

Aspectos estructurales de Rab GTPasas de *Entamoeba histolytica*

Structural aspects of Rab GTPases from *Entamoeba histolytica*

Isaac Serna Gutiérrez, Salma Abisay Guerrero Vertiz, Ana Luz Morales Guerrero, América Liliana Estrada Hernández, Itzel Sierra Lemus, Felipe Padilla-Vaca, Quetzalli Xiadany Macías Cervantes, Marcos Vicente Gómez, Naurú Idalia Vargas Maya y Bernardo Franco Bárcenas¹

¹Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato. Guanajuato 36050, México.

ni.vargas@ugto.mx, bfranco@ugto.mx¹

Resumen

Entamoeba histolytica es un organismo protozoario patógeno de humanos de importancia biomédica. El genoma de este organismo reveló que codifica para más de 90 Rab GTPasas, algunas de las cuales es dudosa su anotación dada su baja homología y la ausencia de los residuos clave en la unión e hidrólisis del GTP. ¿Por qué este organismo codifica para un número tan grande de proteínas relacionadas al control de procesos celulares como la fagocitosis, trogocitosis, motilidad y tráfico vesicular? Las Rab GTPasas son proteínas altamente conservadas y su papel principal es el control del tráfico vesicular y *E. histolytica* depende de la secreción de diversas proteínas para su supervivencia y colonización del hospedero, pero solamente se había observado un alto número de Rab GTPasas u otras GTPasas en organismos multicelulares. En este trabajo, se abordan aspectos estructurales de las Rab GTPasas de *E. histolytica* usando modelos predictivos de su estructura, para determinar si existen indicios sobre su posible papel funcional, y no ser genes simplemente redundantes, para la biología de este organismo. Adicionalmente, se describen algunas características de estas GTPasas que potencialmente las puede posicionar como herramientas de diagnóstico, ya que los métodos tradicionales de diagnóstico son complicadas y tardadas.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*; Rab GTPasas; tráfico vesicular; regulación.

Introducción

Entamoeba histolytica es un organismo protozoario patógeno de humanos cuyo sitio de infección es el colon, causando infecciones intestinales. También puede manifestarse como un organismo que produce infecciones extraintestinales ocasionando la formación de abscesos hepáticos e incluso la colonización de otros órganos como son los pulmones y cerebro (Chou, Austin., 2023) (Jackson-Akers *et al.*, 2023). Posee importancia médica debido a su alta tasa de mortalidad y morbilidad. Se estima que el 10% de la población humana está infectada con este parásito, causando cerca de 50 millones de casos anualmente, de los cuales 100 mil pierden la vida (WHO., 1997) (Ali *et al.*, 2008) (Nasrallah *et al.*, 2022). La transmisión de este organismo es por vía oral-fecal mediante la ingesta de quistes los cuales pueden sobrevivir en el ambiente por semanas e incluso meses.

Este es un parásito cosmopolita, pero su presencia es mayor en países en desarrollo por una deficiencia en higiene y contención del agua potable con agua contaminada con materia fecal, siendo los niños los que presentan mayor morbilidad y mortalidad. La prevalencia ronda entre el 1.72% en Oceanía (la frecuencia más baja) a 21.58% en América del Norte (siendo la más alta). En Europa la prevalencia se observa en viajeros e inmigrantes. De 2022 a la fecha en México se han reportado 59,679 casos de amebiasis intestinal (Boletín epidemiológico del sistema nacional de vigilancia epidemiológica). Las especies que prevalece en humanos son *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki* y *E. bangladeshi*. (Cui *et al.*, 2019) (Stauffer, Ravdin., 2003).

En primates no humanos, se han encontrado casos de infección de este parásito, con diferencias moleculares importantes y se ha identificado a la especie como *Entamoeba nuttalli* (Cui *et al.*, 2019) (Elsheikha *et al.*, 2018), un organismo altamente emparentado con el parásito humano *E. histolytica*. Este dato sugiere que este microorganismo patógeno tiene variaciones genéticas importantes que pueden estar asociadas a sus mecanismos de supervivencia o de respuesta al ambiente, siendo este último, un determinante en su naturaleza como parásito de vertebrados.

En 2005, se determina la secuencia genómica de este organismo patógeno (Loftus *et al.*, 2005). La estructura genómica de *E. histolytica* resaltó dos aspectos importantes. El primero es que hay una baja variación a nivel de nucleótidos entre cepas de laboratorio (Gilchrist., 2016). El segundo, se ha encontrado un gran número de eventos de rearreglo y recombinación en este organismo que han dado lugar a cambios en su estructura genómica importantes y esto a pesar de que este parásito no presenta un ciclo sexual de reproducción (Gilchrist, 2016), lo que pudo resultar en la duplicación de muchos genes. La infección concomitante de diferentes cepas en un mismo hospedero puede ser responsable de esta variación genómica (Ali *et al.*, 2017) y estar asociada a un aumento en la ploidía de este organismo lo que resulta en un aumento de las copias de algunos genes (Parfrey *et al.*, 2008) (Lohia *et al.*, 2007) y esto está asociado a las condiciones de crecimiento del organismo (Mukherjee *et al.*, 2008). El mecanismo más importante relacionado con esta dinámica genómica parece estar asociado a altos niveles de recombinación y entender qué dispara estos eventos puede ayudar a entender la diversidad genética de estos parásitos, que ultimadamente puede resultar en ventajas adaptativas a su medio circundante (Gilchrist, 2016).

Una de las consecuencias de esta diversidad genómica es la expansión de familias de genes en las diferentes especies y cepas del género *Entamoeba* (Wilson *et al.*, 2019). Y un promotor importante de esta variación son los elementos transponibles, que tanto pueden promover recombinación como afectar la expresión de genes vecinos, siendo que al comparar la distribución de estos elementos genéticos pudieron influir en la divergencia entre especies y resultando en diferencias en el fenotipo de virulencia que muestran (Kumari *et al.*, 2011). Análisis genómico ha revelado la expansión de algunos genes, un ejemplo es BspA (que presenta 22 genes homólogos) los cuales son proteínas con un motivo rico en leucinas (Wilson *et al.*, 2019). De este tipo de proteínas hay una que tiene la función de reconocer el factor de necrosis tumoral (TNF) ya que es una proteína homóloga al receptor de TNF (TNFR1) y causa la quimiotaxis de este organismo a este factor inflamatorio (Silvestre *et al.*, 2015), lo que sugiere que pueden surgir funciones nuevas en genes duplicados.

Otra familia de genes homólogos que destaca son los que codifican para proteínas AIG1, con 49 genes homólogos, las cuales son GTPasas que originalmente se identificaron en *Arabidopsis thaliana* y que se ha demostrado que son necesarias para la resistencia a infecciones bacterianas (Reuber, Ausubel., 1996), pero en *E. histolytica* se ha demostrado ser necesarias para el proceso infeccioso, probablemente regulando el tráfico vesicular y, por ende, la secreción de factores de virulencia (Lozano-Mendoza *et al.*, 2023).

Un ejemplo del impacto de la expansión genética que resulta importante, como se menciona en líneas arriba, es la regulación del tráfico vesicular. *E. histolytica* codifica para más de 90 genes pertenecientes a las Rab GTPasas, las cuales son una familia de proteínas involucradas en el tráfico vesicular (Saito-Nakano *et al.*, 2005). Esta expansión genómica es sobresaliente, ya que solamente se ha demostrado un elevado número de genes codificantes para estas GTPasas en organismos multicelulares. Las Rab GTPasas son una familia de proteínas involucradas en regular el tráfico vesicular en células. El hecho que en este parásito tenga una expansión de estos genes sugiere que el tráfico vesicular en *E. histolytica* es complejo y altamente regulado y quizá esté relacionado con otros procesos vitales como lo es la formación del quiste que le permite propagarse entre individuos.

Saito-Nakano y colegas (2005) muestran que no en todos los genes codificantes de estas proteínas tienen los motivos conservados con los homólogos de humano y levadura, lo que sugiere que han divergido en este organismo parásito, de hecho, tienen baja homología con estas proteínas. Por ejemplo, no todos los genes tienen los motivos típicos o tienen nuevos, como son las cisteínas en el carboxilo terminal que se han demostrado en Rab GTPasas de humano son necesarias para una modificación postraduccional (isoprenilación), las cuales en *E. histolytica* son diferentes (Saito-Nakano y col, 2005).

También se ha demostrado en este organismo que hay una localización subcelular diferente para las proteínas Rab GTPasas, ya que algunas se ubican en la membrana celular en la cara citoplásmica lo cual difiere de lo observado en Rab GTPasas en vertebrados que usualmente se asocian a membranas endosomales y lisosomales (McGugan, Temesvari., 2003). Otras isoformas de estas proteínas están asociadas con la regulación del movimiento de vesículas durante la fagocitosis y trogocitosis y la formación del complejo del fagosoma (Saito-Nakano *et al.*, 2021) (Javier-Reyna *et al.*, 2019). Sin embargo, no se ha logrado demostrar que el resto de las RabGTPasas son tanto funcionales como especializadas en una función.

Un aspecto importante para la biología de este organismo es la ausencia de proteínas Rab que en humano están involucradas en el reciclaje de endosomas (Rab4) y en el tráfico trans-Golgi (Rab11) (Saito-Nakano y col, 2005). Esto sugiere que la biología de este organismo tiene diferentes reguladores de procesos celulares y que como se ha sugerido por Verma y colegas (2018), estas proteínas pueden de manera diferencial regular la captura de diferentes células, ya sean bacterias o eritrocitos, ambos tipos celulares esenciales para la supervivencia de este parásito.

Obtener la estructura cristalográfica de una proteína es una tarea compleja, para la cual se requiere obtener una proteína pura y homogénea, la cual en el caso del parásito *E. histolytica* es todavía más complejo dada las condiciones especiales de crecimiento que presenta y los requerimientos en los medios de cultivo (Clarl, Diamond., 2002). Por lo que determinar la estructura cristalográfica de más de 90 proteínas codificantes para Rab GTPasas de *E. histolytica* resultaría ser una tarea titánica. En este trabajo, usando el mayor avance bioinformático de los últimos años, AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021), se analizó la estructura de las GTPasas predichas para este organismo para identificar diferencias en el plegamiento con aquella que se ha logrado cristalizar (Srivastava *et al.*, 2016). El análisis estructural permite encontrar zonas de las proteínas para las cuales no se han logrado obtener una estructura de referencia y por tanto pueden ser regiones novedosas en esta familia de proteínas y, por tanto, ser funcionalmente únicas para este organismo parásito. Adicionalmente, aquellas más divergentes en cuanto a estructura y secuencia, son candidatos a ser blancos terapéuticos.

Materiales y Métodos

La secuencia primaria y los modelos estructurales se obtuvieron de la base de datos Uniprot (uniprot.org/). Se generó una nueva reconstrucción filogenética usando MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Las secuencias se alinearon usando MUSCLE en MEGA11 y la reconstrucción se hizo con el método de Máxima verisimilitud con el modelo de matriz JTT y 1000 réplicas de Bootstrap.

El alineamiento de secuencias fue realizado con Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) y la visualización con Alignment Viewer (<https://alignmentviewer.org/>). Representaciones de secuencias por frecuencia de aminoácidos se hizo con WebLogo (Crooks *et al.*, 2004). Las estructuras no disponibles en Uniprot y modelos de multímeros fueron realizados con AlphaFold2 usando las condiciones predeterminadas en un espacio colaborativo de Google (Mirdita *et al.*, 2022).

Las comparaciones entre las estructuras obtenidas del Protein Data Bank y los modelos generados en este trabajo se hicieron con US-align usando las condiciones predeterminadas (Chengxin *et al.*, 2022) y visualizadas con UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) o PyMol (Schrödinger, DeLano., 2020). UCSF Chimera fue usado también para estimar la carga de superficie de la EhRabX12.

La predicción de cruces transmembranales, péptidos señal y modificaciones postraduccionales se realizó con Protter (Omasits *et al.*, 2014).

Resultados y Discusión

¿Por qué un organismo unicelular tiene 90 secuencias codificantes para Rab GTPasas? ¿Es redundancia genética o hay alguna base funcional al respecto? Para abordar estas preguntas en este trabajo se usaron herramientas computacionales para analizar diferencias en secuencias o estructuras de estas proteínas responsables de regular el tráfico vesicular.

El primer paso fue realizar una reconstrucción filogenética nuevamente ya que el trabajo de Saito-Nakano y col (2005) podría tener secuencias que hayan sido actualizadas en las revisiones más recientes del genoma de *E. histolytica* (versión del 19/04/2023). Las revisiones de las secuencias genómicas son importantes ya que pueden haberse eliminado secuencias anotadas que en realidad hayan surgido de un artefacto durante la secuenciación y ensamblaje del genoma.

En la Figura 1 se compararon las 90 secuencias de *E. histolytica* con las mismas Rab GTPasas de organismos en los que ya se han caracterizado y son referencia de homología en el trabajo de Saito-Nakano y col (2005) mediante un alineamiento múltiple y mostrando gráficamente las regiones de homología (Figura 1, panel A) y por características de carga o hidrofobicidad (Figura 1, panel B). El resultado muestra que la mayoría de las Rab GTPasas son conservadas en tamaño y secuencia y no hay indicios evidentes de características sobresalientes en las secuencias de estas proteínas. Al reconstruir la presencia de los residuos más relevantes de estas proteínas (Bourne *et al.*, 1991) se puede ver que existe una gran diversidad en la caja G1 que es responsable de la unión con el GTP (Figura 1, panel C). En el caso de las GTPasas de *E. histolytica*, los residuos presentes pertenecen a todos los tipos de GTPasas pequeñas, pero no específicamente de las RabGTPasas, donde los residuos conservados son GVGK(T/S), siendo en este organismo más variable (Paduch *et al.*, 2001). El resto de las secuencias relevantes para su función muestran mayor conservación.

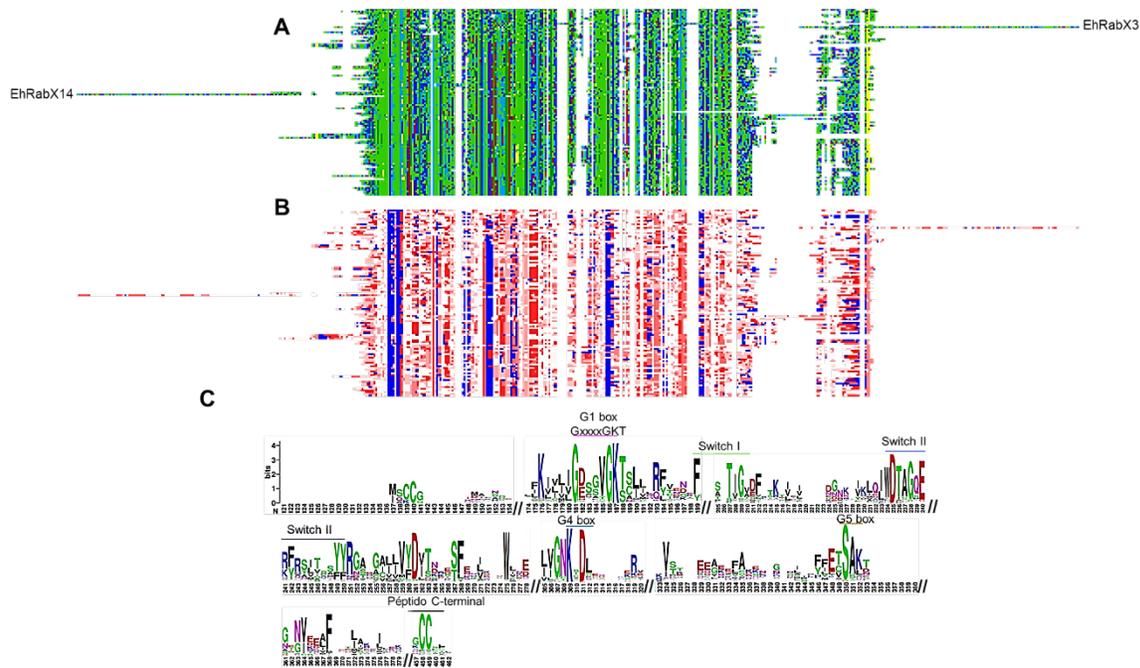


Figura 1. Las Rab GTPasas de *E. histolytica* son conservadas a nivel de secuencia. En el Panel A se muestra el alineamiento general de Rab GTPasas de *E. histolytica*, levadura y humano, usando el código de colores MSA (conservación de residuos). En el panel B, el mismo alineamiento se muestra indicando en azul, carga positiva; en rojo, carga negativa y en blanco, residuos hidrofóbicos. En panel C, se muestra un Weblogo discontinuo de las regiones más conservadas de estas proteínas. Al incluir las secuencias de *E. histolytica* se muestra una mayor diversidad especialmente en la caja G1, que es el sitio de interacción con el GTP.

El resultado anterior sugiere que la diversidad de estas proteínas en *E. histolytica* podría estar relacionada con aspectos estructurales. Usando una de las herramientas más importantes en la biología estructural, AlphaFold y la base de datos que contiene la predicción de la estructura de muchos proteomas completos usando esta herramienta (Varadi *et al.*, 2022) (Jumper *et al.*, 2021), verificamos que la predicción de la estructura de estas proteínas sea consistente con un dato estructural determinado experimentalmente como es el caso de la EhRabX3 (Srivastava *et al.*, 2016). EhRabX3 es una GTPasa atípica, que tiene dos dominios de GTPasa en tándem (ver Figura 1 panel A), uno más conservado que el otro y que in vitro presenta una actividad baja de GTPasa (Chandra *et al.*, 2014). En la Figura 2 panel A, se muestra la comparación entre la estructura cristalográfica de la EhRabX3 y el modelo generado con AlphaFold2. El valor de RMSD muestra un grado de similitud elevado, aunque no perfecto, derivado de que la proteína cristalizada carece del dominio carboxilo terminal, para poder realizar su cristalización. Los sitios catalíticos quedan alineados perfectamente (Figura 2, panel B). Esto sugiere que se puede realizar un análisis comparativo entre todas las Rab GTPasas de *E. histolytica* para evaluar diferencias no encontradas a nivel de secuencia primaria.

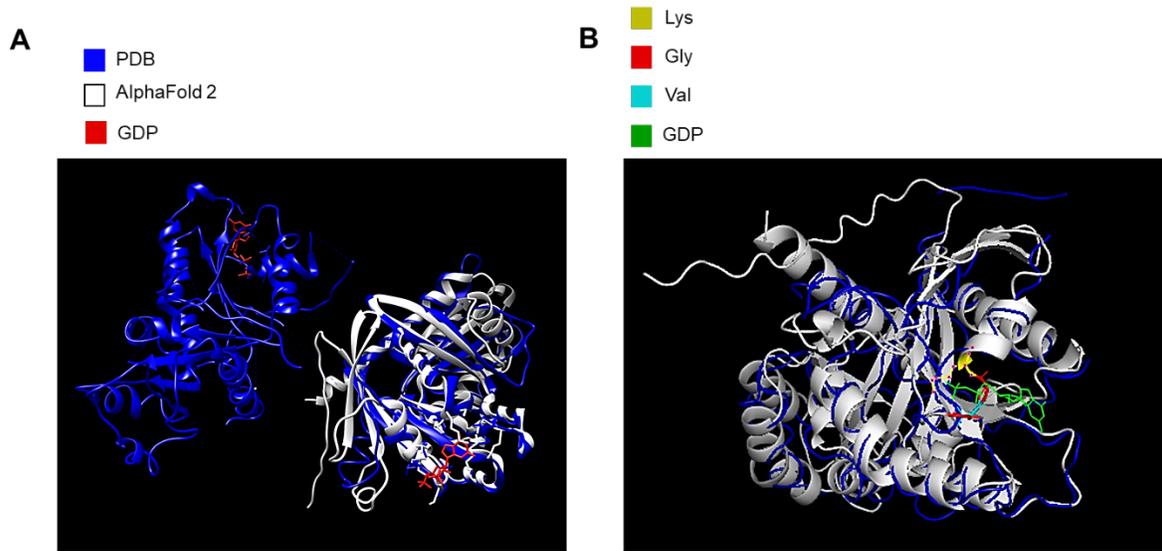


Figura 2. Validación del uso de modelos de AlphaFold2. En el panel A se muestra en azul la estructura cristalográfica de la Rab GTPasa EhRabX3 (en azul, PDB 5C1T) y el modelo de AlphaFold2 (en blanco). Se indica en rojo la posición del GDP. En el panel B, se muestra la posición de los residuos catalíticos de esta Rab GTPasa, así como la posición del GDP. RMSD=2.54.

Para evaluar la diversidad estructural predicha en las Rab GTPasas de *E. histolytica*, se hizo una nueva reconstrucción filogenética con las secuencias de Rab GTPasas disponibles en AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>) y tener una versión actualizada del reporte de Saito-Nakano y col (2005). En la Figura 3 se muestra esta reconstrucción filogenética, la cual fue dividida en 24 grupos, cada uno relacionado entre sí por ancestría, para hacer análisis entre Rab GTPasas homólogas.

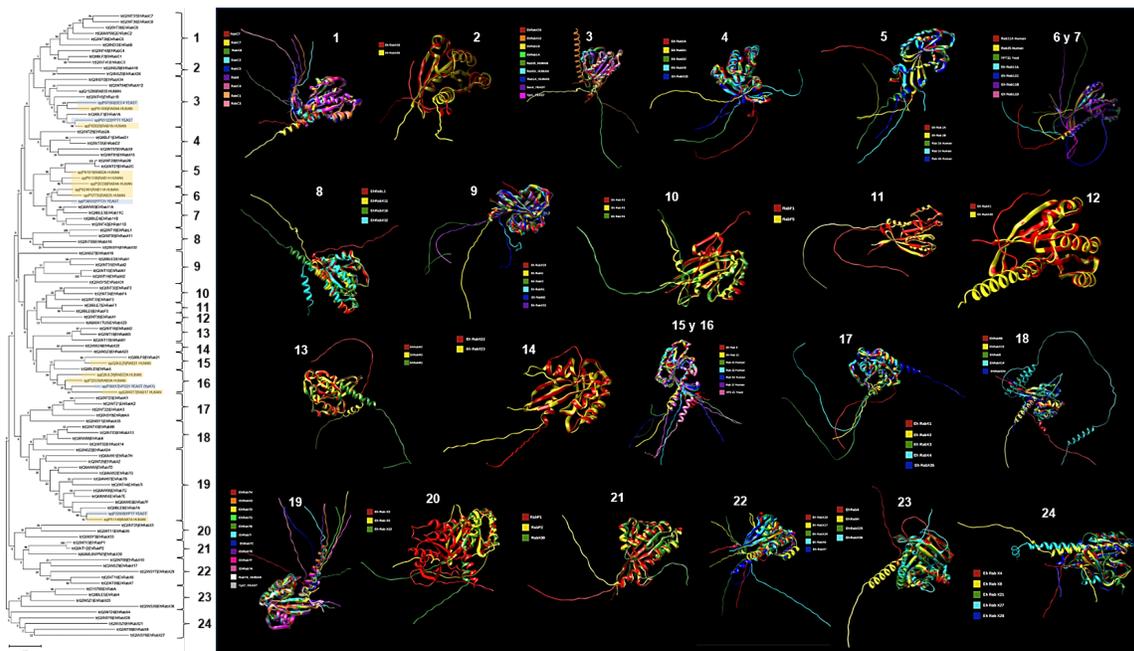


Figura 3. Reconstrucción filogenética y análisis comparativo estructural de las Rab GTPasas de *E. histolytica*. En el árbol filogenético se muestran en azul claro las ramas pertenecientes a proteínas de levadura y en amarillo, las de humano. Los números indican la agrupación hecha por grupos emparentados para realizar comparaciones estructurales usando modelos generados con AlphaFold2. Los grupos se muestran indicando con un número blanco al grupo que corresponden en el árbol filogenético y en cada grupo se indica el color al que corresponde cada proteína el alineamiento.

De manera general, la comparación estructural mostrada en la Figura 3 indica los siguientes aspectos. Primero, los grupos relacionados con Rab GTPasas de organismos conocidos mantienen un plegamiento estructural muy similar (Valor de RMSD ~ 2) y mayor diversidad entre las Rab GTPasas que aparentemente son exclusivas de *E. histolytica* como los grupos 20 al 24 aunque manteniendo el arreglo de alfa hélices y beta plegadas típico en estas proteínas. Segundo, la mayor diversidad se encuentra en el extremo carboxilo terminal, ya que encontramos casos en los que no hay un plegamiento definido (la mayoría), pero casos particulares como en el grupo 1, 8, 12, 15/16, 18, 19, 23 y 24, el extremo carboxilo terminal presenta una alfa hélice que potencialmente puede estar relacionada con la interacción con otras proteínas y no exclusivamente con el factor de disociación del GDP (GDI) (Stenmark, 2009). Tercero, en el caso del grupo 20, en el que se encuentra la EhRabX3, se puede observar que el segundo dominio en tándem de unión a GTP que contiene, reduce el parecido con las GTPasas de su grupo y es algo que se puede observar del grupo 20 al 24, en el que al menos una proteína tiene diferencias estructurales en cada grupo. Finalmente, el panorama general es el siguiente: ¿por qué un organismo unicelular tiene tantas Rab GTPasas? El dato más relevante es que Pereira-Leal y Seabra (2001) reportaron un catálogo de Rab GTPasas en diferentes organismos, destacando que los organismos unicelulares (como las levaduras) sus genomas codifican para un número pequeño de estas proteínas (entre 7 y 11). En organismos más complejos como *C.elegans* o *D. melanogaster*, estos organismos codifican para 29 de estas proteínas. En el caso de plantas y humanos se encuentran entre 57 y 60 proteínas de este tipo (Pereira-Leal y Seabra, 2001). Esto llama la atención ya que en el caso de *E. histolytica* hay al menos 90 secuencias anotadas como Rab GTPasas.

Para abordar la gran diversidad de estas proteínas, se hizo un análisis detallado de la diversidad que se observa a nivel estructural de las Rab GTPasas con más detalle. Lo primero que se reveló es que en *E. histolytica* hay una diversidad en cuanto a los residuos que las codifican. En la Figura 4 panel A se muestra el análisis mediante Scan Prosite (De Castro *et al.*, 2006) de todas las Rab GTPasas, indicando que se tienen tres tipos de Rab GTPasas, aquellas que tienen un dominio amino terminal muy corto (2 a 3 residuos), intermedio (20 a 30 residuos) y largos (de 100 residuos). Al comparar las Rab GTPasas de humano y levadura con las dos Rab GTPasas de *E. histolytica* (Figura 4 panel B), se observa que en el caso de la EhRabX3 la determinación por Scan Prosite no es correcta, ya que el dominio de GTPasa más canónico es justo lo que corresponde a esa extensión amino terminal predicha (Figura 4 panel A). Al analizar estas secuencias no canónicas contra todas las secuencias proteicas conocidas mediante BLASTp, se puede identificar que en el caso de la EhRabX14 (Figura 4, panel C, imagen 1) solamente tiene homólogos en *E. histolytica* y *E. nuttalli*, que es el organismo que infecta simios. No así para la secuencia no canónica de la EhRabX3 (Figura 4, panel C, imagen 2), la cual tiene homólogos en varias especies de *Entamoeba*. Esto permite sugerir que la secuencia amino terminal de la EhRabX14, dado que es única para *E. histolytica* y *E. nuttalli*, potencialmente puede ser una secuencia útil en el diagnóstico molecular de este parásito.

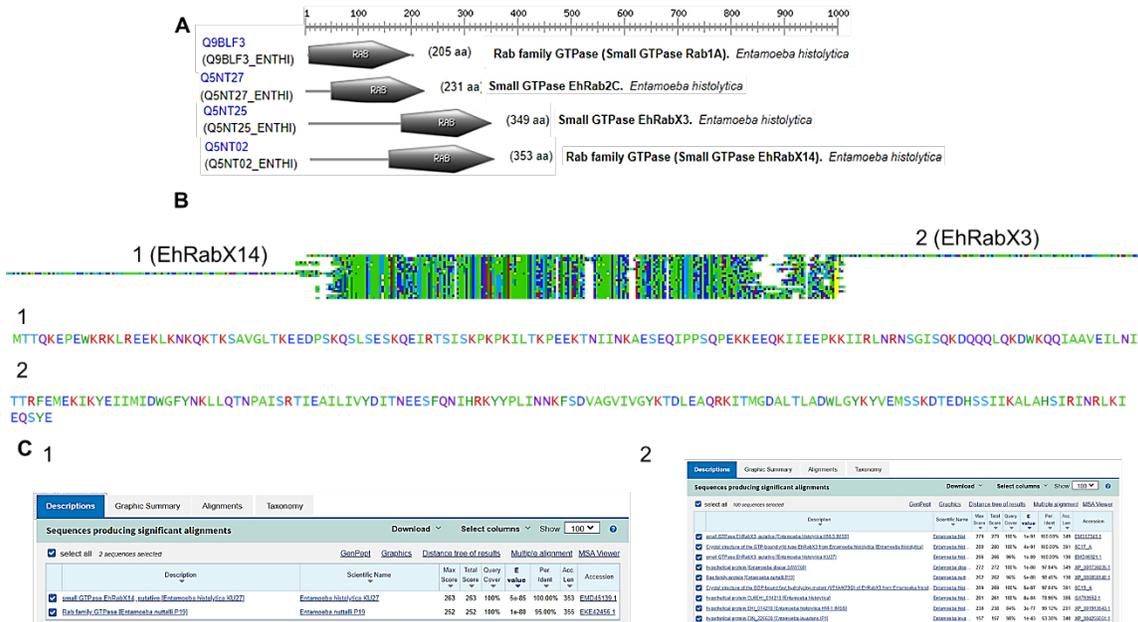


Figura 4. Identificación de una secuencia específica de Rab GTPasas de *E. histolytica* con potencial uso diagnóstico. En el caso del análisis global de similitud de secuencias, se encontró que la EhRabX3 y EhRabX14 tienen secuencias que no son similares al resto de las Rab GTPasas. En el panel A se muestra una captura de pantalla del análisis de todas las Rab GTPasas de *E. histolytica*, mostrando ejemplos representativos de pequeñas (EhRab1A), con un amino-terminal más grande (EhRab2C) y dos ejemplos que tienen un extremo amino terminal más grande (EhRabX3 y EhRabX14). En el panel B se muestra el alineamiento condensado entre las Rab GTPasas de humano y levadura con las dos Rab GTPasas con extensiones amino terminal. En 1 se indica la secuencia de aminoácidos de la extensión amino terminal de la RabX14 y en 2 la extensión de la RabX3. En el panel C, se muestra las capturas de pantalla de los resultados de un análisis tipo BLASTp de las secuencias indicadas en 1 y 2.

Derivado del análisis mediante Scan Prosite, se encontraron otras secuencias peculiares presentes en las Rab GTPasas de *E. histolytica*. Una de ellas es un motivo presente en la EhRabK1, que es homólogo a EGF1/EGF2, el factor de crecimiento epidermal. Este motivo se caracteriza por la presencia de cisteínas que forman un puente disulfuro intramolecular. En la Figura 5 panel A se muestra la posición de estos motivos en la secuencia de la proteína EhRabK1. En el panel B se muestra el análisis del modelo de la proteína EhRabK1 indicando en azul la secuencia de este motivo en rojo las cisteínas presentes en esta proteína. Previamente, Chandra y Datta (2016) mostraron la relevancia de las cisteínas en la EhRabX3 como mecanismo de regulación por estado redox (Chandra y Datta, 2016), al comparar la estructura de la EhRabK1 y EhRabX3 (Figura 5 panel C), se puede observar que el plegamiento es muy diferente, en el caso de la EhRabX3 se muestra en azul la región equivalente a la proteína EhRabK1. Para elucidar si el plegamiento encontrado en la EhRabK1 es similar al EGF1, se usó el modelo de esta última proteína para evaluar esto. En la Figura 5, panel D, se muestra que EGF1 contiene múltiples motivos típicos de esta proteína (Imagen de Scan Prosite) y el modelo estructural muestra un plegamiento similar, para facilitar la comparación se muestran dos dominios indicando en azul la secuencia típica del motivo EGF1 y en rojo las cisteínas de estos. Por lo tanto, este plegamiento puede ser una reminiscencia o casualidad evolutiva, pero podría ser relevante para la función de esta Rab GTPasa.

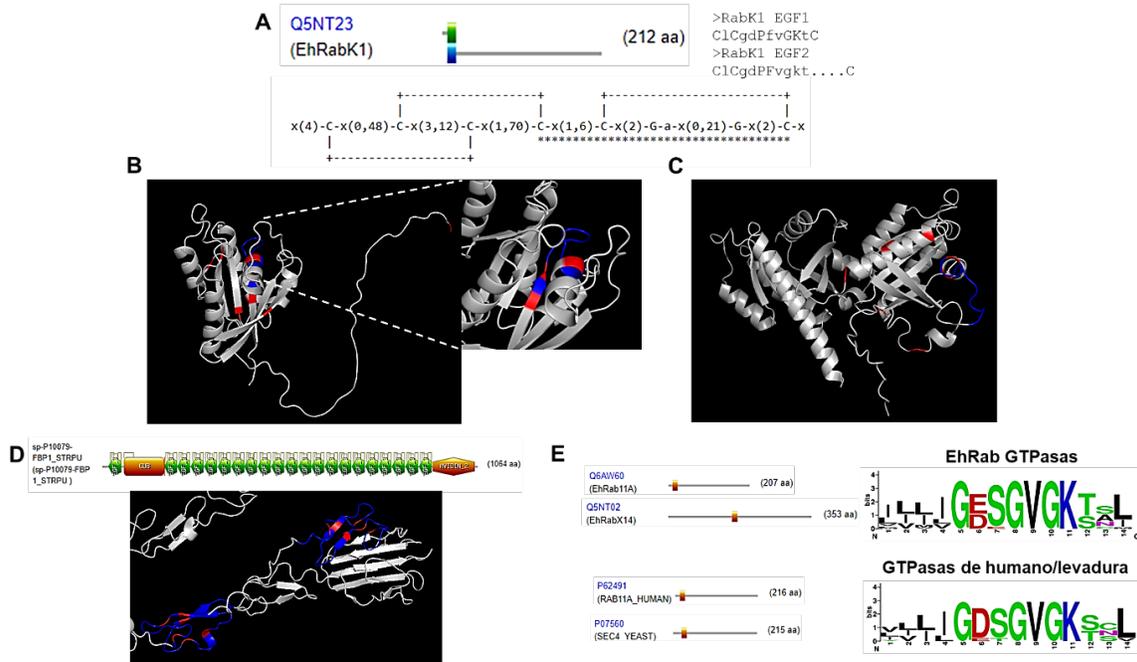


Figura 5. Análisis de secuencias atípicas encontradas en las Rab GTPasas de *E. histolytica*. Mediante el uso de la herramienta Scan Prosite, se detectaron adicionalmente al dominio de Rab GTPasa otros motivos que potencialmente pueden ser importantes para la función de las Rab GTPasas. En el panel A, se encontró en la proteína EhRabK1 un motivo similar a EGF1/2 o el factor de crecimiento epidermal. En este mismo panel se muestran algunas características de este motivo y resalta que forma puentes disulfuro intramoleculares. En el panel B se muestra el modelo estructural para EhRabK1, indicando en rojo el motivo EGF1/2 y en rojo las cisteínas localizadas en este dominio. Como referencia, se muestra en el Panel C la estructura monomérica de la RabX3, que previamente se demostró tener una regulación redox y se indica en azul la región equivalente de la RabK1 y en rojo las cisteínas presentes. En el panel D se muestra la posición de estos motivos en EGF1, lo cual muestra un plegamiento similar que el mostrado en el panel B. En el panel E se muestra otro motivo de 14 aminoácidos que corresponde a proteínas que interactúan con el factor sigma54 bacteriano. El weblogo muestra las diferencias entre las Rab GTPasas provenientes de *E. histolytica* y las de humano y levadura.

Finalmente, el análisis de motivos reveló otra secuencia que llama la atención, un dominio de unión a ATP que está presente en proteínas que interactúan con el factor σ 54 bacteriano (Figura 5 panel D). Este motivo también se puede encontrar en algunas proteínas humanas y de levadura (se muestran dos ejemplos nada más). En el caso de la EhRabX14 se encontró al inicio de la secuencia catalítica, es decir, después de los 100 residuos no relacionados con las Rab GTPasas que se mencionó en la Figura 4. Al comparar estos motivos, son muy conservados, salvo que en las 19 Rab GTPasas de *E. histolytica* se encuentra la posición 6 más variable. Sería interesante saber si esta firma de 14 aminoácidos tiene una relevancia funcional en las Rab GTPasas de todos los organismos analizados en este trabajo.

Con base en los datos anteriores, se analizó la posibilidad de encontrar aspectos estructurales adicionales que pudieran diferenciar aún más las Rab GTPasas de *E. histolytica*. Para esto, se usó Protter, una herramienta que predice cruces transmembranales y modificaciones postraduccionales en secuencias de proteínas y genera resultados gráficos (Omasits, 2014). En la Figura 6, se usaron las secuencias de las Rab GTPasas de humano y levadura para validar la identificación de modificaciones traduccionales en las Rab GTPasas que les permite anclarlas a la membrana. De las proteínas analizadas de humano, dos no pudo identificar estas modificaciones, pero porque ambas no se anclan a membranas internas. Lo mismo ocurre con las proteínas de levadura. Al realizar este análisis con las 90 secuencias de *E. histolytica*, el resultado es que en ningún caso se pudo predecir la modificación postraduccionales de estas proteínas. Sorpresivamente, se encontraron dos características inesperadas.

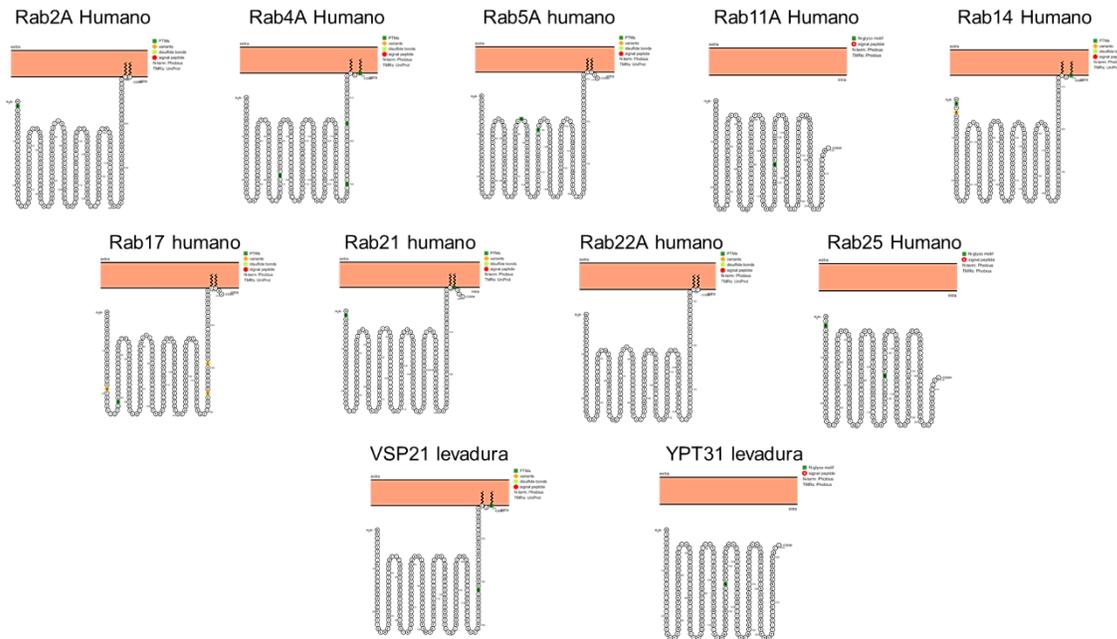


Figura 6. Análisis de topología y modificaciones postraduccionales en Rab GTPasas de organismos cuya función ha sido estudiada. Imágenes del análisis hecho por Protter para identificar modificaciones postraduccionales en Rab GTPasas de humano y levadura. Se indican las modificaciones postraduccionales de prenilación, formación de enlaces disulfuro, péptido señal y presencia de cruces transmembranales. Residuos marcados en rojo indican péptido señal de secreción.

En la Figura 7 Panel A, se encontró que en cinco Rab GTPasas cuentan con un péptido señal que sugiere estas proteínas podrían ser secretadas. De confirmar esto experimentalmente, podrían ser otros blancos para la detección molecular de este organismo. Adicionalmente, en el caso de la EhRabX12, se encontró que en el extremo amino terminal tiene un dominio transmembranal predicho (Figura 7, panel B). Para confirmar esto, usando el visualizador UCSF Chimera (Pettersen, 2004), se estimó la hidrofobicidad de la superficie de esta proteína, siendo una proteína altamente hidrofóbica, especialmente en este dominio predicho membranal, del cual también se muestran los residuos presentes, siendo una hélice con una superficie hidrofóbica.

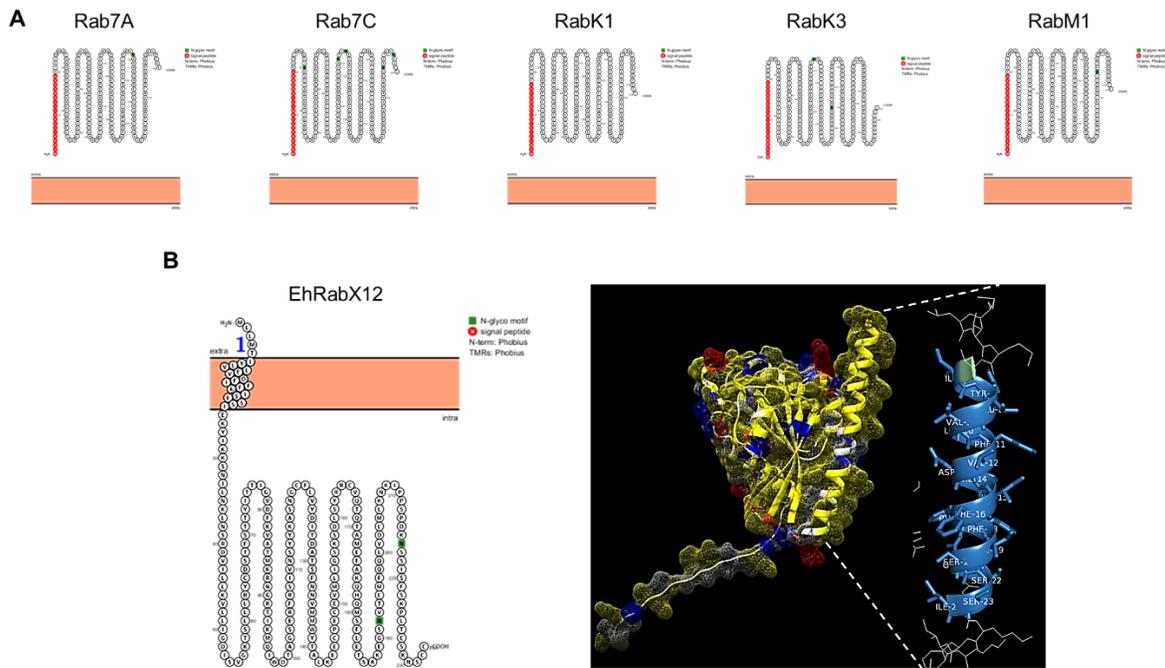


Figura 7. Análisis de topología y modificaciones post-traduccionales en Rab GTPasas de *E. histolytica*. En panel A se muestra el análisis de topología de Rab GTPasas que muestran un péptido señal predicho. Panel B, se muestra el caso de una Rab GTPasa de *E. histolytica* que presenta un cruce transmembranar en el amino terminal. A la derecha se muestra el mapa de superficie; en rojo, carga positiva; en azul, carga negativa y en amarillo, residuos hidrofóbicos. Se muestra una ampliación del posible cruce transmembranar indicando los residuos que lo integran. En toda la figura se muestran las mismas modificaciones postraduccionales que las indicadas en la Figura 5.

Con los datos a nivel de secuencia primaria y estructurales, sugieren que no todas las Rab GTPasas de *E. histolytica* son canónicas y potencialmente su función sea la de regular a otras Rab GTPasas del mismo organismo, no como un mecanismo redundante que permita reponer alguna que incorporara una mutación que la hace no funcional, sino formar heterodímeros funcionales. El racional detrás de esto es la creciente identificación de pseudoenzimas en muchos organismos, específicamente en las GTPasas (Stiegler, Boggon., 2020). Las pseudoenzimas son proteínas que tienen el plegamiento y muchas características de una enzima funcional, pero tienen motivos funcionales degenerados, haciendo que o sean inactivas o catalíticamente incompetentes (Pils, Schultz., 2004). Esta hipótesis está basada en lo que se muestra en la Figura 1 panel C, en *E. histolytica* el único motivo más conservado es el Switch II y la caja G-4, pero los demás son muy divergentes, especialmente en el dominio de unión a GTP (G1). EhRabX3 ya ha sido propuesta como una enzima incompetente en la hidrólisis de GTP lo que la puede representar como una pseudoGTPasa que une nucleótidos, pero se comporta como una pseudoGTPasa dada su baja capacidad catalítica (Stiegler, Boggon., 2020). Por tanto, EhRabX3 es una GTPasa competente, pero que al tener dos dominios podría funcionalmente autorregularse.

Con esta idea, se evaluó la predicción de multímeros in silico usando AlphaFold2. Para validar que esta idea es factible, se utilizaron los grupos más distantes como modelo, siendo el grupo 20 y 24 de la Figura 2 los empleados para este análisis y también se usaron homodímeros, como referencia. En la Figura 8 panel A se muestra la región del alineamiento de las proteínas del grupo 20, y se muestra que la caja G1 es conservada con los residuos clásicos de unión a GTP. Debajo del alineamiento se muestran las estructuras siguientes: la estructura de la Rab7 de humano determinada experimentalmente, así como SEC4 de levadura, también determinada experimentalmente. Como se muestra en ambas estructuras (rojo para la caja G1 y azul para el GTP), la posición de los sitios catalíticos se encuentra en posiciones similares en la estructura, en un asa que es relevante para acomodar las cadenas laterales de los residuos que interactúan con el GTP (Stiegler, Boggon., 2020). Esto también es cierto al predecir un homodímero de la proteína EhRab7, la cual los residuos forman un asa como la mostrada en las proteínas de levadura y humano, además que el plegamiento es semejante. Para probar entonces en proteínas cuya caja G1 es una firma conservada, pero tienen una región de GTPasa adicional probable, dada la cercanía filogenética (Figura 2), se hizo la predicción de la estructura del heterodímero de EhRabX3 con EhRabX5 (Figura 8, panel A). La estructura predicha muestra que la formación del heterodímero ocurre con la región repetida catalítica, un mapeo preliminar sugiere que es una

interacción estable (datos no mostrados) y la orientación de los residuos catalíticos predicha es consistente con la capacidad catalítica de la proteína y los residuos del carboxilo terminal quedan libres en el caso de ambas proteínas para ser modificados y poder interactuar con la membrana de vesículas intracelulares.

Para expandir un poco esta hipótesis, ahora se analizó un grupo en el cual la caja G1 es más divergente, para lo cual se analizó el grupo 24 (Figura 2) y los resultados se muestran en la Figura 8, panel B. Al realizar la predicción de un heterodímero entre la EhRabX8 y la EhRabX27, se observa que no hay un buen modelo en el cual se prediga una interacción consistente entre ambas proteínas, que la orientación de los residuos carboxilo terminal estén en la misma orientación y adicionalmente, que los sitios catalíticos queden orientados consistentes con aquellas determinadas experimentalmente. Se muestra el análisis con la herramienta Protter (Figura 8, panel B) que sugiere que el carboxilo terminal de la EhRabX27 no es membranaral, a pesar de tener una estructura helicoidal predicha. Esto también es consistente con la RabX8 y el análisis con Protter (Figura 8, panel B). Sin embargo, otro par analizado del mismo grupo, la EhRabX4 y EhRabX21, muestran otro heterodímero con una interacción adecuada en términos de orientación tanto de los residuos catalíticos y el extremo carboxilo terminal (Figura 8, panel B).

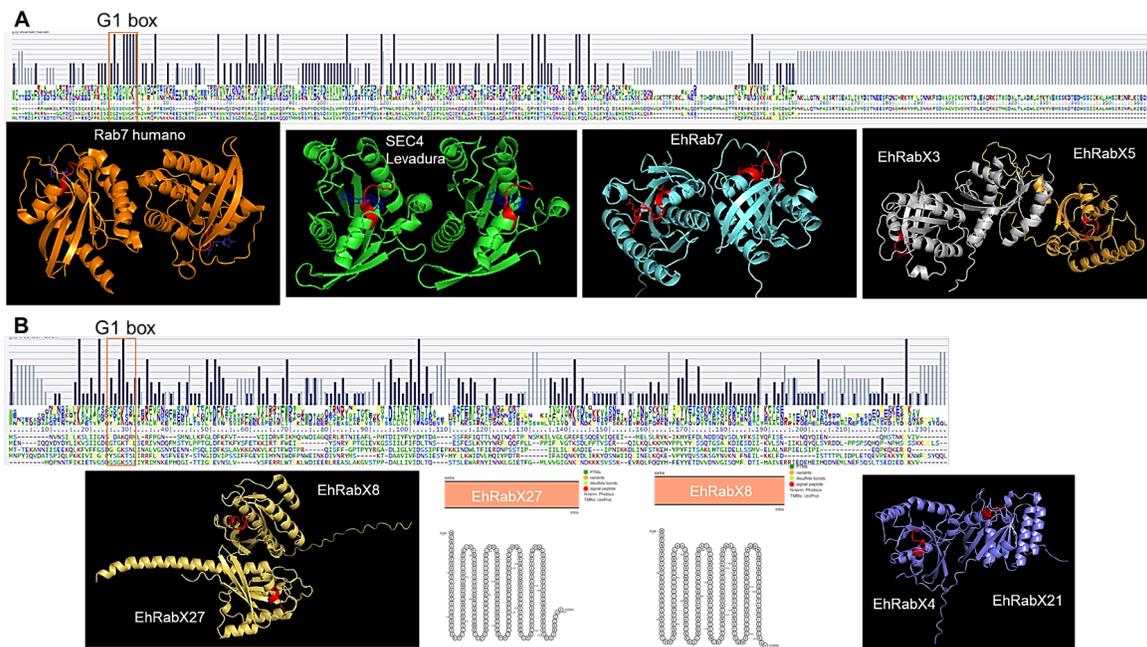


Figura 8. ¿Podría haber regulación por pseudo enzimas? Análisis de la orientación de los residuos catalíticos de dos grupos aparentemente específicos de *E. histolytica* de Rab GTPasas. Panel A, predicción de formación de heterodímeros de dos Rab GTPasas de un mismo clado (grupo 20). Se muestra la orientación de los residuos requeridos para la unión del GTP (en rojo). La proteína canónica más cercana evolutivamente es Rab7A (PDB 1T91), mostrando el dímero y los residuos responsables de unir GTP (en rojo) y GTP (en azul). Como referencia, se muestra el dímero predicho de la Rab7 de *E. histolytica*, en azul está la estructura de toda la proteína y en rojo los residuos que corresponden a la región a GTP, que en este ejemplo son los residuos DEKCGKT, no los canónicos DSVGKT. Panel B, comparación estructural de otro clado específico de *E. histolytica* (grupo 24).

Los datos sugieren que algunas Rab GTPasas de *E. histolytica* tienen características en su secuencia y plegamiento que potencialmente pueden formar dímeros que regulen su función, actividad e incluso localización en vesículas intracelulares, que permitan tener un control fino sobre las proteínas que serán secretadas por el parásito. Esto tiene una estrecha relación con su capacidad de invasión y supervivencia en el hospedero.

Conclusiones

En el presente trabajo se plantea un posible mecanismo mediante el cual la diversidad de Rab GTPasas en *E. histolytica* puede estar ligada a una red de regulación mediado por proteínas homólogas de cada grupo, la diversidad en secuencia de los motivos funcionales de cada proteína puede brindar una hidrólisis diferencial del GTP y de este modo controlar la distribución de vesículas intracelulares a destinos diferentes y probablemente controlar el tipo de carga en cada vesícula. Se propone que el mecanismo involucra la

formación de heterodímeros de proteínas homólogas con diferencias en los sitios activos que presenta cada uno.

El uso de herramientas computacionales permite abordar, de manera masiva, aspectos tanto evolutivos como funcionales de proteínas esenciales para funciones celulares y descubrir nuevas características de estas proteínas, con lo cual se puede proponer hipótesis que puedan abordarse con estrategias experimentales. Tal es el caso de algunas Rab GTPasas que con el análisis hecho en este trabajo se descubrió tienen el potencial de ser secretadas o bien, asociarse íntimamente a membranas celulares. Así mismo, en este trabajo proponemos que las Rab GTPasas no son redundantes y tienen la posibilidad de formar un intrincado mecanismo regulatorio no relacionado con su localización subcelular nada más, sino también funcional y proponemos que tienen la posibilidad de formar un mecanismo más complejo en el que se involucre la formación de heterodímeros que controlen tanto su localización subcelular como su función catalítica, controlando la gran red de vesículas intracelulares que *E. histolytica* posee. Este trabajo abre la posibilidad de generar nuevas estrategias experimentales para estudiar el papel de las Rab GTPasas de este organismo.

Bibliografía

1. Ali IK, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA Jr, Clark CG. (2017). *Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol. 45(2):285-9. doi: 10.1128/JCM.01335-06.
2. Ali, I.K.M.; Clark, C.G.; Petri,W.A, Jr. (2008). *Molecular Epidemiology of Amebiasis*. Infect. Genet. Evol. 2008, 8, 698–707.
3. Boletín epidemiológico del sistema nacional de vigilancia epidemiológica, Número 26, Volumen 40, semana 26. [p.21] <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/837749/sem26.pdf>
4. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1991). *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature. 349(6305):117-27. doi: 10.1038/349117a0.
5. Chandra M, Datta S. (2016). *Role of cysteine residues in the redox-regulated oligomerization and nucleotide binding to EhRabX3*. Mol Biochem Parasitol. 208(2):84-90. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.06.009.
6. Chandra M, Mukherjee M, Srivastava VK, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Datta S. (2014) *Insights into the GTP/GDP cycle of RabX3, a novel GTPase from Entamoeba histolytica with tandem G-domains*. Biochemistry.53(7):1191-205. doi: 10.1021/bi401428f.
7. Chengxin Zhang, Morgan Shine, Anna Marie Pyle, Yang Zhang. (2022). *US-align: Universal Structure Alignment of Proteins, Nucleic Acids and Macromolecular Complexes*. Nature Methods, 19: 1109-1115
8. Chou A, Austin RL. (2023). *Entamoeba histolytica Infection*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 32491650
9. Clark CG, Diamond LS. (2002). *Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance*. Clin Microbiol Rev. (3):329-41. doi: 10.1128/CMR.15.3.329-341.2002.
10. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. (2004). *WebLogo: A sequence logo generator*, Genome Research, 14:1188-1190
11. Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. (2019). *Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of Entamoeba spp*. Infect Genet Evol. 2019 Nov;75:104018. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104018
12. De Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N. (2006). *ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins*. Nucleic Acids Res. 34(Web Server issue: W362-5).
13. Elsheikha HM, Regan CS, Clark CG. *Novel Entamoeba Findings in Nonhuman Primates*. Trends Parasitol. 2018 Apr;34(4):283-294. doi: 10.1016/j.pt.2017.12.008.
14. Gilchrist CA. (2016) *The E. histolytica Genome Structure and Virulence*. Curr Trop Med. 3(4):158-163. doi: 10.1007/s40475-016-0088-9.
15. Jackson-Akers JY, Prakash V, Oliver TI. (2023). *Amebic Liver Abscess*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 28613582

16. Javier-Reyna R, Montaña S, García-Rivera G, Rodríguez MA, González-Robles A, Orozco E. (2019). *EhRabB mobilises the EhCPADH complex through the actin cytoskeleton during phagocytosis of Entamoeba histolytica*. Cell Microbiol. (10): e13071. doi: 10.1111/cmi.13071.
17. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. (2021). *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature. 2021 Aug;596(7873):583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
18. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature. 2021 Aug;596(7873):583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
19. Kumari V, Sharma R, Yadav VP, Gupta AK, Bhattacharya A, Bhattacharya S. (2011). *Differential distribution of a SINE element in the Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar genomes: role of the LINE-encoded endonuclease*. BMC Genomics. 12:267. doi: 10.1186/1471-2164-12-267.
20. Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark U.C., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabinowitz E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Gilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster P.G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N.M., Petri W.A., Jr., Clark C.G., Embley T.M., Barrell B., Fraser C.M., Hall N.(2005). *The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica*. Nature. 2005;433:865–868.
21. Lohia A, Mukherjee C, Majumder S, Dastidar PG. (2007). *Genome re-duplication and irregular segregation occur during the cell cycle of Entamoeba histolytica*. Biosci Rep. 27(6):373-84. doi: 10.1007/s10540-007-9058-8.
22. Lozano-Mendoza J, Ramírez-Montiel F, Rangel-Serrano Á, Páramo-Pérez I, Mendoza-Macías CL, Saavedra-Salazar F, Franco B, Vargas-Maya N, Jeelani G, Saito-Nakano Y, Anaya-Velázquez F, Nozaki T, Padilla-Vaca F. (2023). *Attenuation of In Vitro Virulence Is Associated with Repression of Gene Expression of AIG1 Gene in Entamoeba histolytica*. Pathogens. 12(3):489. doi: 10.3390/pathogens12030489.
23. McGugan GC Jr, Temesvari LA. (2003). *Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 129(2):137-46. doi: 10.1016/s0166-6851(03)00115-4.
24. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y. et al. (2022). *ColabFold: making protein folding accessible to all*. Nat Methods 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
25. Mukherjee C, Clark CG, Lohia A. *Entamoeba shows reversible variation in ploidy under different growth conditions and between life cycle phases*. PLoS Negl Trop Dis. 2(8): e281. doi: 10.1371/journal.pntd.0000281.
26. Nasrallah J, Akhouni M, Haouchine D, Marteau A, Mantelet S, Wind P, Benamouzig R, Bouchaud O, Dhote R, Izri A. (2022). *Updates on the worldwide burden of amoebiasis: A case series and literature review*. J Infect Public Health. 15(10):1134-1141. doi: 10.1016/j.jiph.2022.08.013.
27. Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. (2014). *Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data*. Bioinformatics. 30(6):884-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btt607.
28. Omasits, U.; Ahrensm, C.H.; Müller, S.; Wollscheid, B. Protter. (2004). *Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data*. Bioinformatics 2014, 30, 884–886.
29. Paduch M, Jeleń F, Otlewski J. (2001). *Structure of small G proteins and their regulators*. Acta Biochim Pol. 2001;48(4):829-50
30. Parfrey LW, Lahr DJ, Katz LA. (2008). *The dynamic nature of eukaryotic genomes*. Mol Biol Evol. 787-94. doi: 10.1093/molbev/msn032.

31. Pereira-Leal JB, Seabra MC. (2001). *Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins*. J Mol Biol. 313(4):889-901. doi: 10.1006/jmbi.2001.5072.
32. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. J Comput Chem. (2004). *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. 25(13):1605-12.
33. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem. 25(13):1605-12
34. Pils B, Schultz J. (2004). *Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes*, J Mol Biol. 340, 399–404. Todd AE, Orengo CA, Thornton JM (2002) Sequence and structural differences between enzyme and nonenzyme homologs, Structure. 10, 1435–51.
35. Reuber TL, Ausubel FM. (1996). *Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes*. Plant Cell. 8(2):241–249.
36. Saito-Nakano y col, 2005; Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T., 2001. *Small GTP-binding proteins*. Physiological Reviews 81, 153–208
37. Saito-Nakano Y, Loftus BJ, Hall N, Nozaki T. (2005). *The diversity of Rab GTPases in Entamoeba histolytica*. Exp Parasitol. 110(3):244-52. doi: 10.1016/j.exppara.2005.02.021.
38. Saito-Nakano Y, Wahyuni R, Nakada-Tsukui K, Tomii K, Nozaki T. (2021). *Rab7D small GTPase is involved in phago-, trogocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan Entamoeba histolytica*. Cell Microbiol. 2021 Jan;23(1):e13267. doi: 10.1111/cmi.13267.
39. Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020. *PyMOL*, Available at: <http://www.pymol.org/pymol>.
40. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. and Higgins D.G. (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Mol. Syst. Biol. 7:539
41. Silvestre A, Plaze A, Berthon P, Thibeaux R, Guillen N, Labruyère E. (2015). *In Entamoeba histolytica, a BspA family protein is required for chemotaxis toward tumour necrosis factor*. Microb Cell. 2(7):235-246. doi: 10.15698/mic2015.07.214.
42. Srivastava VK, Chandra M, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Datta S. (2016). *Crystal Structure Analysis of Wild Type and Fast Hydrolyzing Mutant of EhRabX3, a Tandem Ras Superfamily GTPase from Entamoeba histolytica*. J Mol Biol.428(1):41-51. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.003.
43. Stauffer W, Ravdin JI. *Entamoeba histolytica: an update*. Curr Opin Infect Dis. 2003 Oct;16(5):479-85. doi: 10.1097/00001432-200310000-00016
44. Stenmark H. *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. (2009). Nat Rev Mol Cell Biol. 10(8):513-25. doi: 10.1038/nrm2728.
45. Stiegler AL, Boggon TJ. (2020). *The pseudoGTPase group of pseudoenzymes*. FEBS J. 287(19):4232-4245. doi: 10.1111/febs.15554.
46. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. (2021). *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11*. Mol. Biol. Evol. 2021, 38, 3022–3027.
47. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S. (2022). *AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models*. Nucleic Acids. Res.50(D1):D439-D444. doi: 10.1093/nar/gkab1061.
48. Verma K, Srivastava VK, Datta S. (2020). *Rab GTPases take centre stage in understanding Entamoeba histolytica biology*. Small GTPases. (5):320-333. doi: 10.1080/21541248.2018.1528840.
49. WHO. (1997). *Amoebiasis. Report on the WHO*. Pan American Health Organization/UNESCO Expert Consultation Mexico City Geneva-WHO. Wkly. Epidemiol. Rec. 1997, 72, 97–100.

50. Wilson IW, Weedall GD, Lorenzi H, Howcroft T, Hon CC, Deloger M, Guillén N, Paterson S, Clark CG, Hall N. (2019). *Genetic Diversity and Gene Family Expansions in Members of the Genus Entamoeba*. *Genome Biol Evol.* 11(3):688-705. doi: 10.1093/gbe/evz009.