a 3'- Untranslated Regions (UTR) IRE can indirectly activate translation via the suppression of mRNA degradation [77,78]. In mice, the targeted disruption of IRP-1 and IRP-2 is correlated with phenotypic abnormalities. IRP-1 is associated with pulmonary hypertension, whereas disruption of IRP-2 is associated with microcytic anemia, iron overload in the intestine and liver and neurological defects, and mice that lack IRPs show difficulty in absorbing iron in the intestine [79]. The presence of parallel systems in protozoa such as *T. vaginalis* was recently found by our group and similar systems in *Plasmodium falciparum* have been found by Loyevsky *et al.* [9,80]. In *E. histolytica*, a bioinformatics analysis showed the presence of IRP-type proteins, which have homology with human IRP-2 [24].

IRE-like sequences in *E. histolytica*

The presence of structures similar to IREs in the mRNA of virulence factors in *E. histolytica* was assessed by our group. Using Zuker mfold software, New York, USA, we identified hairpin structures in the CP transcripts (*EhCP1*, *EhCP2*, *EhCP5* and *EhCP* [putative]), the Hb-binding protein (*Ehbmbp26*) at both the 5' and 3'-UTRs (Figure 3) and *FeSOD* exclusively at the 3'-UTR (Figure 3). These IRE-like structures are atypical, because they are not similar to those found in mammals. Similarly, they were able to bind to human IRP in REMSA assays [24]. Moreover, they contained the conserved GUU/UUG sites specific for protozoa [81]. These data suggest the presence of a mechanism similar or parallel to the IRE/IRP iron regulation system in *E. histolytica*.

Conclusion

Parasite virulence factors are crucial for the interaction between host and parasite, as well as for the progression and severity of infection. These virulence factors can be modulated by the microorganism as well as by the host. Iron is a determinant in the survival of *E. histolytica* and is capable of modulating the expression of virulence factors, including CPs, proteins involved with the oxidative stress response, parasite cytoskeletal molecules and metabolic enzymes. Likewise, IRE-like in the RNA of virulence factors have been recently identified that indicate the presence of a post-transcriptional iron regulation system similar to the IRE/IRP of mammals.

Future perspective

The majority of the virulence factors are up- or downregulated by iron as well as their functionality in *E. histolytica* is unknown. In addition, there are many homologous virulence factor proteins whose functions have not been characterized in *E. histolytica*. The mechanism of virulence gene regulation in response to iron is currently being investigated.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb-2018-0066

Executive summary

Iron & *Entamoeba histolytica*

- *Entamoeba histolytica* depends on iron for its pathogenicity, metabolism, reproduction and survival.

Molecular functions of virulence factors up- & downregulated by iron

Cysteine proteases

- Proteolytic enzymes are involved in the mechanism of pathogenicity. The most highly expressed virulence factors include *EhCP1*, *EhCP2* and *EhCP5*, and these are upregulated. *EhCP4* and *EhCP6* are positively regulated by iron.

Hemoglobin-binding proteins

- Negative regulation by iron was shown for Ehmbp26 and Ehmbp45, which obtain iron from the haem group.

Oxidation-reduction proteins

- Aldose reductase possibly participates in siderophore biosynthesis and/or ROS formation. Superoxide dismutase (*EhSOD*) is responsible for the detoxification of superoxide radicals. Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (*EhADH2*) is responsible for the internalization of human holo-transferrin. NADPH-dependent oxidoreductase (*EhNO2*) is involved in redox homeostasis through the reduction of L-cysteine and iron. All of these genes are upregulated by iron.

Actin cytoskeleton organization proteins

- Actin and genes related to the reorganization of the parasite cytoskeleton such as actobindin and cofilin are downregulated by iron. The iron concentration could affect the cytoadherence capacity of the trophozoite.

Metabolic enzymes

- Acyl-CoA synthetase is involved in the catabolism of fatty acids. Cysteine synthase CS1 and CS2 and cysteine desulphurase (Nif5) are involved in cysteine metabolism and possibly in the metabolism of sugar-containing amino acids, and both are upregulated by iron. S-adenosylmethionine synthetase (SAM) participates in the biosynthesis of SAM and in many biosynthetic pathways including methionine-cysteine conversion and haem biosynthesis. SAM is downregulated by iron.

Identification of a possible iron responsive element/iron responsive protein mechanism in *E. histolytica*

- The presence of *cis* elements in mRNA (iron responsive elements [IREs] like) was demonstrated in the *actin* and *Ehmb26* genes, suggesting the presence of a post-transcriptional IRE/iron responsive protein [IRP] iron regulatory system in this parasite.

Conclusion

- Parasite virulence factors are crucial for the interaction between host and parasite, as well as for the progression and severity of infection. Iron is a determinant in the survival of *E. histolytica* and is capable of modulating the expression of virulence factors, including cysteine proteases, factors involved with the oxidative stress response, parasite cytoskeletal molecules and metabolic enzymes. A possible mechanism of iron regulation is via the IRE/iron responsive protein system.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by Grants 152772 (to C León-Sicaíros) and 179251 (to M de la Garza) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. It was also supported by the Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAP) from Universidad Autónoma de Sinaloa (to C León-Sicaíros). Aurora Gastelum-Martínez was a scholarship recipient from CONACyT, México. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

1. Faust DM, Guillen N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect.* 14(15), 1428–1441 (2012).
2. Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* 184, 337–344 (2001).
3. Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67(8), 3703–3713 (1999).
4. Weinberg ED. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46(3), 231–238 (1999).
5. Hernandez-Flores A, Almaraz-Barrera M, de J, Lozano-Amado D *et al.* A new nucleocytoplasmic RhoGAP protein contributes to control the pathogenicity of *Entamoeba histolytica* by regulating EhRacC and EhRacD activity. *Cell Microbiol.* 18(11), 1653–1672 (2016).
6. Finkelstein R, Sciortino C, McIntosh M. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* 5(4), S759–S777 (1983).
7. Weinberg ED. Iron loading and disease surveillance. *Emerg. Infect. Dis.* 5(3), 346–352 (1999).
8. Jurado RL. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 25, 888–895 (1997).

9. Figueroa-Angulo EE, Rendón-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J *et al.* The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect.* 14(15), 1411–1427 (2012).
10. Martínez-Palomo A. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today* 3(4), 111–118 (1987).
11. Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med. Int. Mex.* 23(5), 398–407 (2007).
12. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(2), 318–331 (2000).
13. Stanley SL. Amoebiasis. *Lancet* 361(9362), 1025–1034 (2003).
14. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(1), 72–81 (2008).
15. Adish AA, Estey SA, Gyorkos TW, Johns T. Risk factors for iron deficiency anaemia in preschool children in northern Ethiopia. *Public Health Nutr.* 2(3), 243–252 (1999).
16. Villavicencio-Quejreiro A. La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 15(2), 116–132 (2012).
17. Lucía N, Mfopa A, Jeannette T *et al.* *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* and amebiasis co-infections: synergetic and antagonistic effect on anemia in cameroonian school children. *Int. J. Heal. Sci. Res.* 5(12), 143–152 (2015).
18. Gilman RH, Fitzgerald F. Heavy *Trichuris* Infection and amoebic dysentery in Orang Asli children. a comparison of the two diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 313–316 (1976).
19. Vanacova S, Liston DR, Tachezy J, Johnson PJ. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 235–255 (2003).
20. López-Soto F, León-Sicaños N, Reyes-López M *et al.* Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Genet. Evol.* 9(6), 1038–1050 (2009).
21. Bruchhaus I, Tannich E. Purification and molecular characterization of the NAD⁺-dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 748(1994), 743–748 (1994).
22. Espinosa A, Pedríz G, Paz-y-Miño CG, Lanfranchi R, Phay M. Effects of iron depletion on *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) and trophozoite growth: implications for anti-amoebic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(4), 675–678 (2009).
23. Serrano-Luna JJ, Negrete E, Reyes M, de la Garza M. *Entamoeba histolytica* HMI:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp. Parasitol.* 89(89), 71–77 (1998).
24. Soto-Castro L, Plata-Guzmán LY, Figueroa-Angulo EE *et al.* Iron-responsive-like elements in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* (2508), 1329–1342 (2017).
25. Loftus B, Anderson I, Davies R *et al.* The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433(7028), 865–868 (2005).
26. Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* 100(1), 3–17 (2014).
27. León-Sicaños N, Reyes-López M, Canizalez-Román A *et al.* Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* 151, 3859–3871 (2005).
28. Ortíz-Estrada G, Luna-Castro S, Piña-Vázquez C *et al.* Iron-saturated lactoferrin and pathogenic protozoa: could this protein be an iron source for their parasitic style of life? *Future Microbiol.* 7(1), 149–164 (2012).
29. Reyes-López M, Piña-Vázquez C, Serrano-Luna J. Transferrin: endocytosis and cell signaling in parasitic protozoa. *BioMed Res. Int.* 2015, 12 (2015).
30. Serrano-luna J, Piña-vázquez C, Reyes-lópez M, Ortíz-Estrada G, de la Garza M. Proteases from *Entamoeba* spp. and pathogenic free-living amoebae as virulence factors. *J. Trop. Med.* 2013, 32 (2012).
31. León-Sicaños N, Reyes-Cortes R, Guadrón-Llanos AM, Madueña-Molina J, León-Sicaños C, Canizalez-Román A. Strategies of intracellular pathogens for obtaining iron from the environment. *BioMed Res. Int.* 2015, 17 (2015).
32. Ortíz-Estrada G, Calderón-Salinas V, Shibayama-Salas M, León-Sicaños N, de La Garza M. Binding and endocytosis of bovine hololactoferrin by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Biomed Res. Int.* 2015, 375836 (2015).
33. Yang W, Li E, Kairong T, Stanley SL. *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional *adhE* gene product of *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 253–260 (1994).
34. Reyes-López M, Bermúdez-Cruz RM, Avila EE, de la Garza M. Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2) and clathrin are involved in internalization of human transferrin by *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* 157, 209–219 (2011).
35. Verma K, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Datta S. Insights into endosomal maturation of human holo-transferrin in the enteric parasite *Entamoeba histolytica*: essential roles of Rab7A and Rab5 in biogenesis of giant early endocytic vacuoles. *Cell Microbiol.* 17(12), 1779–1796 (2015).

36. Cruz-Castañeda A, Hernández-Sánchez J, Olivares-Trejo JJ. Cloning and identification of a gene coding for a 26-kDa hemoglobin-binding protein from *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 91(3), 383–389 (2009).
37. Cruz-Castañeda A, López-Casamichana M, Olivares-Trejo JJ. *Entamoeba histolytica* secretes two haem-binding proteins to scavenge haem. *Biochem J* 434(1), 105–111 (2011).
38. Cruz-Castañeda A, Olivares-Trejo JJ. Ehmbp45 is a novel hemoglobin-binding protein identified in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett* 582(18), 2806–2810 (2008).
39. Tsutsumi V, Martínez-Palomo A, Tanikawa K. Scanning electron microscopy of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res* 23(2), 173–175 (1992).
40. Said-Fernández S, López-Revilla R. Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Z Parasitenkd* 67, 249–254 (1982).
41. Talamás-Lara D, Chávez-Munguía B, González-Robles A *et al*. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: a comparative study. *Biomed Res Int* 2014, 626259 (2014).
42. Anaya-Velázquez F, Padilla-vaca F. Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. *Future Microbiol* 6(3), 255–258 (2011).
43. Cross AS. What is a virulence factor? *Crit Care* 12(6), 197 (2008).
44. Park S, Lee S, Lee J, Yong T. Differential gene expression by iron-limitation in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 114(2), 257–260 (2001).
45. Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, Ortega-López J. *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: iron response in gene expression and proteolytic activity. *Biomed Res Int* 2015, 946787 (2015).
46. Ning TZ, Kin WW, Mustafa S *et al*. Detection of *Entamoeba histolytica* in experimentally induced amoebic liver abscess: comparison of three staining methods. *Asian Pac J Trop Biomed* 2, 61–65 (2012).
47. Mayet FG, Powell SJ. Anemia associated with amoebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg* 13(6), 790–793 (1964).
48. Lee J, Park S, Yong T. Effect of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *Korean J Parasitol* 46(1), 37–40 (2008).
49. Hernández-Cuevas NA, Weber C, Hon C-C, Guillen N. Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *PLoS ONE* 9(9), e107102 (2014).
50. Trejos-Suárez J, Castaño-Osorio JC. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio* 13(2), 100–110 (2009).
51. Zhang Z, Yan L, Wang L *et al*. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 37(3), 542–548 (2000).
52. Scholze H, Schulte W. On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed Biochim Acta* 47(2), 115–123 (1988).
53. Luaces AL, Barrett AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 250(3), 903–909 (1988).
54. Li E, Yang WG, Zhang T, Stanley SL. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amoebic pathogenesis. *Infect Immun* 63, 4150–4153 (1995).
55. He C, Nora GP, Schneider EL *et al*. A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, *EhCP4*, is key for invasive amoebiasis and a therapeutic target. *J Biol Chem* 285(24), 18516–18527 (2010).
56. Thibeaux R, Avé P, Bernier M *et al*. The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nat Commun* 5, 1–10 (2014).
57. Hellberg A, Nowak N, Leippe M, Tannich E, Bruchhaus I. Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif* 24(1), 131–137 (2002).
58. Thibeaux R, Dufour A, Roux P *et al*. Newly visualized fibrillar collagen scaffolds dictate *Entamoeba histolytica* invasion route in the human colon. *Cell Microbiol* 14(5), 609–621 (2012).
59. Moncada D, Keller K, Anki S, Mirelman D, Chadee K. Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology* 130(3), 721–730 (2006).
60. Gosh A, Rahab S. Molecular and functional characterisation of a stress responsive cysteine protease, *EhCP6* from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif* 109, 55–61 (2015).
61. Levicán G, Katz A, de Armas M, Núñez H, Orellana O. Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3135–3140 (2007).
62. Sabaty M, Adryanczyk G, Roustan C, Cuiñé S, Lamouroux C, Pignol D. Coproporphyrin excretion and low thiol levels caused by point mutation in the *Rhodobacter sphaeroides* S-adenosylmethionine synthetase gene. *J Bacteriol* 192, 1238–1248 (2010).
63. Bruchhaus I, Tannich E. Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Mol Biochem Parasitol* 67, 281–288 (1994).

64. Reyes-López M, Bermúdez-Cruz RM, Avila EE, De La Garza M. Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2) and clathrin are involved in internalization of human transferrin by *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* 157(1), 209–219 (2011).
65. Espinosa A, Perdrizet G, Paz-γ-Miño G, Lanfranchi R, Phay M. Effects of iron depletion on *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) and trophozoite growth: implications for antiamebic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(4), 675–678 (2009).
66. Black PN, DiRusso CC. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 286–298 (2007).
67. Jeelani G, Husain A, Sato D *et al.* Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 285, 26889–26899 (2010).
68. Ali V, Hashimoto T, Shigeta Y, Nozaki T. Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique enteric protozoan parasite that possesses both phosphorylated and nonphosphorylated serine metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* 271, 2670–2681 (2004).
69. Mishra V, Kumar A, Ali V, Nozaki T, Zhang KYJ, Bhakuni V. Glu-108 is essential for subunit assembly and dimer stability of d-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181, 117–124 (2012).
70. Marie C, Petri WA. Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 68(1), 493–520 (2014).
71. Cornick S, Moreau F, Chadee K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 evokes mucin exocytosis from colonic goblet cells via αvβ3 integrin. *PLoS Pathog.* 12(4), 1–24 (2016).
72. Lee YA, Nam YH, Min A *et al.* *Entamoeba histolytica* -secreted cysteine proteases induce IL-8 production in human mast cells via a PAR2-independent mechanism. *Parasite* 21, 1 (2014).
73. Sánchez V, Serrano-Luna J, Ramírez-moreno E, Tsutsumi V, Shibayama M. *Entamoeba histolytica*: overexpression of the gal/galnac lectin, *ehsp2* and *ehsp5* genes in an *in vivo* model of amebiasis. *Parasitol. Int.* 65(6), 665–667 (2016).
74. Rostami S, Rezaeian M, Jamali R, Rezaei S, Babaei Z, Hooshyar H. Differences in *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 gene isolated from Bandar Abbas and Tabriz, Iran. *Int. J. Enteric Pathog.* 5(2), 49–53 (2017).
75. Ackers JP, Mirelman D. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 367–373 (2006).
76. Iyer LR, Singh N, Verma AK, Paul J. Differential expression and immunolocalization of antioxidant enzymes in *Entamoeba histolytica* isolates during metronidazole stress. *Biomed. Res. Int.* 2014, 1–11 (2014).
77. Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbosa G, Nesse A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Hematología* 39(3), 301–314 (2005).
78. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* 434(3), 365–381 (2011).
79. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system *in vivo*: insights from mouse models. *Front. Pharmacol.* 5, 176 (2014).
80. Loyevsky M, LaVaute T, Allerson CR *et al.* An IRP-like protein from *Plasmodium falciparum* binds to a mammalian iron-responsive element. *Blood* 98(8), 2555–2562 (2001).
81. Torres-Romero JC, Arroyo R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infect. Genet. Evol.* 9(6), 1065–1074 (2009).
82. León-Sicairos N, Ordaz-Pichardo C, Carrero JC, de la Garza M. Lactoferrin in the battle against intestinal parasites: a review. In: *Natural Remedies in the Fight Against Parasites*. Khater M, Gi GG (Eds), Intech Open, Benha University, Egypt, 155–185 (2017).
83. Wilson ME, Vorhies RW, Andersen KA, Britigan BE. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect. Immun.* 62(8), 3262–3269 (1994).
84. Reyes-López M, Serrano-Luna JJ, Negrete-Abascal E, León-Sicairos N, Guerrero-Barrera AL, de la Garza M. *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp. Parasitol.* 140, 132–140 (2001).
85. López-Soto F, González-Robles A, Salazar-Villatoro L *et al.* *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int. J. Parasitol.* 39, 417–426 (2009).

2. Iron Regulatory Proteins-like in the amitochondriate parasites *Entamoeba histolytica* and *Giardia duodenalis*?

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

Iron Regulatory Proteins-like in the amitochondriate parasites *Entamoeba histolytica* and *Giardia duodenalis*?

Authors: Gastelum-Martínez A. A.¹, Arroyo R.², Figueroa-Angulo E.², Plata-Guzmán L. Y.¹, Reyes-Sánchez L. A.¹, Soto-Castro L.¹, López-Moreno H. S.¹, Garzón-Tiznado J. A.¹, Reyes-López M.³, De La Garza M.³, León-Sicairos N.¹ and León-Sicairos C.¹.

¹Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria) Culiacán, Sinaloa 80030, México.

²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco. México, D.F. 07360. México.

³Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco. México, D.F. 07360. México.

*Correspondence should be addressed to Claudia León-Sicairos
e-mail: claudialeonsicairos@uas.edu.mx
Telephone (52) 667 7137860

Abstract

Iron homeostasis in eukaryotes is heavily regulated at the post-transcriptional level by the Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein (IRE/IRP) system. Cytoplasmic proteins IRP-1 and IRP-2 interact with stem loops structures (IREs) in untranslated regions of mRNAs encoding proteins involved in iron metabolism. Infections from *Entamoeba histolytica* and *Giardia duodenalis* can cause amebiasis and giardiasis respectively. Both parasites require iron rich concentrations for growth, however the mechanisms of iron regulation in these protozoans are largely uncharacterised. Recently, our research group identified IRE-like elements in some mRNAs in *E. histolytica* that codes for virulence proteins. *E. histolytica* IRE-like can bind to cytoplasmic proteins, which suggests the possibility of an IRE/IRP system in this parasite. Using *in silico* and preliminary experimental analyses, this addresses the possibility of post-transcriptional iron regulation mediated by IRP-like and RNA binding proteins in *E. histolytica* and *G. duodenalis*. Our data reveals that probably the IRP-like proteins involved in this iron regulatory mechanism, they could also be multifunctional proteins in both parasites.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, RNA-binding protein, post-transcriptional regulation by iron; IRE-IRP system

B. Participación en congresos

1. 6^{to} Congreso de la rama de fisicoquímica, estructura y diseño de proteínas



**6^o CONGRESO DE LA RAMA
DE FISICOQUÍMICA, ESTRUCTURA
Y DISEÑO DE PROTEÍNAS**

DURANGO, MEXICO

November 6-10, 2017

Sociedad Mexicana de Bioquímica certify that

Aurora Alicia Gastelum Martinez

Presented the poster and oral entitled:

Proteínas reguladoras de hierro en *E. histolytica*

By:

Gastelum-Martinez, Aurora Alicia; Plata-Guzmán, Laura Yuliana; Soto-Castro, Liliana; Figueroa-Angulo, Elisa Elvira; Arroyo Rossana; Garzón-Tiznado, José Antonio; Puga-Barraza, Francisco; Hernández-Valenzuela, Marco Antonio; López-Moreno, Héctor Samuel; De la Garza, Mireya; Reyes-López, Magda; León-Sicairos, Claudia.

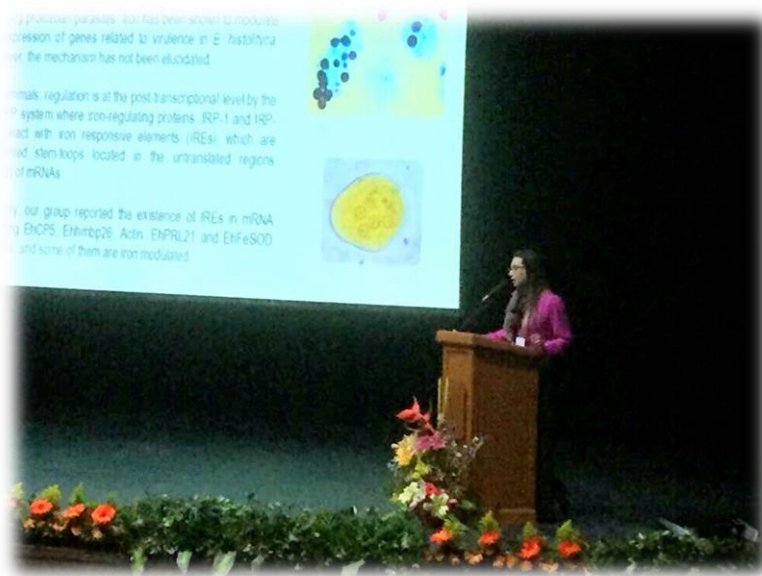
At the 6^o Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas held on November 6-10, 2017 in Durango, Durango, Mexico.

On behalf
The organizing Committee


Dr. Alfredo Téllez Valencia

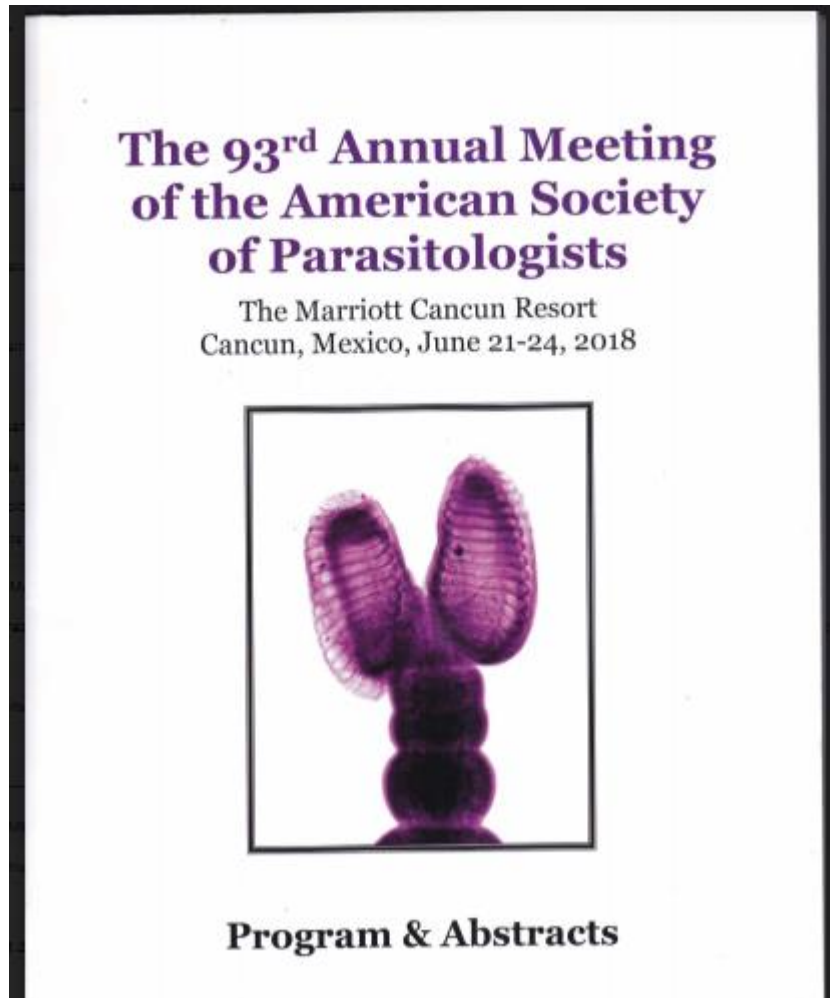

Dra. Mariana Peimbert Torres





Ponencia Oral

2. The 93rd Annual Meeting of the American Society of Parasitologists



1. Sequences of RNA-Binding Proteins (RBP) in amitochondriates parasites *E. histolytica* and *G. duodenalis*.

GENOMICS AND MOLECULAR BIOLOGY

(157)

Gastelum-Martinez, Aurora Alicia; Plata-Guzmán, Laura Yuliana; Figueroa-Angulo, Elisa Elvira; Arroyo, Rossana; Garzón-Tiznado, José Antonio; Reyes-Sánchez, Luz Adriana; De la Garza, Mireya; Reyes-López, Magda; León-Sicairos, Claudia. SEQUENCES OF RNA-BINDING PROTEINS (RBPS) IN AMITOCHONDRIATES PARASITES: *E. HISTOLYTICA* AND *G. DUODENALIS*.



Sequences of RNA-binding proteins (RBPs) in amitochondriate parasites: *E. histolytica* and *G. duodenalis*

Gastelum-Martinez Aurora Alicia, Plata-Guzmán Laura Yuliana, Reyes-Sánchez Luz Adriana, Figueroa-Angulo Elisa Elvira, Arroyo Rossana, Garzón-Tiznado José Antonio, De la Garza Mireya, Reyes-López Magda and León-Sicairos Claudia.

Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Av. De las Américas y Joséfa Ortiz (Cd. Universitaria), Culiacán, Sinaloa, México. C.P. 80330.
E-mail: claudia.leonsicairos@yahoo.com.mx



53

Abstract

Entamoeba histolytica and *Giardia duodenalis* are two protozoa that cause intestinal diseases worldwide. *E. histolytica* is the causative agent of amoebiasis, while *G. duodenalis* causes giardiasis. Both parasites need iron for their survival and virulence; however, iron regulation mechanisms still in study. In mammals, iron homeostasis is regulated at the post-transcriptional level by the IRE/IRP system (Iron Response Elements/Iron Regulatory Proteins). The cytoplasmic proteins IRP-1 and IRP-2 interact with IREs, which are conserved stem-loops structures found in the untranslated regions (UTR) of the mRNAs that encode proteins related to iron homeostasis [1,2]. This mechanism was previously described in *T. vaginalis*, for Tvp14 and Tvp12 proteins which are regulated at the post-transcriptional level [3,4]. Due to their evolutionary closeness we hypothesized the existence of the IRE/IRP system in *E. histolytica* and *G. duodenalis*. Previously, our research group found IRE-like structures in the mRNA of *E. histolytica* by *in silico* analysis. In addition, proteins that interact with human IRPs antibodies are found in the cytoplasmic extracts of both parasites. Therefore, our objective was to search *in silico* RNA binding proteins that would participate in the post-transcriptional regulation of iron in the amitochondriate parasites *E. histolytica* and *G. duodenalis*, in order to determine the presence of this IRE/IRP-like mechanism. Thus, we perform an *in silico* analysis, in which the amino acid sequences of the human IRP1 and 2 proteins were searched. In addition, *T. vaginalis* IRP-like (o-TvACT3, HSP70-4 and Actin) were used as probes in both in *E. histolytica* (AmoebaDB) as in *G. duodenalis* (GiardiaDB) genomes; subsequently possible orthologous were analyzed for RNA-binding motifs in the SMART9 and proSite program. The analysis revealed possible orthologous for *E. histolytica*, of which only four showed RNA-binding domains. On the other hand, *G. duodenalis* genome showed 28 possible orthologous however none of them showed RNA-binding sites; possible the binds would occur once the protein acquires the tertiary structure. These results suggest the presence of an iron post-transcriptional mechanism IRE/IRP-like in *E. histolytica* and *G. duodenalis*. Likewise, studies are in progress to identify and characterize IRP-like proteins. The knowledge derived from this work can help in the future for the development of new diagnostic methods.

Results and Discussion

Table 1. Possible orthologs of human IRP1 and IRP2 found in *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome.

Microorganism	Protein	ID Gene bank	ID AmoebaDB	Name	Length (aa)	Molecular Weight (kDa)	Identity (%)
<i>E. histolytica</i>	IRP-1	P21399.3	EHI_131110A-p1	Hypothetical protein	154	16.94	39
	IRP2	P48200.3	EHI_050750A-p1	Protein phosphatase 2C domain containing protein	837	92.07	28
			EHI_036510A-p1	Hypothetical protein	440	48.4	29
<i>G. duodenalis</i>	IRP-1	P21399.3	GL50803_14790	Hypothetical protein I28_1-p1	420	46.2	32

2. Search of RBPs in *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome

In the *G. duodenalis* proteome, four possible orthologs were found for TvACT3, seven for Actin and ten for HSP70-4, however none of them presented nucleic acid binding domains, however, possibly these proteins could interact with nucleic acids after protein folding. Moreover, we found hypothetical, heat shock and actin proteins, among others.

On the other hand, in the *E. histolytica* proteome, 14 possible orthologs for TvACT3 were found of which only one showed RNA binding domains, meanwhile 25 possible orthologs for HSP70-4 were found of which four showed nucleic acids binding domains, while 15 possible orthologs for Actin were found of which two showed nucleic acids binding domains (Table 2).

Materials and Methods

1. Search of IRP-like in the *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome



2. Search of RBPs in the *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome



Table 2. Possible orthologs of TvACT3, HSP70-4 and Actin found in *E. histolytica* proteome.

Protein Probe	ID InChIbD	Possible orthologs (total)	Sequences with binding site to N ⁺	ID AmoebaDB	Name	Molecular weight (kDa)	Identity (%)	Binding Site	RNA-Binding Site	Name of Binding Site
TvACT3	TvAG_193450	14	1	EHI_202480 A-p1	Calponin-hormotry domain containing protein	31	29	2	1	ProQ
TvHSP70-4	TvAG_044570	25	4	EHI_022830 mP9A-p1	Heat shock protein70, mitochondria al. putative	66	48	3	1	PCNA
TvACT	TvAG_054030	15	1	EHI_043940 actin, putative	actin, putative	36	74	3	1	54
	TvAG_200190	15	1	EHI_043940 actin, putative	actin, putative	36	74	3	1	54

Results and Discussion

1. Search of IRP-like in the *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome

The analysis revealed three possible orthologs for *E. histolytica*, none of which have DNA or RNA binding sites, however, the possible orthologs of IRP2 (ID EHI_050750A-p1), has a molecular size very similar to that of the human IRP [5]. On the other hand, *G. duodenalis* only showed one possible orthologs which was obtained for human IRP1 and neither contain binding sites to nucleic acids. These results are similar those reported for *Trichomonas vaginalis*, amitochondrial parasite with evolutionary closeness to *E. histolytica* and *G. duodenalis*, which did not exhibited orthologs of human IRP1 and IRP2 instead exhibit multifunctional proteins which are capable to interact with RNA according to intracellular iron concentrations. Thus, we hypothesized that both *E. histolytica* and *G. duodenalis* have a similar behavior.

Conclusion

Our data suggest that probably the IRP-like proteins may exist in the cytoplasm of the *E. histolytica* and *G. duodenalis*, which could participate in a post-transcriptional regulation IRE/IRP-like system. Thus, as occurs in *T. vaginalis* IRP-like, these proteins could be multifunctional.

None of the sequences presented RNA-binding domains

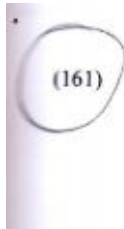
Acknowledgements

We are grateful for the support of PROFAP and CONACYT (152772) to CRLS, AAGM and LYPG were a scholar-ship recipient from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

References

1. Fournier K. Iron metabolism and the IRP/IRE regulatory system. *Annu Rev Physiol*. 2008;70(1):1-13. doi:10.1152/physiol.00021.2008.
2. Jones RS, Meehan M, Blakesley M, Collier AC, Miskiewicz C. The IRP/IRE Regulatory Network. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(2):169-178. doi:10.1016/j.ab.2012.05.005. Article from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448888/>.
3. Bouchard-Lacoste R, Faganha RB, Gauthier LS, et al. The mitochondrial cytochrome P-450 hemo C contains an iron-responsive element. *FEBS Lett*. 2002;521(1):11-16. doi:10.1016/S0014579402000100.
4. Reyes-Rivera JC, Arroyo R. Expression of *Entamoeba histolytica* genes regulated by iron concentrations. Evidence for a post-transcriptional iron regulation via IRP/IRE system. *Indian J Biochem Biochem Sci*. 2014;43(1):10-15. doi:10.1007/s12040-013-0503-2.
5. Boudat M. The role of iron regulatory proteins in hemostasis and disease. *Int J Hematol*. 2008;87(4):474-481. doi:10.1007/s12017-008-1007-7.

2.- Specific interaction of two IRE-Like from *Entamoeba histolytica* to human iron regulatory proteins



Plata-Guzmán, Laura Yuliana; Figueroa-Angulo, Elisa Elvira; Calla-Choque, Jaeson; Arroyo, Rossana; De la Garza, Mireya; Reyes-López, Magda; Chávez Ontiveros, Jeanett; Soto-Castro, Lilitiana; Gastelum-Martínez, Aurora Alicia; Garzón-Tiznado, José Antonio; León-Sicairos, Claudia. SPECIFIC INTERACTION OF TWO IRE-LIKE FROM *ENTAMOEBEA HISTOLYTICA* TO HUMAN IRON REGULATORY PROTEINS.

#150

Specific interaction of two IRE-like from *Entamoeba histolytica* to human iron regulatory proteins

Plata-Guzmán Laura Yuliana¹, Figueroa-Angulo Elisa Elvira², Calla-Choque Jaeson², Arroyo Rossana², De la Garza Mireya³, Reyes-López Magda³, Chávez Ontiveros Jeanett¹, Soto-Castro Lilitiana¹, Gastelum-Martínez Aurora Alicia¹, Garzón-Tiznado José Antonio¹, León-Sicairos Claudia¹.

¹Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria) Culiacán, Sinaloa 80030, Mexico. ²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco. Mexico City, CP 07360. Mexico. ³Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico D.F. 07360, Mexico.

INTRODUCTION

Entamoeba histolytica infect human causing amoebiasis, that is catalogued as the third most frequent parasitic cause of death worldwide. In *E. histolytica* has been reported that iron has the ability to modulate the expression of genes related to the virulence of the parasite. However, the mechanism by which this expression is regulated has not been well described. In mammals, the posttranscriptional regulation of iron by the IRE/IRP system (Iron Responsive Element/Regulatory Protein) is the most studied. The iron regulatory cytoplasmic proteins, IRP-1 and IRP-2, interact with Iron Responsive Elements (IRE), which are conserved stem-loop structures located in the untranslated regions (UTR) of the mRNA that encode proteins related to iron homeostasis. Recently, our research group has reported the existence of a posttranscriptional iron regulation system parallel to the IRE/IRP system in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*, this mechanism has been described for some proteins of T. vaginalis virulence. In addition, our group has found stem-loops structures in *E. histolytica* mRNAs coding tRNCP^{lys}, tRNAC^{gln}, tRNAC^{glu}, tRNAC^{gaa}, tRNAC^{gac}, tRNAC^{guc}, tRNAC^{gug} and tRNAC^{gaa} proteins, in some of which it has been shown that are modulated by iron. However, the functionality of the IRE-like structures has not been demonstrated. Therefore, the aim of this work was to determine the specific interaction of two IREs of the parasite tRNAC^{gln} and tRNAC^{gaa} to human cytoplasmic proteins. Our interaction assays were carried out using these IREs of the parasite with cytoplasmic extracts of HeLa cells. Our results showed specific interaction of IRE-IRP type. In addition, by UV-crosslinking assays we observed protein bands of 96 and 110 kDa. These data suggest the presence of an IRE/IRP system in *E. histolytica*.

METHODS

RESULTS AND DISCUSSION

The tRNAC^{gln} RNA sequence (5'-L102202) is able to form two IRE-like hairpins at both 5'UTR; however, the IRE-like structure at the 3' UTR appears more stable. This structure contains the conserved A-U in the upper stem (as reported in higher eukaryotes) and A-U residues in the loop that could be a variant of the CUG protospacer-specific motif. In addition, it has been reported to be down-regulated by iron [1], thus, the IRE-like structure located at the 3' UTR could be functional. Moreover, the acetic sequence (2'-L140120) is able to form two IRE-like structures at both 5'UTR, including the coding region, as reported for tRNAC^{gaa} [2]. The 5'-end of acetic-IRE contains CUU residues in the loop, A-U residues conserved in the upper stem and unpaired G reported in the canonical IREs [2] (Figure 1).

CONCLUSION

Our results show evidence of the presence of atypical IRE-like hairpin-loop structures in some *E. histolytica* mRNAs, supporting the possibility of an iron-regulatory mechanism at the posttranscriptional level similar to the IRE/IRP system of higher eukaryotes. Moreover, the tRNAC^{gln} and acetic IRE-like structures specifically bind to the human IRP1 (IR and TIR) and to other cytoplasmic proteins. Investigation of this mechanism could provide insight into the complex functions that iron plays in the metabolism, survival and virulence of this human parasitic pathogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the support of DEFICONACTY (10270), PROPPM-UG, PROMET-UG and OJEL. Laura Yuliana Plata Guzmán is CONACYT scholarship holder.

REFERENCES

- Shenker C, López-Casamitros B, Cruz-Castellanos A, Olvera J. Transferrin regulates mRNA levels of genes involved in iron utilization of *Plasmodium falciparum*. *Mol Bio* 2010; 34:404-410.
- Soto-Castro L, Bernal-Benito E, León-Sicairos C, Astudillo-López L, Gallegos-Sánchez L et al. The bacterium cytoplasmic protein TIG1 transcription factor binds an iron-responsive element. *FEBS Lett* 2007; 581:2015-2020.
- Yan H. The functional stability of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol* 2008; 18:100-101.
- Henderson IR, Marvell S, Smead C, Kilar J. C. Optimal sequence and structure of iron-responsive elements. Selection of IRE stem-loops with high affinity for iron regulatory factor. *J Biol Chem* 1994; 269:11485-11490.

C. Participación en conferencias



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
SORSUM VERSUS

CONSEJO DE INVESTIGACIONES 2017

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
FCQB



La **Facultad de Ciencias Químico Biológicas**
a través de la
Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms" y los
programas de Maestría y Doctorado en Ciencias Biomédicas (PNPC-CONACYT)
Otorgan la presente

CONSTANCIA

A

M en C AURORA ALICIA GASTÉLUM MARTÍNEZ

Por su ASISTENCIA a las conferencias

¿QUÉ ES ESO DE LAS CIENCIAS ÓMICAS Y COMO SE APLICAN AL ESTUDIO DE UN PARÁSITO COMO EL CISTICERCO?
y
"EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y LOS ESTUDIOS DE POSGRADO EN MÉXICO"

Impartidas en Culiacán, Sinaloa, el 20 de Mayo de 2016.

Atentamente
"Sorsum versus"



Dr. Jorge Milán Carrillo
Director



Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Sinaloa, Sinaloa
DIRECCIÓN



Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho
Jefa de la Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms" y Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biomédicas

Act
ve a

SE OTORGA LA SIGUIENTE

CONSTANCIA A:

AURORA ALICIA GASTELUM MARTINEZ

POR ASISTIR AL CURSO:

ScienceDirect - Scopus - Mendeley

Universidad Autónoma de Sinaloa

13 de Junio del 2017

2 horas



Mtro. Juan Miguel Juárez Del Toro
INSTRUCTOR
Latin America North



Trasciende de México
CAPACITACIÓN Y USO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS

D.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Cuerpo Académico en Inmunogenética
y Biología Molecular

CONSTANCIA

a:

MC AURORA ALICIA GASTELUM MARTINEZ

Por haber acreditado el **I CURSO TEÓRICO: Aplicaciones de las plataformas TaqMan OpenArrays y PCR digital en investigación biomédica** realizado del 24 al 26 de mayo de 2017 con un valor curricular de 8 horas

Dra. Maribel Aguilar Medina
Coordinadora del Curso

Dr. Jorge Milán Carrillo
Director FCQB

Dra. Maribel Acosta Tejeda
Especialista de aplicaciones applied biosystems thermo fisher scientific

