

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD
DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

Análisis del efecto de la expresión de las proteínas
EhTRF-like sobre la estabilidad del genoma de *Entamoeba*
histolytica.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

Euclides Jordan Alejandre

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

CODIRECTORA

Dra. Lilia López Cánovas

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, Septiembre, 2020

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

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

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

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Abigail Betanzos Fernández, CINVESTAV-IPN.
Secretario: Dra. Lilia López Cánovas, UACM-PCG.
Vocal: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM-PCG.
1^{er}. Suplente: Dra. Minerva Camacho Nuez, UACM-PCG.
2^{do}. Suplente: Dr. Mauricio Castañón Arreola, UACM-PCG.

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

UACM

CODIRECTORA

Dra. Lilia López Cánovas

UACM

Este proyecto fue realizado en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México plantel del Valle bajo la dirección de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga y la codirección de la Dra. Lilia López Cánovas en colaboración con el Centro de Investigación en Estudios Avanzados del IPN. Agradezco el apoyo financiero otorgado por la Dra. Elisa Azuara mediante su proyecto de ciencia básica CONACYT “Factores de unión a repetidos teloméricos (TRFs) de *E. histolytica*: la importancia de mantener la integridad del genoma” (N° 222956), así mismo agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por los apoyos económicos otorgados durante el transcurso de la licenciatura.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Azuara, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, y apoyo para el avance de este proyecto. A la Dra. López por abrirme las puertas de su laboratorio desde un inicio, y darme nociones fundamentales y complejas de la ciencia. A la Dra. Betanzos, por su ayuda para la revisión y el análisis de las microscopías confocales y a la unidad de microscopía confocal del CINVESTAV-IPN. A la Dra. Camacho por sus valiosos comentarios y evaluaciones en todo momento los cuales nutrieron este trabajo. Al Dr. Castañón, por sus acertados comentarios y críticas que fueron de gran ayuda.

A la Dra. Jacqueline por todos los comentarios positivos y constructivos que sirvieron para no decaer pero también por sus valiosas pláticas y críticas que sé me servirán en el resto de mi vida.

Al M. en C. Eduardo Carrillo, por su disposición que tuvo conmigo en el proceso de los experimentos de secuenciación.

Para finalizar pero no por ello menos importante a todos los que fueron, son y tuve el placer de conocer dentro del “amiba team” quienes han ayudado directa o indirectamente a la generación de todo este conocimiento, además a casi todos los pertenecientes al laboratorio 2 que formamos una gran amalgama para poder tolerar tanto estrés. A mis amigos y compañeros (los bb's) Karen, Luis, Prepo, Macri, Víc, Bryan, Wonka, Manzana, Yuss, Jacqui con quienes bailé, reí y disfruté cada momento. ¡Ah!, y antes de que lo olvide a Gambi.

Índice

1 Resumen	1
2 Abstract	2
3 Introducción	3
3.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	3
3.3 Regiones teloméricas	14
3.4 Daños genotóxicos: origen, reparación y consecuencias	22
4 Antecedentes	28
5 Justificación	35
6 Hipótesis	35
7 Objetivo General	35
7.1 Objetivos Particulares	35
8. Estrategia Experimental	36
9 Materiales y Métodos	37
9.1 Cultivo de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	37
9.2 Extracción de DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	37
9.3 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	38
9.4 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el arreglo [G ^{GCC}] de <i>E. histolytica</i>	38
9.5 Extracción de DNA plasmídico	42
9.6 Proteína recombinante rEhTRF-like I para los ensayos DPI-ELISA indirecto	47
9.7 Ensayos de interacción de DNA-Proteína (DPI)-ELISA indirecto	48
9.8 Transfección de <i>E. histolytica</i>	49
9.9 Extracción de RNA total	51
9.10 Obtención de extractos proteicos totales	53
9.11 Tratamientos genotóxicos de los trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	56
9.12 Ensayos de viabilidad en respuesta a tratamientos genotóxicos	57
9.13 Inmunolocalización del Aducto 8-oxoG	57
9.14 Análisis Estadístico	58
10 Resultados	59
10.1 Selección, clonación y corroboración del arreglo [G ^{GCC}] de <i>E. histolytica</i>	59
10.2 Unión de las proteínas EhTRF-like con fragmentos repetidos de <i>E. histolytica</i>	62

10.3 Transfección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> para sobreexpresar o silenciar a la proteína EhTRF-like III.....	64
10.4 Expresión a nivel de RNA y proteína de EhTRF-Like III en trofozoítos transfectados ...	65
10.5 Viabilidad celular de trofozoítos transfectados durante dos tratamientos genotóxicos.....	69
10.6 Formación del aducto 8-oxoG en respuesta a los tratamientos genotóxicos en trofozoítos transfectantes.	70
11 Discusión.....	78
12. Conclusiones.....	84
13. Perspectivas.....	85
14. Bibliografía.....	86
15 Anexo.....	98
15.1 Electroforesis en campos pulsados.....	107

Abreviaturas.

SIGNOS ESPECIALES	
° C	Grados Celsius
8-oxoG	8-oxo7, 8-dihidro-2'-desoxyguanosina.
α -N	Anticuerpo específico contra n donde n es cualquier epítipo
A	
A	Adenina.
aa	Aminoácidos.
Ab	Anticuerpo
AEI	Amibiasis Extraintestinal.
AGx	Agentes Genotóxicos.
AHA	Absceso Hepático Amebiano.
AI	Amibiasis Intestinal.
AP	Amebaporos.
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR	Proteína Relacionada Ataxia Telangiectasia Mutada
B	
BrEt	Bromuro de Etidio.
BSA	Albúmina Sérica Bovina
C	
CO ₂	Dióxido de Carbono.
CPDS	Dímeros Ciclobutano Pirimidina
D	
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
gDNA	Ácido Desoxirribonucleico Genómico
dsDNA	Doble cadena de DNA
DBDS	Dominio de unión a DNA
dsbDNA	Ruptura de doble cadena de DNA
DDR	Respuesta a daño de DNA
E	
EhCPs	Familia de Cisteína Proteasas secretadas por <i>Entamoeba histolytica</i> pueden ser EhCP1, EhCP2, EhCP3, EhCP5 o EhCP112.
EhLec.	Lectina específica de <i>Entamoeba histolytica</i> .
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i> .
<i>E. coli</i>	<i>Entamoeba coli</i> .

<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i> .
<i>E. gingivalis</i>	<i>Entamoeba gingivalis</i> .
ELISA	Ensayo inmunoenzimático del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbet Assay.
G	
GAL / GALNAC	Residuos de N-acetil-D-galactosamina
G-STRAND	Hebra telomérica enriquecida en Guaninas.
3' G-OVERHANG	Extremo 3' rico en Guaninas.
G : C	Regiones complementarias ricas en Guanina y Citosina características del telómero.
H	
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno.
HG1S	Subunidad pesada de la lectina de <i>E. histolytica</i>
HN	Proteínas histonas, el sub índice indica la clase de Histona 1, 2A, 2B, 3 o 4.
HR	Recombinación Homóloga.
HRP	Peroxidasa de Rábano.
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i> .
K	
kb	kilobases
KERP	Proteínas ricas en Lisina y Ácido glutámico.
L	
LINES	Elementos Interespaciadores Largos Nucleares.
LMA	Agarosa de bajo punto de fusión.
M	
M1	Estadio de Mortalidad 1
M2	Estadio de Mortalidad 2
mb	Mega bases.
MUC	Mucina puede referirse a cualquier tipo de Mucina MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6.
N	
NHEJ	Recombinación no Homologa.
O	
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Durante toda la noche.
P	
pDNA	DNA plasmídico.
PFGE	Electroforesis de campos pulsados.

PBS	Buffer fosfato salino.
pH	Potencial de Hidrógeno.
pb	Pares de Bases.
R	
RNA	Ácido Ribonucleico.
mRNA	RNA mensajero
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno.
RPM	Revoluciones por minuto.
S	
SAPLIP	Saposin-like proteins, proteínas similares a saposina.
ssDNA	Cadena Sencilla de DNA.
ssbDNA	Ruptura de cadena sencilla del DNA
SINES	Elementos Interespaciadores Cortos Nucleares.
STR	Repetidos Cortos en Tándem.
T	
TA	Temperatura Ambiente.
tDNA	DNA Telomérico.
TM	Temperatura de alineamiento.
TRF	Factor de Repetidos Teloméricos.
tRNA's	RNAs de Transferencia.
U	
UV	Radiación Ultra Violeta.

1 Resumen

El telosoma es un complejo proteína-DNA que contiene a la maquinaria Shelterin, encargada de preservar la topología del cromosoma, además de contribuir en el mantenimiento y envejecimiento celular, fungiendo así como un reloj biológico que monitorea la “calidad de vida” de la célula y controla el número de replicaciones celulares. Dentro de las proteínas involucradas en este complejo, se encuentra TRF2, proteína homodimérica la cual debe su unión al telómero a su dominio de unión a DNA tipo MYB; además, mediante su dominio RBM interactúa con la proteína RAP1, evitando así la fisión de los extremos cromosómicos y preservando la estabilidad génica. *E. histolytica* contiene 3 ORF's, que codifican para 3 proteínas nombradas EhTRF-like-I, -II y -III. Mediante análisis filogenéticos se determinó que EhTRF-like I y II son homólogas a HsTRF1, mientras que EhTRF-like III es homóloga a HsTRF2. En la mayoría de los organismos secuenciados los telómeros son ricos en guanina y susceptibles a la oxidación mediada por agentes genotóxicos. En *E. histolytica*, hasta ahora la identificación de telómeros no ha sido posible; sin embargo, análisis genómicos han identificado regiones polimórficas tipo STR, que flanquean genes codificantes para tRNA's, ya que en otros parásitos este tipo de arreglos cumplen la función telomérica, se ha propuesto que en *E. histolytica* funcionan de la misma manera. En este trabajo, para determinar la unión de las proteínas EhTRF-like con diferentes fragmentos tipo STR, se empleó un ensayo DPI-ELISA indirecto. Además, para entender la función de EhTRF-like III en *E. histolytica*, se sobre-expresó o se inhibió a la proteína y se analizaron sus efectos fenotípicos. Para ello primeramente, los cambios de expresión fueron corroborados mediante ensayos de RT-PCR y Western Blot. Y posteriormente, los trofozoítos transfectantes se sometieron a diferentes agentes genotóxicos analizándose la viabilidad así como la formación del aducto 8-oxoG. De manera general, las proteínas EhTRF-like se unieron diferencialmente a secuencias distintas tipo STR. La sobreexpresión de EhTRF-like III condujo a una mayor viabilidad celular post-tratamiento y menor formación del aducto 8-oxoG. El silenciamiento del gen EHI_148140 generó una menor viabilidad celular post-tratamiento, similar a la observada en la especie no patógena *E. dispar*, además de una mayor abundancia en la formación del aducto 8-oxoG. Por lo que, en conjunto estos datos nos permiten sugerir que la proteínas EhTRF-like se unen a regiones asociadas a los arreglos de tRNA's lo cual permite generar evidencia de que estas regiones podrían tener una papel en la función telomérica en el parásito. Además nuestros datos indican un papel relevante de la proteína EhTRF-like III en la protección del genoma en *E. histolytica*.

2 Abstract

The telosome is a protein-DNA complex recognized by the Shelterin machinery. This complex preserves the chromosome topology, as well as contributes to telomere maintenance and cellular ageing, acting as a biological clock that controls the number of cell replications. Among the proteins involved in this Shelterin machinery, TRF2 protein is one of the most relevant. TRF2 is a homodimeric protein that owes its binding to the telomere to its MYB- DNA-binding domain. Furthermore, through its RBM domain interacts with the RAP1 protein, thus preventing the fusion of chromosomal ends and preserving genome stability. *E. histolytica* contains 3 ORF's, which encode for 3 proteins dubbed EhTRF-like-I, -II, and -III. By phylogenetic analysis, it was determined that EhTRF-like I and II are homologous to HsTRF1, while EhTRF-like III is homologous to HsTRF2. In most organisms, telomeres are rich in guanine and they are susceptible to oxidation mediated by genotoxic agents. In *E. histolytica*, telomere identification has not been possible so far; however, genomic analyses have identified STR-type polymorphic regions that flank genes coding for tRNAs, it has been proposed that in *E. histolytica* could function as chromosome ends with a telomeric function. In this work, we determined the binding of EhTRF-like proteins to one STR-type fragment, using an indirect DPI-ELISA assay. Besides, to understand the function of EhTRF-like III in *E. histolytica*, the protein was over-expressed or inhibited and its phenotypic effects were analyzed. To complete this task, the expression changes were corroborated by RT-PCR and Western Blot assays. And subsequently, the transfectant trophozoites were subjected to different genotoxic agents, analyzing their viability as well as the formation of the 8-oxoG adduct. In general, EhTRF-like proteins bound differentially to different the STR-like sequences. EhTRF-like III overexpression led to greater post-treatment cell viability and less formation of the 8-oxoG adduct. The silencing of the EhTRF-like III gene generated a lower post-treatment cell viability, similar to that observed in the non-pathogenic species like *E. dispar*, with a higher abundance in the formation of the 8-oxoG adduct. These data allow us to suggest that the EhTRF-like proteins bind to regions associated with the tRNA arrays, and provide evidence about the possible role of this regions in telomeric function in the parasite. Furthermore, our data indicate that EhTRF-like III protein is essential for protecting the genome of *E. histolytica*.

3 Introducción

3.1 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) es el parásito protozoario del intestino con mayor prevalencia a nivel mundial. Está categorizado como patógeno prioritario Clase B, por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los EUA (NIAID, por sus siglas en inglés)¹. Este parásito es el agente causal de la amibiasis², y se puede encontrar en dos diferentes estadios³, cada uno con funciones biológicas distintas⁴

A pesar de que el descubrimiento del parásito tiene más de 14 décadas⁴, aún resulta complicado su diagnóstico y las metodologías moleculares existentes resultan costosas para implementarlas en países donde existe mayor prevalencia, incidencia y morbilidad^{5,6}. En este sentido la opción más aplicada en muchos de estos países en vías de desarrollo es el diagnóstico microscópico⁵, aunque para ello se requieren recursos humanos capacitados y especializados, para poder diagnosticar la presencia de *E. histolytica*. Asimismo, el uso de pruebas moleculares es necesario para diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar*, puesto que morfológicamente son parecidas^{7,8}.

E. histolytica es un parásito procarionte simple, ya que no cuenta con organelos tales como mitocondrias, peroxisomas o microtúbulos citoplasmáticos; además su aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y liso no están bien desarrollados. La forma de motilidad y alimentación del parásito se da mediante pseudopodios⁵ (Fig. 1). A nivel bioquímico este parásito no tiene hemoproteínas, glutatión, ciclo de Krebs, vía colateral de las pentosas y la glucólisis no está regulada alostéricamente; además, la actina y ubiquitina son sumamente divergentes: En relación a su genoma, la cantidad de intrones en sus genes es baja; los extremos 5' UTR's son muy cortos y los genes ribosomales, aproximadamente 200 por célula, se encuentran en plásmidos extracromosomales⁹.

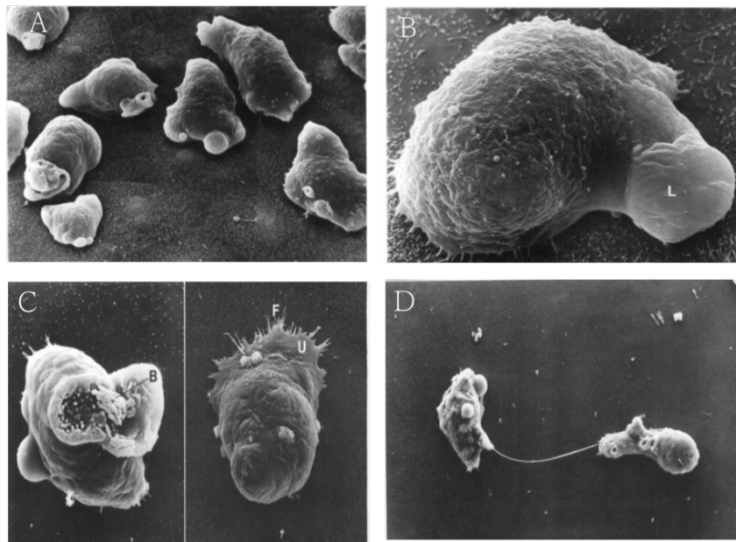


Figura 1 Microscopía electrónica de barrido de trofozoítos de *E. histolytica*. A) Trofozoítos de *E. histolytica* adheridos a células MDCK. B) Trofozoíto de *E. histolytica* adherido a una célula MDCK, en donde se puede observar un lobopodio (L). C) Trofozoítos de *E. histolytica* mostrando la formación de un estroma fagocítico listo para la ingesta de bacterias (B); además, se muestra la formación de filopodios (F), así como el uroide (U). D) División celular de un trofozoíto de *E. histolytica*. Tomado y modificado de GONZALEZ-ROBLES, M et al, 1983.

3.1.2 Epidemiología de la Amibiasis

E. histolytica es considerado un protozooario parásito cosmopolita, endémico de México y de las regiones tropicales^{7,10}. Según datos de la OMS, se estima que entre 30 a 50 millones de personas son afectadas por este parásito a nivel mundial^{11,12}. Mientras que en México, el InDRE reporta hasta la semana 11 del 2020, un total de 3,302 afectados por amibiasis intestinal (AI), de los cuales 12 han desarrollado absceso hepático amebiano (AHA), con un acumulado de 31, 624 y 162 casos, respectivamente¹³. Así mismo, se calcula que del 10 al 20% de las personas infectadas desarrollan signos severos de la enfermedad, provocando entre 40,000 y 100,000 muertes anualmente^{11,14}. En estas mismas aproximaciones y en algunas más recientes se reporta que en México, la AI se encuentra dentro de las primeras 20 causas de morbilidad, ocupando el decimosexto lugar¹⁵, además de que se propone que en nuestro país el 20% de la población está infectada con el parásito^{16,17}. La incidencia para AI tiene los mayores porcentajes en los grupos de edad de 1 a 4 años, con 17.16%; mientras que en el segundo lugar de incidencia, se encuentra en el grupo de 25 a 44 años de edad, con un 17.05%. En cuanto al AHA, las estadísticas indican que los grupos con mayor incidencia son los que corresponden a 25 a 44 años, con el 29.03%. A nivel mundial esta infección es la tercera causa de mortalidad, la cual solo se ve superada por la malaria y la esquistosomiasis¹⁷. A pesar de contar con estos datos epidemiológicos, algunos autores destacan la imprecisión de los mismos, dadas las dificultades del diagnóstico que presenta la enfermedad; por lo que se sugiere la necesidad de reevaluar la epidemiología de la amibiasis^{18,19}.

3.1.3 Taxonomía y filogenia

El clado *Amoebozoa* es un grupo de interés para la investigación, dadas sus características atípicas^{3,20}; estos organismos unicelulares son procariontes primitivos y por ello representan un modelo convencional para estudiar modelos de fagocitosis, migración celular, desarrollo de pluricelularidad y para estudios evolutivos²¹, ofreciendo puntos de deconstrucción para entender procesos en organismos evolutivamente más jóvenes.

El primer caso clínico a causa del patógeno descrito, se reporta en el año 1875, referenciado por el Dr. Fedor Alek Sandrovich Lösh en San Petersburgo, al cual nombró como *Entamoeba coli* (*E. coli*). Él describió al patógeno, en un agricultor de nombre J. Markow proveniente del distrito de Arcángel cerca del círculo polar ártico, de 24 años de edad, físicamente sano, quien presentó malestar general, diarrea, y malestares rectales⁴; aunque fue hasta 1903 que Fritz Schaudinn, nombró como *E. histolytica* a este patógeno^{1,2}.

En 1919 Clifford Dobell describió tres especies de *Entamoeba* como parasitarias del hombre. Las especies de *Entamoeba* implicadas en infecciones humanas que producían quistes tetranucleados, deberían estar relacionadas con *E. histolytica*; mientras que aquellas que producían quistes tetranucleados, pero eran inocuas para el hombre, tendrían que agruparse como *E. dispar*; y todas aquellas encontradas en cavidades bucales y posibles causantes de infecciones orales, las relacionó a *E. gingivalis*²². Fue así que estos tres taxones contuvieron a las distintas especies de *Entamoeba* por un largo tiempo¹⁶.

Émile Brunt propuso en 1925 incluir a las amibas causantes de disentería en un grupo específico. Además, estableció que existía una especie de *Entamoeba* no patógena pero parecida morfológicamente a *E. histolytica*, a esta especie le llamó *E. dispar*. Con ello sentó las bases de la existencia de dos especies morfológicamente iguales, cuya patogenicidad era totalmente distinta²³.

El primer estudio filogenético realizado en 1997 por Clark y Diamond, corroboró la clasificación taxonómica de las especies existentes²⁴. En 1999 Silberman *et al* establecieron que tanto el género como los grupos morfológicos, son monofiléticos²⁵. Las filogenias más recientes han sido realizadas en 2007 por Ponce-Gordo y colaboradores²⁶ y en 2010 por Stensvold y colaboradores²⁷, quienes corroboraron la no correlación entre el agrupamiento y el número de núcleos en los quistes maduros, es decir la no coincidencia entre los grupos genéticos y los grupos morfológicos (Fig. 2).

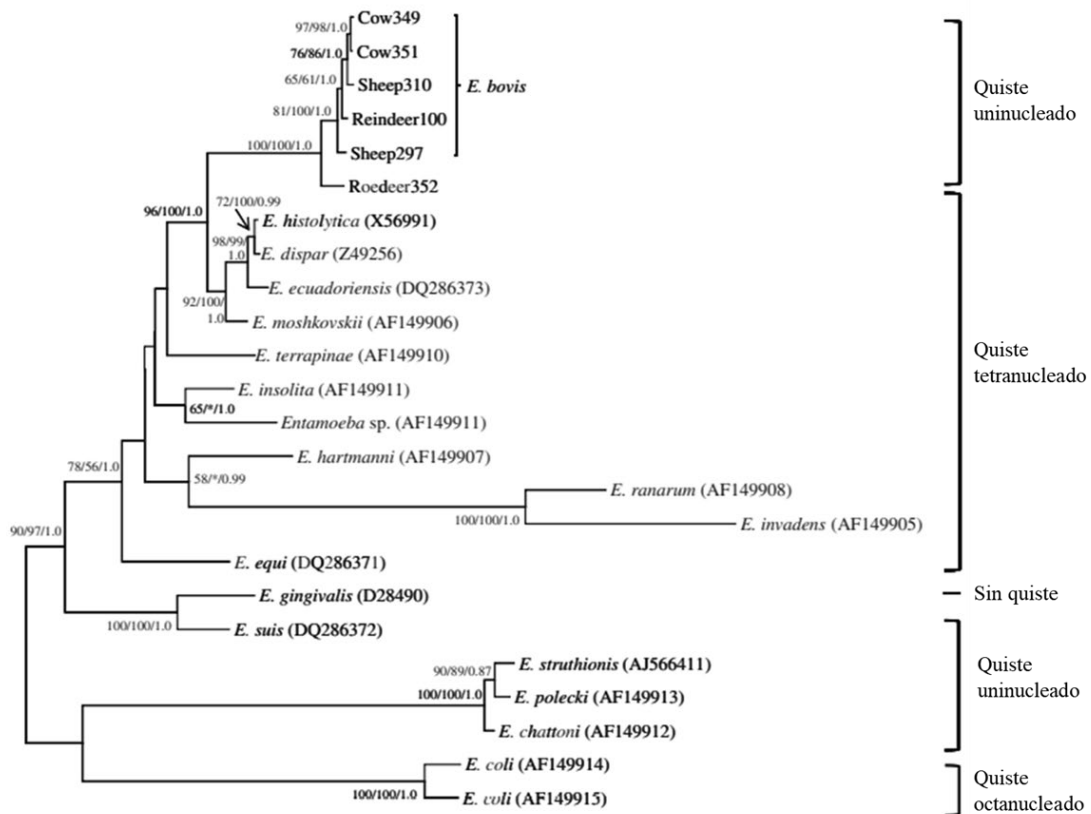


Figura 2. Análisis filogenético del género *Entamoeba* con base en el gen que codifica para *ssrRNA*. La construcción filogenética muestra el agrupamiento de las distintas especies del género, en donde se observa la independencia de la formación del número de núcleos de los quistes con el grupo filogenético. Tomado de Stensvold et al. 2010.

Todas las evidencias y estudios a esta compleja familia han permitido, hasta el día de hoy la siguiente clasificación taxonómica, la cual tendrá que adecuarse a los cambios que sugieran las nuevas evidencias y/o reglas del campo^{2,25,27}.

Dominio: Eucariota

Reino: Protista

Filo: Sarcomastigospora

Subfilo: Sarcodina

Clase: Rhizopodea

Subclase: Lobosea

Orden: Amoebida

Familia: Endamoebidae

Género: Entamoeba

Especie: *Entamoeba histolytica*

3.1.4 Ciclo de vida

E. histolytica se puede encontrar en dos distintas etapas²⁸, trofozoítos móviles uni- o binucleados (fase invasiva) o quistes tetranucleados (fase infectante) (Fig. 1); aunque también se pueden diferenciar en el ciclo de vida del parásito prequistes y formas metaquísticas^{6,28}, los cuales tienen distintas funciones en el ciclo de vida del organismo³. Se ha reportado que la dinámica entre los distintos estadios obedece distintos estímulos microambientales a los cuales está expuesto el patógeno^{29,30}, sin embargo aún es complicado inducir *in vitro* el enquistamiento de *E. histolytica*^{6,31}.

E. histolytica es un parásito cuyo ciclo de vida es monoxeno y cuya reproducción se da mediante fisión binaria (Fig. 1D)^{3,28}, es decir que se trata de un parásito asexual^{9,23,32}. No obstante, evidencias derivadas de los diversos estudios del genoma de *E. histolytica*, muestran la presencia de genes relacionados a recombinación, sugiriendo la probable presencia de mecanismos afines con la meiosis celular, lo que podría estar asociado con la diversidad genómica en el parásito³³.

El ciclo de vida se divide canónicamente en tres etapas^{23,28} (Fig. 3).

1.- La ingestión del quiste, la cual se puede dar mediante alimentos o bebidas contaminadas con quistes tetranucleados; es decir quistes maduros^{2,28,34} (Fig. 3).

2.- La ruptura de la pared de los quistes y la conversión a la forma invasiva, favorecida por la acidificación de la pared de quitina del quiste en el estómago, seguido de la neutralización o alcalinización de los jugos digestivos, mediada por las sales biliares, liberando en el íleon distal, una amiba metaquística tetranucleada, la cual dará origen mediante fisión binaria a 8 pequeñas amibas^{1,28,34}.

3.- Migración del patógeno al lumen del intestino grueso. Aquí si las condiciones son propicias, el parásito invadirán la mucosa intestinal produciendo AI²⁸. En algunos casos el patógeno tendrá grandes probabilidades de colonizar, por vía hemolítica, a distintos órganos, generando amibiasis extraintestinal (AEi)¹⁴ principalmente invadirá al hígado, formando AHA^{35,36}, aunque también se ha encontrado en pulmón¹¹, riñón, músculo cardíaco³⁷ y en menor medida en cerebro³⁸, pero donde puede producir una letalidad de hasta el 95%^{37,38}. También se han reportado casos de amibiasis cutánea, la cual se produce comúnmente cuando el parásito se propaga por contigüidad a la región perianal y genital, encontrando abscesos en estas zonas. En todos estos órganos y regiones, clínicamente se observan úlceras destructivas, dolorosas y de rápida evolución, que pueden producir la mutilación de las zonas afectadas (Fig. 4)¹.

El ciclo de vida del parásito concluye con el enquistamiento producido por cambios ambientales o estrés, excretándose del hospedero quistes tetranucleados, los cuales pueden reinfectar al hospedero original o a un nuevo^{2,6,28,29} (Fig. 3). A pesar de que se cree que *Homo sapiens* (*H. sapiens*) es el único organismo que puede ser infectado por *E. histolytica*, hay autores que indican que deberían incluirse a la gran mayoría de los primates no humanos²⁸, así como a *Canis lupus familiaris*, *Felis catus*, y el género *Rattus*³⁹.

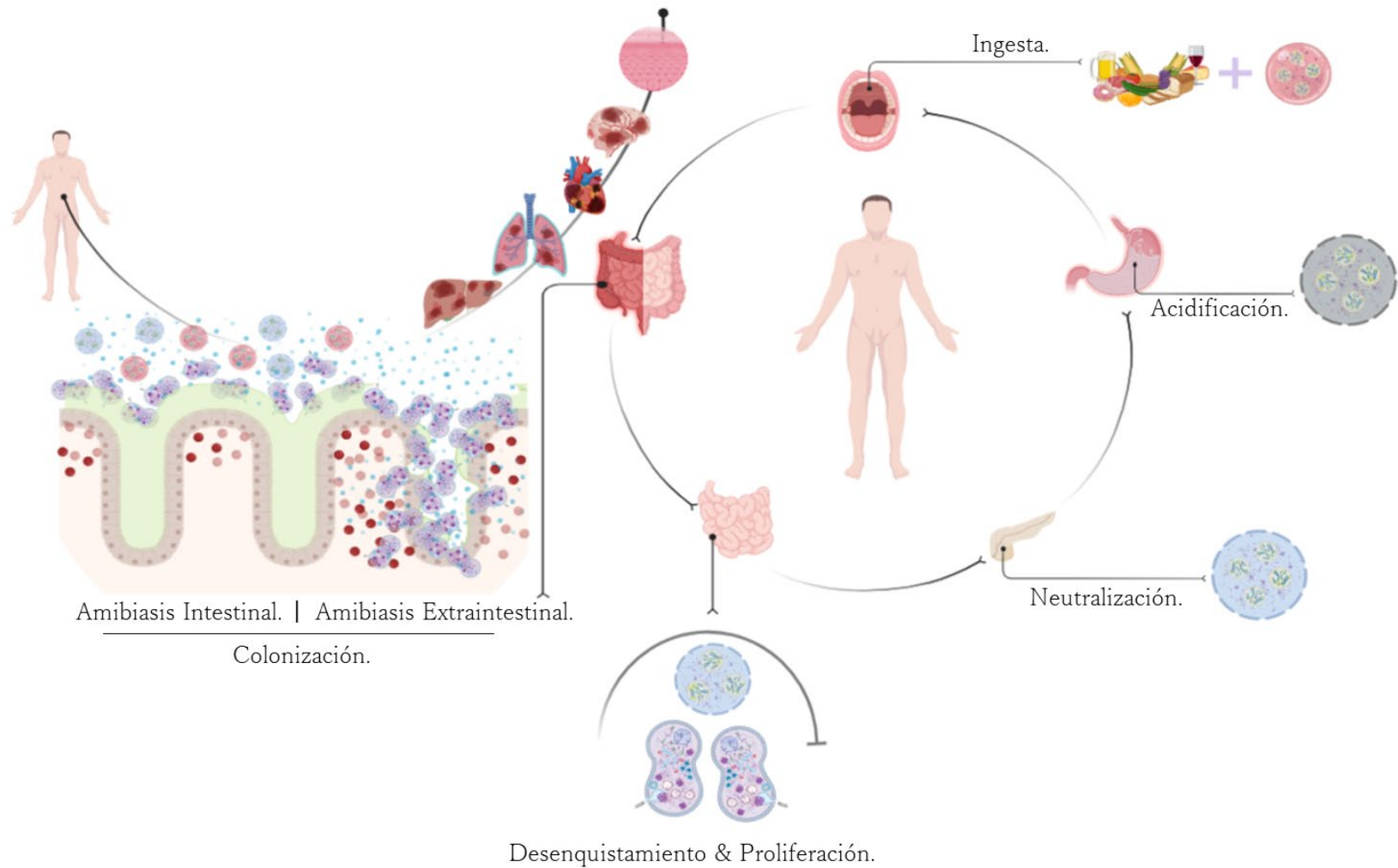


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*. Inicia con la ingesta del quiste, después ocurre la acidificación de la pared de quitina en el estómago y la subsecuente neutralización del ácido por las sales biliares, concluyendo con el desenquistamiento, proliferación y colonización del colon en el hospedero. Realizado en Bio-render. Basado en CDC, amebiasis, 2019.

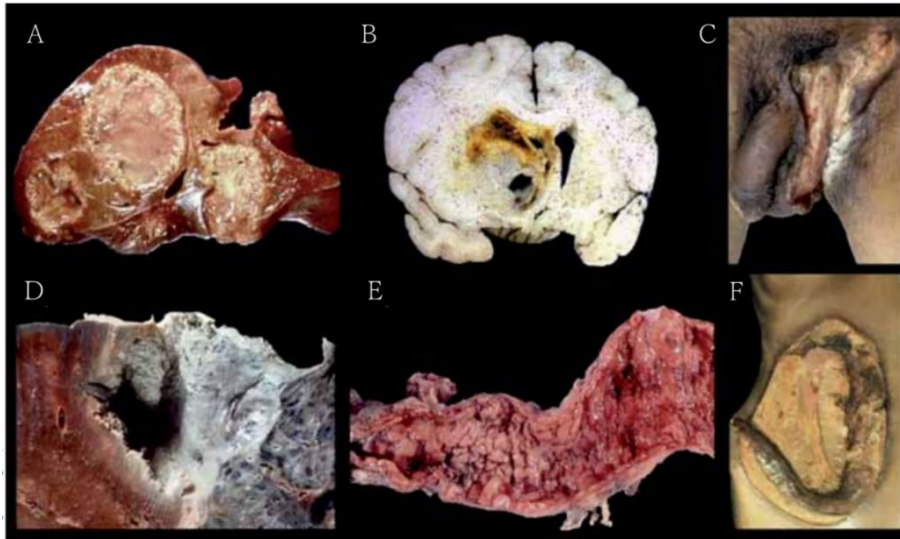


Figura 4. Lesiones en diferentes órganos ocasionadas por *E. histolytica*. Una vez establecida la colonización, la AEi se puede presentar en distintos órganos. A) AHA. B) Absceso cerebral. C) Amibiasis cutánea. D) Ruptura de AHA. E) Megacolon tóxico. F) Hemiabdomen derecho invadido por AHA. Tomado de Olivós-García Alfonso y colaboradores, 2011.

3.1.5 Etiología de la amibiasis

Muchas especies del género *Entamoeba* son capaces de colonizar al humano^{6,40}, aunque no todas son patógenas⁴¹. En 1913 Walker y Sellards establecieron un importante avance para el conocimiento de la etiología de la amibiasis, concluyeron que el mismo organismo puede ser el causal de infecciones intestinales y extraintestinales (Fig. 3) en unos individuos, pero puede presentarse como portadores asintomáticos en otros³⁵. Actualmente se ha visto que no solamente *E. histolytica* es capaz de generar amibiasis, ya que se han encontrado otras especies como *Entamoeba moshkovskii* en infecciones en niños, adultos y ratones⁴²; así mismo *Entamoeba bangladeshi* es considerada como agente patógeno⁴³. También se han descrito otras especies con menor frecuencia en las lesiones, como *Entamoeba hartmanii*, *Entamoeba polecki* y *Entamoeba gingivalis*. Si bien los factores determinantes de la infección aún son poco conocidos, se han encontrado relaciones entre la genética del huésped y el genotipo de parásito, indicando que la carga génica de ambos participantes es determinante en el resultado de la infección.

Un hecho importante a considerar es que los quistes provienen en su mayoría de portadores asintomáticos³⁴, pues en la fase aguda de la infección los pacientes excretan solo trofozoítos mientras que los pacientes asintomáticos y crónicos, pueden excretar hasta 1.5×10^7 quistes/día² (Fig. 3).

No todas las cepas de *E. histolytica* tienen la misma capacidad de patogenicidad³⁶. En un estudio con muestras provenientes de Bangladesh, se genotipificaron 6 *loci* basados en regiones repetidas tipo STR que flanquean genes codificantes para tRNA. En este trabajo se estableció una asociación entre los distintos STR y el resultado de la infección entre pacientes asintomáticos y aquellos que

presentaron sintomatología. Además, los parásitos de los pacientes asintomáticos raramente contenían los genotipos de los parásitos que provenían de pacientes sintomatológicos o con AHA.

3.1.6 Factores de virulencia

La virulencia de *E. histolytica* se basa en gran medida en la secreción de enzimas que le permiten penetrar e invadir, a través de la mucosa del colon, las células epiteliales y, posteriormente interferir con la respuesta inmune humoral del huésped⁴⁴.

La proliferación de los trofozoítos se lleva a cabo dentro del lumen intestinal rico en mucosa colónica⁴⁵. Este moco está compuesto por distintos tipos de monómeros de mucina (Muc), unidos mediante puentes disulfuro, siendo Muc2 el principal monómero^{44,46,47}. Muc2 está compuesta por distintos oligosacáridos unidos por un enlace O-glicosídico a residuos de Serina y Treonina de la apomucina. Las ramificaciones de oligosacáridos incluyen N-acetyl-D-galactosamina (Gal/GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa, galactosa y ácido siálico. Estos componentes le atribuyen distintas funciones a la Muc, las cuales incluyen hidratación, formación del gel, rigidez y resistencia contra proteasas^{45,47}. *E. histolytica* desarrolló un sistema que le permite degradar con efectividad esta barrera, mediante diferentes enzimas como las amilasas, mediadas por la interacción de la lectina de 260 kDa, a través de su subunidad pesada de 170 kDa específica para residuos de N-acetyl-D-galactosamina (Gal/GalNAc)⁴⁸ (Fig. 5). *E. histolytica* también utiliza otras proteínas de anclaje, como las proteínas ricas en lisina (K) y ácido glutámico (E) denominadas KERP1 y KERP2; además, proteínas ricas en serina (S), treonina (T) e isoleucina (I) llamadas STIRP. Tanto KERP1 como STIRP son exclusivas de *E. histolytica* y ambas están implicadas en la adherencia del parásito con las células blanco⁴⁹.

Otro complejo importante de la superficie para *E. histolytica* es el denominado EhCPADH, compuesto por una cisteín-proteasa (EhCP112) y una proteína de adhesión (EhADH112), que está involucrado en la adhesión, fagocitosis y citólisis de proteínas del hospedero, provocando un aumento en la permeabilidad paracelular y contribuyendo a la desorganización y destrucción de la pared intestinal⁵⁰. Tras un anclaje exitoso a la mucina favorecido por estos y otros factores, el parásito liberará distintos tipos de moléculas citolíticas. Dentro del genoma de *E. histolytica* se pueden identificar 80 genes que codifican para proteasas, pero 50 de ellos son específicos para cisteín-proteasas (EhCPs), pertenecientes a la súper familia de la papaína. De entre estos 50 genes, el 90% de los transcritos codifican para EhCP1, EhCP2 y EhCP5⁵¹. Estas EhCPs se encargan de degradar

proteínas de la matriz extracelular como lamina y colágeno, así como las regiones C-terminal ricas en cisteína de la Muc^{47,52}, favoreciendo así la unión entre el parásito y las células blanco⁵². Además, las EhCPs contribuyen a suprimir la respuesta inmune del hospedero, degradando moléculas señalizadoras del sistema, tales como anticuerpos (Ab) y moléculas involucradas en el sistema del complemento⁵³. *E. histolytica* también secreta distintos tipos de glicosidasas como sialidasas, α -glucosidasas y β -N-acetilhexosaminidasa^{45,54} (Fig. 5).

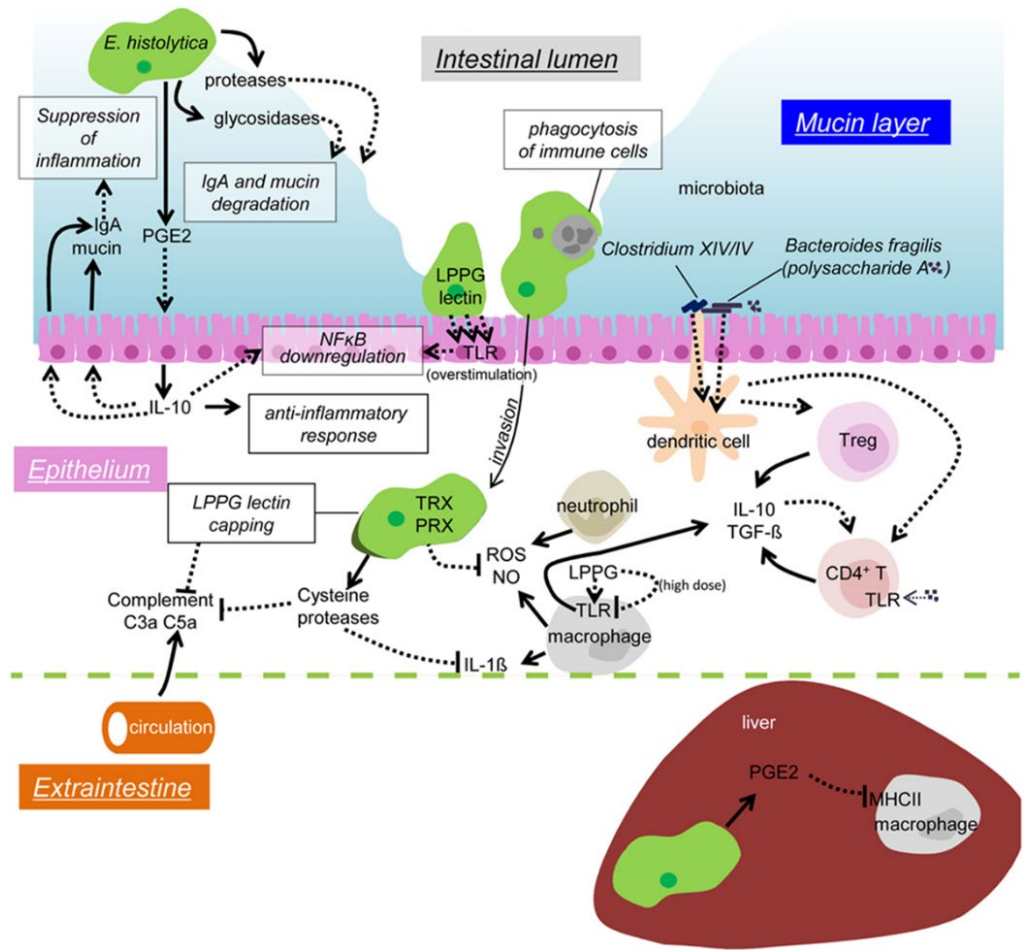
E. histolytica tiene otro complejo de proteínas citolíticas ubicadas en vesículas llamadas amebaporos (AP). Estas proteínas tipo saposinas (SAPLIP), tienen un dominio conservado de 6 cisteínas unidas por puentes disulfuro. Los AP son los responsables principales de formar canales iónicos o microporos en las membranas lipídicas de las células del hospedero. A través de estos canales se difunde agua, iones (salida de Na⁺ y K⁺ y entrada de Ca²⁺) y otras moléculas pequeñas, resultando así en la lisis celular por choque osmótico. *E. histolytica* cuenta con 16 genes que codifican para SAPLIP, pero únicamente AP-A, AP-B y AP-C exhiben actividad formadora de poros⁵⁵. Los AP presentan una estructura y función similares a las N-lisinas, perforinas y granulinas, que se encuentran en las células NK y en los linfocitos T citotóxicos. La secreción de los AP, en conjunto con EhCPs y otros factores de virulencia, trae como resultado la destrucción de los neutrófilos y la consecuente liberación de sus productos tóxicos. Esto puede amplificar las lesiones causadas por las amibas, produciéndose áreas de necrosis en la mucosa intestinal y focos de ulceración, que condicionan los cuadros clínicos de mala absorción y disentería^{51,53}.

Otros mecanismos asociados a la patogenicidad de *E. histolytica* son aquellos que le permiten a los trofozoítos soportar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (NOS). Las principales moléculas involucradas en la tolerancia contra el estrés oxidativo, son las proteínas: peroxiredoxina (Prx), superóxido dismutasas, flavoproteína A ferredoxina, tioredoxina (Trx) y Trx reductasa. Estas se encargan de degradar los componentes tóxicos para *E. histolytica* (Fig. 5). Se ha visto que el estrés oxidativo incrementa la virulencia de *E. histolytica*, causando la sobreexpresión de factores de adhesión como el fosfolípido transportador tipo ATPasa/flipasa. Además altera el flujo metabólico de componentes tales como el glicerol y la síntesis de quitina⁵⁶.

Finalmente, el componente genético tanto del parásito como del huésped es importante durante el desarrollo de la infección⁵⁷. La organización génica de elementos intracromosomales repetidos se ha asociado con el grado de virulencia, inclusive en distintas cepas de la misma especie⁵⁸. Un ejemplo de esto son los genes codificantes para distintos tRNAs, los cuales están flanqueados por grupos de 500-1750 pb con múltiples repetidos cortos en tándem (STR)⁵⁹. La alta variabilidad de estos STR está asociada con la progresión de la infección, así como con el desarrollo del AHA⁵⁸. Estos procesos patogénicos son resultado de la adaptación y evolución del parásito, para poder proliferar en el huésped, retando sus líneas de defensa.

Figura 5. Mecanismos de patogénesis de *E. histolytica* para proliferar en el huésped.

La secreción de las proteasas y amilasas degradan a la mucina colónica y a las IgA. Además, los trofozoítos fagocitan o trogocitan células del sistema inmune, reduciendo la respuesta del huésped. Una vez en el epitelio, los trofozoítos son capaces de frenar la respuesta del complemento degradando C3 y C5, por acción de sus cisteín-proteasas. En el epitelio, los trofozoítos toleran el estrés oxidativo (ROS y NOS) causado por los macrófagos y neutrófilos, mediante el sistema de tioredoxina (TRX) y peroxiredoxina (PRX). En el hígado, la PGE2 de la amiba y del huésped causan la inhibición de MHC de clase II en los macrófagos, produciéndose un proceso antiinflamatorio. Las flechas sólidas indican la secreción de alguna molécula, las flechas punteadas indican la interacción entre dos moléculas o una señal de transducción. Las citosinas en letras negras son las que participación en la eliminación del parásito; mientras aquellas involucradas en la manifestación de la enfermedad se muestran en rojo.



3.3 Regiones teloméricas

Los extremos terminales de los cromosomas lineales fueron descritos por primera vez en 1938 por Hermann J. Müller. Él observó que los terminales cromosómicos del genoma de *Drosophila melanogaster*, al ser expuestos a rayos X, no sufrían las mismas alteraciones que el resto del genoma; por lo tanto, determinó que estas regiones contenían una secuencia protectora. En su momento, a esa región se la llamó “gen terminal” y con el tiempo se nombró “telómero” del griego Τέλος (final) y Μέρος (parte)⁶⁰.

Tres años después, la investigación de Bárbara McClintock con *Zea mays* indicó que estas regiones podrían estar asociadas a la prevención de ciclos de ruptura-fusión-puente generados por cromosomas dicéntricos, los cuales son catastróficos para la célula. Además, señaló que estas regiones podían diferenciarse de las rupturas generadas por distintos tipos de radiación⁶⁰.

Dadas las hipótesis prematuras generadas por Müller y McClintock, los investigadores de la época se vieron renuentes a aceptarlas, por lo que las investigaciones sobre estas regiones cesaron. Con el tiempo, James Watson develó que el mecanismo de replicación del DNA generaba regiones 3' terminales de cadena sencilla (3' G-overhang) redundantes, al cual nombró como “problema de la replicación terminal”. Además, postuló que de una generación a otra, estas regiones se acortaban y por ende necesitaban de un mecanismo para la protección del telómero⁶¹.

En esta misma época, Hayflick y Moorhead establecieron, a partir de un cultivo de células diploides *in vitro*, el fenómeno de “fase III”, donde la célula pierde su capacidad de crecimiento gradualmente. Para explicarlo desarrollaron 3 hipótesis, una de las cuales trataba del proceso de senescencia, en el cual una ligera reducción de la tasa de replicación lleva al sistema a un agotamiento gradual hasta alcanzar niveles críticos e irreversibles; y por lo tanto, observando un efecto acumulativo⁶².

Fue entonces cuando Alexsei Matveevich Olovnikov identificó que, “el problema de la replicación terminal” generaba acortamiento telomérico progresivo. Esto actuaba como una especie de reloj interno, capaz de determinar el número de divisiones que la célula puede soportar a lo largo de su vida; asociando esta idea con un proceso de envejecimiento y de control proliferativo. Olovnikov al igual que Watson, pensaba que la célula debería de tener un sistema de mantenimiento del telómero⁶³.

Posteriormente, los trabajos de Elizabeth Blackburn con *Tetrahymena thermophila*, demostraron que el parásito contenía regiones hexanucleotídicas, tipo CCAA, en el macro y micronúcleo⁶⁴. Más adelante, en conjunto con Jack Szostak, clonaron grandes grupos de genes humanos en una molécula de DNA lineal de levadura, empleada como vector. Estos vectores eran poco estables y no eran capaces de replicarse. Sin embargo, al agregar la región hexanucleotídica a los cromosomas transgénicos, éstos se replicaban. Con esto, demostraron la existencia del mantenimiento de telómeros; además, generaron la idea de la conservación evolutiva de la región y sus procesos intrínsecos⁶⁵.

Años después E. Blackburn y Carol Greider demostraron con extractos de *Tetrahymena thermophila*, que la síntesis *de novo* de repetidos TTGGGG sucedía gracias a la acción de un enzima denominada por ellas como “transferasa telómero terminal” y actualmente conocida como telomerasa⁶⁴. Los resultados obtenidos dilucidaron la aparente contradicción entre dos hechos comprobados, primero: el acortamiento progresivo de los telómeros durante cada división celular^{61,63}, y segundo: su replicación, proceso que ocurre en forma independiente a la del resto del ADN cromosómico⁶⁴.

3.3.1 Biogénesis, Replicación y Mantenimiento

La investigación en los telómeros, logró identificar a la enzima telomerasa (TERT) responsable de la biogénesis del DNA telomérico (tDNA), esta es una enzima transcriptasa reversa⁶⁶, sumamente activa en células germinales que permite la elongación, replicación y mantenimiento de los telómeros^{67,68}. Su inhibición en células somáticas constituye un mecanismo supresor tumoral que “obliga” a que las células salgan del ciclo celular y entren en un estado senescente^{63,69,70} (Fig. 7).

Durante la replicación de células germinales y somáticas, el DNA es duplicado gracias a un macrocomplejo conformado principalmente por KU80, Tau, DNA Pol σ , DNA Pol α , RNasa H, ligasa I, helicasa y topoisomerasa. Este complejo no es perfecto, pues genera el “problema de la replicación terminal”, derivado de la naturaleza funcional de la polimerasa; por lo que la TERT ha sido preservada evolutivamente, para la elongación y mantenimiento del genoma⁷¹ (Fig. 8).

TERT es una enzima formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico⁶⁴, donde la porción proteica se denomina retrot transcriptasa telomerasa humana (hTERT, por sus siglas en inglés de human telomerase reverse transcriptase); y por la porción ribonucleotídica se llama RNA telomerasa humana (hTER, por sus siglas en inglés human telomerase RNA), la cual según la especie puede tener una talla de entre 146 y 1,544 pb, además de contar con algunas proteínas accesorias adicionales^{64,72}.

Las características físicas de la cadena doble de DNA (complementariedad y antiparalelidad) en conjunto con la prosesividad de la DNAPol σ ($5' \rightarrow 3'$), encargada de la replicación^{73,74}, generan el acortamiento telomérico y el envejecimiento celular ya que las propiedades de cada macromolécula permiten la creación de dos cadenas distintas durante las rondas replicativas: la cadena continua (parental $3' \rightarrow 5'$), sintetizada directamente por la enzima (hija $5' \rightarrow 3'$); y la cadena retrasada (parental $5' \leftarrow 3'$), la cual para ser sintetizada requiere de primers de RNA y pequeños oligonucleótidos llamados fragmentos de Okazaki, esto se producen de manera complementaria y antiparalela a la cadena retrasada, es decir $3' \leftarrow 5'$. Dichos fragmentos son sintetizados por la subunidad con actividad primasa de la DNAPol α , los cuales proporcionan el extremo 3'OH necesario para la prosesividad de la DNAPol σ ⁷⁴.

El acortamiento telomérico se produce por dos razones: 1) ya que la secuencia río arriba del primer fragmento de Okazaki sintetizado, no puede ser cebado por la DNA Pol α mediante su actividad primasa, pues la región de cebado está más allá del extremo final del cromosoma resultando en una cadena hija más corta que la parental⁶⁵. 2) Para eliminar el cebador la maquinaria de replicación empuja al cebador y al fragmento de okazaki. Cualquiera de los dos mecanismos tienen como consecuencia el acortamiento del telómero⁶⁶ (Fig. 8). Al término del proceso replicativo la célula puede sufrir arresto si la longitud del tDNA está comprometida y presenta una talla menor de 400 pb⁶⁷. Dicho arresto celular de la replicación es en su mayoría permanente y se conoce como senescencia replicativa o estadio de mortalidad 1 (M1)⁶².

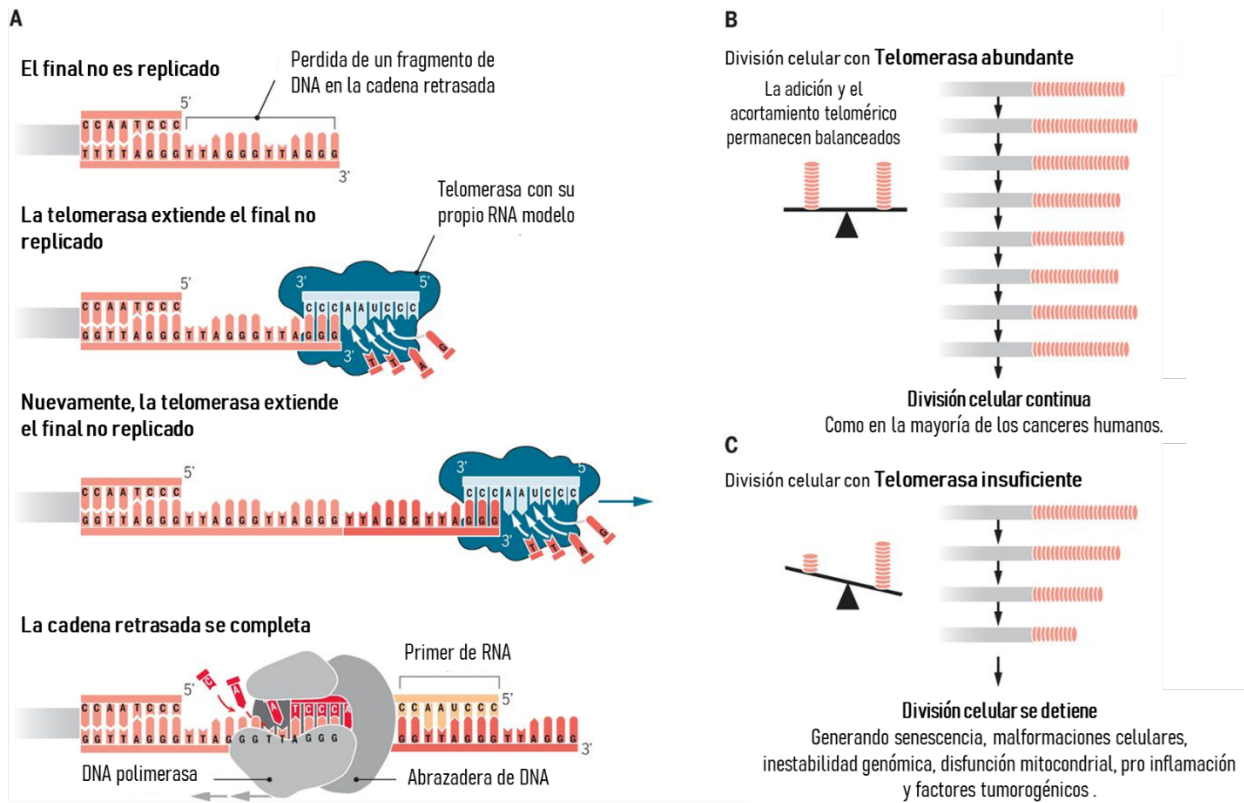


Figura 7. Biogénesis y control de la longitud telomérica. A) Replicación del tDNA mediada por la telomerasa, seguida por la síntesis del telómero por la DNA polimerasa. B) En cada división de las células somáticas, los telómeros sufren acortamiento telomérico debido a la incapacidad de replicar el telómero en su totalidad. En estas células, al activarse la telomerasa se puede desarrollar cáncer. C) El acortamiento telomérico es inevitable y al ser extremadamente corto, se encienden vías que desencadenan la senescencia celular. Tomado de Blackburn, Elizabeth H. et al, 2015.

3.3.2 Características, funciones y estructuras de los telómeros

La mayoría de las regiones teloméricas de organismos eucariontes (desde plantas hasta mamíferos) y de algunos procariontes, son secuencias de naturaleza 5'-(TTAGGG)*n*-3' pero no exclusivas^{75,76}. Estos complejos nucleoprotéicos no codificantes, además de ser complementarios y ricos en Guaninas y Citosinas (G/C)^{65,67,77}, tienen una longitud de 2-20 kilo bases (kb). Aunque se ha visto que al momento de nacer, los telómeros de las ratas de laboratorio suelen tener un tamaño de 20-50 kb^{78,79}. Es interesante mencionar entonces que la longitud telomérica se hereda en un margen del 36% al 80%⁸⁰, pues se ha determinado que telómeros muy cortos son inherentes a familias con síndromes asociados a telómeros. De manera similar, se ha observado la asociación entre la longitud telomérica de los neonatos, con los niveles de estrés experimentados por la madre durante el embarazo⁸¹.

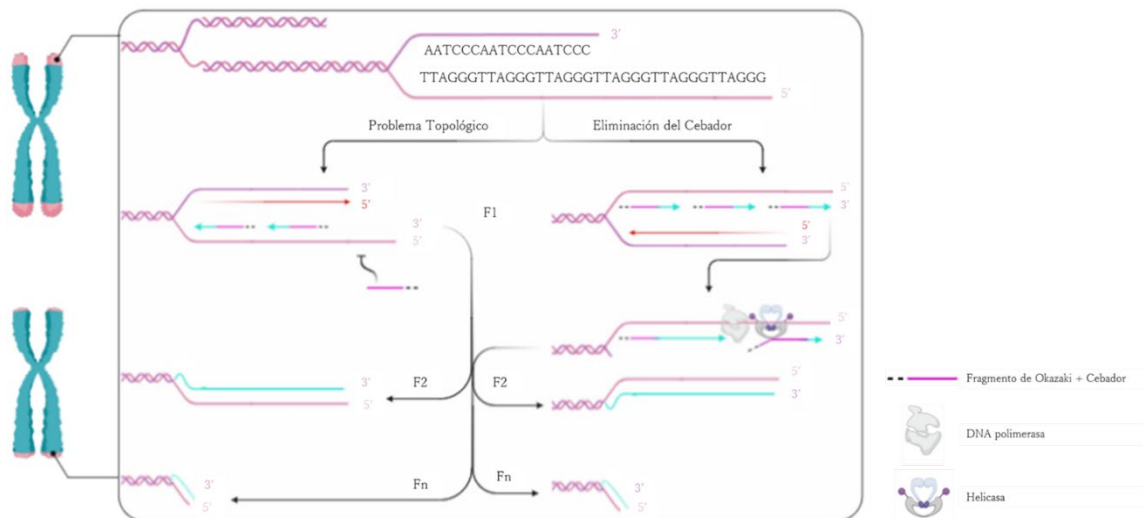


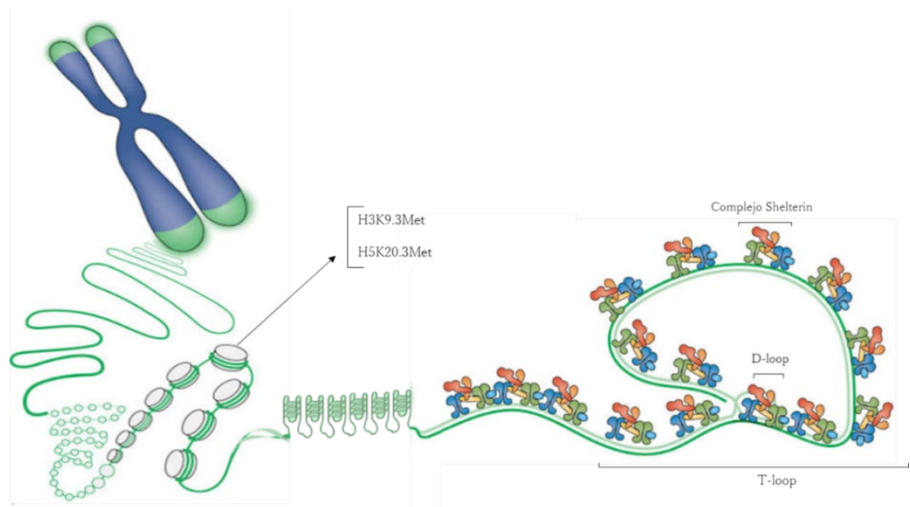
Figura 8. Acortamiento telomérico límite de Hayflick. En la parte superior se representa la secuencia telomérica TTAGGG, a partir de la cual se desencadena el problema topológico. La polimerasa tiene un impedimento espacial y no puede generar el fragmento de Okazaki en la primera generación (F1), lo que eventualmente produce acortamiento telomérico progresivo en cada división celular (F2→Fn). El problema de la eliminación del cebador implica que la cadena retrasada en F1 perderá el fragmento de Okazaki, debido al empuje de la helicasa y DNA polimerasa, pertenecientes al complejo de replicación, generando así la pérdida de un fragmento de DNA en F2 y repitiéndose progresivamente hasta Fn. Ambos mecanismos conducen a la pérdida de la longitud telomérica, el envejecimiento y la senescencia celular. Basado en Watson, Biología Molecular del gen, 2016 y Realizado con Bio-render.

Otra característica de los telómeros es la estructura que adquiere el DNA telomérico la cual es una región de doble cadena que termina en cadena sencilla, hasta ahora se sabe que esta cadena sencilla, posee un alto porcentaje de Guanina y es nombrada como G-strand, resulta de la replicación de la cadena continua (parental 3'→5' / hija 5' → 3'), generando un brazo 3' sobresaliente de distintas longitudes, dependiendo del organismo. Por ejemplo, en mamíferos la longitud varía de 50-500 nucleótidos (nt), generando brazos grandes denominados 3' G-overhang^{79,82}, en comparación con otros eucariontes^{67,68} (Fig. 9). Diversos estudios muestran la presencia del 3' G-overhang en más del 80% de los organismos (reinos eucariota, protozoa)⁶⁷, lo que revela una alta conservación de esta región de cadena sencilla y la relaciona de manera funcional con la estructura y el mantenimiento telomérico⁷⁹.

Por otro lado, el nivel de condensación de la cromatina en estas regiones las dota de otra característica importante, relacionándolas directamente con la protección del genoma⁷⁹. En cierta medida esta compactación es mediada por las marcas epigenéticas (trimetilaciones de las histonas H3K9 y H5K20) presentes en el tDNA^{67,75}.

Las características fisicoquímicas del telómero también favorecen el rearrreglo estructural y el empaquetamiento. Por ejemplo, el alto contenido de Guaninas favorece las interacciones en el telómero mediante puentes de hidrógeno de Hoogsteen, formando estructuras que se pliegan entre sí y dando lugar a diferentes niveles de organización más complejos denominados cuádruplex G⁸³, todo lo cual promueve la compactación y protección del telómero (Fig. 9). Cabe mencionar que la conformación estructural del tDNA es sumamente particular, ya que la cadena 3' G-overhang es capaz de plegarse sobre el tDNA de doble cadena, invadiéndola y llevando a la formación estructural de un bucle denominado t-loop; la cadena desplazada generará así un segundo bucle de desplazamiento, denominado D-loop⁸⁴ (Fig. 9).

Figura 9. Estructura del t-loop. El arreglo cromosómico muestra las características típicas descritas hasta ahora para la región telomérica. Se muestran las marcas epigenéticas H3K9.3MET y H5K20.3MET en la región subteloamérica, así como las estructuras G4 y el telosoma. El complejo Shelterin es fundamental para la formación del telosoma, ya que permite la inserción de la cadena sencilla en



la cadena doble, generando así el T-loop; mientras que la cadena desplazada generará el D-loop. Modificado de Maciejowski, John y De Lange, Titia, 2017.

Si bien estas características del tDNA ayudan al mantenimiento y estado de compactación, se requiere de un complejo multiprotéico llamado complejo Shelterin^{75,82}, que dotan estructuralmente al telómero de una especie de “cubierta” que refuerza la protección al telómero. Además, estas proteínas favorecen el buen funcionamiento del reloj mitótico, arrojando a las células en senescencia cuando se requiere⁸⁵; y también participan en la protección contra la fusión de los extremos, debido a la reparación errónea por las vías de unión de extremos no homólogos (NEHJ) o de recombinación homóloga (HR).

Estas vías se activan por el reconocimiento indebido de los extremos terminales, como cuando hay una ruptura de dsDNA^{75,85}. Los telómeros desprotegidos también están asociados a factores de reparación de daño al DNA (DDR por sus siglas en inglés DNA damage repair), como 53BP1, MRE11, formas fosforiladas de H2AX y ATM12, los cuales activan la cascada de señalización que culminan en el arresto del ciclo celular, hasta que el daño sea reparado⁸⁶. Cabe mencionar que las bases moleculares que distinguen DDR transitorias de DDR persistentes son desconocidas⁸⁷. De manera adicional, el complejo Shelterin tiene relación con la replicación completa de los cromosomas, contribuye a la organización cromosómica dentro del núcleo y participa en la regulación de la expresión génica⁸⁵ (Fig. 10). El telómero es una región de DNA ubicada al final de los cromosomas estrictamente lineales, con roles bien definidos, que incluyen la replicación controlada de las células y la estabilidad del cromosoma, además está implicado de manera fina y precisa en procedimientos moleculares en cada fase de crecimiento y vida de la célula.

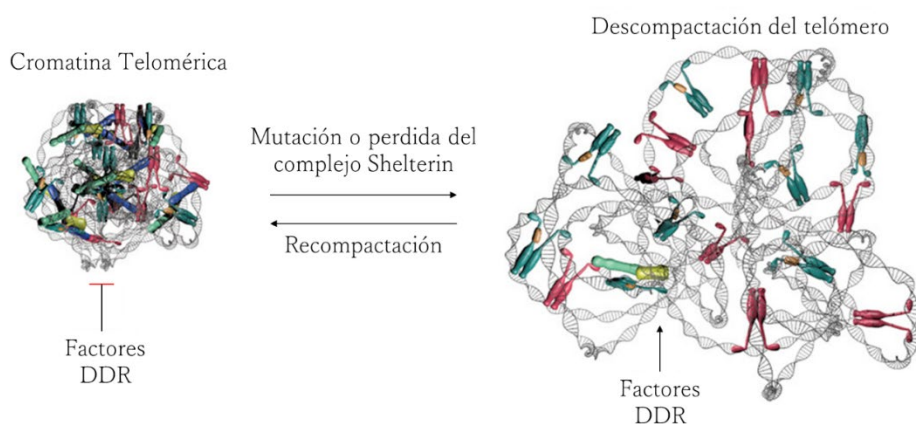


Figura 10. Rol del complejo Shelterin en la cromatina telomérica. El complejo Shelterin protege a la cromatina telomérica (heterocromatina) del reconocimiento indebido por parte de la maquinaria de reparación del daño por dsbDNA o cualquier otro factor de reparación (DDR). La mutación o pérdida del

complejo Shelterin o de alguno de sus componentes genera la descompactación del telómero y la acumulación de factores DDR, llevando así a la célula a generar estructuras cromosómicas aberrantes. Tomado de Bandaria, Jigar et al. 2006.

3.3.3 Interacciones de las regiones teloméricas con el complejo Shelterin.

Dada la naturaleza química, rica en G/C de la mayoría de los telómeros, esta región es susceptible al daño genotóxico exógeno¹¹². Así, en veteranos de guerra expuestos a gas pimienta, se observó la presencia de telómeros más cortos y susceptibilidad a desarrollar algún tipo de tumorigenesis⁸⁸.

La función del telómero, así como su relación con diversas proteínas, está conservada en diferentes organismos. A pesar de ello, la arquitectura y composición del telómero son variadas y han presentado cambios rápidos a lo largo de la evolución⁸⁴. Además, las funciones del telómero son asistidas por la interacción de proteínas específicas referidas como telosoma o Shelterin⁸⁹.

El complejo Shelterin generalmente está formado por un núcleo de seis proteínas TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 y TPP1. Estas proteínas tienen ortólogos o parálogos a lo largo de diferentes especies, pero conservan su función esencial que consiste en proteger al repetido telomérico del reconocimiento de la maquinaria de reparación de daño y dotarlo de resistencia a agentes genotóxicos (Fig. 11)^{75,89}.

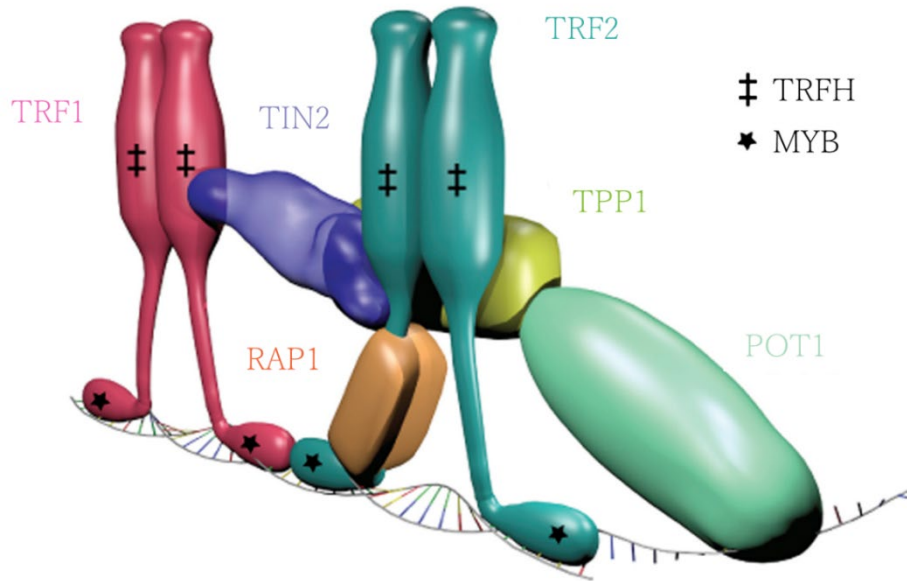
El factor del repetido telomérico 1 (TRF1 del inglés, telomeric repeat factor 1) y 2 (TRF2 del inglés, telomeric repeat factor 2)⁷⁵, cumplen funciones diferentes en el mecanismo de mantenimiento y estabilidad de genoma⁸⁵. Estas proteínas comparten la misma arquitectura espacial y 2 motivos conservados, el primero denominado TRFH, ubicado en la región N-terminal y que se encarga de la homodimerización; y el segundo llamado SANT/Myb de unión a DNA, ubicado en el C-terminal⁹⁰. Ambos dominios están separados por aproximadamente 100 y 150 aminoácidos (aa) en TRF1 y TRF2, respectivamente⁹¹. La homodimerización de cada proteína es vital para el reconocimiento del motivo hexanucleotídico del tDNA 5'-TAGGGTT-3'⁷⁶. Además estas proteínas TRF, interactúan con DDR y TERT⁹² (Fig. 11).

La proteína de protección del telómero (POT1 por sus siglas en inglés protection of telomer 1) interactúa con el telómero, uniéndose con el brazo de cadena sencilla 3' G-overhang y como heterodímero con TPP1⁹³ (acrónimo de las primeras letras de TINT1; PTOP y PIP1). Aunque TPP1 no interactúa con el tDNA, sirve de conector entre TRF1/TRF2 y POT1, y además puede reclutar a TERT a los extremos terminales⁹⁴ (Fig. 11).

El factor nuclear de interacción a TRF1 2 (TIN2 del inglés TRF1-interacting nuclear factor 2), al igual que TPP1, es un importante regulador proteína-proteína del telómero, pues se encarga de la interacción directa entre TRF1-TRF2 sirviéndoles como puente. Adicionalmente interactúa con el heterodímero TPP1/POT1. La interacción entre TIN2 y el resto del complejo de Shelterin indica una importante coordinación e integración de señales fundamentales para el mantenimiento del telómero⁹³ (Fig. 11).

La proteína de replicación 1 (RAP1 por sus siglas en inglés de replication protein A 1) es la subunidad menos estudiada del complejo y se sabe que interactúa mediante su dominio Myb con el telómero, al heterodimerizarse con TRF2⁹² (Fig. 11).

Figura 11. Componentes del complejo Shelterin. El núcleo del complejo Shelterin está formado por 6 subunidades independientes. TRF1 y TRF2 se unen a la doble cadena de DNA, mediante un dominio de unión a DNA tipo MYB (★). Además deben homodimerizarse para unirse al DNA. TRF2 es la única proteína del complejo capaz de interactuar con RAP1. TIN2 se conecta a las



TRFs mediante su dominio de homodimerización (⚡). POT1 se une a la cadena de DNA sencilla, mediante un dominio de unión OB-Fold. Además, POT1 se acompleja con TPP1. TPP1 al interactuar con TIN2, pliega la cadena sencilla hacia la doble cadena, generando así los T-loop y D-loop. Tomado de Bandaria, Jigar et al. 2006.

3.4 Daños genotóxicos: origen, reparación y consecuencias

Los agente genotóxicos (AGx) desencadenan múltiples consecuencias, en algunos casos letales para la célula, generando “saltos” en la replicación, transcripción o bien frenar la replicación, estos efectos están superditados al daño generado, siendo el más letal las rupturas de doble cadena (dsbDNA) que mantienen la célula en paro, hasta que la lesión sea reparada por completo⁹⁵.

Las fuentes de AGx pueden ser endógenas, derivadas de diferentes procesos metabólicos; aunque se ha demostrado que no son suficientes para dañar al genoma⁷⁵. Los AGx también pueden ser exógenos⁹⁶, como: la radiación UV de diferentes tipos como UVA ($\lambda = 340 \text{ nm} - 400 \text{ nm}$), UVB ($\lambda = 295 \text{ nm} - 320 \text{ nm}$) y UVC ($\lambda = 254 \text{ nm}$)⁹⁷, y la exposición a diferentes agentes químicos como radón, humo de cigarro, contaminación, metales tóxicos y pesticidas ⁹⁸. Es importante resaltar que independientemente de su origen, los daños pueden generalizarse como físicos (rupturas y modificaciones topológicas) o químicos (modificaciones en determinados grupos funcionales de los ácidos nucleicos), y su repercusión para la célula es distinta, dependiendo de las vías de reparación que se activen.

El daño inducido por radiación, deriva principalmente de la absorción de la energía de rayos UV ($\lambda = 254 \text{ nm} - \lambda 400 \text{ nm}$), siendo la exposición prolongada al sol la principal fuente de daño⁹⁹. El principal fotoproducto se denomina dímeros de ciclobutano de pirimidinas (CPDs por sus siglas en inglés) (80% - 90%), los cuales afectan a las bases pirimídicas adyacentes (Pir<>Pir). La radiación UV también puede generar fotoproductos de pirimidona (6-4PPs, 10% - 20%)⁹⁷ y es capaz de ocasionar alteraciones significativas en el estado redox, induciendo la producción de ROS mediante la fotosensibilización tipo I. De manera, que el producto derivado del daño oxidativo generado por la radiación UV será generalmente el aducto 8-oxoG, que causa firmas mutacionales G>T⁹⁸.

Respecto a los AGx derivados del daño químico, las ROS/NOS generan principalmente modificaciones químicas en las bases nitrogenadas (mediante la oxidación o etilación de las bases)^{75,88}. La guanina es la base que presenta la mayor susceptibilidad a oxidarse, generando así el aducto 8-oxoG. De no ser resuelta esta lesión en la primera ronda de replicación, habrá un apareamiento erróneo entre 8-oxoG-A y en la segunda ronda de replicación se generará una transversión tipo C>T, perpetuando así el genotipo A:T^{95,100}

Los AGx oxidativos son capaces de generar más de 100 diferentes tipos de daños en las bases nitrogenadas del DNA, produciendo también rupturas de cadena sencilla (ssbDNA), sitios abásicos y lesiones de hidantoína¹⁰¹. Además del aducto 8-oxoG, otras purinas oxidadas son más citotóxicas debido a su capacidad para bloquear la replicación y transcripción del DNA⁹⁸.

Una vez generado, el aducto 8-oxoG es susceptible a procesos consecutivos de oxidación, generando otras lesiones que incluyen las espiroiminodihidantoina (Sp)¹⁰² y guanidinohidantoina (Gh)¹⁰³. Las glicosidasas NEIL1 y mNEIL3 reparan las lesiones superoxidadas Sp y Gh de cuádruplex G del telómero y del ssDNA, pero el aducto 8-oxoG no puede ser reparado⁹⁸.

Adicionalmente al aducto 8-oxoG, las pirimidinas son también susceptibles de daño por ROS/NOS, generando varias lesiones que incluyen: timina glicol (Tg), 5 hidroxicitosina, y 5 hidroxiruacil. La Tg es la lesión de timina oxidada más común y es citotóxica, porque puede bloquear la replicación del DNA¹⁰².

Como se mencionó en un inicio, cada lesión es reparada de manera deferente. Los CPDs suelen repararse de manera directa, mediante la acción de fotoliasas¹⁰⁴ o bien mediante la vía NER, la cual está involucrada en la remoción específica del nucleótido dañado, eliminando un fragmento de 13 a 14 nt. Por su parte los daños derivados de ROS/NOS son reparados por la vía ver, mediante una DNA glicosilasa (monofuncional o bifuncional), específica para la lesión⁹⁸.

3.4.1 Genotoxicidad

El mantenimiento de la integridad del genoma es crucial durante la proliferación celular, además de que juega un rol crítico para el desarrollo del cáncer y el envejecimiento⁷⁵. Así, cuando los productos de los AGx exceden la capacidad de las enzimas encargadas del procesamiento del DNA, es inevitablemente que éste sufra mutaciones que desencadenan fenotipos específicos^{97,105}.

Como ya explicamos, en el tDNA una de las lesiones más frecuentes es el aducto 8-oxoG, que se encuentra principalmente en la cadena 3'-overhang, sin embargo, esto puede saturar la capacidad de reparación por la vía BER y contribuir al acortamiento telomérico⁷⁵.

Las regiones teloméricas son blancos preferidos para el daño aleatorio del DNA, incluyendo la reparación menos eficiente de las ssbDNA, inducidas por UV⁸⁶. Los repetidos TTAGGG son sitios preferidos para la unión de hierro, el cual es un mediador en las reacciones Fenton que generan radicales OH⁻ altamente reactivos y eventualmente inducen la ruptura 5' de las bases GGG. Se tiene bien caracterizado que la deficiencia de la peroxiredoxina I (PRDX1), aumenta la susceptibilidad del telómero a las ROS/NOS⁹⁸; por lo que la sensibilidad que presentan los telómeros frente a los AGx particularmente ROS, se debe a la naturaleza rica en guanina de la región⁸⁶.

De no ser reparadas de manera eficiente las lesiones en el telómero generadas por los AGx⁹⁸, se produce una erosión acelerada del telómero y se restringe el periodo proliferativo de las células, conduciéndolas a senescencia⁶⁸ e inestabilidad génica, lo que contribuye a numerosos padecimientos relacionados con la edad y a enfermedades degenerativas, incluyendo el cáncer⁹⁸.

El estrés oxidativo que acelera el acortamiento del tDNA y la disfunción telomérica producida por el daño a las bases nitrogenadas, conllevan a la pérdida extensiva del telómero y a la crisis telomérica.

Esta crisis, está caracterizada por la desintegración estructural del telómero, la fusión e inestabilidad cromosómica y la formación de puentes de cromatina y micronúcleos, todo lo cual conduce a la muerte celular. Estos fenotipos de crisis teloméricas se atribuyen a la presencia exacerbada del aducto 8-oxoG y a la ausencia de la glicosilasa OGGI⁹⁷.

A pesar de la información descrita anteriormente, el mantenimiento del telómero es muy poco comprendido. Por ejemplo, a pesar de que las células logran mantener al telómero, se sabe que después de los procesos senescentes, las células se vuelven inmortales⁸¹. Los mecanismos de respuesta al daño de DNA (DDR), que arrestan la progresión del ciclo celular hasta que el daño sea removido, se han asociado con el fenotipo senescente¹⁰⁶. No obstante, se desconocen las bases moleculares que distinguen a la DDR transiente de la persistente. Algunos estudios señalan heterogeneidad en la reparación genómica, sugiriendo además que ciertas regiones, como los telómeros, son resistentes al saneamiento de la lesión, por lo que se ha correlacionado el envejecimiento con la acumulación del daño en el DNA⁹⁶. Así, los mecanismos de DDR sugieren un desgaste telomérico independiente, y que la senescencia celular es el resultado del daño irreparable en el tDNA y la señalización de las vías DDR⁸⁷.

Esos daños tendrán distintos fenotipos. Así, el fenotipo telomérico debido a daños por oxidación, es diferente al observado por la depleción de algún componente de la maquinaria Shelterin. Por ejemplo, en el caso de la pérdida de TRF2 se observa la fusión de los cromosomas⁷⁵, mientras que el telómero presentará diferentes firmas de transversión o transiciones (Fig. 12)⁹⁷.

3.4.2 La maquinaria Shelterin defiende al telómero del daño

En conjunto el telómero y las proteínas del complejo Shelterin son importantes para la estabilidad, conformación tridimensional y mantenimiento telomérico⁷⁵. Al eliminar algún componente del complejo shelterin se activan las vías DDR, generando productos aberrantes (Fig. 12).

TRF1 es un regulador negativo de la longitud del telómero y su sobreexpresión conlleva a un acortamiento del telómero¹⁰⁷, adicionalmente esta proteína evita la activación de las vías de ataxia telangiectasia mutada (ATM) y de ataxia telangiectasia relacionadas a la proteína Rad3 (ATR)⁹¹. Una vez que TRF1 es fosforilada por ATM, mediante MRN o posiblemente por una tanquirasa¹⁰⁸, será incapaz de interactuar con el tDNA de doble cadena, favoreciendo así el alargamiento telomérico⁹².

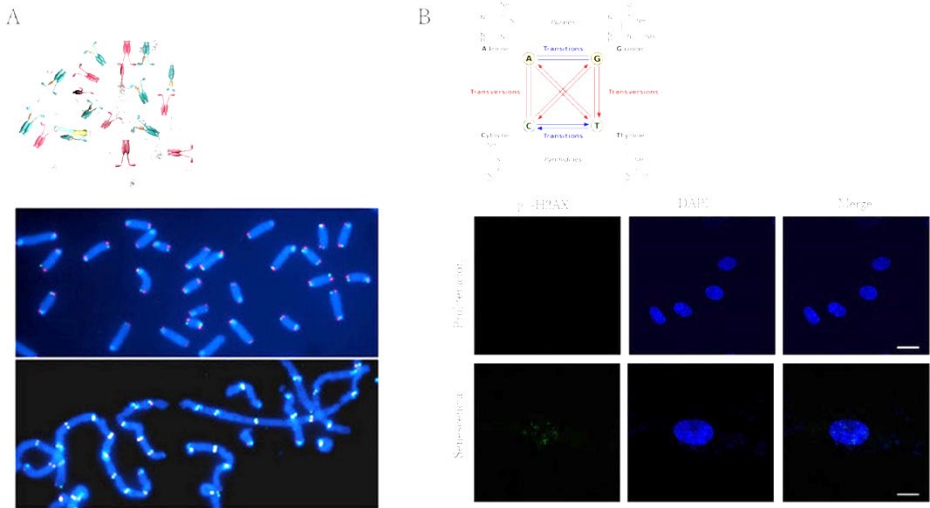


Figura 12. Efectos de la pérdida de algún componente del complejo Shelterin y del envejecimiento celular.

A) Se muestra que la pérdida de algún componente del Shelterin conduce a la fusión de los cromosomas. B) El envejecimiento celular por su parte genera marcas epigenéticas específicas en el telómero,

como la acumulación de la histona γ -H2AX, o bien firmas mutacionales que se pueden identificar como transversiones o transiciones.

En contraste, TRF2 está envuelto en la regulación de la longitud del telómero así como en la formación y estabilización del T-loop¹⁰⁹. Cuando TRF2 se inhibe, se pierde la conformación tridimensional del telómero y el 3' G-Overhang. Este último, al promover la fusión cromosómica mediante recombinación homóloga directa (HDR por sus siglas en inglés, homology-Directed recombination) o bien por la activación de la vía ATM^{76,91,110}. TRF2 se asocia con proteínas involucradas en la DDR, reclutando algunas de estas proteínas hacia el telómero, posiblemente para prevenir que éste sea reconocido como una ruptura de DNA o bien para sensibilizar a la célula del daño telomérico⁹².

Rapl está involucrada en la inhibición de HDR⁹¹ y en el silenciamiento génico; ya que en levaduras, se ha determinado que participa en el silenciamiento de genes localizados cerca de los telómeros⁷². Al suprimirla, los telómeros se alargan y se pierde la heterogenicidad de la región⁹².

El subcomplejo TPP1/POT1 interactúa, mediante el dominio C-terminal de TPP1, con TIN2, lo que favorece la unión de todas las subunidades del complejo. Así este subcomplejo inhibe las vías ATR. POT1 se une al tDNA 3' G-overhang, regulando así la longitud telomérica, protegiendo el final cromosómico y estabilizando el T-loop. Por otra parte, TIN2 interactúa con TRF1, mientras que TPP1 se asocia con POT1, por lo que la asociación TRF1-TIN2-TPP1-POT1 está a cargo de TIN2 y POT1, sugiriendo además un importante control en la comunicación del telómero⁹².

La asociación entre TRF1 y TIN2 tiene lugar en el citoplasma y es necesaria para la translocación de TRF1 al núcleo. En tanto que el emparejamiento TIN2/TRF2 se lleva a cabo en el telómero. Por su parte, las interacciones TIN2/TPP1 y TPP1/POT1 ocurren en el citoplasma y núcleo, respectivamente^{90,108}. La señal de exportación nuclear (NES) de TPP1 controla su concentración y de manera indirecta la de POT1, ya que esta señal se encuentra contigua al dominio de unión para POT1, sugiriendo que su interacción esté relacionada con su localización nuclear⁹⁴.

La unión entre TIN2/TPP1 promueve la localización nuclear de POT1/TPP1 por un mecanismo aún no determinado. Se ha encontrado que TIN2 retiene en el núcleo a POT1/TPP1, lo que sugiere que TIN2 además de participar en el ensamblaje del telosoma, actúa como una soga nuclear para las subunidades del complejo, orientando y asegurando el montaje del mismo. Por su parte, la presencia de TPP1 en el citoplasma, resulta en la activación de las vías DDR y en la desregulación de la longitud telomérica^{94,111}. En conjunto, estas evidencias sugieren la interacción coordinada de TIN2/TPP1/POT1 en el citoplasma para ensamblar al complejo Shelterin y garantizar la función del telosoma en el núcleo⁹³.

Una vez en el núcleo, TRF1 y TRF2 sondan el genoma para translocarse adecuadamente en el telómero, donde su afinidad por el tDNA es considerablemente mayor que por regiones no teloméricas. No obstante, algunos complejos pueden encontrarse en otras regiones diferentes al telómero¹¹².

Dentro de los roles descritos del complejo Shelterin se encuentran: evitar la activación de la DDR, en los extremos terminales de los cromosomas; regular la actividad de la TERT, en las regiones terminales^{84,85}; contribuir en la compactación de la cromatina del telómero, mediada por las marcas epigenéticas; y colaborar en la resistencia del telómero contra los daños⁷⁵. La pérdida de cualquier componente del Shelterin resulta en el inicio de las vías de reparación por dsbDNA.

Estas vías pueden ser: NHEJ, la cual induce la fusión de los cromosomas y posiblemente desencadena la crisis del telómero¹¹⁰; o HR¹¹³. De manera que, la maquinaria Shelterin actúa a través de distintos mecanismos, interactuando con varias proteínas y en distintas etapas del ciclo celular, convirtiendo así al telosoma en un conjunto altamente dinámico y sumamente regulado.

4 Antecedentes

E. histolytica es uno de los primeros protistas para los cuales se publicó un borrador de su secuencia genómica en 2005; posteriormente este fue revisado y reanotado, se ha estimado que el genoma abarca 20,799,072 pb¹¹⁴, distribuidos en 1,496 scaffolds. El porcentaje génico se calculó en el 32% del genoma, es decir 8,201 genes con un tamaño promedio de 1.26 kb. Una cuarta parte de estos genes contiene intrones, y solo 6% posee múltiples intrones. Al 46% (3,788) de las proteínas codificadas por su genoma, se les asoció con una función putativa; y 58 familias, de al menos 5 miembros, fueron identificadas como proteínas exclusivas de *E. histolytica*^{9,115}.

Hasta el momento no se han identificado características generales que compartan todos los telómeros analizados ya que estos tienen características propias en cada especie analizada, sin embargo podemos generalizar algunas características del telómero, de manera independiente al organismo son regiones repetitivas, localizadas en los extremos terminales de los cromosomas y asociadas a heterocromatina. En *E. histolytica* las regiones teloméricas, no se han podido identificar ya que no posee ninguna secuencia telomérica que asemeje a nivel nucleotídico a algún otro telómero¹¹⁶.

Derivado del análisis del genoma de *E. histolytica* se observó que el 10% de este está conformado por 25 diferentes arreglos los cuales están caracterizados por poseer regiones interespaciadoras las cuales son secuencias repetidas tipo STR ricas en A:T (aproximadamente 80%), además pueden incluir uno o más genes que codifican para tRNAs (Fig. 13A); el tamaño de estos arreglos es variable, en promedio se encuentran entre 490 pb -1775 pb cuya longitud total puede ser de entre 18 kb a 59 kb (Fig. 13B), por lo que estos arreglos están caracterizados por ser altamente polimórficos⁶².

La reanotación del Genoma arrojó que estas secuencias están presentes en 25 arreglos distintos: 9 arreglos contienen un solo gen para tRNA, 11 arreglos contienen 2 genes, 3 arreglos contienen 3 genes, un arreglo contiene 4 genes y otro arreglo contiene 5 genes.

La mayoría de los arreglos son ricos en A+T (aproximadamente 80%), no obstante 4 de ellos tienen porcentajes mayores de G+C. Tres de estos arreglos están asociados al gen ribosomal 5S, mientras que el cuarto arreglo puede estar relacionado con genes que codifican para moléculas nucleares pequeñas de RNA^{59,116}.

Estudios adicionales mostraron que los arreglos se repiten de 70 a 250 veces, estimándose un total de 4500 tRNA por célula¹¹⁶. Finalmente, existe evidencia de la localización de estos arreglos en los extremos de los cromosomas además de que pueden ser funcionalmente equivalentes a las secuencias teloméricas canónicas, que están ausentes en *E. histolytica*⁹, cabe mencionar que les han asociado posibles roles estructurales para el genoma del parásito¹¹⁶.

En el genoma de *E. histolytica* también se identificaron eventos de transferencia horizontal de genes (LTG por sus siglas en inglés Lateral Transfer Genes), describiéndose 68 genes con este origen. El 58% de estos genes están relacionados con el metabolismo, mientras que del 42% restante se desconoce su función⁹. También, se describió que los genes ribosomales se encuentran en episomas circulares de 24 kb, caracterizados por tener dos unidades de transcripción palindrómicas y un repetido invertido. Esos círculos representan el 20% del total de material genómico¹¹⁵.

A pesar de la incorporación de más especies de *Entamoeba*⁵⁹, aún está muy poco entendida la biología molecular de muchas de ellas, así como su composición genómica. El número de cromosomas y la ploidía también es desconocida¹¹⁷; no obstante, experimentos de hibridación de DNA han sugerido que el genoma podría ser tetraploide y contar con 14 cromosomas (Fig. 6)^{8,118}.

La multiplicidad cromosómica del género se puede deber a la plasticidad e inestabilidad genómica, asociadas con la múltiple variabilidad genómica intra e inter especies¹¹⁹. Esta característica del género se debe principalmente a la existencia de múltiples elementos LINEs y SINEs¹²⁰. No obstante, se ha probado la existencia de transposones de clase I y II, relacionándose esta última a especies no patógenas¹²¹

La organización genómica inusual del género *Entamoeba* ha dificultado la identificación de secuencias “canónicas” terminales para cromosomas lineales, tal es el caso de las secuencias teloméricas. Aunque el arreglo de las secuencias de genes tRNA sugiere la existencia de regiones teloméricas. Además, el arreglo tan variado que se ha encontrado a lo largo del género sugiere la evolución de las especies, por lo que los arreglos podrían utilizarse como marcadores moleculares de población¹²².

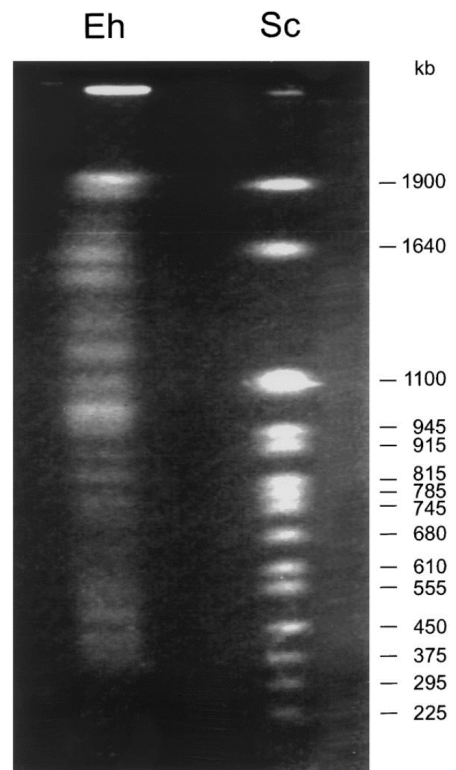


Figura 6. Cariotipo de *E. histolytica* obtenido mediante PFGE. Separación del genoma de 2×10^6 pb de *E. histolytica* (Eh) por bloque. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 0.7% y se añadió un marcador de talla correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Tomado de Willhoeft, Ute, 1999.

En general, las marcas epigenéticas encontradas en diversos organismos se han asociado con diferentes funciones celulares. En la mayoría de los organismos superiores, las marcas típicas en zonas teloméricas y subteloméricas, son la trimetilación en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y la trimetilación en la lisina 20 de la histona 4 (H4K20me3). En el caso de *E. histolytica*, la di y trimetilación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me2/ H3K4me3) se ha relacionado con actividad transcripcional; la dimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me2) está asociada a los genes silenciados mediante RNA de interferencia; y la dimetilación de la arginina 3 en la histona 4 (H4R3me2) y la acetilación de la región N-terminal de la histona 4, están relacionadas a la activación transcripcional^{123,124}. Por esta razón, es importante identificar marcas epigenéticas típicas de las regiones subteloméricas y teloméricas en el genoma de *E. histolytica*.

Derivado del análisis del genoma del parásito, se estima que el 10% está conformado por 25 diferentes de arreglos, interespaciados por secuencias repetidas tipo STR ricas en A:T (~80%), y por uno o más genes que codifican para tRNAs (Fig. 13A). La talla de estos arreglos es variable (490-1775 pb) y su longitud total va de entre 18 kb a 59 kb (Fig. 13B), por lo que son altamente polimórficos⁶². La localización de estos arreglos en los extremos de los cromosomas, sugiere que estos arreglos podrían ser funcionalmente equivalentes a las secuencias teloméricas canónicas, ausentes en *E. histolytica*⁹.

Mediante análisis *in silico* del genoma de *E. histolytica*, se han identificado genes que codifican para proteínas relacionadas con regiones teloméricas. El genoma contiene 3 secuencias cuyos productos guardan porcentajes importantes de identidad con las proteínas TRF 1 y TRF 2 de humano, sobretodo en el dominio de unión a DNA tipo MYB. Estos productos se han denominado EhTRF-like I (locus EHI_001090), EhTRF-like II (locus EHI_001110) y EhTRF-like III (locus EHI_148140)¹²⁵.

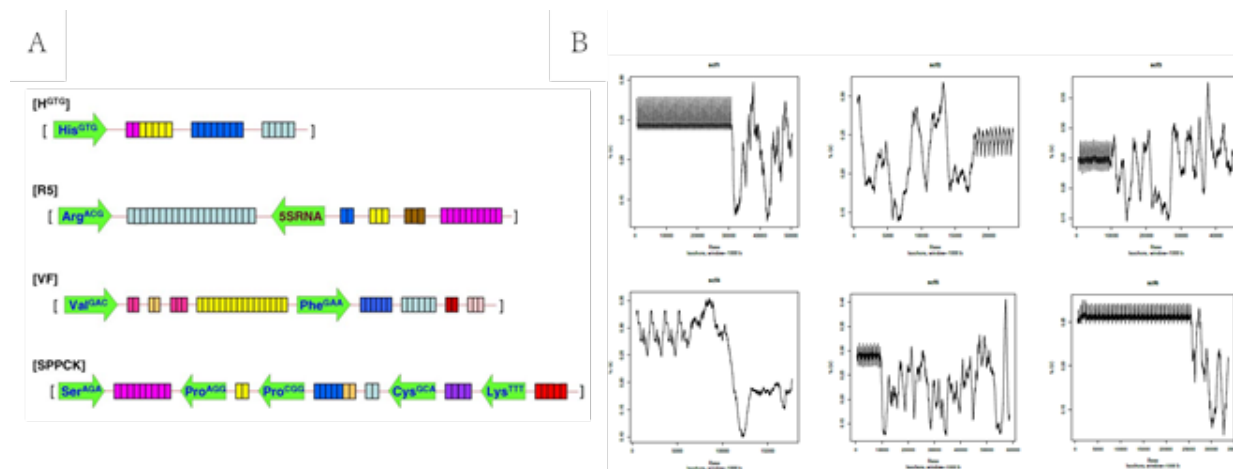


Figura 13. Arreglos de tRNAs de *E. histolytica* A) Organización de los diferentes arreglos de tRNAs y STR's, el sentido de los genes se representa por las cabezas de las flechas. B) Análisis de isocoros para diferentes arreglos de tRNAs, se observan las unidades de repetición. Modificado de Clark et al, 2006 y tomado del análisis de Isocoros realizado por el M. en C. Helios Cárdenas Hernández.

Las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* tienen rasgos característicos típicos de sus homólogas en humanos, como el dominio de unión a DNA tipo MYB, conservado en las tres proteínas, y el motivo telobox VDLKDKWRT, presente en la tercer hélice del dominio de unión a DNA tipo MYB, capaz de reconocer secuencias teloméricas¹²⁶ (Fig. 14B).

A diferencia del humano, que tiene sus genes codificantes para HsTRF1 y HsTRF2 ubicados en distintos lugares, *E. histolytica* posee los genes EHI_001090 y EHI_001110 en el mismo contig, por lo que se podría suponer que sus productos son parálogos. EhTRF-like I y EhTRF-like II son similares a HsTRF1, ya que presentan un extremo N-terminal ácido y puntos isoeléctricos de 5.84 y 6.68, respectivamente, en comparación con el punto isoeléctrico de 5.99 de HsTRF1. Por su parte, el gen EHI_148140 se encuentra en un *locus* distinto y las características fisicoquímicas de la proteína EhTRF-like III son similares a su homólogo en humano HsTRF2, ya que ambos contienen un extremo N-terminal básico y sus puntos isoeléctricos son 8.39 y 9.22,

respectivamente. Además, ambas cuentan con un dominio de unión a RAP-1. En el caso particular de HsTRF2, cuenta también con un dominio de unión a TIN2, ausente en EhTRF-like III. De forma similar a las proteínas HsTRF, las EhTRF-like conservan los dominios necesarios para su función específica, como el dominio de homodimerización, el de señalización nuclear y el de unión a DNA tipo MYB¹²⁶ (Fig. 14A). De manera interesante, a través de microscopía electrónica de transmisión (MET) se demostró que EhTRF-like III se localiza en regiones de heterocromatina condensada (Fig. 15), sugiriendo su presencia en regiones teloméricas¹²⁶.

Rendón-Gandarilla et al demostraron que las proteínas EhTRF-like son capaces de interactuar con un fragmento hexanucleotídico de naturaleza humana (5'-TTAGGG-3') además de que demostraron que una sonda derivada del arreglo NK1 de *E. histolytica* de 42 pb (5'-TTAGTATT-3') es capaz de interactuar con las proteínas EhTRF-like compitiendo por la interacción con la proteína, demostrando así que las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica* son capaces de reconocer al telómero humano (5'-TTAGGG-3') pero éstas presentan una mayor afinidad de unión por el fragmento (5'-TTAGTATT-3') derivado del arreglo de tRNA NK1 (Fig. 15J-K). Estos ensayos de retardamiento y competencia mostraron además que tanto EhTRF-like I como EhTRF-like III son capaces de formar diferentes complejos de retardamiento (Fig. 15J-K)¹²⁶.

Por otro lado, se conoce muy bien la tolerancia que experimenta el parásito a AGx, como radiación UV y H₂O₂. Por ejemplo, la viabilidad celular de trofozoítos tratados con 150 µj/cm² de UV y con 2.5 mM de H₂O₂ se mantiene en un 85%¹²⁷.

En nuestro grupo de trabajo se determinó que la expresión de los genes EHI_001090 y EHI_001110 presentan una expresión basal similar, mientras que la expresión basal del gen EHI_148140 se encuentra incrementada¹²⁶. Con la idea de comprender el rol de la proteína EhTRF-like III, así como su unión con fragmentos derivados de arreglos teloméricos diferentes, se generaron amibas que sobre expresan o tienen expresión disminuida del gen EHI_148140. Basados en esta estrategia experimental se analizó la sobreexpresión y silenciamiento del gen mediante RT-PCR y el análisis de la proteína se realizó mediante ensayos de inmunodetección además, se analizó la viabilidad celular de los trofozoítos transfectantes al ser sometidos a diferentes agentes genotóxicos (UV y H₂O₂) además observamos la formación del aducto 8-oxoG¹²⁶, en los trofozoítos transfectantes.

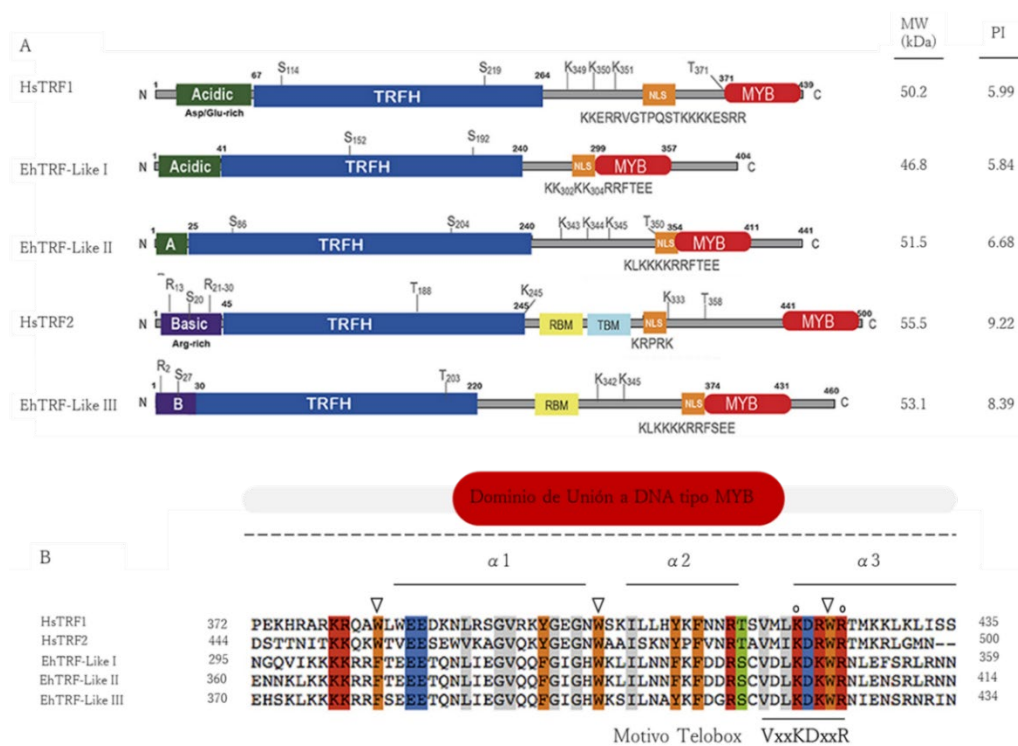


Figura 14. Comparación entre las proteínas EhTRF-like y HsTRF. A) Comparación estructural donde se muestran los dominios de dimerización (TRFH), de señalización nuclear (NSL), de unión a DNA tipo MYB (MYB), de unión a RAP-1 (RBM) y a TIN-2 (TBM). A la derecha, se incluye una tabla con los pesos moleculares (MW) de cada

proteína, así como su punto isoelectrico (PI). B) Alineamiento múltiple del dominio MYB perteneciente a las proteínas EhTRF-like y HsTRF. Las barras sólidas muestran las tres hélices típicas del dominio; las cabezas de flecha indican los triptófanos conservados; y los pequeños círculos muestran los residuos idénticos. Modificado de Rendón-Gandarilla et al., 2018.

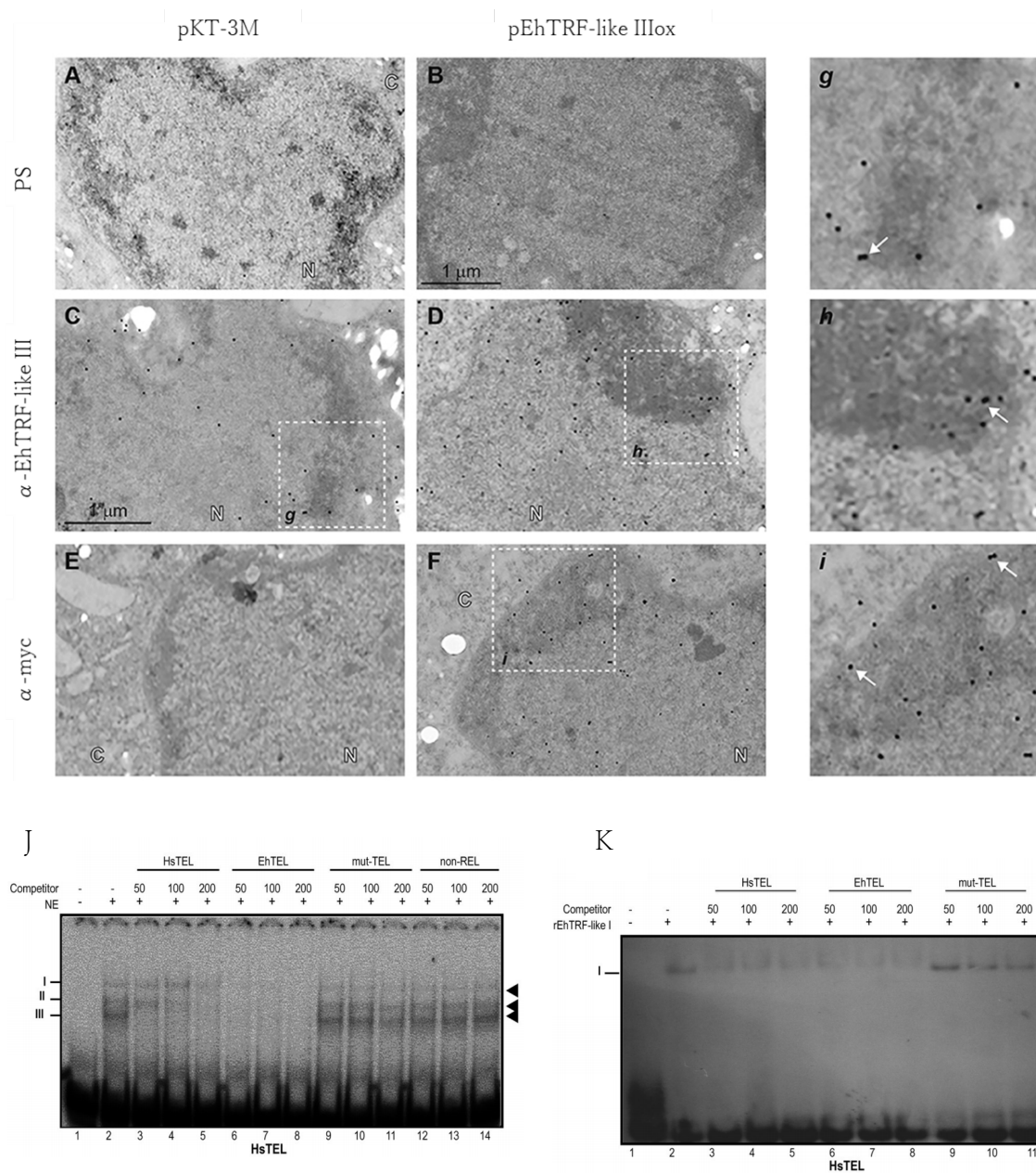


Figura 15. Detección de la proteína EhTRF-like III en los núcleos de trofozoitos transfectantes. PS trofozoitos incubados con suero preinmune (A, B) α -EhTRF-like III (C, D), α -Myc (E, F), seguido de la incubación con un anticuerpo marcado con oro α -conejo (gi). N, núcleo, C, citoplasma, las flechas indican las partículas de oro (J) Análisis de retardamiento de las proteínas EhTRF-like III (K) y EhTRF-like I. Tomado de Rendón-Gandarilla et al., 2018.

5 Justificación

En el genoma de *E. histolytica* se encontraron secuencias de repetidos tipo STR, las cuales flanquean a genes codificantes para tRNAs. A pesar de su heterogenicidad, estas regiones se han propuesto como posibles secuencias teloméricas, además de atribuirles una función en la organización genómica de este organismo. Aunado a esto, en su genoma también se han identificado 3 genes que codifican para proteínas homólogas a TRF1 y TRF2 de *H. sapiens*, las cuales se denominaron EhTRF-like I, II y III. En particular, EhTRF-like I y III tienen afinidad por una secuencia derivada de uno de los arreglos de tRNA, NK1; además se localizan en el núcleo en regiones heterocromáticas, cercanas a la periferia nuclear. Sin embargo, se desconoce si son capaces de unirse a otras secuencias relacionadas a algún otro arreglo de tRNAs; además los mecanismos moleculares a través de los cuales, estas proteínas participan en la protección de los extremos terminales de los cromosomas son desconocidos. Por tanto el análisis experimental de la proteína EhTRF-like III nos permitirá entender los mecanismos moleculares que podrían estar participando en la protección de los extremos terminales de los cromosomas del parásito.

6 Hipótesis

Las proteínas EhTRF-like reconocen los arreglos de tRNAs, y la sobreexpresión o inhibición de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos de *E. histolytica* se asociará con la formación del aducto 8-oxoG cuando se somete al parásito a estímulos genotóxicos.

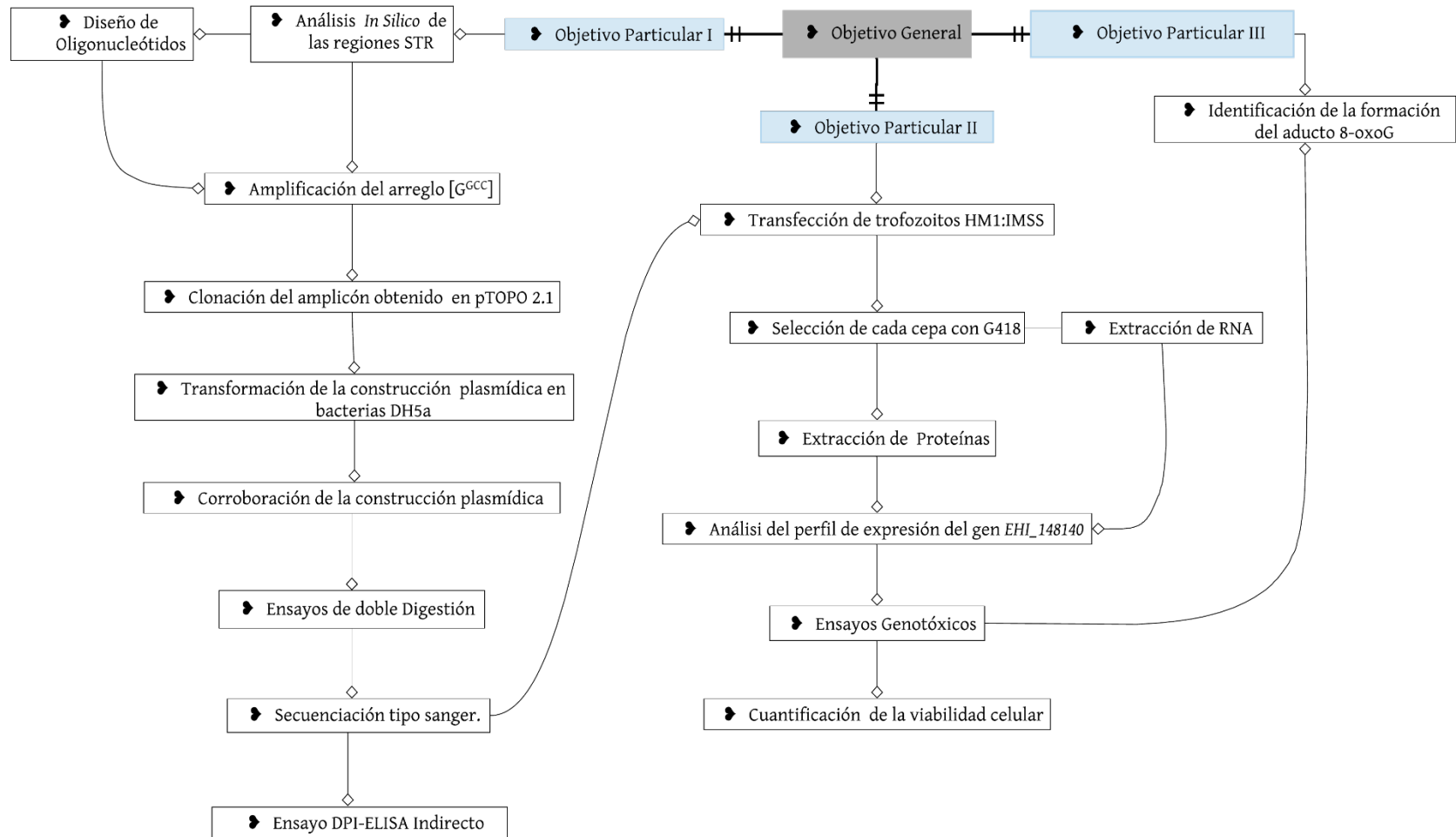
7 Objetivo General

Determinar la unión de las EhTRF-like a arreglos de tRNA's, e identificar el papel de EhTRF-like III en presencia de agentes genotóxicos, en trofozoítos de *E. histolytica*.

7.1 Objetivos Particulares

- ‡ Determinar la unión de las proteínas EhTRF-like al arreglo de tRNA [G^{GCC}] de *E. histolytica*.
- ‡ Analizar el efecto de la sobreexpresión o la inhibición de la proteína EhTRF-like III en la viabilidad celular durante el tratamiento con agentes genotóxicos. (Radiación; UV y H₂O₂).
- ‡ Analizar la formación del aducto 8-oxoG al someter a trofozoitos transfectantes (OX/SI) de *E. histolytica* a dosis crecientes, de diferentes agentes genotóxicos.

8. Estrategia Experimental



9 Materiales y Métodos

9.1 Cultivo de *E. histolytica* y *E. dispar*

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron cultivadas en tubos de vidrio con medio TYI-S33 para disminuir la presión parcial de oxígeno¹²⁸. También se utilizó medio TYI-S33 suplementado con 20% (% v.v) de Suero de Bovino Adulto (BioWest) inactivado por calor, 3% de vitaminas de Dimond (Invitrogen), además de contar con los siguientes antibióticos y antimicóticos, Penicilina (100 U/mL o 0.25 µg/mL) (Sigma-Aldrich), Estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). El medio se esterilizó por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm.

Las cepas de *E. histolytica* y *E. dispar* se crecieron hasta alcanzar >90% de confluencia, posteriormente para despegar a los parásitos se incubaron a 4° C (en un baño de hielo) durante 7-10 minutos y para desprender los trofozoitos de la superficie, los tubos se golpearon suavemente. Las amibas fueron cosechadas por centrifugación a 300 RCF durante 5 minutos a 4° C, posteriormente se decantó el sobrenadante y se lavaron de 1-2 veces con PBS pH 6.8 frío y estéril repitiendo entre cada lavado el mismo programa de centrifugación. Los trofozoitos así cosechados se usaron inmediatamente en los ensayos posteriores.

9.2 Extracción de DNA genómico de *E. histolytica*

El DNA genómico (gDNA) de *E. histolytica* fue obtenido mediante el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, 4×10^6 trofozoitos se cosecharon como se describió previamente y se resuspendieron en 600 µl de buffer de Lisis Nuclear (Nuclei Lysis Solution). Subsecuentemente, se adicionaron 3 µl de solución de RNasa (RNase Solution) homogenizando la mezcla por inversión de 3 a 5 veces para proceder a incubar los lisados celulares a 37° C durante 30 minutos, terminando con una incubación por 5 minutos a temperatura ambiente (TA) y seguido de la adición de 200 µl de buffer de Precipitación de Proteínas (Protein Precipitation Solution). Esta mezcla se agitó de manera vigorosa en vortéx e incubó durante 5 minutos en hielo terminando con una centrifugación de 15,000 RCF durante 4 minutos a TA. El DNA se precipitó con 600 µl de Isopropanol de grado Biología Molecular (Sigma-Aldrich) a TA, posteriormente se centrifugó a 15,000 RCF durante 1 minuto a TA. El gDNA empastillado se resuspendió por inversión en 600 µl de Etanol al 70% grado de biología molecular (Sigma-Aldrich) a TA. Finalmente se recentrifugó la mezcla de lavado con el último programa de centrifugación utilizado, y la pastilla de gDNA se dejó secar poniendo el tubo invertido sobre un papel absorbente durante 10 a 15 minutos.

Para finalizar el protocolo se rehidrató el gDNA con 25-50 μ l (de acuerdo al tamaño de la pastilla) de agua estéril libre de nucleasas (Pisa) la cual fue incubada previamente durante 60 minutos a 65° C. El gDNA se cuantificó en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific) y se determinó el rendimiento y la pureza obtenida mediante la relación de absorbancia a 260/280 nm. La integridad del gDNA se corroboró mediante electroforesis en un gel de Agarosa al 1.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, teñido con 100 μ g/mL de BrEt y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

9.3 Cultivo de *Escherichia coli* DH5 α

Las bacterias transformadas que se emplearon en este trabajo se cultivaron en condiciones de esterilidad en medio LB (Sigma-Aldrich) o LB-Agar (Sigma-Aldrich) suplementados con ampicilina 100 μ g/mL (Sigma Aldrich). La cepa se mantuvo en placas de agar LB^{AMP100} y cuando se requirió fueron expandidas en medio LB^{AMP100} e incubadas ON a 37° C con agitación constante (200 rpm en una incubadora (New Brunswick Scientific) con agitación. Los cultivos se cosecharon en fase logarítmica (O.D 0.1-0.5) y se empastillaron por centrifugación a 19,000 RCF durante 5 minutos a 4° C, al concluir el programa de centrifugación se decantó el sobrenadante. Las bacterias así cosechadas se usaron para purificar los diferentes plásmidos generados en este trabajo.

9.4 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el arreglo [G^{GCC}] de *E. histolytica*

Para llevar a cabo la amplificación del arreglo [G^{GCC}], el cual tiene un tamaño de 813 pb y el gen que codifica para el tRNA de la Glicina, se obtuvo la secuencia a partir del número de acceso BK005662 de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los oligonucleótidos específicos se diseñaron para amplificar dos regiones que flanquean el gen del tRNA de Gly, las cuales tienen un tamaño de 277 y 465 pb (Fig. 16), a cada oligonucleótido sintetizado se le adicionaron los sitios de restricción (5' *Xba* I—//—*Xho* I 3') (Tabla 1). El diseño de los oligonucleótidos fue corroborado *in silico* con ayuda del software Primer-Blast de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), para determinar si los oligonucleótidos formaban estructuras secundarias se utilizó el software Multiple Primer Analyzer de ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

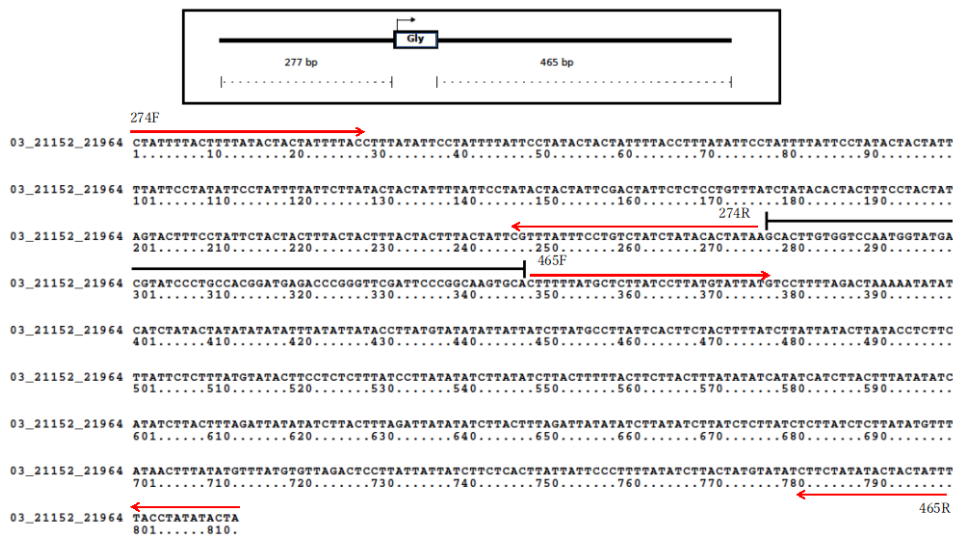


Figura 16. Arreglo genómico para el tRNA [G^{GCC}] de *E. histolytica*. En el panel superior se muestra la organización del arreglo de tRNA [G^{GCC}] de Glicina. En el panel inferior se indican con flechas los sitios de alineamiento de

los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los fragmentos de 813 y 277 pb. La secuencia codificante del tRNA está marcada con la barra a partir del nucleótido 277 hasta el nucleótido 347. Tomado del análisis de IsoCoros realizado por el M. en C. Helios Cárdenas Hernández.

9.4.1 Amplificación y purificación del arreglo [G^{GCC}] de *E. histolytica*

La amplificación del arreglo [G^{GCC}] se llevó a cabo mediante PCR punto final. Como molde se utilizaron 100 ng de gDNA de *E. histolytica*, 10 μM de los oligonucleótidos específicos, 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 4.0 mM de MgCl₂, 0.5x buffer GoTaq, 1U de Taq Polimerasa (Promega), en cbp 50 μl. La amplificación se realizó en el GeneAmp(R) PCR system 9700 thermal cycler (Applied Biosystems), empleando el siguiente programa: 95° C de desnaturalización inicial seguido por 28 ciclos de 95° C de desnaturalización; la temperatura de alineamiento para el fragmento de 277 pb fue de 57° C (Fig. 17.) mientras que para el arreglo de 813 pb fue de 55° C (Fig. 17), finalmente ambos fragmentos se extendieron a 72° C. Para corroborar que los productos de PCR tenían el tamaño esperado, estos se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, teñido con 100 μg/mL de BrEt y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

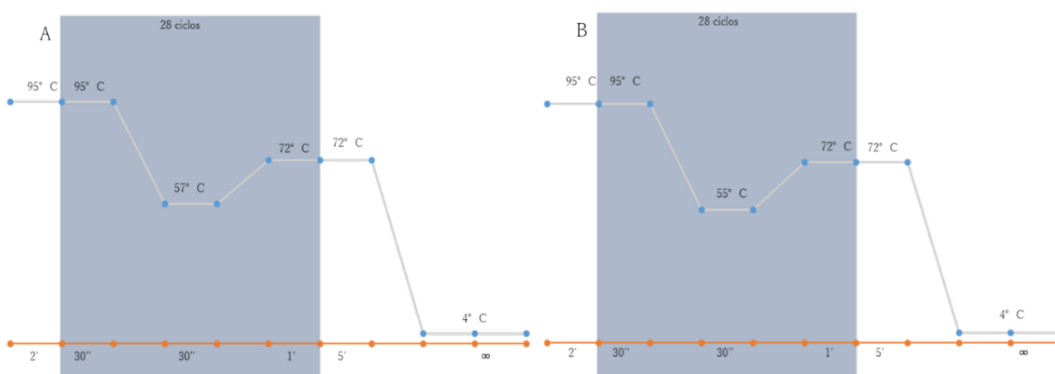


Figura 17. Programas de amplificación empleado para la obtención de los diferentes fragmentos del arreglo

[G^{GCC}]. En A se muestra la temperatura de alineamiento específica para amplificar el fragmento de 277 pb. En B se muestra la temperatura de alineamiento específico para amplificar el fragmento de 813 pb.

9.4.2 Clonación de los diferentes fragmentos del arreglo [G^{GCC}] de *E. histolytica* en el vector pCR(R)2.1-TOPO(R)

Los amplicones de 813 y 277 pb del arreglo [G^{GCC}] fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se adicionó a la reacción de PCR un volumen de solución de unión a la membrana. Las mezclas se transfirieron a una columna e incubaron a TA durante 1 minuto. Posteriormente se centrifugaron a 16,000 RCF durante 1 minuto a TA, al concluir el programa se desechó el sobrenadante y se adicionaron 700 µl de solución de lavado de la membrana complementada con etanol repitiendo el mismo programa de centrifugado. Este último paso se repitió una vez más con 500 µl de solución de lavado de la membrana y una centrifugación de 5 minutos. Al concluir se centrifugó sin tapa la columna durante 1 minuto para eliminar el etanol residual. Para la elución se transfirió la columna a un tubo de polipropileno de 1.5 mL (Axygen) estéril e incubó con 50 µl de agua libre de nucleasas (PiSA) durante 1 minuto a TA, eluyendo el producto de PCR mediante centrifugación 16,000 RCF durante 1 minuto a TA.

Para clonar los fragmentos del arreglo [G^{GCC}] los amplicones se sometieron a un ciclo de poliadenilación adicional en el cuál se agregó 1U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega) en 1x buffer GoTaq, 10 mM dATP a 72° C durante 10 minutos. La clonación se llevó a cabo en el vector pCR(R)2.1-TOPO(R) (Fig. 18) del kit TOPO TA Cloning (R) (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se emplearon 4 µl del producto de PCR recién poliadenilado, 1 µl de solución de sal (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl₂) y 1 µl del vector PCR(R)2.1-TOPO(R), la mezcla se homogenizó e incubó durante 5 minutos a TA.

Tabla 1
 Secuencia de nucleótidos empleados para amplificar distintas regiones del repetido telomérico STR [G^{ccc}]

CLAVE	≈	SECUENCIA (5'➤3')	✂ (5'➤3')	LONGITUD EN PB	★	✎	TM OPTIMA	%GC	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO
274F	+	CTATTTTACTTTTATACTACTATTTTACC	<i>Xba</i> I T CTAGA	29	1 (C)	29 (C)	57° C	20.69	277 pb pre tRNA.Gly
274R	-	TAGTGTATAGATAGACAGGAAATAAACG	<i>Xho</i> I C TCGAG	28	247 (A)	274 (C)		32.14	
465F	+	CTTTTTATGCTCTTATCCTTATGTATTATG	<i>Xba</i> I T CTAGA	30	349 (C)	378 (G)	55° C	26.67	465 pb post tRNA.Gly
465R	-	TAGTATATAGGTAAAATAGTAGTATATAGAA G	<i>Xho</i> I C TCGAG	32	782 (A)	813 (C)		21.88	
274F	+	CTATTTTACTTTTATACTACTATTTTACC	<i>Xba</i> I T CTAGA	29	1 (C)	29 (C)	55° C	20.69	813 pb, Fragmento completo
465R	-	TAGTATATAGGTAAAATAGTAGTATATAGAA G	<i>Xho</i> I C TCGAG	32	782 (A)	813 (C)		21.88	

≈ (Polaridad de la cadena molde). ★(Base inicial en el molde).

✂ (Sitio de corte). ✎(Base final en el molde).

Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a TA, esto permitió la formación de dos fases, una acuosa y transparente y una segunda fase viscosa la cual se retiró con un mondadientes estéril. Consecutivamente, se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 250 µl de isopropanol absoluto grado de biología molecular (Sigma-Aldrich) y se homogenizó por inversión. Para terminar de precipitar el pDNA se centrifugó la mezcla a 4,600 RCF durante 10 minutos a 4° C, y el pDNA empastillado se lavó con 600 µl de Etanol al 70% grado de biología molecular (Sigma-Aldrich) a 4° C. Subsecuentemente se recentrifugó la mezcla con el último programa de centrifugación utilizado, el lavado concluyó con el secado de la pastilla sobre un papel absorbente durante 10 a 15 minutos. Finalmente, el pDNA se rehidrató con un volumen específico (25-50 µl) de acuerdo a la pastilla de agua estéril libre de nucleasas (PiSA) la cual fue incubada previamente durante 60 minutos a 65° C, una vez bien resuspendido el pDNA se cuantificó en el NanoDrop Lite (Thermo Scientific) y se determinó el rendimiento y su pureza. La integridad del gDNA se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, teñido con BrEt a 100 µg/mL y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

Para llevar a cabo los protocolos de secuenciación tipo Sanger y la transfección de los plásmidos pKT3M, PKT3M_148140_Ox, pBackbone y pBackbone_148140_Si se requiere un pDNA con una pureza adecuada y es por ello que se empleó el kit QIAGEN® Plasmid Purification (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, se crecieron las bacterias transformadas en 5 ml de medio LB^{AMP100} y se adicionó 1 mL de las bacterias en 500 mL de medio LB^{AMP100}. El cultivo se cosechó y fue resuspendido en buffer P1 el cual contenía RNasa A. La lisis se favoreció mezclando en un vortéx (VORTEX GENE 2). Posteriormente se adicionó buffer P2 homogenizando la mezcla por inversión de 4 a 6 veces incubando durante 5 minutos a 25° C. Una vez concluido esta incubación se agregó el buffer P3, previamente incubado frío y se mezcló vigorosamente por inversiones de 4-6 veces seguido de una incubación en hielo (4° C). La centrifugación siguiente se realizó bajo el programa 20,000 RCF durante 30 minutos a 4° C. El pDNA se recuperó del sobrenadante y se recentrifugó bajo el programa 20,000 RCF durante 15 minutos a 4° C, una vez clarificado el sobrenadante se pasó por la columna QIAGEN-tip adecuada equilibrada previamente con buffer de equilibrio QBT. Se dejó pasar sobrenadante por gravedad y se prosiguió a lavar el pDNA con buffer de lavado QC.

El pDNA se eluyó con buffer de elución QF en un tubo de polipropileno (Axygen) estéril de 15 mL, que contenía 0.7 volúmenes (respecto al volumen eluido) de Isopropanol absoluto de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) seguido del programa de centrifugación $\geq 15,000$ RCF durante 30 minutos a 4° C. La pastilla se lavó con Etanol al 70 % de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) para concluir con una centrifugación de $\geq 15,000$ RCF durante 10 minutos a TA, el pDNA se dejó secar de 5 a 10 minutos (hasta que la pastilla fuera transparente) y se rehidrató en un volumen apropiado de 25-50 μ l de agua estéril libre de nucleasas (PiSA) la cual fue incubada previamente durante 60 minutos a 65° C. Una vez bien resuspendido el gDNA se cuantificó en el NanoDrop Lite (Thermo Scientific) y se determinó el rendimiento y su pureza. La integridad del gDNA se observó por electroforesis en un gel de Agarosa al 1.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, teñido con BrEt a 100 μ g/mL y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

9.5.1 Restricción de pDNA

Una vez determinada la concentración y la integridad del pDNA, para determinar si los plásmidos contenían los insertos de 813 y 277 pb , los mismos se cortaron con las enzimas de restricción *Xba*I, *Xho*I o *Sma*I (New England Biolabs) dependiendo del fragmento y la construcción plasmídica a analizar (Tabla 2). Para las reacciones de restricción se empleó un Mix que contenía buffer CutSmart 1x (New England Biolabs), BSA 0.1 μ g/ μ l, agua libre de nucleasas cbp 49 μ l y finalmente se adicionó 1 U/ μ l de enzima. La mezcla fue homogenizada con vórtex (VORTEX GENE 2), posteriormente se agregó a tubos de polipropileno de 1.5 mL (Axygen) 1 μ g de pDNA, y se aforó a 50 μ l con el Mix preparado anteriormente, seguida de la incubación del tratamiento a la temperatura respectiva para cada enzima (Tabla 2) en baño maría durante 16 horas. Para finalizar se corroboró la digestión por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, teñido con BrEt a 100 μ g/mL y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

Tabla 2

Enzimas empleadas para la Restricción de las construcciones plasmídicas.

Clave	Sitio de Corte	Nebbuffer.				Temperatura Optima	Temperatura Inactivación	★	Construcción			
		1.1	2.1	3.1	CutSmart				A	B	C	D
<i>Xba</i> I	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC T...5'	<10%	100%	75%	100%	37° C	65° C 20 minutos	-	*	*	-	-
<i>Xho</i> I	5'...C TCGAG...3' 3'...GAGCT C...5'	75%	100%	100%	100%	37° C	65° C 20 minutos	-	*	*	*	*
<i>Sma</i> I	5'...CCC GGG...3' 3'...GGG CCC...5'	<10%	<10%	<10%	100%	25° C	65° C 20 minutos	-	-	-	*	*

A= pTopo_[G^{sec}]₈₁₃; B= pTopo_[G^{sec}]₂₇₇; C= Pkt3_148140_Ox; D = Backbone_148140_Si

9.5.2 Secuenciación del pDNA de las clonas candidatas

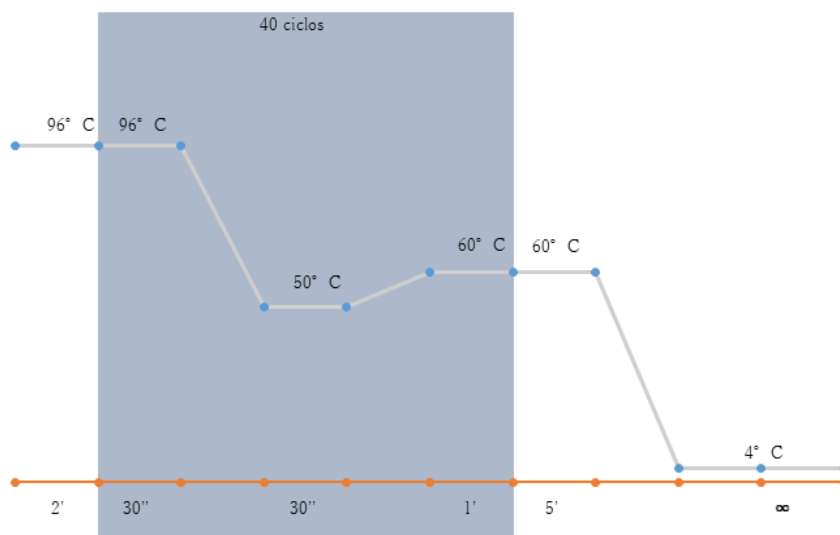
Para corroborar que las construcciones obtenidas no contuvieran mutaciones, los plásmidos que resultaron ser positivos para el ensayo de restricción fueron expandidos y preservados como se mencionó con anterioridad, posteriormente se purificó el pDNA como se indicó previamente. Para la secuenciación de los fragmentos se utilizó el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se secuenciaron ambas cadenas de dos clonas positivas para cada fragmento, usando un oligonucleótido específico, la primera reacción se realizó con el oligonucleótido Sentido mientras que la segunda fue hecha con el oligonucleótido Antisentido (Tabla 3). Cada reacción tenía como templado 500 ng de pDNA, 100 nM de oligonucleótido específico, 2 µl de BigDyeTM Terminator v1.1 5x Sequencing buffer para una concentración final de 0.5x, 4 µl de BigDyeTM Terminator v3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems), cada mix fue aforado con agua libre de nucleasas y estéril a 20 µl. Las muestras fueron sometidas a las condiciones de amplificación recomendada por el fabricante (Fig. 19) en el termociclador GeneAmp(R) PCR System 9700 (Applied Biosystems). Una vez concluido el protocolo, la reacción se purificó mediante el DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, la resina de la columna provista por el kit fue homogenizada mediante vortéx o agitación manual, este procedimiento se llevó a cabo con la tapa ligeramente abierta para evitar la formación de vacío, una vez homogenizada la resina la protección inferior fue retirada manualmente y con cuidado de no tocar la boquilla recién expuesta se depositó la columna en el tubo colector incluido en el Kit, paso seguido por una centrifugación a 750 RCF durante 3 minutos a TA. Una vez concluida la centrifugación el tubo colector fue desechado y la columna se introdujo a un tubo de polipropileno de 1.5 mL (Axygen) estéril, los 20 µl de la reacción

de secuenciación se depositaron lentamente por el centro, en oscuridad, sin tocar la resina, la reacción fue sometida inmediatamente al mismo programa de centrifugación que se aplicó anteriormente, el eluido se secó al vacío en un Concentrador (EPPENDORF, concentrator 5301) durante 45 minutos a 45° C o 20 minutos a 60° C, y al concluir el secado se conservó a -20° C protegido de la luz. Para llevar a cabo la secuenciación se resuspendió el pDNA y se inyectó la muestra en el secuenciador Applied Biosystems de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La secuencia obtenida se analizó mediante el programa BioEdit para comprobar la calidad de la secuencia obtenida, posteriormente se realizó una búsqueda por homología empleando el programa Blastn para determinar la identidad de la secuencia en la base datos (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Finalmente, se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia obtenida y la secuencia reportada en la base de datos empleando ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para concluir se evidenciaron los nucleótidos conservados mediante BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Los plásmidos así analizados que contenían los fragmentos de 813 y 277 pb se denominaron pTOPO_[G^{gcc}]₈₁₃ y pTOPO_[G^{gcc}]₂₇₇ y se amplificaron, purificaron y guardaron a -20 C.

Tabla 3
Oligonucleótidos empleados para la secuenciación tipo Sanger de las construcciones plasmídica

Clave	Polaridad	Secuencia (5'➤3')	Construcción Secuenciada.
274Fw	+	CTATTTTACTTTTATACTACTATTTTACC	pTopo [G ^{gcc}] 277pb
274Rv	-	TAGTGTATAGATAGACAGAAATAACG	pTopo [G ^{gcc}] 277pb
274F	+	CTATTTTACTTTTATACTACTATTTTACC	pTopo [G ^{gcc}] 813pb
465R	-	TAGTATATAGGTAATAATAGTAGTATATAGAAG	pTopo [G ^{gcc}] 813pb
148140Fw	+	GCGCGTTCTCAAATACAACC	pKT3M.148140.Ox
148140Rv	-	G TTCAGAGGCTGCAGGAAGT	pKT3M.148140.Ox
148140Fw	+	GCGCGTTCTCAAATACAACC	pBackbone.148140.Si
148140Rv	-	G TTCAGAGGCTGCAGGAAGT	pBackbone.148140.Si

Figura. 19. Protocolo de amplificación utilizado para la secuenciación. Estas condiciones se emplearon de manera general para todas las construcciones.



9.6 Proteína recombinante rEhTRF-like I para los ensayos DPI-ELISA indirecto

En el laboratorio se contaba con la proteína recombinante EhTRF-like I la cual estaba congelada a -20°C en buffer de elución (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl y 500 mM Imidazol) Es por ello que para los ensayos de ELISA, rEh TRF-like I fue dializada a través de una membrana de diálisis de celulosa regenerada de grado estándar (SPECTRUM) de poro 7 (50,000 Da) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, empleándose la relación 1mL : 1cM (Volumen de Proteína: Longitud de Membrana). La membrana se lavó durante 30 minutos con agua desionizada y estéril a TA con agitación suave (50 rpm) al concluir el lavado se selló un extremo (5 mm) con las pinzas de seguridad para diálisis (SPECTRUM). Se adicionó el volumen de proteína a dializar cuidadosamente a la membrana, al concluir la deposición de la proteína se selló el extremo faltante del sistema (3-5 mm) con una pinza de seguridad para la diálisis. La membrana fue incubada durante 4 horas a 4°C en agitación baja (20 rpm) en una parrilla con agitación (Corning Company) en 1L de buffer de Recambio [25 mM Tris-HCL; 30 mM NaCl] , con la finalidad de que el sistema estuviera totalmente suspendido en el medio se empleó un contrapeso de Mercurio. Al concluir las 4 primeras horas de incubación se reemplazó el buffer de Recambio con un litro nuevo y se dejó ON a 4°C en agitación baja (20 rpm). Al día siguiente se hizo un nuevo cambio de buffer y se dejó durante 4 horas más, al concluir la diálisis se verificó la integridad de la proteína mediante un gel de poliacrilamida SDS-Page al 15%.

9.7 Ensayos de interacción de DNA-Proteína (DPI)-ELISA indirecto

Para el DPI se realizó la variante de ELISA indirecto, se estandarizó con concentraciones crecientes de dsDNA (25 ng/μl, 50 ng/μl, 100 ng/μl, 250 ng/μl, 500 ng/ μl, 1 μg/μl y 4 μg/μl) diluido en 50 μl de buffer de unión como se ha descrito previamente¹³⁰. Para ello previamente se hibridaron en buffer TM a 95° C durante 5 minutos los siguientes oligonucleótidos: 1)HuTR (el cual corresponde a un oligonucleótido de 34 pb que contiene la secuencia canónica telomérica humana (TTAGGG)₄ como control positivo); 2) EhTR (correspondiente a un oligonucleótido de 42 pb que contiene una secuencia derivada del arreglo [NK] de *E. histolytica*, (TTAGTATT)₄), 3) EhTR-2 (el cual corresponde al oligonucleótido de 32 pb que contiene una secuencia derivada del arreglo [R^{TCT}] de *E. histolytica*, (TTATATGT)₄); 4) Eh-NonRel (que corresponde a un oligonucleótido que contiene 27 pb de la región codificante gen EHI_165450 de *E. histolytica*); 5) el fragmento [G^{GCC}] de 277 (que corresponde al fragmento que contiene las secuencias STR que se encuentran 5' río arriba del gen que codifica para el tRNA de Gly); 6) el fragmento [G^{GCC}] de 813 (correspondiente al fragmento de 813 pb el cual incluye el arreglo completo que contiene el gen que codifica para el tRNA de Gly y las secuencias STR) Posteriormente los diferentes fragmentos se fijaron en placas de 96 pozos pretratadas para unir ácidos nucleicos (catálogo CLS2503, Corning Company) (Fig. 20). Para ello, se incubó la placa y el dsDNA a 50° C en un horno de hibridación (Amershan Bioscience) con agitación ON, al concluir la incubación se retiró el sobrenadante y se fijó el DNA en la placa aplicando 3,200 μJ/cm² en un horno de radiación UV (STRATALINKER) como se ha descrito con anterioridad por Nagata et al¹⁶⁶. Posteriormente, la placa se bloqueó con 200 μl de solución de bloqueo de DNA a 4° C, ON, en una parrilla con agitación media (100 rpm) (Corning Company). Al día siguiente se retiró la solución con un movimiento enérgico sobre papel absorbente y los pozos se lavaron tres veces durante 5 minutos con 200 μl de buffer TE-100 a TA en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media-alta (150 rpm). A continuación, se adicionó a cada pozo 25 μl de la proteína rEhTRF-Like I y extractos totales en una relación 1 : 3 (Proteína : DNA) resuspendidas en buffer de Binding (BDG 1X) e incubó durante 20 minutos a 4° C en una parrilla con agitación media (100 rpm) (CORNING). Al concluir la incubación se retiró el sobrenadante y se lavaron los pozos como se explicó anteriormente.

La interacción DNA : Proteína se incubó a 4° C, ON, en una parrilla con agitación media (100 rpm) con 200 μl buffer de Bloqueo de Proteína, al concluir la incubación se retiró el sobrenadante y los pocillos se lavaron tal cual se explicó en pasos anteriores.

A continuación, se incubó durante 60 a 90 minutos los pozos con 100 μ l de la buffer de Ab-primario α His (que reconoce el tag de Histidinas que está acoplado a la rEhTRF-like I) o α EhTRF-like III (que reconoce un péptido diferencial para la proteína; N-CNKQKVQPQVSQPH-C) a TA en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media (100 rpm) posteriormente se lavaron los pocillos e incubaron durante 60 minutos a TA en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media (100 rpm) en total oscuridad con 100 μ l de buffer de α -IgG acoplado a HRP . Finalmente, se lavó cada pozo como se describió e incubó cada pocillo durante 30 minutos con 200 μ l de OPD (sigma) diluido en amortiguador de citratos a TA en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media (100 rpm) en total oscuridad, al concluir se leyó la placa en un lector de ELISA (BIO-TEK) a 450nm.

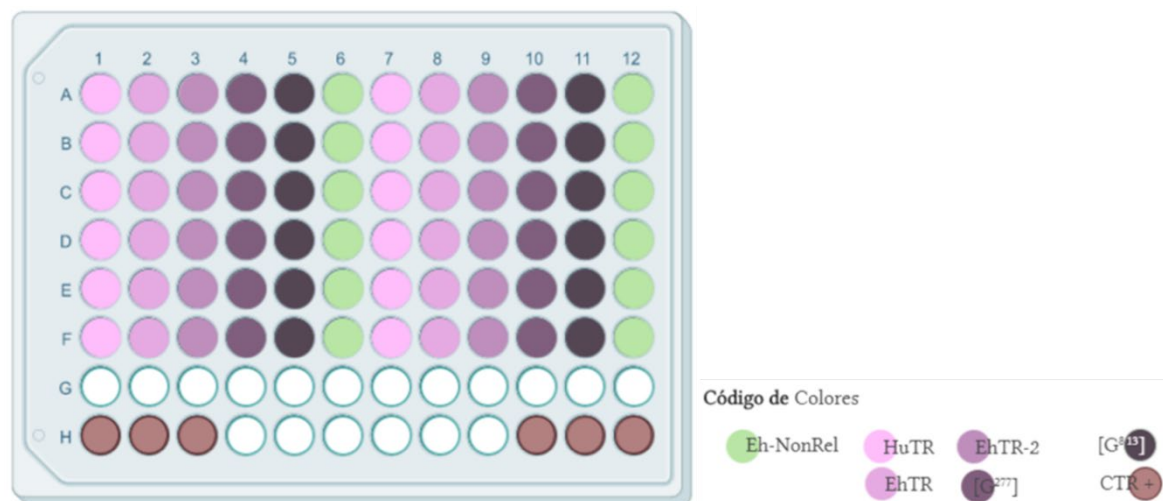


Figura 20. Esquema de la placa del ensayo DPI-ELISA indirecto. Para los ensayos de unión a dsDNA la interacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos tratadas para la unión a DNA. Las columnas 1-6 representan los ensayos en donde se empleó la proteína rEhTRF-like I revelados con el anticuerpo α -His, mientras de las columnas 7-12 representan los ensayos en donde se emplearon los extractos totales revelados con el anticuerpo α -EhTRF-like III. Para cada ensayo se empleó un control positivo de ensayo ELISA que incluye a la proteína rEhTRF-like I revelado con el anticuerpo α -EhTRF-like I.

9.8 Transfección de *E. histolytica*

Para llevar a cabo los ensayos funcionales se transfectaron 8×10^5 trofozoitos los cuales se sembraron en placas de 6 pozos (Corning) y se incubaron a 37° C en una incubadora con 8% de CO₂ durante 1 h para permitir que se adhirieran al menos el 80% de las células. Posteriormente, se retiró el medio TYI-S33 complementado y se dio un primer lavado con medio TYI-S33 basal entibiado previamente. Se preparó la mezcla de transfección la cual contenía 20 μ g de pDNA, 100 μ l de medio TYI-S33 basal y 20 μ l de Superfect Lipofectamine (Qiagen).

La mezcla fue homogenizada totalmente con vortéx e incubada a 37° C durante 10 minutos. Posteriormente terminada esta incubación se mezcló la solución con 800 µl de medio TYIS-33 completo. Esta mezcla se adicionó a la monocapa suave y homogéneamente e incubó por un periodo de 4 horas. Para favorecer la disgregación de los complejos DNA-Lipofectamina la placa se agitó gentilmente de manera oscilante cada 30 minutos, esta última incubación se realizó en la incubadora con 8% de CO₂. Para finalizar el protocolo se enfrió la placa tal y como se explicó anteriormente, y se recuperaron los trofozoitos sometidos al tratamiento de transfección en tubos de vidrio con 12 mL de medio TYI-S33 complementado y tibio; se permitió la recuperación de las células durante 24 a 48 horas y una vez que se observara una monocapa ($\geq 90\%$ de confluencia) se comenzó con la selección con concentraciones crecientes de 1 µg/ µl hasta 20 µg/µl de antibiótico G418, puesto que los plásmidos empleados para las construcciones contienen un gen de resistencia a neomicina (Fig. 21). Una vez establecidas las clonas transfectantes se cultivaron para determinar la inhibición o la sobreexpresión a nivel transcripcional y traduccional mediante ensayos de RT-PCR e Inmunodetección o bien para los ensayos funcionales.

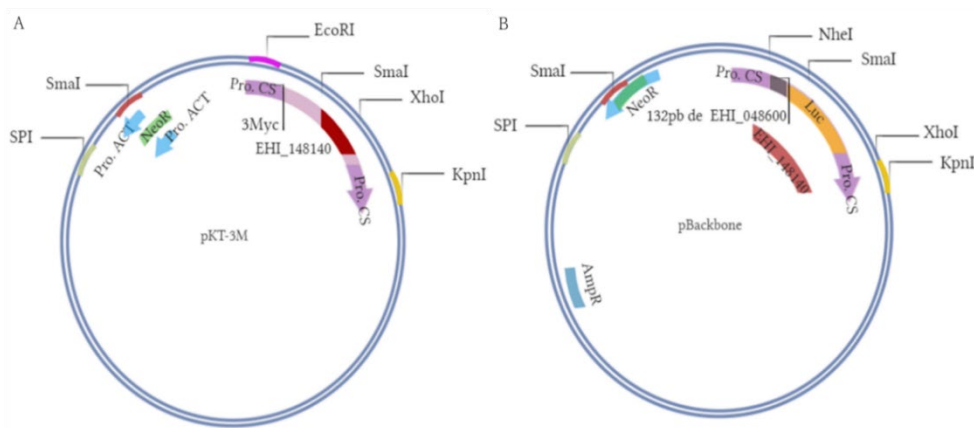


Figura 21. Mapa de los Vectores de expresión e inhibición empleados en *E. histolytica* para los estudios funcionales del gen EHI_148140. En A se muestra la construcción plasmídica empleada para la sobreexpresión del gen EHI_148140 el cual está clonado entre los sitios de corte *SmaI*,

XhoI; además se muestran los promotores específicos de amiba: actina (Pro. ACT) el cual permite la expresión del gen de *neomicina*, y los promotores específicos de amiba cisteína sintasa (Pro. CS) que permite la expresión del gen del gen clonado además de la etiqueta de afinidad 3Myc. En B se muestra la construcción plasmídica empleada para el silenciamiento del gen EHI_148140 el cual está clonado entre los sitios de corte *SmaI* y *XhoI* asociado a un fragmento de 132 pb que permite su silenciamiento. Ambas construcciones contienen un gen de resistencia a Neomicina y un gen de resistencia a Ampicilina. Los plásmidos se dibujaron con el programa Bio-render software (<https://biorender.com>).

9.9 Extracción de RNA total

Cuando se tuvieron los trofozoitos transfectantes en la presión de selección deseada se llevó a cabo la extracción de RNA total de las diferentes cepas transfectantes y de trofozoitos WT. El RNA total fue extraído mediante TRIzol Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, 4×10^6 trofozoitos fueron cosechados como se especificó previamente y resuspendidos en 1 mL de TRIzol Reagent (Invitrogen) una vez homogenizada la solución adecuadamente se transfirió a tubos de 1.5 mL de polipropileno (Axygen) estériles y fueron procesadas inmediatamente (o bien se almacenaron a -80°C por no más de un año). La mezcla de TRIzol se incubó durante 15 minutos a TA, al concluir la incubación, a cada tubo se le adicionaron 200 μl de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (Sigma-Aldrich) y se agitó la mezcla vigorosamente hasta conseguir un tono rosa pastel (no más de 15 segundos). Posteriormente, la solución se centrifugó a 12000 RCF durante 15 minutos a 4°C , al concluir el ciclo de centrifugación se obtuvieron las tres fases típicas la extracción, la fase acuosa (superior) en donde se encuentra el RNA total, la fase orgánica (intermedia) en donde están depositadas las proteínas y DNA y la fase inorgánica, residuos químicos utilizados para la extracción. Una vez recuperado el RNA las dos fases residuales fueron almacenadas a -20°C por no más de un año o procesadas al día siguiente para la obtención de DNA o Proteínas. El RNA se depositó en un tubo 1.5 mL de polipropileno (Axygen) estéril de manera tal que no se contaminara con biomoléculas y componentes de las otras fases, dichos tubos contenían 500 μl de isopropanol absoluto de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol usado, posteriormente se incubó ON o hasta por 96 horas (para mejorar el rendimiento) a -20°C , una vez concluido el proceso de precipitación el RNA se centrifugó a 12000 RCF durante 10 minutos a 4°C , la pastilla resultante se lavó adecuadamente con 1 mL de etanol al 75% de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol usado. Inmediatamente después se recentrifugó la mezcla a 7500 RCF durante 5 minutos a 4°C al concluir la centrifugación la pastilla se secó sobre papel absorbente durante 10 minutos a TA. Al concluir el secado la pastilla fue resuspendida en 25-100 μl de agua DEPC, incubaba previamente durante una hora a 65°C . El RNA obtenido fue cuantificado mediante NanoDrop Lite (Thermo Scientific) y se determinó el rendimiento y su pureza. Del eluido total 10 μg de RNA fueron sometidos a un tratamiento con DNasa I (Promega) y se verificó la integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, durante 10 minutos, teñido con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

9.9.1 RT-PCR

Para los ensayos de expresión génica se empleó el ensayo de RT-PCR tiempo final con el kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se desnaturizó durante 5 minutos a 65° C 500 ng/μl de RNA libre de DNA, 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 μM de Oligonucleótidos específicos (Tabla 3), en cbp 12 μl. Durante el tiempo de desnaturalización se prepararon las reacciones necesarias para la síntesis de cDNA, en un tubo de polipropileno de 1.5 mL (Axygen) estéril se mezcló buffer de síntesis de cDNA 5X, DTT 0.1M, RNaseOUT™ 40 U/μl, agua DEPC y ThermoScript™ RT (15 U/μl). El mix fue homogenizado y se mezclaron 8 μl en cada reacción, las muestras se trataron bajo el siguiente programa 60 minutos a 55° C, 5 minutos a 85° C terminado este periodo se agregó a cada reacción 1μl de RNase H e incubó a 37° C durante 20 minutos, el 10% del cDNA obtenido de este paso se utilizó para la amplificación mediante PCR. Para ello se empleó la DNA Taq Polimerasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante para ello, además del cDNA se utilizaron 10 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 μM de oligonucleótidos específicos, 4.0 mM de MgCl₂, 0.5x buffer GoTaq, 1U de Taq Polimerasa (Promega), en cbp 50 μl . La amplificación se realizó en el GeneAmp(R) PCR system 9700 thermal cycler (Applied Biosystems), bajo el programa de 95° C de desnaturalización inicial seguido por 28 ciclos de 95° C de desnaturalización; la temperatura de alineamiento fue de 55° C, 72° C de extensión y 72° C de extensión final (Fig. 22). Para corroborar que la expresión del gen EHi_148140 se observaron los productos de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en buffer TBE o TAE 0.5X, teñido con 100 μg/mL de BrEt y revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

TABLA 3
OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA RT-PCR

CLAVE	Polaridad	Secuencia (5'➤3')	Talla del amplicón.
EHI_148140 FW	+	GCGCGTTCTCAAATACAACC	69 pb.
EHI_148140 RV	-	GTTCAGAGGCTGCAGGAAGT	69 pb.
RIB40S FW	+	ATTCGGAAATAGAAGAGGAGG	69 pb
RIB40S RV	-	ACTAATTCTTCCAAGCTTGGT	69 pb

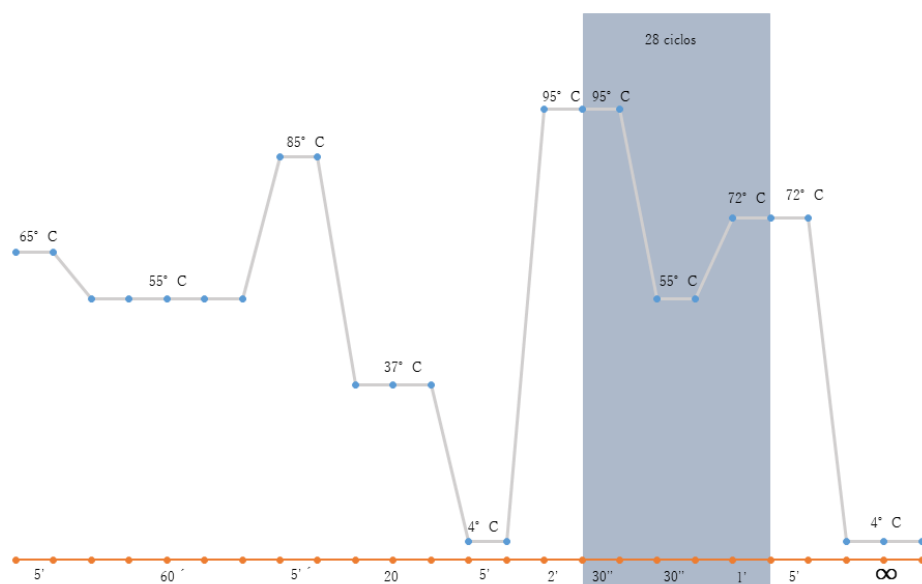


Figura 22. Programa de amplificación empleado para detectar la expresión del gen EHI_148140. En la primer parte se muestran las condiciones empleadas para obtener el cDNA a partir de RNA total mientras que en la cinta gris muestra las temperaturas empleadas para la PCR con la variante de la temperatura de alineamiento específica del gen.

9.10 Obtención de extractos proteicos totales

Para la obtención de los extractos totales se empleó al reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para ello, solo la fase orgánica (intermedia) fue recuperada en un tubo de polipropileno de 1.5 mL (Axygen) estéril el cuál contenía 300 µl de etanol absoluto de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol usado para la extracción. La mezcla fue homogenizada mediante inversiones e incubada durante 2-3 minutos a TA, terminado el periodo de incubación se centrifugó la mezcla a 2000 RCF durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante fue recuperado en un tubo de polipropileno de 15 mL (Axygen) estéril el cual contenía 1.5 mL de isoporpanol absoluto de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) por cada mL de TRIzol utilizado, la mezcla fue incubada durante 10 minutos a TA e inmediatamente se centrifugó a 12000 RCF durante 10 minutos a 4° C. La pastilla obtenida fue lavada con 2 mL de buffer de lavado [0.3 M hidrocloreuro de guanidina; 95% etanol grado biología molecular] por cada mL de TRIzol usado; el lavado se mantuvo de 3 días a una semana a 4° C para mejorar el rendimiento. Al concluir este periodo se centrifugó la mezcla a 7500 RCF durante 5 minutos a 4° C, la pastilla se sometió a 2 ciclos de lavados con buffer de lavado con incubaciones de 20 minutos a TA y sometida al mismo ciclo de centrifugado. Posterior, al tercer lavado, la pastilla fue resuspendida con 2 mL de etanol absoluto de grado biología molecular (Sigma-Aldrich) e incubada durante 20 minutos a TA, para finalizar se centrifugó la mezcla a 7500 RCF durante 5 minutos a 4° C, la pastilla se secó de 5 a 10 minutos.

Para la solubilización de las proteínas se empleó el buffer de Resuspensión [62.5 mM lauril sarcosinato de sodio; 1% SDS]; 95% etanol grado biología molecular] incubado previamente a 50° C, una vez resuspendida la pastilla por completo se centrifugó la mezcla a 10,000 RCF durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se recuperó en tubo de polipropileno de 1.5 mL (Axygen) estéril. Las proteínas obtenidas fueron alícuotadas y almacenadas a -20° C hasta su uso.

9.10.1 Cuantificación de los extractos proteicos totales y la proteína recombinante rEhTRF-like I

Para determinar el rendimiento de proteínas obtenido mediante TRIzol (Invitrogen) se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad), de acuerdo con las sugerencias del fabricante. Para ello, a partir de un stock de 10 mg/mL de BSA (marca) disuelta en agua desionizada y estéril se obtuvo la curva estándar con las siguientes concentraciones 2 mg/mL; 1.5 mg/mL; 1.0 mg/mL; 0.5 mg/mL y 0.25 mg/mL de BSA. Una vez obtenida la curva estándar se diluyó el Reactivo de Bradford (Bio-Rad) en una relación 1:4 y se filtró con ayuda de una pirinola con una membrana de papel Whatman #1 protegido de la luz. Subsecuentemente las muestras y la curva estándar fueron analizadas por triplicado. En placas de pozos montables (E.I.W.A) se pusieron 10 µl de muestra o curva estándar y se le adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad) recién preparado la mezcla se incubó durante 5 minutos a TA, en caso de que se formaran burbujas fueron eliminadas con ayuda de una aguja. Al concluir la incubación la placa se leyó en un lector de ELISA a 595 nm.

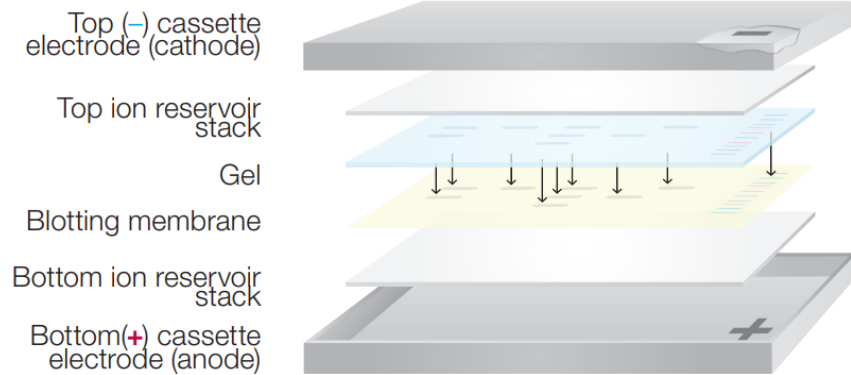
9.10.2 Electroforesis SDS-PAGE de los extractos proteicos totales y la proteína recombinante rEhTRF-like I

La integridad de las proteínas se observó mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Para ello 30 µg/mL de proteínas fueron resuspendidas en buffer de carga 10X [1M Tris-HCL; 50% glicerol; 10% SDS; 1% azul de bromofenol] con 10% β-mercaptoetanol, se hirvieron durante 5 minutos. La electroforesis se realizó con buffer de corrida 1X [0.125M Tris base; 0.96 M glicina; 0.5% SDS] suficiente bajo las condiciones siguientes 20 minutos a 70 Volts. Al concluir este periodo se aumentó el voltaje a 100 Volts durante 100 minutos. Al concluir la electroforesis se tiñó un gel durante 2 horas con Azul de Coomassie (Bio-Rad), posteriormente se destiñó con solución desteñidora hasta que quedaran marcadas las proteínas solamente, un gel “espejo” sin tinción fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) de 0.22 µm.

9.10.3 Transferencia e inmunodetección de la proteína EhTRF like III

La electrotransferencia de las proteínas se realizó en la cámara semiseca Turbo Blot (Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se montó el sistema de transferencia de la siguiente manera: Ánodo › papel filtro (Bio-Rad) › Membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) › Gel de poliacrilamida › papel filtro (Bio-Rad) › Cátodo (Fig. 23), además todos los materiales utilizados para el ensayo fueron incubados en buffer de transferencia frío durante 5 minutos y se aseguró que durante el montaje permanecieran ligeramente húmedos. Para llevar a cabo la transferencia de las proteínas se aplicó una corriente eléctrica de 20 Volts con amperaje constante por 20 minutos. Una vez concluido el protocolo de transferencia se desmontó el sistema y cuidadosamente se transfirió la membrana de nitrocelulosa a un recipiente con fondo plano e incubó durante 5 minutos con rojo de Ponceau. Al terminar la tinción se decantó el colorante y se lavó la membrana con agua desionizada estéril hasta lograr ver la tinción de las proteínas. Para la inmunodetección la transferencia se sometió a un proceso de bloqueo de 60 minutos a 37° C con buffer de bloqueo [PBS 1X; tween 20X; leche descremada], al concluir se lavó rápidamente con buffer de lavado [PBS 1X, Tween 20X] e incubó ON a 4° C en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media (100-200 rpm) con buffer de bloqueo nuevo. Al finalizar el bloqueo la membrana se lavó vigorosamente durante una hora con 6 cambios de buffer de lavado, los primeros dos cambios a los 15 minutos, los subsecuentes dos cambios cada 10 minutos y los cambios finales cada 5 minutos. Al concluir el proceso de lavado se incubó la membrana ON a 4° C en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media (100-200 rpm) con los anticuerpos primarios, diluidos en buffer de anticuerpo. Posteriormente, se lavó la membrana con el mismo programa de lavado descrito anteriormente con la buffer de lavado. Al finalizar se incubó la membrana durante 60 minutos a 37° en un rotador serológico (LW Scientific) a velocidad media (100-200 rpm) con un anticuerpo secundario α -conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson Inmune Research) disueltos en buffer de anticuerpo secundario. Al concluir la incubación se lavó nuevamente la membrana como se describió anteriormente y se adicionó 500 μ l de sustrato Luminata Forte HRP (Merck Millipore) y se incubó durante 5 minutos para inmediatamente revelar la luminiscencia en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad) con periodos de 1 hasta 100 segundos de captura.

Figura 23. Esquema del montaje para la transferencia Semi Seca.
 Se muestra la organización jerárquica del sistema montado para la electrotransferencia en la parte superior se observan el cátodo y en la inferior en ánodo, (Bio-Rad, 2000).



9.11 Tratamientos genotóxicos de los trofozoitos de *E. histolytica*

Como modelos de estrés oxidativo se usaron como agentes genotóxicos la radiación UV y H_2O_2 (agentes oxidantes). Ambas condiciones ya se han usado previamente en este parásito para inducir daño al DNA^{127,131} en distintas dosis. Para ello, los trofozoitos se cultivaron y cosecharon como se explicó con anterioridad omitiendo los lavados con PBS 1X pH 6.8. En lugar de ello se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en medio TYI-S33 complementado precalentado a 37° C. Los trofozoitos se cuantificaron con ayuda de una cámara de Neubauer. Una vez determinado el número de trofozoitos se colocaron 8×10^5 trofozoitos en placas de poliestireno de 6 pozos pretratadas para la adhesión de las células (Corning), las placas se llenaron con medio TYI-S33 complementado, o bien se adhirieron a cubreobjetos estériles con 200 μ l de medio TYI-S33 complementado. Posteriormente se incubaron por un periodo de 30 a 60 minutos en una atmosfera con 8% CO_2 , una vez adheridas las células y con una confluencia $\geq 90\%$ se retiró el medio sin dañar la monocapa. Para la radiación ionizante se empleó un horno de radiación (Stratalinker) empleando dosis de 150 μ J/cm² hasta 300 μ J/cm². Para el estímulo con estrés oxidante los trofozoitos se trataron con medio TYI-S33 en presencia de diferentes concentraciones de H_2O_2 : 1 mM, 2.5 mM y 5.0 mM. Para ello, la monocapa libre de medio TYI-S33 complementado, fue incubada durante 60 minutos con el medio TYI-S33 suplementado con las diferentes concentraciones de H_2O_2 . Al concluir el tratamiento se retiró el medio con H_2O_2 y se prepararon a los trofozoitos para análisis experimentales posteriores.

9.12 Ensayos de viabilidad en respuesta a tratamientos genotóxicos

Para los ensayos de viabilidad 8×10^5 trofozoitos se adhirieron y trataron en placas de 6 pozos tal y como se describió previamente. Al concluir las agresiones genotóxicas los trofozoitos se despegaron como se indicó con anterioridad en 1 mL de medio TYI-S33 basal, e incubaron con Trypan Blue Dye 0.4% solution (Bio-Rad) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para ello, se resuspendieron los trofozoitos en dilución 1:1 (Trofozoitos:Trypan Blue), seguido de una incubación de 5 minutos. Para evitar que el componente dañara a las células se comenzó la incubación con una diferencia de tiempo entre cada una de 10 minutos. Al finalizar la interacción se contaron en cámara de Neubauer. Los trofozoitos fueron cuantificados bajo los estándares establecidos para el ensayo, aquellos que tuvieran coloración azul se clasificaron como trofozoitos inviables y aquellos que tuvieran una coloración amarillenta se clasificaron como viables. Al concluir la clasificación se determinó la viabilidad celular siguiendo la fórmula estándar de conteo celular empleada para la cámara de Neubauer.

9.13 Inmunolocalización del Aducto 8-oxoG

El daño inducido por los agentes genotóxicos se determinó mediante la detección del aducto 8-OxoG empleando el reactivo Avidina-FITC (Sigma-Aldrich), el cual se une de manera específica al 8-OxoG¹³². Para ello, 8×10^5 trofozoitos tratados con los agentes genotóxicos fueron fijados en cubreobjetos como previamente se explicó. Al concluir con el estímulo genotóxico, la monocapa fue tratada con etanol absoluto (Sigma-Aldrich) de grado biología molecular (mantenido a -20°C) durante 30 minutos a -20°C , posteriormente los trofozoitos se lavaron dos veces con 1 mL de buffer de lavado a 37°C adicionada gota a gota por la pared, evitando el contacto directo con la monocapa. Inmediatamente después de los lavados se adicionó 1 mL de RNasa A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich) e incubó 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente los trofozoitos se lavaron para adicionar 1 mL de buffer de NH_4Cl [50 mM NH_4Cl ; 1X PBS] e incubó como se describió previamente. Al concluir, los trofozoitos se bloquearon con 1 mL de buffer de bloqueo con la temperatura y tiempo anterior. Al concluir el bloqueo la monocapa se trató con 50 μl de Avidina-FITC durante 60 minutos a 37°C en cámara húmeda. Al finalizar se adicionaron 50 μl de α -EhTRF-like III disuelto en el buffer de Anticuerpo-Primario y se incubó en oscuridad, en una cámara húmeda a 4°C , ON (Todas las soluciones empleadas se mantuvieron a 37°C).

Al día siguiente el anticuerpo primario se retiró y se lavaron los trofozoitos con 1 mL de buffer de bloqueo, y 2 veces más con 1 mL solución de lavado. Al finalizar se adicionó 50 μ l de α -IgG de conejo acoplado al fluoróforo Alexa 546 en buffer de Ab-secundario y se incubó durante 60 minutos a 37° C en completa oscuridad en una cámara húmeda, al finalizar los cubreobjetos se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer de bloqueo y 2 veces más con 1 mL buffer de lavado. Para concluir los cubreobjetos se secaron para transferirlos a portaobjetos estériles los cuales contenían 10 μ l de VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories). Para ello, la monocapa del cubreobjetos se puso lentamente en contacto con el reactivo evitando la formación de burbujas. Para terminar se sellaron las preparaciones con 3 capas delgadas de barniz transparente. La inmunodetección fue observada en un microscopio confocal leica (SP2) perteneciente al CINVESTAV-IPN, unidad zacatenco con ayuda de la Dra. Abigail Betanzos. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Las X (Leica), Image J (National Institutes of Health), y procesadas en Illustrator (Adobe Systems).

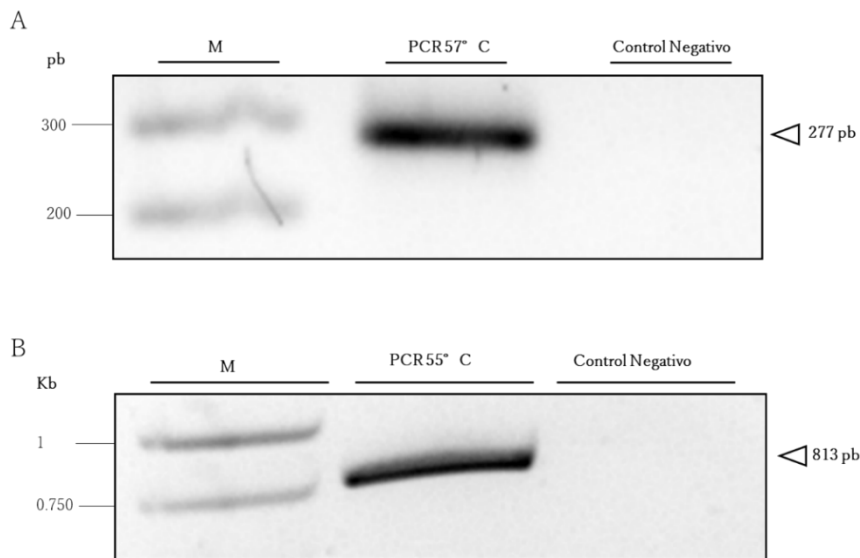
9.14 Análisis Estadístico

Para los análisis estadísticos se realizaron pruebas de normalidad por cada grupo estudiado, una vez determinada la distribución de los datos se empleó un análisis Gaussiano. El análisis de normalidad se llevó a cabo con dos pruebas diferentes con un Intervalo de Confianza del 99% ($\alpha=1\%$), el análisis subsecuente se consideró una prueba de una cola; al concluir el primer análisis se empleó en dependencia del experimento una prueba de t de Studen (t pareada) de una sola cola o una prueba de ANOVA. Todos los análisis estadísticos experimentales fueron hechos en el GraphPad Prism versión 8.2.1.

10 Resultados

10.1 Selección, clonación y corroboración del arreglo $[G^{GCC}]$ de *E. histolytica*

Rendón-Gandarilla y col¹²⁷. demostraron que la proteína recombinante EhTRF-like I se une a una sonda derivada del arreglo NK1 [correspondiente a los genes de tRNA N^{GTT} y K^{CTT}]¹²⁶. Por lo que en este trabajo, nos propusimos determinar si las proteínas EhTRF-like se unían al arreglo $[G^{GCC}]$, el cual tiene una longitud de 30,000 pb. Este arreglo, es uno de los más largos en el genoma de *E. histolytica* y además presenta 39 unidades de repetición, las cuales tienen una longitud de 813 pb (Fig. 16). La secuencia del arreglo $[G^{GCC}]$ se obtuvo de la base de datos GenBank, utilizando el número de acceso BK005662.1. A partir de esta secuencia, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar dos fragmentos. El primer fragmento amplificado tuvo una talla de 277 pb y corresponde a la región 5' río arriba del sitio de inicio de la transcripción del tRNA (Fig. 16, Fig. 24A). Mientras que el segundo fragmento amplificado, fue el correspondiente al arreglo completo de 813 pb y contiene el gen que codifica para el tRNA de Gly (Fig. 16, Fig. 24B).



Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector TOPO-TA y las construcciones generadas se analizaron por digestión enzimática. Los plásmidos pTOPO_ $[G^{GCC}]$ 277 y pTOPO_ $[G^{GCC}]$ 813 se sometieron a ensayos de doble digestión con las enzimas *Xba I* y *Xho I*, liberando un fragmento de 277 pb, correspondiente a la región 5' río arriba del sitio de inicio de la transcripción del tRNA, o un fragmento de 813 pb, correspondiente al arreglo completo, respectivamente (Fig. 25)

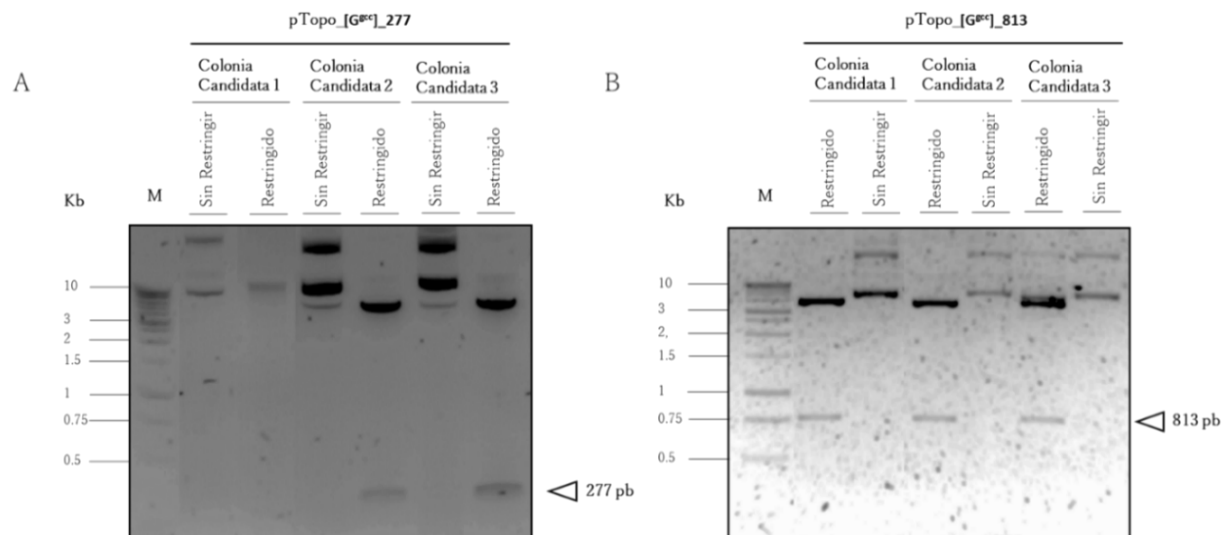


Figura 25. Digestión enzimática de los plásmidos pTOPO_[G^{Gcc}]₂₇₇ y pTOPO_[G^{Gcc}]₈₁₃. Los vectores se purificaron y restringieron con las enzimas *Xba* I/*Xho* I. Los productos se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%, teñido con BrEt. **A)** Análisis de las clonas bacterianas transformadas con el plásmido pTOPO_[G^{Gcc}]₂₇₇. **B)** Análisis de las clonas bacterianas transformadas con el plásmido pTOPO_[G^{Gcc}]₈₁₃. Control: plásmidos sin restringir. **M:** marcador de talla molecular de 1 kb.

Los fragmentos obtenidos se secuenciaron y alinearon con la secuencia reportada en GenBank (BK005662, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), empleando el programa CLUSTALW. Los nucleótidos conservados se marcaron empleando el software BoxShade. La secuencia del fragmento de 277 pb perteneciente al plásmido pTOPO_[G^{Gcc}]₂₇₇, coincidió al 100% con la reportada (Fig. 26). Sin embargo, el fragmento de 813 pb de la construcción pTOPO_[G^{Gcc}]₈₁₃, presentó 4 variaciones dentro de la región del gen que codifica para el tRNA (Fig. 27). A pesar de esto, consideramos el uso de este fragmento para nuestros subsecuentes ensayos, ya que la secuencia del repetido tipo STR no presentó cambios. En resumen, nuestros resultados indican que las construcciones pTOPO_[G^{Gcc}]₂₇₇ y pTOPO_[G^{Gcc}]₈₁₃ contienen los fragmentos esperados, por lo que pueden ser empleados como molde para obtener suficiente DNA y llevar a cabo los ensayos de unión a DNA.

Figura 26. Alineamiento de la secuencia del fragmento de 277 pb del arreglo de tRNA [G^{ccc}] clonado en pTOPO2 con la reportada en el GenBank.

[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	1	CTACTATTTTACCTATTTTACTTTTATACTACTATTTTACCTTTATATTCTATTTTATT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	1	CTACTATTTTACCTATTTTACTTTTATACTACTATTTTACCTTTATATTCTATTTTATT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	61	CCTATACTACTATTTTACCTTTATATTCTATTTTATTTCCTATACTACTATTTTATTCCCT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	61	CCTATACTACTATTTTACCTTTATATTCTATTTTATTTCCTATACTACTATTTTATTCCCT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	121	ATATTCTATTTTATTCTTATACTACTATTTTATTTCCTATACTACTATTCGACTATTCTC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	121	ATATTCTATTTTATTCTTATACTACTATTTTATTTCCTATACTACTATTCGACTATTCTC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	181	TCCTGTTTATCTATACACTACTTTCCCTACTATAGTACTTTCCCTATTCTACTACTTTACTA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	181	TCCTGTTTATCTATACACTACTTTCCCTACTATAGTACTTTCCCTATTCTACTACTTTACTA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	241	CTTTACTACTTTACTATTTCGTTTATTTCCCTGTCTATCTATACTACTATAA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _277.	241	CTTTACTACTTTACTATTTCGTTTATTTCCCTGTCTATCTATACTACTATAA

La secuencia del fragmento contenido en el vector pTOPO_[GGCC]_277, se alineó con la secuencia BK0056621-1 reportada en la base de datos GenBank, mediante CLUSTALW. Los nucleótidos conservados se evidenciaron mediante el software Box Shade. Los nucleótidos sombreados evidencian la identidad entre las dos secuencias.

[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	1	GCACCTTGTGGTCCAATGGTATGACGTATCCCTGCCACGGATGACACCCGGGTTCGATTCC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	1	GCACCTTGTGGTCCAATGGTATGACGTATCCCTGCCACGGATGACACCCGGGTTCGATTCC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	61	CGGCAAGTGCACTTTTATGCTCTTATCCCTTATGTATTATGTCCTTTTACTACTAAAAATA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	61	CGGCAAGTGCACTTTTATGCTCTTATCCCTTATGTATTATGTCCTTTTACTACTAAAAATA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	121	TATCATCTATACTATATATATATATTATATATACCTTATGTATATATTATATCTTATGC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	121	TATCATCTATACTATATATATATATTATATATACCTTATGTATATATTATATCTTATGC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	181	CTTATTCACCTTCTACTTTTATCTTATTATACTTATACTCTTCTTATTCTCTTTATGTAT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	181	CTTATTCACCTTCTACTTTTATCTTATTATACTTATACTCTTCTTATTCTCTTTATGTAT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	241	ACTTCCTCTCTTATCCCTTATATATCTTATATCTTACTTTTACTTCTTACTTTATATAT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	241	ACTTCCTCTCTTATCCCTTATATATCTTATATCTTACTTTTACTTCTTACTTTATATAT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	301	CATATCATCTTACTTTATATATCATATCTTACTTTAGATTATATATCTTACTTTAGATTA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	301	CATATCATCTTACTTTATATATCATATCTTACTTTAGATTATATATCTTACTTTAGATTA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	361	TATATCTTACTTTAGATTATATATCTTATATCTTATCTCTTATCTCTTATATG
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	361	TATATCTTACTTTAGATTATATATCTTATATCTTATCTCTTATCTCTTATATG
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	421	TTTATAACTTTATATGTTTATGTGTTAGACTCCTTATTATTACTTCTCACTTATTATTC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	421	TTTATAACTTTATATGTTTATGTGTTAGACTCCTTATTATTACTTCTCACTTATTATTC
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	481	CCTTTTATATCTTACTATGTATATCTTCTATATACTACTATTTTACCTATATACTACTAT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	481	CCTTTTATATCTTACTATGTATATCTTCTATATACTACTATTTTACCTATATACTACTAT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	541	TTTACTTTTATACTACTATTTTACCTTTATATTCCCTATTTTATTCCCTATACTACTATTTT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	541	TTTACTTTTATACTACTATTTTACCTTTATATTCCCTATTTTATTCCCTATACTACTATTTT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	601	ACCTTTATATTCCCTATTTTATTCCCTATACTACTATTTTATTCCCTATATTCCCTATTTTATT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	601	ACCTTTATATTCCCTATTTTATTCCCTATACTACTATTTTATTCCCTATATTCCCTATTTTATT
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	661	CTTATACTACTATTTTATTCCCTATACTACTATTCGACTATTCTCTCTGTTATCTATAG
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	661	CTTATACTACTATTTTATTCCCTATACTACTATTCGACTATTCTCTCTGTTATCTATAG
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	721	ACTACTTTCCCTACTATAGTACTTTCCCTATTCTACTACTTTACTACTTTACTACTTTACTA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	721	ACTACTTTCCCTACTATAGTACTTTCCCTATTCTACTACTTTACTACTTTACTACTTTACTA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	781	TTTCGTTTATTTCCCTGTCTATCTATACTACTATAA
[G ^{ccc}] BK005662.1 pTopo_[G ^{ccc}] _813.	781	TTTCGTTTATTTCCCTGTCTATCTATACTACTATAA

Figura 27. Alineamiento de la secuencia del fragmento de 813 pb del arreglo de tRNA [G^{ccc}] clonado en pTOPO2.1 con la reportada en el GenBank. La secuencia del fragmento contenido en el vector pTOPO_[GGCC]_813, se alineó con la secuencia BK0056621-1 reportada en la base de datos GenBank, mediante CLUSTALW. Los nucleótidos conservados se evidenciaron mediante el software Box Shade. Los nucleótidos sombreados evidencian la identidad entre las dos secuencias.

10.2 Unión de las proteínas EhTRF-like con fragmentos repetidos de *E. histolytica*

Para determinar la unión de las proteínas EhTRF-like a los fragmentos de 277 pb y 813 pb correspondientes al arreglo [G^{GCC}], se llevó a cabo un ensayo de unión a DNA tipo DPI-ELISA indirecto. En este tipo de ensayos, además de contar con cantidades suficientes de los fragmentos de 277 pb y 813 pb, se requiere de proteínas EhTRF-like, por lo se empleó a la proteína recombinante EhTRF-like I y extractos de *E. histolytica*, en los cuales se ha descrito la presencia de proteínas EhTRF-like¹²⁶. La integridad de la proteína rEhTRF-like I y de los extractos totales obtenidos se determinó por medio de electroforesis desnaturizante de SDS-PAGE al 15%. En el caso de la proteína recombinante, se observó una banda de 50 kDa, la cual corresponde al peso predicho de rEhTRF-like I previamente reportado¹²⁶ (Fig. 28A). Mientras que el corrimiento electroforético de los extractos totales, evidenció múltiples bandas bien definidas y abundantes, las cuales corresponden a proteínas con pesos moleculares en un rango de 20 a 250 kDa (Fig. 28B), lo cual es indicativo de que poseen una integridad adecuada.

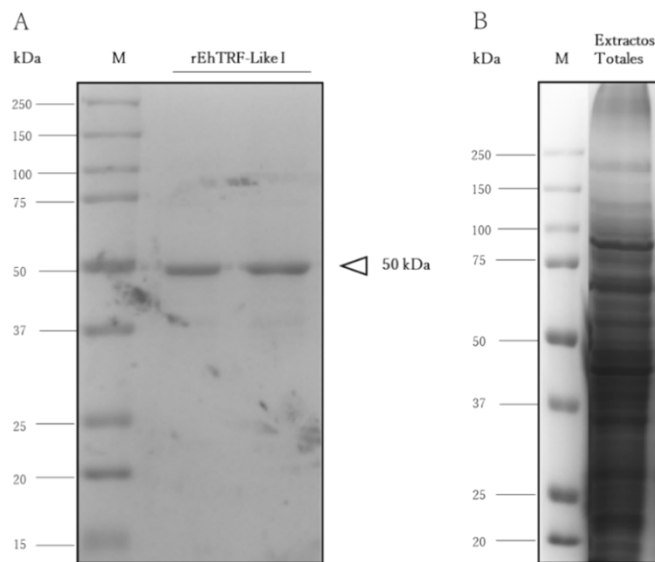


Figura 28. Integridad de las proteínas empleadas en el ensayo DPI-ELISA indirecto. Las proteínas se resolvieron por electroforesis desnaturizante en SDS-PAGE al 15% y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. **A)** Proteína rEhTRF-like I dializada, la cual posee un peso molecular de 50 kDa. **B)** Extractos proteicos totales obtenidos de trofozoítos. **M:** Marcador Dual-Color de peso molecular.

Con las proteínas y el DNA, se llevaron a cabo los ensayos DPI-ELISA indirecto, los cuales mostraron que las proteínas EhTRF-like reconocen distintas secuencias o fragmentos de DNA. Es decir, rEhTRF-like I se unió 1.6 veces más al fragmento de 813 pb el cual corresponde a la secuencia completa del arreglo de tRNA en comparación a la unión que se observó con el fragmento HuTR (1.24 veces), y mostró una unión de 0.9 veces más por el fragmento [G^{GCC}] de 277 pb y por el STR derivado del arreglo [R^{TCT}] (EhTR-2) en comparación al fragmento HuTR. La unión más baja que se observó, en comparación al fragmento HutR se produjo con el arreglo [NK] (EhTR) con 0.5 veces más (Fig. 29).

En caso de la proteína EhTRF-like III presente en los extractos totales, los resultados mostraron que la unión por el fragmento [G^{GCC}] de 277 pb fue de 1.57 veces mayor al fragmento HuTR (1.08 unidades), la unión al fragmento [G^{GCC}] de 813 pb fue de 1.08 unidades más que la que se observó con el fragmento HuTR, mientras que la unión por las sondas derivadas de los arreglos [NK] y [R^{TCT}] fue de 0.07 y 0.17 veces mayor que la unión por la sonda HuTR respectivamente (Fig. 29).

En ambos casos, la unión de las proteínas EhTRF-like a la secuencia no relacionada (Eh-NonRel) fue casi nula, indicando su especificidad de reconocimiento. La secuencia HuTR, usada como control positivo del ensayo, presentó un menor reconocimiento que las secuencias derivadas de los arreglos de *E. histolytica*. De manera adicional, para el ensayo de ELISA se incluyó como control positivo, solo a la proteína recombinante rEhTRF-like I, la cual es reconocida por el anticuerpo α -His, debido al tag al que está fusionada (Fig. 29). En resumen, estos resultados demuestran que las proteínas EhTRF-like pueden unirse a las secuencias de DNA presentes en el arreglo tRNA de [G^{GCC}]. Además, se puede concluir que *in vitro*, existe un reconocimiento diferencial de las proteínas EhTRF-like por los fragmentos de 277 pb y 813 pb y por diferentes secuencias derivadas de otros STR de los arreglos de tRNA, encontrados en el genoma de este parásito.

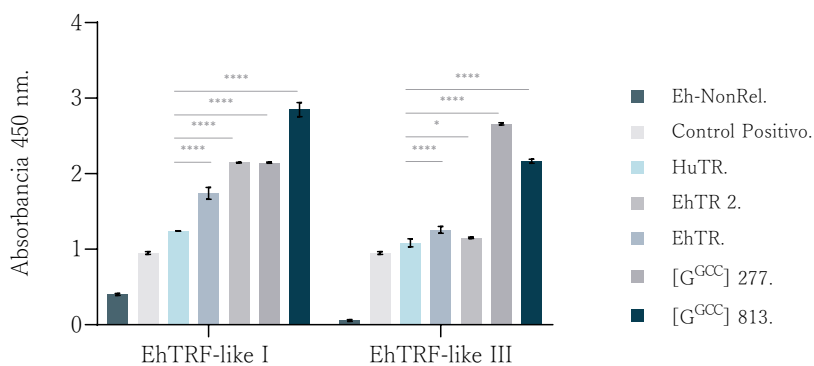


Figura 29. Ensayos de DPI-ELISA indirecto con las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica*. El DNA se fijó a una placa de 96 pozos y posteriormente se agregó la proteína rEhTRF-like I o extractos totales del parásito. Se adicionó el anticuerpo α -His (gráfica del lado izquierdo) o α -EhTRF-like III (gráfica del lado derecho). Eh-NonRel: oligonucleótido de 27 pb

de la región codificante gen EHI_165450 de *E. histolytica*. Control positivo: Proteína rEhTRF-like I. HuTR: oligonucleótido de 34 pb que contiene la secuencia canónica telomérica de humano. EhTR-2: oligonucleótido de 32 pb con la secuencia derivada del arreglo [RTCT] de *E. histolytica*. EhTR: oligonucleótido de 42 pb con la secuencia derivada del arreglo [NK] de *E. histolytica*. [G^{GCC}] 813: arreglo completo que contiene el gen que codifica para el tRNA de Gly y las secuencias STR. [G^{GCC}] 277: fragmento que contiene las secuencias STR que se encuentran 5' río arriba del gen que codifica para el tRNA de Gly. (n=6, *p<0.1, ****p<0.0001).

10.3 Transfección de trofozoítos de *E. histolytica* para sobreexpresar o silenciar a la proteína EhTRF-like III

Con la finalidad de sobreexpresar o silenciar a la proteína EhTRF-like III en *E. histolytica*, en primer lugar hay que producir los plásmido que contengan el DNA correspondiente. En el laboratorio se contaba con los vectores: pKT-3M, que se emplea para la sobreexpresión de genes en este parásito¹³³, y pKT3M_14840_Ox, que contiene el gen completo EHI_148140 y permite la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III. También se tenían los plásmidos: pBackbone, el cual se utiliza para inhibir la expresión de genes mediante la formación de estructuras tipo *harpin* que impiden la entrada de los mRNAs al ribosoma¹³⁴, y pBackbone_148140_Si: que permite el silenciamiento de *EhTRF-like III*.

Con la finalidad de corroborar que estos vectores contenían el DNA deseado, se llevaron a cabo ensayos de digestión enzimática, los cuales mostraron que los plásmidos linearizados tenían una talla de ~5850 pb y liberaban un fragmento de ~1382 pb o ~1500 pb, correspondiente a la longitud del gen EHI_148140 y a un gen reportero de luciferasa respectivamente (Tabla 4, Fig. 30).

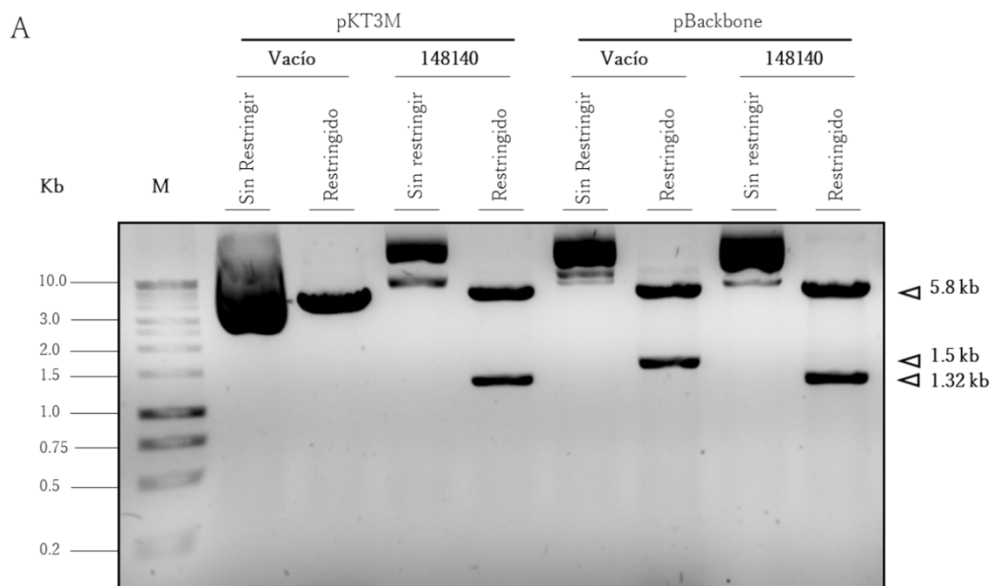
Tabla 4

Digestión de plásmidos empleados para la transfección de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .			
Construcción	Talla del plásmido linearizado	Talla del inserto.	Inserto
pKT3M	~5850	-----	-----
pKT3M_148140_Ox	~5850	~1382	EHI_148140
pBackbone	~5850	~1500	gen reportero <i>luciferasa</i>
pBackbone_148140_Si	~5850	~1382	EHI_148140

Una vez corroborado que las construcciones contenían el fragmento de la talla esperada, las secuencias se analizaron para determinar si correspondían a las anotadas en el GeneBank, mediante alineamientos llevados a cabo en el software CLUSTALW. Los resultados de la secuenciación de las construcciones pKT3M_148140_Ox y pBackbone_148140_Si, mostraron que la secuencia clonada no contenía cambios a nivel nucleotídico (Fig. 31). Con estos resultados concluimos que los plásmidos con los que contábamos contienen el gen EHI_148140 clonado y sirven para sobreexpresar o silenciar la proteína EhTRF-like III cuando se introducen en trofozoítos mediante transfección. Cabe mencionar que estos plásmidos contienen un sitio de resistencia a neomicina, por lo que al ser incorporados en los trofozoítos, les conferirán resistencia a este antibiótico, permitiendo la selección de parásitos que hayan integrado estos vectores.

Cada plásmido (20 ng de cada uno; pKT3M, pKT3M_14840_Ox, pBackbone y pBackbone_148140_Si) se transfectó en trofozoítos (8×10^5), los cuales se sometieron a selección con el análogo de neomicina G418 hasta obtener clonas resistentes en 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 30. Electroforesis de los productos de la digestión de los plásmidos pKT-3M, pKT3M_14840_Ox, pBackbone y pBackbone_148140_Si. Los plásmidos obtenidos de colonias bacterianas transformadas se purificaron, restringieron con las enzimas *Sma*I/*Xho*I y se resolvieron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con BrEt. Como control, cada vector se corrió sin restringir. **M:** marcador de talla molecular de 1 kb. **Flechas:** talla esperada para los plásmidos linearizados e insertos.



10.4 Expresión a nivel de RNA y proteína de EhTRF-Like III en trofozoítos transfectados

Los trofozoítos transfectados y seleccionados con G418, se analizaron mediante RT-PCR y western blot para conocer la expresión de EhTRF-like III a nivel de mRNA y proteína. Para el análisis de RT-PCR se extrajo el RNA total de los trofozoítos de las clonas transfectantes y se resolvió en un gel de agarosa para analizar su integridad. El gel nos permitió observar 3 bandas bien definidas que corresponden al mRNA y a las subunidades 18s y 28s del rRNA, indicado que el RNA obtenido tiene la integridad requerida para los ensayos de RT-PCR (Fig. 32A). Posteriormente, se realizaron los ensayos de RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para el gen EHI_148140, los cuales amplifican una región interna de 69 pb. Como control de carga se emplearon oligonucleótidos específicos para el gen *Rib40s*, los cuales amplifican una región interna de 140 pb. En estos ensayos se incluyó además un control negativo de la RT-PCR donde no se usó la enzima RT, el cual permitió corroborar que no existe contaminación de gDNA. Los fragmentos amplificados en la PCR se resolvieron en un gel de agarosa y correspondieron a la talla esperada para los genes EHI_148140 y *Rib40s*. Además, se observó que la población de trofozoítos transfectados con el plásmido

pKT3M_148140_Ox presentó un incremento en la cantidad de amplificado, comparada con los trofozoítos transfectados con el vector vacío pKT3M (Fig. 32B). En tanto que los parásitos transfectados con la construcción pBackbone_148140_Si, disminuyeron la cantidad de amplificado, en comparación con los trofozoítos que contienen al vector vacío pBackbone. Las bandas de los amplificados se cuantificaron por densitometría, normalizando los valores respecto a la expresión del gen Rib40s. Los resultados corroboraron los hallazgos observados en el gel de agarosa, demostrando que las diferencias fueron estadísticamente significativas (Fig. 32C).

```

EHI_148140      1  ATGAGAGAAAAAAGTAAAAAAGAACAATTAATAATATGAACACTCAAAACAATACTATG
pBackbone_148140_Si 1  ATGAGAGAAAAAAGTAAAAAAGAACAATTAATAATATGAACACTCAAAACAATACTATG
pKT3M_148140_Ox  1  ATGAGAGAAAAAAGTAAAAAAGAACAATTAATAATATGAACACTCAAAACAATACTATG

EHI_148140      61 AACGATGACAAATGTCCTTCAGCACGTCGTATTATTGACCAATTAACACAAAATCAAATT
pBackbone_148140_Si 61 AACGATGACAAATGTCCTTCAGCACGTCGTATTATTGACCAATTAACACAAAATCAAATT
pKT3M_148140_Ox  61 AACGATGACAAATGTCCTTCAGCACGTCGTATTATTGACCAATTAACACAAAATCAAATT

EHI_148140      121 GACGAAATTAATTTGTATGATAATCATAAAAAAACATTATTATCAATTTGCGAATATCTT
pBackbone_148140_Si 121 GACGAAATTAATTTGTATGATAATCATAAAAAAACATTATTATCAATTTGCGAATATCTT
pKT3M_148140_Ox  121 GACGAAATTAATTTGTATGATAATCATAAAAAAACATTATTATCAATTTGCGAATATCTT

EHI_148140      181 ATTGATTGAGAAATTAATTTCTGATCTTTTGAACAATGTTTAAACACAACAAGTATTCATG
pBackbone_148140_Si 181 ATTGATTGAGAAATTAATTTCTGATCTTTTGAACAATGTTTAAACACAACAAGTATTCATG
pKT3M_148140_Ox  181 ATTGATTGAGAAATTAATTTCTGATCTTTTGAACAATGTTTAAACACAACAAGTATTCATG

EHI_148140      241 GAATCAGACATTCACAGTCTCTTCATAATAAAAGATCATTGGCATTGTGTTATTCAATTT
pBackbone_148140_Si 241 GAATCAGACATTCACAGTCTCTTCATAATAAAAGATCATTGGCATTGTGTTATTCAATTT
pKT3M_148140_Ox  241 GAATCAGACATTCACAGTCTCTTCATAATAAAAGATCATTGGCATTGTGTTATTCAATTT

EHI_148140      301 CTTGAATGTGTAGAACCACCATGTTGTGAAGTAGAGAATTTACCAAAAAGTTATAGCTAAT
pBackbone_148140_Si 301 CTTGAATGTGTAGAACCACCATGTTGTGAAGTAGAGAATTTACCAAAAAGTTATAGCTAAT
pKT3M_148140_Ox  301 CTTGAATGTGTAGAACCACCATGTTGTGAAGTAGAGAATTTACCAAAAAGTTATAGCTAAT

EHI_148140      361 GTAATTCAAATTTATTGTTCTGATAGTAATGCAGAAATATTAATAACTGTTCTTCATTG
pBackbone_148140_Si 361 GTAATTCAAATTTATTGTTCTGATAGTAATGCAGAAATATTAATAACTGTTCTTCATTG
pKT3M_148140_Ox  361 GTAATTCAAATTTATTGTTCTGATAGTAATGCAGAAATATTAATAACTGTTCTTCATTG

EHI_148140      421 ATAGGAATAGTTGGAATGATTTCTGTATTTTCATATGTTTGCAGCGTTCTCAAATACAACCA
pBackbone_148140_Si 421 ATAGGAATAGTTGGAATGATTTCTGTATTTTCATATGTTTGCAGCGTTCTCAAATACAACCA
pKT3M_148140_Ox  421 ATAGGAATAGTTGGAATGATTTCTGTATTTTCATATGTTTGCAGCGTTCTCAAATACAACCA

EHI_148140      481 AGTGAACFAAATCGAGAATTAATAATTTTACTTCCTGCAGCCTCTGAACAGCCATATGTA
pBackbone_148140_Si 481 AGTGAACFAAATCGAGAATTAATAATTTTACTTCCTGCAGCCTCTGAACAGCCATATGTA
pKT3M_148140_Ox  481 AGTGAACFAAATCGAGAATTAATAATTTTACTTCCTGCAGCCTCTGAACAGCCATATGTA

EHI_148140      541 GCCTCGTCTAGAAAAATTTGTTTAGCTGCTACAGAAGCATTATTAAGAAGCACCACCAAAA
pBackbone_148140_Si 541 GCCTCGTCTAGAAAAATTTGTTTAGCTGCTACAGAAGCATTATTAAGAAGCACCACCAAAA
pKT3M_148140_Ox  541 GCCTCGTCTAGAAAAATTTGTTTAGCTGCTACAGAAGCATTATTAAGAAGCACCACCAAAA

EHI_148140      601 GATGAAACAACCTGATAGCTTTAAGTATTTTCAACTATACCTGACGTACAATATATTCTT
pBackbone_148140_Si 601 GATGAAACAACCTGATAGCTTTAAGTATTTTCAACTATACCTGACGTACAATATATTCTT
pKT3M_148140_Ox  601 GATGAAACAACCTGATAGCTTTAAGTATTTTCAACTATACCTGACGTACAATATATTCTT

EHI_148140      661 TCTCGGTACCCATTAGATAGGACAATAGATCATATTAACAATTATTATATCAATACAAA
pBackbone_148140_Si 661 TCTCGGTACCCATTAGATAGGACAATAGATCATATTAACAATTATTATATCAATACAAA
pKT3M_148140_Ox  661 TCTCGGTACCCATTAGATAGGACAATAGATCATATTAACAATTATTATATCAATACAAA

```

Figura 31. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen EHI_148140 clonado en los vectores de transfección pKT3M y pBackbone, con la secuencia obtenida de la base de datos GeneBank. Los alineamientos de ambas secuencias se realizaron mediante CLUSTALW y los nucleótidos conservados se evidenciaron mediante el software Box Shade

Una vez determinados los cambios a nivel transcripcional del gen EHI_148140 en los trofozoítos transfectantes, corroboramos el aumento o disminución de la proteína EhTRF-like III por medio de inmunodetección. Con la finalidad de corroborar la integridad de las proteínas y la homogeneidad en la carga, los extractos totales extraídos de trofozoítos transfectados se resolvieron un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% de y se tiñeron con azul de Coomassie. El gel mostró una serie de bandas bien definidas, con un peso molecular que va desde los 10 a los 250 kDa, en todos los extractos proteicos analizados (Fig. 33A). De manera paralela, se corrió otro gel, el cual fue transferido a una matriz de nitrocelulosa para llevar a cabo la inmunodetección con el anticuerpo α -EhTRF-like III. Los resultados del western blot revelaron dos bandas de 50 y 75 kDa, donde la banda de 50 kDa corresponde al tamaño teórico reportado para la proteína EhTRF-like III y la banda de 75 kDa podría deberse a modificaciones postraduccionales previamente reportadas para esta proteína¹²⁶. Además, claramente se observa que en los trofozoítos transfectados con la construcción pKT3M_148140_Ox, hay un incremento de estas bandas, en comparación con los trofozoítos transfectados con el plásmido vacío pKT3M (Fig. 33B), coincidiendo con los cambios encontrados a nivel transcripcional. Mientras que las proteínas provenientes de los trofozoítos transfectados con la construcción pBackbone_148140_Si mostraron una disminución de las bandas, con respecto a las observadas en los trofozoítos transfectados con el vector vacío pBackbone. Como control de carga para la inmunodetección, se empleó a la proteína EhPCNA con un peso de ~29 kDa, cuya banda presentó una intensidad homogénea en todas las condiciones empleadas, indicando que los cambios en EhTRF-like III se deben al efecto de la transfección con las distintas construcciones plasmídicas (Fig. 33C). Con la finalidad de hacer cuantitativas las diferencias observadas, se llevaron a cabo análisis densitométricos de las bandas inmunodetectadas y determinamos estadísticamente que EhTRF-like III se sobreexpresa alrededor de ~4.6 veces en los trofozoítos con pKT3M_148140_Ox, en tanto que esta proteína disminuye ~20 veces en los parásitos con pBackbone_148140_Si (Fig. 33D). Como control adicional se analizaron trofozoítos sin transfectar (HM1:IMSS), los cuales exhibieron una cantidad de EhTRF-like III similar a la de los controles con los plásmidos vacíos. En resumen, podemos afirmar que fuimos capaces de generar clonas de trofozoítos transfectados que sobreexpresan y tienen disminuida la cantidad de EhTRF-III, a nivel de mensajero y de proteína

Figura 32. Análisis del transcrito EhTRF-like III en los trofozoítos transfectados.

A) Análisis de la integridad del RNA obtenido de las clonas transfectantes, resuelto en un gel de agarosa al 2.5% teñido con BrEt. Números a la derecha: talla de las subunidades 18s y 28s del rRNA. **B)** RT-PCR de los genes EHI_148140 (panel superior) y *Rib40s* (control de carga, panel medio), donde los productos amplificados se resolvieron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con BrEt. Control negativo de la RT el cual no tenía RNA ni cDNA (panel inferior). **M:** marcador de talla molecular de 1 kb. Números a la derecha: talla de los genes EhTRF-like III y *Rib40s*. **C)** Expresión relativa del gen EHI_148140. Los pixeles de cada banda correspondiente al fragmento de 69 pb, en la figura (B), se cuantificaron y normalizaron con respecto al amplificado del gen *Rib40s*. (n=3, ***p<0.001, ****p<0,0001).

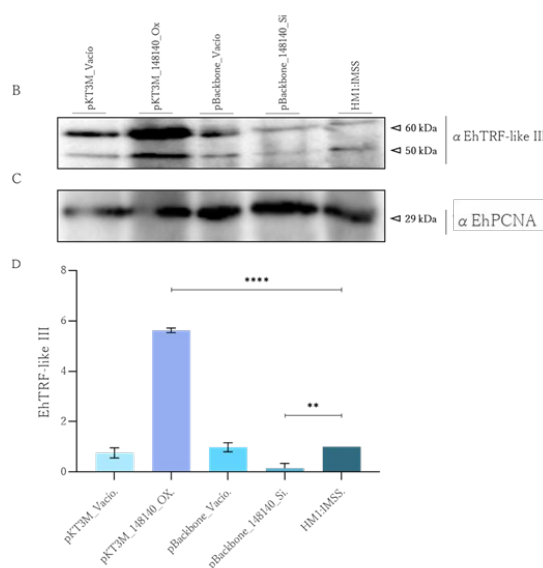
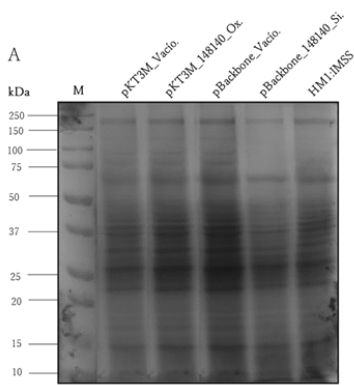
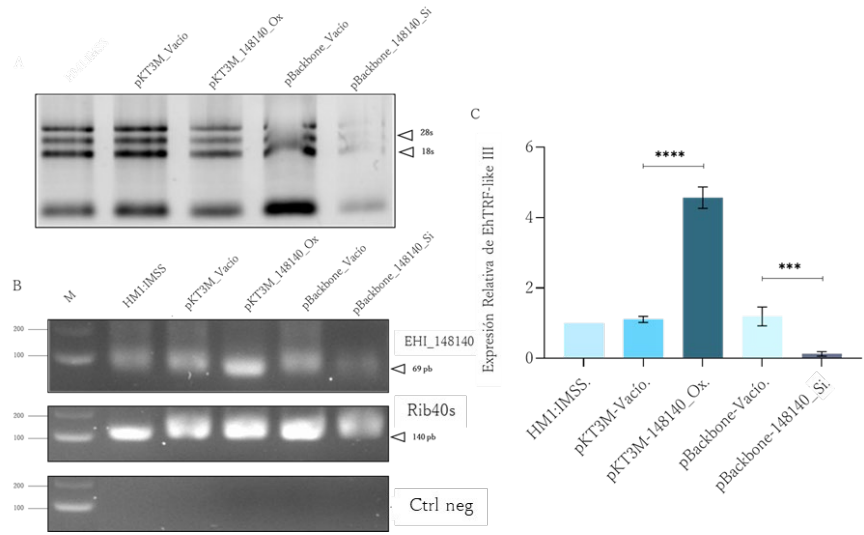


Figura 33. Inmunodetección de la proteína EhTRF-like III en extractos totales de trofozoítos transfectados.

A) Análisis de la integridad de extractos proteicos de trofozoítos transfectados y sin transfectar (HMI:IMSS), analizados por SDS-PAGE al 15% y teñidos con azul de Coomassie. **M:** marcador de peso molecular. **B)**

Inmunodetección de la proteína EhTRF-like III, empleando un anticuerpo específico. **C)** Inmunodetección de la proteína EhPCNA, empleada como control de carga. **D)** Expresión relativa de la proteína EhTRF-like III, con respecto al control de carga. Los pixeles de las bandas de la figura (B) se cuantificaron y normalizaron con respecto a la figura (C). (n=3, **p<0.01, ****p<0,0001).

10.5 Viabilidad celular de trofozoítos transfectados durante dos tratamientos genotóxicos

10.5.1 Tratamiento con radiación UV

En los trofozoítos transfectados, determinamos el efecto de diferentes dosis o concentraciones de los agentes genotóxicos UV y H₂O₂, sobre la viabilidad celular. En primer lugar, observamos que el tratamiento de UV, disminuyó significativamente la viabilidad de los trofozoítos controles (transfectados con los plásmidos vacíos), de una manera dosis dependiente. De manera interesante, observamos que los parásitos que sobreexpresaban EhTRF-like III no disminuyeron su viabilidad a ninguna de las dosis de UV empleadas (Fig. 34). En cambio, los trofozoítos que tenían disminuida la expresión de EhTRF-like III, presentaron una viabilidad reducida con respecto a la intensidad del daño, como mencionamos anteriormente *E. histolytica* exhibe una alta tolerancia por el estrés oxidativo esto en gran medida está asociado a su patogénesis, sin embargo *E. dispar* presenta una menor tolerancia por diversos genotóxicos, por lo que decidimos determinar cómo se comportaba esta cepa no patógena en nuestro análisis. Particularmente, al aplicar una dosis de 150 µJ/cm² de UV, los trofozoítos con poca expresión de la proteína EhTRF-like III redujeron su viabilidad en un 23% ± 0.3%, al comparar el resultado con el observado en la cepa no patógena *E. dispar*, se observó que se comportaban de la misma manera ya que ante el mismo agente disminuyeron su viabilidad en un 21% ± 1% (Fig. 34). En cambio, al someter a estos trofozoítos (pBackbone_148140_Si y *E. dispar*) a un estímulo de 300 µJ/cm², la viabilidad celular decayó en un 73% ± 8% y 47 ± 7%, respectivamente (Fig. 34).

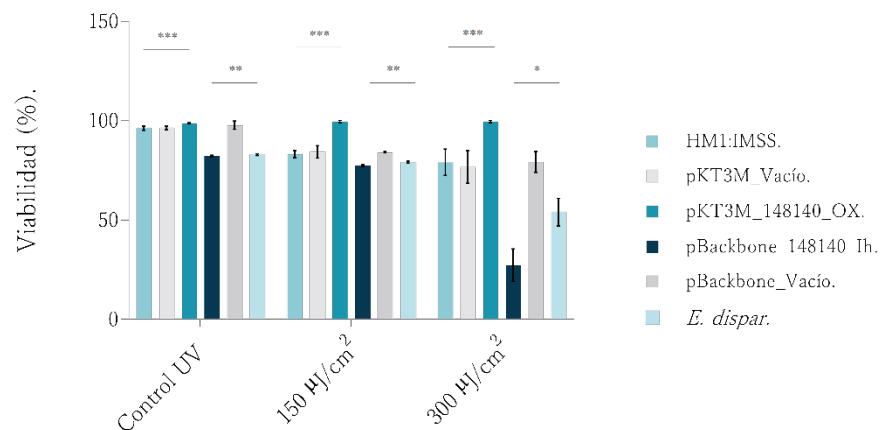


Figura 34. Viabilidad celular de trofozoítos de *E. histolytica*

transfectados y no transfectados de *E. dispar* durante el tratamiento con radiación UV. La viabilidad de trofozoítos (8×10^4) tratados con dos diferentes dosis de radiación UV, se estimó mediante azul tripano (* $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

10.5.2 Tratamiento con H₂O₂

También se evaluó la viabilidad de trofozoítos transfectados sometidos a diferentes concentraciones de H₂O₂ (1, 2.5 y 5.0 mM). Estas concentraciones afectaron de manera dependiente la viabilidad de los trofozoítos control (Fig. 35). Al igual que cuando los parásitos se trataron con UV, la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III evitó el daño en la viabilidad celular, producida por las diferentes concentraciones de H₂O₂, observándose una ligera disminución no significativa del 3%±2%, con respecto a la viabilidad de los trofozoítos sin tratamiento. En el caso de los trofozoítos que tenían silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III, se observó una disminución en su viabilidad celular del 38%±2%, 46%±1% y 83%±1% al ser tratados con 1, 2.5 y 5 mM de H₂O₂, respectivamente. De manera consistente con los datos observados anteriormente en los trofozoítos de *E. dispar* tratados con UV, las dosis crecientes de H₂O₂ mostraron una reducción de la viabilidad celular en 36±0.3%, 48%±2% y 75%±0.7%, respectivamente (Fig. 35).

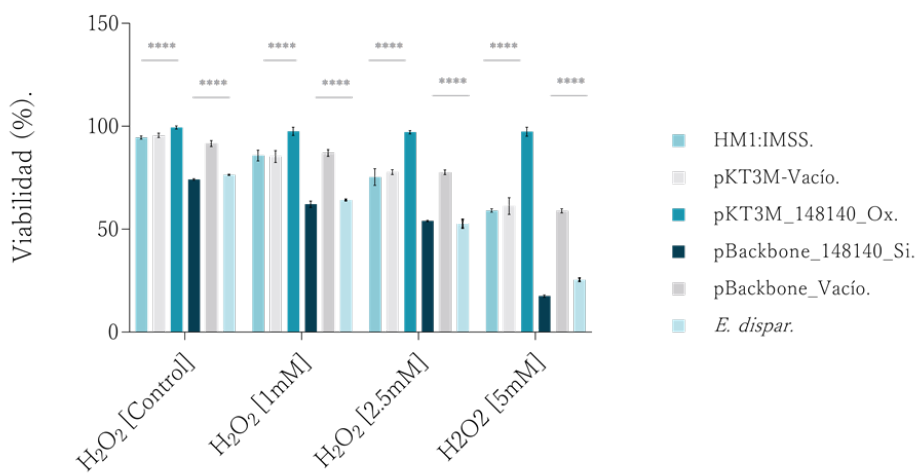


Figura 35. Determinación de la viabilidad celular de trofozoitos transfectantes, de la cepa *E. histolytica* y de *E. dispar* frente a H₂O₂. 8x10⁴ trofozoitos fueron tratados con diferentes concentraciones mM de H₂O₂, la viabilidad celular se estimó mediante azul tripano (**** p<0.0001).

Con estos resultados se puede sugerir, que la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III protege de alguna manera a los trofozoítos del daño genotóxico producido por la UV y el H₂O₂, en cambio la disminución de su expresión, vuelve más susceptibles a los parásitos a estos agentes.

10.6 Formación del aducto 8-oxoG en respuesta a los tratamientos genotóxicos en trofozoítos transfectantes.

10.6.1 Condiciones basales

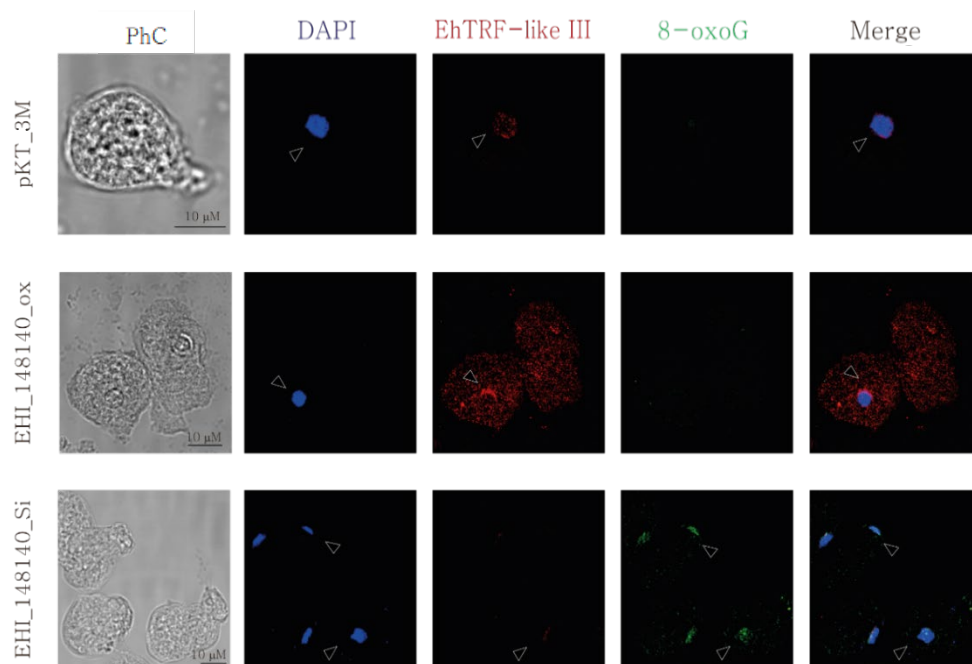
Se sabe que los tratamientos genotóxicos (UV y H₂O₂) producen daño al DNA; formando el aducto 8-oxoG, que puede ser detectado mediante avidina-FITC¹²⁶.

En este trabajo evaluamos el efecto de la sobreexpresión o silenciamiento de la proteína EhTRF-like III, en la formación del aducto 8-oxoG producido por los tratamientos genotóxicos antes mencionados. En primer lugar, analizamos la formación del aducto mediante microscopía confocal en trofozoítos transfectados en condiciones basales. Las imágenes de microscopía evidencian que el aducto 8-oxoG solo se formó en los trofozoítos que tiene disminuida la expresión de EhTRF-like III; es decir que no se observó tinción de avidina-FITC en los trofozoítos transfectados con los vectores vacíos, ni con el plásmido pKT3M_148140_Ox (Fig. 36). Al cuantificar la intensidad de fluorescencia correspondiente al aducto, se observó que los trofozoítos controles y que sobreexpresan EhTRF-like III, presentaron valores de 0.3 ± 0.2 unidades de fluorescencia; mientras que los trofozoítos silenciados exhibieron en 0.9 ± 0.4 veces más aducto 8-oxoG, con respecto al control (Fig. 39).

En estas mismas preparaciones observamos la localización de la proteína EhTRF-like III mediante el empleo del anticuerpo específico α -EhTRF-like III. Esta proteína presentó una localización en el núcleo de los trofozoítos del control, pero se incrementó significativamente en este organelo y en el citoplasma de los parásitos que la sobreexpresan; mientras que disminuyó claramente en los trofozoítos silenciados (Fig. 36). De manera interesante, estos parásitos con poca EhTRF-like III presentaron núcleos ovalados.

Figura 36. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados.

Inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546 (rojo). Adicionalmente, la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoítos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: núcleos con morfología nuclear y la presencia del aducto 8-oxoG.



10.6.2 Tratamiento con radiación UV

10.6.2.1 Tratamiento con 150 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV

Los trofozoítos control (pKT_3M y pBackbone) tratados con 150 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ presentaron, como era de esperarse, el aducto 8-oxoG (Fig. 37) en 0.5 ± 0.3 y 1.4 ± 0.3 veces, respectivamente, en comparación con los trofozoítos no transfectados (Fig. 39). En estas células, el aducto co-localizó con EhTRF-like III en ciertas regiones nucleares (Fig. 37). De manera interesante, los parásitos que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III y que fueron sometidos a este mismo tratamiento, no exhibieron tinción de avidina-FITC (Fig. 37).

En cambio, el estímulo de 150 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV sobre los trofozoítos silenciados, produjo un aumento en la intensidad nuclear del aducto 8-oxoG (Fig. 37). La cuantificación de la fluorescencia indicó que dicho incremento fue de 1.28 ± 0.2 veces, con respecto al control sin tratamiento (Fig. 39). La morfología nuclear de estos trofozoítos también se vio afectada, pues se observó la formación pequeñas estructuras tipo micronúcleos, las cuales co-localizaron con la formación del aducto 8-oxoG (Fig. 37).

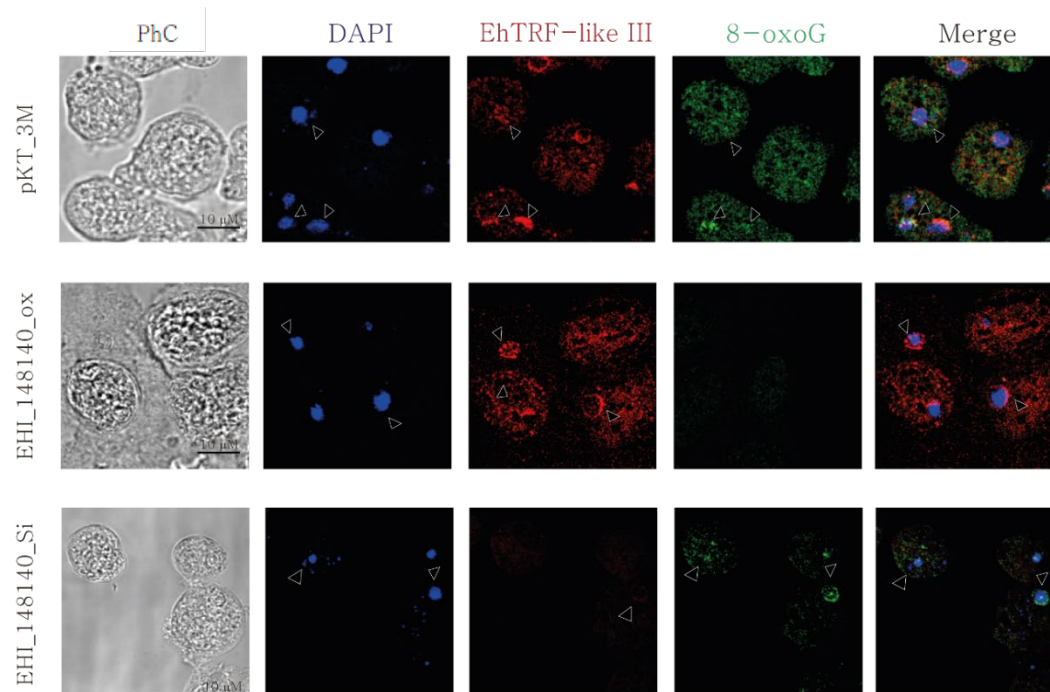


Figura 37. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados y tratados con 150 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV.

Trofozoítos transfectados y tratados con 150 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV, se sometieron a

inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546 (rojo). Adicionalmente, la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoítos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: núcleos con morfología ovalada y con la presencia del aducto 8-oxoG.

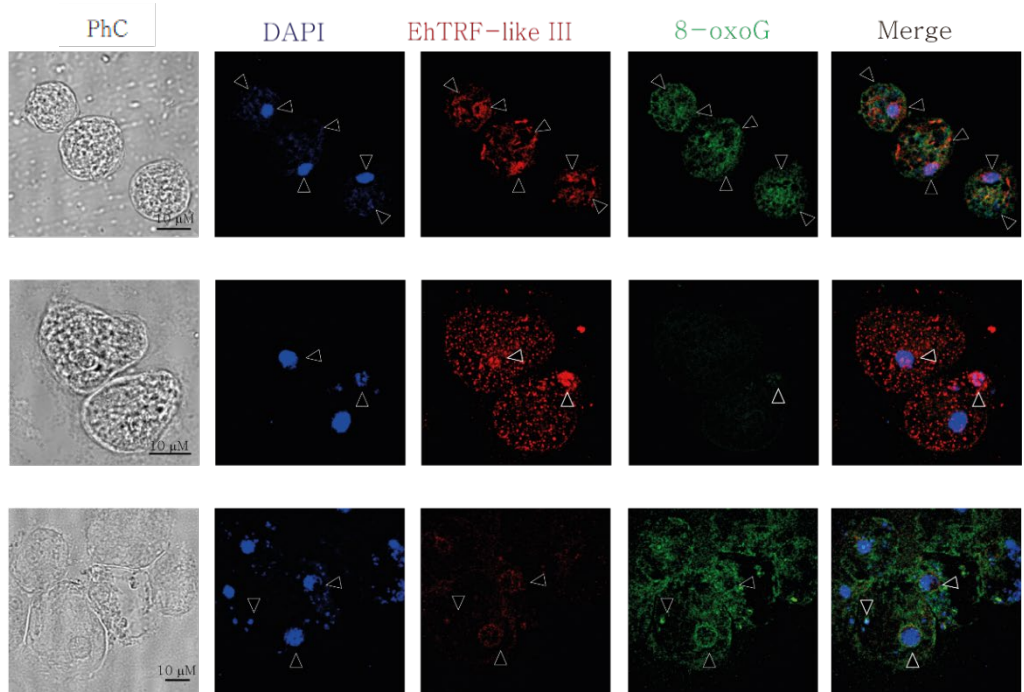
10.6.2.2 Tratamiento con 300 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV

En el caso de los trofozoítos tratados con 300 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV, se observó que la formación del aducto 8-oxoG se intensificó tanto en los trofozoítos controles y en los que tenían silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III. En estos trofozoítos, se observó el incremento del número de micronúcleos y también se observó que algunos de los parásitos estaban rotos y con presencia de daño en el citoplasma, sugiriendo que no toleraron el estrés inducido por la radiación y se produjeron rupturas en su DNA.

Por su parte, a esta dosis de UV, se pudo detectar la formación del aducto 8-oxoG en los parásitos que sobreexpresaban a la proteína EhTRF-like III. Cabe mencionar que en todos los trofozoítos transfectados, EhTRF-like III co-localizó con el aducto 8-oxoG (Fig. 38). La cuantificación de fluorescencia confirmó lo observado en las imágenes de microscopía confocal, indicando un incremento en la formación del aducto 8-oxoG de 6.5 ± 0.5 veces en los trofozoítos silenciados, de 1.1 ± 0.2 veces en los parásitos control y de 0.2 ± 0.04 veces en trofozoítos que sobreexpresan EhTRF-like III (Fig. 39).

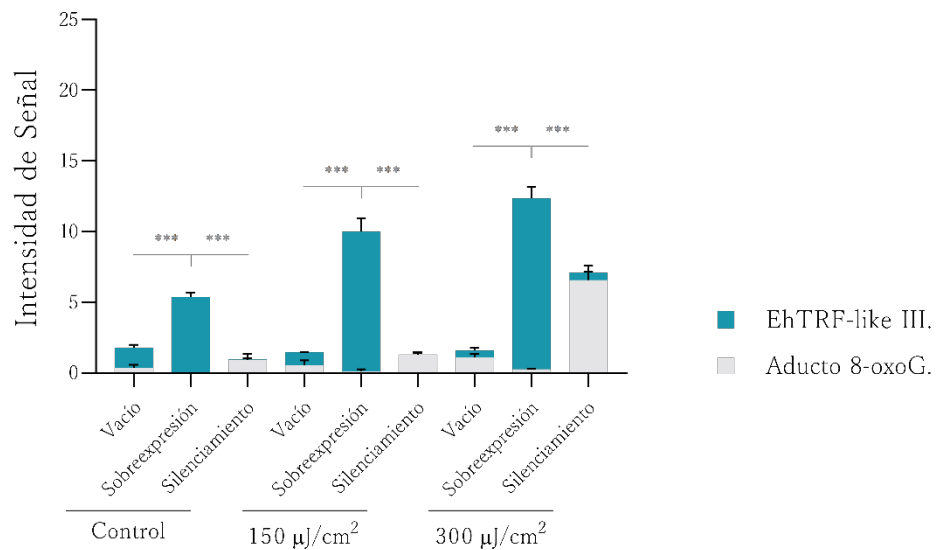
En resumen, podemos decir que el estímulo de UV produjo un daño importante en los trofozoítos, especialmente en los que tenían disminuida la expresión de la proteína EhTRF-like III, donde incrementó la formación del aducto 8-oxoG. En concordancia, cuando esta proteína se sobreexpresa, parece que de alguna manera protege al DNA y casi no se forma el aducto.

Figura 38. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados y tratados con 300 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV. Trofozoítos transfectados y tratados con 300 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV, se sometieron a



immunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546 (rojo). Adicionalmente, la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoítos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: micronúcleos.

Figura 39. Cuantificación de la formación del aducto 8-oxoG en trofozoítos transfectados y tratados con radiación UV. Cuantificación de la fluorescencia de EhTRF-like III (canal rojo con $\lambda=546$ nm) y de avidina-FITC (canal verde con $\lambda=494$ nm), observada en las imágenes de microscopía confocal de trofozoítos transfectados con pKT_3M (control), pKT3M_148140_Ox (sobrexpresión) o pBackbone_148140_Si (silenciamiento) y tratados con diferentes dosis de radiación UV. (n=30; ***p<0.001).



10.6.3. Tratamientos con H₂O₂
 10.6.3.1. Tratamiento con 1 mM de H₂O₂

El tratamiento de los trofozoítos transfectados con H₂O₂ produjo un efecto similar al observado por la radiación UV, ya que en parásitos controles y con la expresión de la proteína EhTRF-like III disminuida (Fig S1), y además tratados con 1 mM de peróxido, se observó la formación del aducto, el cual co-localizó con EhTRF-like III. La formación del aducto fue mayor en los trofozoítos silenciados, comparado con los controles y además los núcleos presentaron una morfología ovalada (Fig. 40 y 43). La fluorescencia de la avidina-FITC incrementó en 1.3 ± 0.2 y 5.25 ± 0.7 veces, en los trofozoítos control y silenciados, respectivamente (Fig. 43). Aparentemente, los trofozoítos que tienen sobreexpresada a la proteína EhTRF-like III y tratados con esta concentración de H₂O₂, no presentaron al aducto 8-oxoG (Figs. 40 y 43).

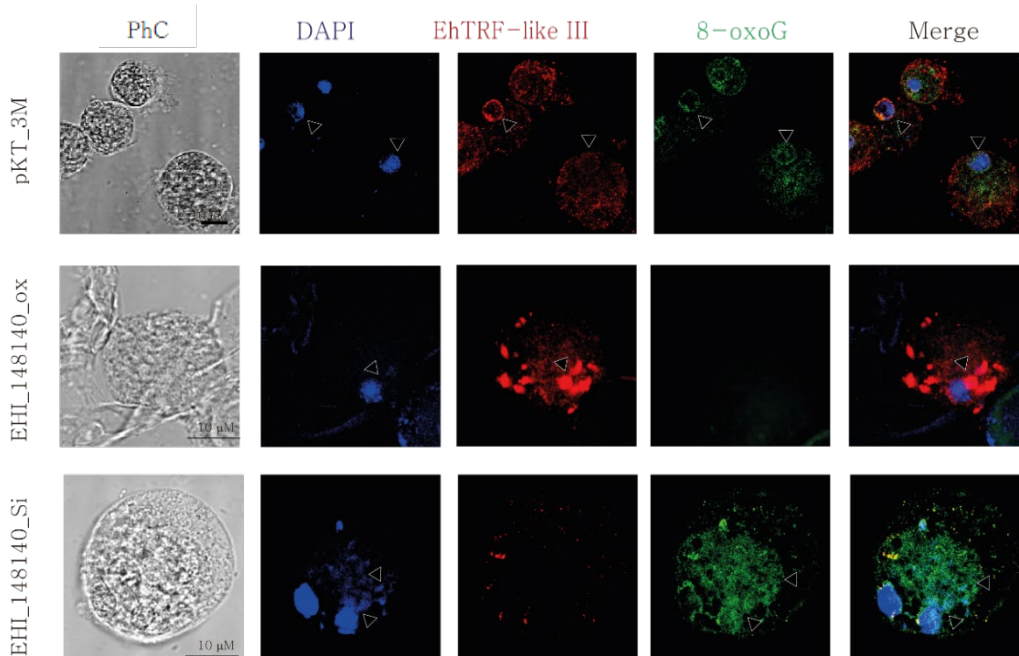


Figura 40. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados y tratados con 1 mM de H₂O₂. Trofozoítos transfectados y tratados con 1 mM de H₂O₂, se sometieron a inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546

(rojo). Adicionalmente, la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoítos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: micronúcleos.

10.6.3.2 Tratamiento con 2.5 mM de H₂O₂

En los trofozoítos donde la expresión de la proteína EhTRF-like III estaba silenciada y que fueron tratados con 2.5 mM de H₂O₂, se incrementó la presencia del aducto 8-oxoG en el núcleo, co-localizando con EhTRF-like III.

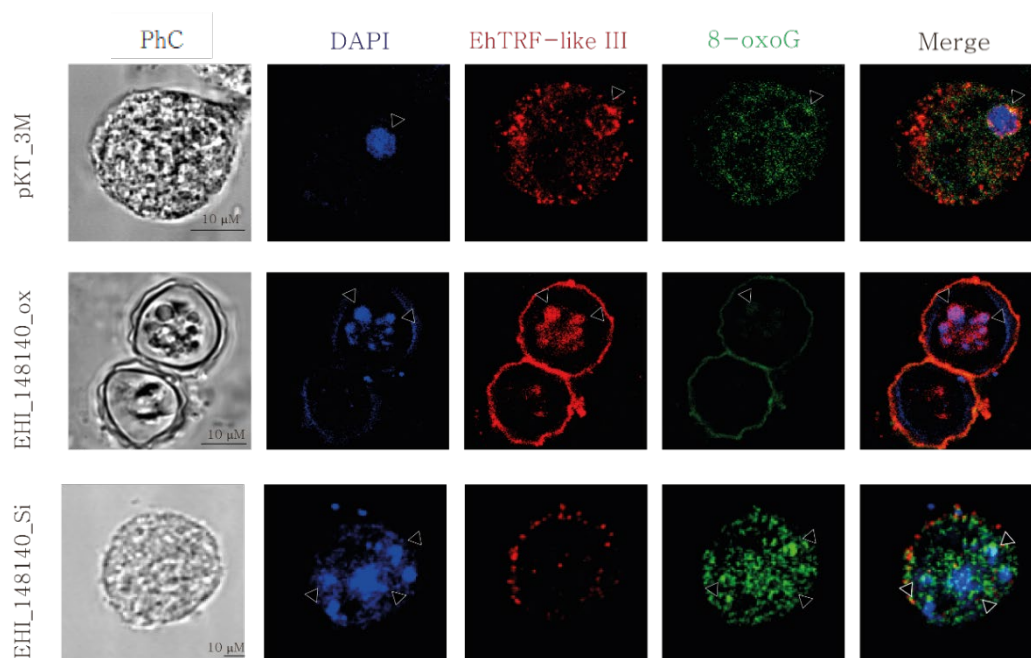
Esta cantidad fue mayor que la observada en los trofozoítos tratados con una dosis menor de H₂O₂. En cambio, los trofozoítos control tratados con esta dosis presentaron el aducto en la misma proporción que a 1 mM H₂O₂ (Fig. 41).

Los cambios en la morfología nuclear también fueron más evidentes en los trofozoítos silenciados, ya que se observó la formación de 4 estructuras tipo micronúcleos, así como la presencia del aducto en el citoplasma. De manera similar, en los trofozoítos control se identificaron micronúcleos, aunque de menor tamaño y con la presencia de la proteína EhTRF-like III, la cual co-localizó con el aducto 8-oxoG (Fig. 41)

Los datos cuantitativos confirmaron que la intensidad de avidina-FITC correspondiente al aducto, fue de 7.04 ± 1.6 y 1.3 ± 0.3 veces en los trofozoítos con baja expresión de EhTRF-like III y control, respectivamente (Fig. 43). Es relevante mencionar que a estos niveles de H₂O₂, casi no se formó el aducto 8-oxoG en los trofozoítos con sobreexpresión de EhTRF-like III (Fig. 41), mostrando una cantidad de fluorescencia de 0.2 ± 0.1 veces (Fig. 43).

Figura 41. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados y tratados con 2.5 mM de H₂O₂.

Trofozoítos transfectados y tratados con 2.5 mM de H₂O₂, se sometieron a inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546 (rojo). Adicionalmente, la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoítos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: micronúcleos.



10.6.3.3 Tratamiento con 5 mM de H₂O₂

En trofozoítos tratados con una concentración de 5 mM de H₂O₂ se localizó al aducto 8-oxoG en el núcleo y de manera interesante en “focis” extranucleares, en ambos casos co-localizando con EhTRF-like III. Los micronúcleos también fueron evidentes en estas condiciones (Fig. 42).

En los parásitos silenciados el aducto se formó en mayor cantidad que la observada a dosis menores (Fig. 42), presentando una intensidad de 10.5 ± 0.3 veces (Fig. 43). Los trofozoítos control mostraron un enriquecimiento del aducto 8-oxoG de 2.6 ± 0.1 veces, comparado con el observado a dosis menores (Fig. 43).

El incremento del aducto 8-oxoG en los trofozoítos que sobreexpresaban a la proteína fue ligero, pero significativo (1 ± 0.2 veces) (Figs. 42-43). En resumen, encontramos que los trofozoítos con una baja expresión de EhTRF-like III son más susceptibles al daño producido por el H₂O₂ de una manera dosis dependiente; en cambio, cuando esta proteína se sobreexpresa, casi no se produce el aducto 8-oxoG, sugiriendo que EhTRF-like III participa de manera importante en la protección contra agentes genotóxicos, específicamente durante el mantenimiento telomérico de *E. histolytica*.

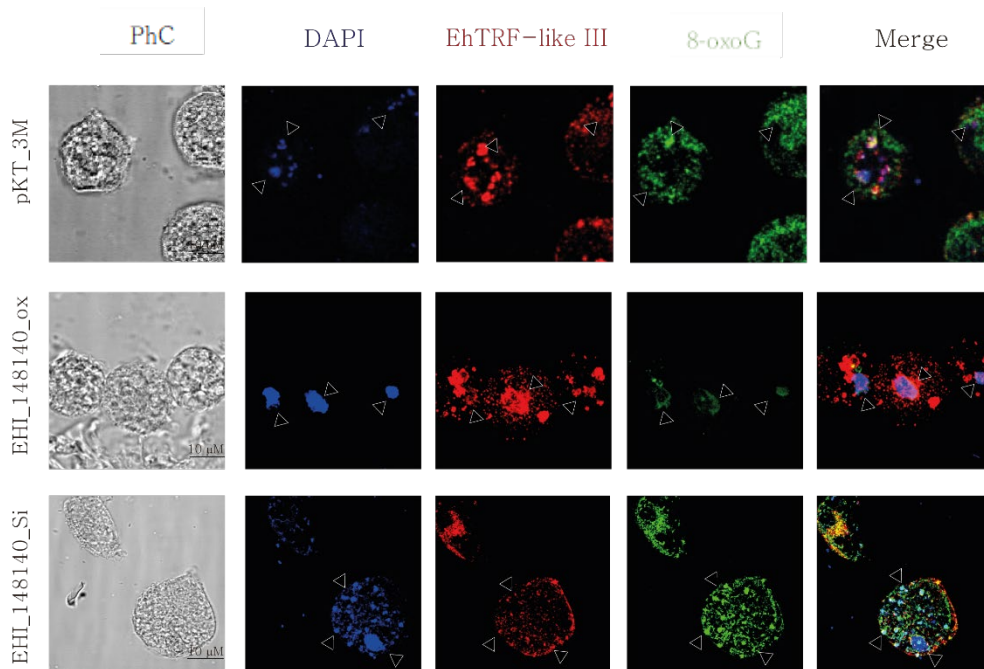


Figura 42. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoítos transfectados y tratados con 5 mM de H₂O₂.

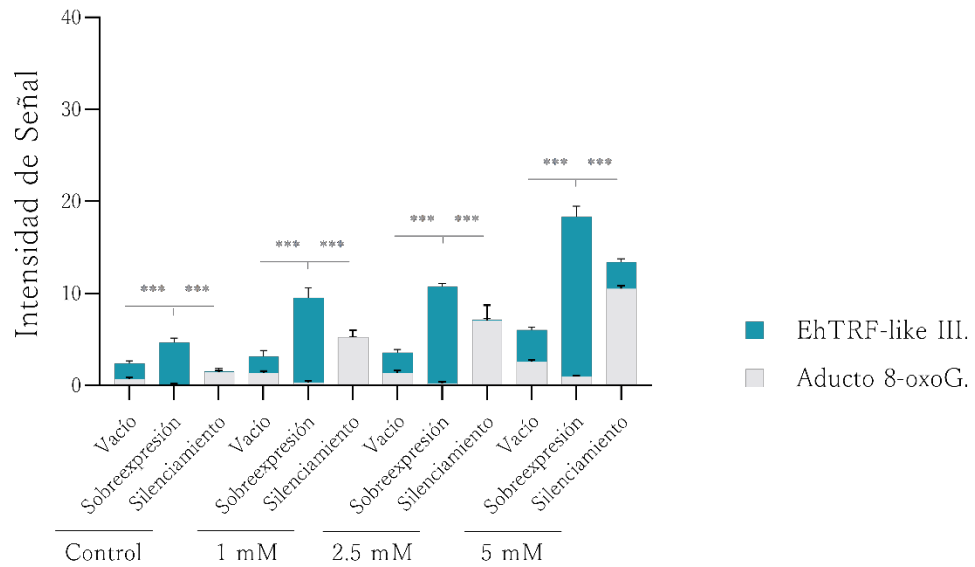
Trofozoítos transfectados y tratados con 5 mM de H₂O₂, se sometieron a inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546 (rojo). Adicionalmente,

la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoítos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: micronúcleos.

Figura 43.
Cuantificación de la formación del aducto 8-oxoG en trofozoítos transfectados y tratados con H₂O₂.

Cuantificación de la fluorescencia de EhTRF-like III (canal rojo con $\lambda=546$ nm) y de avidina-FITC (canal verde con $\lambda=494$ nm), observada en las imágenes de

microscopía confocal de trofozoítos transfectados con pKT_3M (control), pKT3M_148140_Ox (sobrexpresión) o pBackbone_148140_Si (silenciamiento) y tratados con diferentes dosis de H₂O₂. (n=30; ***p<0.001).



11 Discusión

E. histolytica es un parásito cuyo genoma se encuentra secuenciado en su totalidad; sin embargo, hasta ahora no se han identificado secuencias teloméricas canónicas, lo cual no significa que el organismo carezca de telómeros^{9,135}. Al respecto, Clark *et al* han identificado que aproximadamente el 10% del genoma está conformado por arreglos que contienen secuencias repetidas tipo STR, las cuales flanquean a genes que codifican para tRNAs. Estos arreglos varían en tamaño de 490 a 1775 pb y contienen de 1 a 5 genes tRNAs y diferentes secuencias repetidas de tipo STR con tamaños variables que pueden llegar hasta los 30,000 pb. Se ha propuesto que dichas regiones pueden encontrarse en zonas subteloméricas o que incluso sean secuencias teloméricas^{116,136}.

En otros organismos parásitos unicelulares como *Trypanosoma brucei*, las regiones codificantes para rRNA, las cuales están flanqueadas por repetidos polimórficos, se han asociado con regiones subteloméricas¹³⁷. De la misma manera, en el caso de *Dictyostelium discoideum* se ha observado la presencia de elementos palindrómicos extracromosomales asociados a rRNA, los cuales también están presentes en las regiones terminales de los cromosomas¹³⁸. En otros parásitos como *Plasmodium falciparum*, las regiones asociadas a telómeros (TAS) están enriquecidas en secuencias ricas en A:T (70%)¹³⁹.

En la mayoría de los organismos, la región telomérica tiene un alto contenido de G:C, en cambio *E. histolytica* posee un enriquecimiento de A:T a lo largo de su genoma. Además, este parásito posee una alta eficiencia para sintetizar bases complementarias durante daños oxidativos¹⁴⁰. De manera que las regiones asociadas a tRNA, ricas en A:T, podrían funcionar como regiones estructurales terminales en los cromosomas de *E. histolytica*. La alta heterogeneidad presentada por los arreglos asociados a tRNA's no es exclusiva de este parásito, pues también se ha visto en *Leishmania braziliensis*, donde obedece a eventos de recombinación¹⁴¹. Por lo que podemos inferir que estas regiones tipo STR asociadas a tRNA's podrían funcionar como telómeros en *E. histolytica*.

Por otra parte, se ha reportado en el genoma de *E. histolytica* una secuencia de 32 pb que es reconocida por la proteína rEhTRF-like I. Esta secuencia se deriva del arreglo NK1, el cual presenta una talla de 1006 pb y está asociado a los genes codificantes para el tRNA de asparagina (Asn^{GTT}) y para Lisina (Lys^{CTT})¹²⁶. EhTRF-like I es homólogo de la proteína HsTRF1¹²⁶, por lo que se propone que podría tener un papel similar, participando en la función telomérica de *E. histolytica*. Es por ello, que en este trabajo nos planteamos como objetivo determinar si las proteínas rEhTRF-like I y EhTRF-like III pueden reconocer otras secuencias repetidas derivadas de los arreglos tipo STR asociadas a tRNA's. Después del análisis de los múltiples arreglos reportados por Clark *et al*, se eligió el arreglo [G^{GCC}], ya que contiene al gen que codifica para el tRNA de Gly, posee una longitud de $\sim 30,000$ pb y presenta 39 unidades de repetición (813 pb cada una)¹¹⁶.

Empleando el ensayo DPI-ELISA indirecto demostramos que las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like III son capaces de reconocer diferencialmente a los distintos fragmentos empleados. EhTRF-like I se unió preferentemente al arreglo tipo STR asociado al tRNA de Gly; mientras que EhTRF-like III se unió de manera preferente a la parte del arreglo tipo STR, que no contenía ningún gen de tRNA. Estas diferencias pudieran ser relevantes, ya que en *Homo sapiens* se ha descrito que la afinidad de HsTRF1 y HsTRF2 por la secuencia telomérica presenta distintas constantes de disociación de 2.0×10^{-7} M y 7.5×10^{-7} M, respectivamente, indicando que la afinidad de HsTRF1 por la secuencia telomérica es mayor, en comparación con HsTRF2¹⁰⁷. La diferencia en las constantes de disociación podría estar relacionada con la función que cumple cada proteína en la región telomérica, ya que HsTRF2 requiere modificar su unión a la región telomérica de manera dinámica durante la formación del t-loop^{67,107,109}. Nuestros resultados sugieren que EhTRF-like I presenta una mayor afinidad por el arreglo de 813 pb, el cual contiene al gen que codifica para el tRNA de Gly y las secuencias derivadas de diferentes STR's asociados a tRNA's, en comparación a EhTRF-like III

que se une con mayor afinidad al fragmento de 277 pb, que contiene exclusivamente regiones repetidas (Fig. 29). Nuestros resultados sugieren que tanto EhTRF-like I como EhTRF-like III son proteínas cuya función telomérica es diferencial, ya que observamos que la proteína EhTRF-like III se une más a regiones repetidas grandes, las cuales no están asociadas a genes codificantes. Es importante mencionar que este es el primer reporte que determina *in vitro* la unión entre las proteínas EhTRF-like I y EhTRF-like III y los arreglos de tRNA completos o parciales relacionados a los STR asociados al gen que codifica para el tRNA de glicina. Además, estos hallazgos nos permiten proponer que las proteínas EhTRF-like I y III realizan actividades diferentes, pero cooperativas, en las regiones terminales de los cromosomas¹⁴². Esto correlaciona con el hecho de que está bien establecido que la especialización de las proteínas es una de las principales fuerzas evolutivas que permiten la especiación, además de dotar a un organismo de diferentes estrategias contra varios tipos de estrés^{142,143}.

Para determinar la función génica, se emplean como estrategias la sobreexpresión o la inhibición de sus productos y, posteriormente se analizan los fenotipos que ocasionan. En este caso, para continuar la caracterización de estas proteínas, se obtuvieron amibas transfectantes que sobreexpresaron o presentaron disminuida la expresión de EhTRF-like III, transfectando trofozoítos con diferentes construcciones plasmídicas. Para la sobreexpresión del gen EHI_148140, empleamos el plásmido pKT-3M, pues ha sido ampliamente empleado para la caracterización de factores de transcripción en este parásito^{32,133,144}. En el caso del silenciamiento del gen, usamos el plásmido pBackbone, el cual al ser transcrito a mRNA, se une en parte, a estructuras tipo tallo-burbuja, lo que impide su entrada al ribosoma y con ello se inhibe la expresión de la proteína¹³⁴. Los trofozoítos con mayor o menor cantidad de EhTRF-like III fueron seleccionados a una concentración de 20 µg del análogo de neomicina G418¹²⁶.

La sobreexpresión o silenciamiento del gen EHI_148140, se corroboró a nivel de transcrito y proteína. A nivel de proteína, nuestros resultados mostraron un enriquecimiento y disminución de la banda de 55 kDa¹²⁶, que corresponde al tamaño reportado por Rendón-Gandarilla et al, en los trofozoítos transfectados con pKT3M_148140_Ox y pBackbone_148140_SipKT-3M_, respectivamente. Adicionalmente, detectamos una banda de 60 kDa, la cual podría corresponder a modificaciones post-traduccionales, como la sumoilación¹²⁶. Al respecto, cabe mencionar que la proteína EhTRF-like III posee 3 sitios (Ψ KXE, Ψ representa cualquier aminoácido hidrofóbico) susceptibles de ser sumoilados¹⁴⁵. En las proteínas TRFs, este tipo de modificaciones se asocian con

su estabilidad¹⁴⁶, así como con su ensamblaje en el cromosoma¹⁴⁷. Tampoco descartamos la posibilidad de que EhTRF-like III pueda sufrir otro tipo de modificaciones pos-traduccionales. Al respecto, se ha reportado que la proteína HsTRF2 presenta metilación en algunos residuos de argininas, lo cual es importante para su unión con el telómero¹⁴⁸, sin embargo no representa un cambio importante en el peso de la proteína¹⁴⁹.

Con la idea de que EhTRF-like III posiblemente se relaciona con la protección del genoma de *E. histolytica*, como lo hacen sus ortólogos TRF2 y TRF2, consideramos que la sobreexpresión de EhTRF-like III, incrementaría su localización en las regiones terminales de los cromosomas y produciría una mayor estabilidad genómica y mayor supervivencia celular. Además, diversos estudios han determinado que la expresión de las proteínas del complejo Shelterin, particularmente TRF2, están asociadas con estas funciones en diferentes organismos^{76,90,107,112}.

Los resultados en este trabajo mostraron que los trofozoítos que sobreexpresaron a la proteína EhTRF-like III, resistieron considerablemente las dosis y concentraciones crecientes de UV y H₂O₂, inclusive mejor que las cepas virulentas recién extraídas de hígado de hámster. Nuestros datos muestran que la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III en *E. histolytica*, le confiere una mayor tolerancia al estrés oxidativo, ya que observamos una viabilidad celular $\geq 98\%$ post-tratamiento en todos los casos. A pesar de que nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III le proporciona una mayor estabilidad al genoma de *E. histolytica*, reportes de Bernadette-Nera et al y Smogerzewska-Agata et al, demostraron que la sobreexpresión de HsTRF2 conduce al acortamiento y pérdida del telómero, desencadenando un fenotipo senescente, fusión cromosómica y promoción de la heterogenicidad telomérica, que eventualmente produce cáncer^{150,151}. Sin embargo, para determinar la toxicidad de la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III en nuestro modelo de estudio sería interesante continuar la presión de selección con el antibiótico a concentraciones aún mayores. En nuestro grupo de trabajo hemos determinado que a 60 $\mu\text{g/ml}$ de presión de selección, los trofozoítos aún son viables y no presentan fenotipos senescentes; no obstante, no hemos evaluado los efectos en la proteína EhTRF-like III ni en la estabilidad del genoma.

Por otro lado, los trofozoítos que tenían silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III presentaron una menor viabilidad celular ($\leq 90\%$), en condiciones basales (Fig. 39-40). Diversos estudios han demostrado que la supresión de TRF2 conduce a inestabilidad génica, fusión cromosómica^{66,76,81,90} y en humanos, además, se ha visto que desencadena la senescencia primaria

(M1)¹⁵², lo que nos permite sugerir que el silenciamiento de EhTRF-like III le supone a *E. histolytica* una menor tolerancia al estrés microambiental. De manera consistente al estudio realizado por Garret-Morgan et al en ratones¹⁵³, nosotros observamos una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo de los trofozoítos que tenían silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III. De manera interesante podemos señalar que la viabilidad de estos trofozoítos fue similar a *E. dispar* sugiriendo un probable rol patogénico de la proteína EhTRF-like III.

En este trabajo también determinamos si la sobreexpresión o inhibición de la expresión de EhTRF-like III tenía algún efecto en la formación del aducto 8-oxoG, en presencia de estrés inducido por UV o H₂O₂. En el caso de los trofozoítos que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III casi no se detectó al aducto. Por el contrario, los parásitos que tenían silenciada su expresión presentaron un incremento en la formación del aducto 8-oxoG, de manera proporcional a la concentración o intensidad de los tratamientos empleados. Esto es consistente con diferentes análisis realizados con anterioridad en otros modelos celulares, los cuales incluyen diferentes líneas celulares utilizadas para el estudio del estrés oxidativo. Sun-Luxi et al. emplearon las líneas celulares U2OS, HeLa, MCF7, IMR90 y BJ para estudiar el efecto del aducto 8-oxoG y determinaron que el estrés oxidativo generado por la célula es insuficiente para causar un daño considerable; sin embargo, la acumulación del estrés oxidativo en el telómero conduce a diferentes lesiones que producen inestabilidad génica¹⁵⁴.

Por su parte Coluzzi-Elisa et al. observaron que en fibroblastos MRC-5, derivados de cultivo primario de pulmón fetal humano, la formación del aducto 8-oxoG resulta letal para el crecimiento celular, pues desencadena el arresto de la horquilla de replicación, lo que conlleva a senescencia celular¹⁵⁵. Finalmente, Fouquerel-Elise et al observaron que altas concentraciones del aducto 8-oxoG, conducen al acortamiento prematuro del telómero, deficiencia en la replicación, formación de cromosomas dicéntricos, puentes anafásicos e inestabilidad génica⁹⁶. A pesar de estas evidencias, como ya mencionamos con anterioridad, en nuestro modelo de estudio la sobreexpresión de EhTRF-like III es bien tolerada por los trofozoítos y les confiere una mayor resistencia a los agentes genotóxicos. Por su parte, en los trofozoítos que tenían silenciada EhTRF-like III, el tratamiento con estrés oxidativo agresivo generó la ruptura de DNA, así como lisis celular, como ha sido reportado por Nandi et al¹⁵⁶. En conjunto, con los datos obtenidos de viabilidad celular y detección del aducto 8-oxoG, podemos inferir que EhTRF-like III está relacionada con la tolerancia al estrés oxidativo, confiriéndole así una ventaja a *E. histolytica*.

De manera interesante, al analizar la estructura primaria de las proteínas EhTRF-like de *E. histolytica*, se ha identificado que conservan una cisteína, cerca del dominio de unión tipo MYB¹²⁶ (Fig. 14B). La presencia de este residuo de cisteína es importante ya que algunos autores han sugerido un rol antioxidante de proteínas ricas en cisteínas o *per se* del residuo de cisteína, al oxidar selectivamente el azufre de su estructura¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. De aquí podemos inferir que, el mantenimiento de esta cisteína cerca del dominio de unión al DNA tipo MYB, a través de generaciones, pudo representar una ventaja adaptativa para el parásito^{142,143}.

La morfología observada para los trofozoítos que sobreexpresan a la proteína EhTRF-like III no se modificó, en comparación con los trofozoítos control. Sin embargo, aquellos trofozoítos que tenían silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III, mostraron una morfología diferente y fueron más pequeños, en relación con los parásitos control.

Además, a medida que los daños oxidativos aumentaban, los trofozoítos silenciados eran más esféricos, lo cual es indicativo de que el parásito está sufriendo estrés (Fig. 36-44). Crabbe et al reportaron que las proteínas TRF están relacionadas con la organización topológica del DNA e interactúan con componentes de la matriz nuclear¹⁶¹. Nuestros resultados mostraron que los núcleos de los trofozoítos silenciados tenían una morfología más ovalada, respecto a la de los controles (Fig. 36, Fig. 40). Esto podría relacionar a EhTRF-like III con la organización topológica del genoma de *E. histolytica*, y también podría sugerir su participación en el mantenimiento de la estructura nuclear. Al respecto, Wood et al demostraron que la interacción entre TRF2 y lamina A/C, facilita la localización y organización funcional de los finales cromosómicos¹⁶². Sin embargo, se requieren más estudios para determinar el papel de EhTRF-like III como factor de organización estructural en el núcleo de este parásito.

En conjunto, todos nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de la proteína EhTRF-like III podría estar relacionada a la patogenicidad del parásito, confiriéndole protección a su genoma en contra de agentes oxidantes y eventualmente a un incremento en su viabilidad celular. En contraste, el silenciamiento de la proteína conduciría a una mayor susceptibilidad al daño del genoma, cambios en la organización nuclear y a una viabilidad celular parecida a la especie no patógena (*E. dispar*).

12. Conclusiones

- ‡ Las proteínas EhTRF-like I y II podrían tener funciones diferentes en el genoma de *E. histolytica* ya que se determinó que se unen de forma diferencial al arreglo del gen de tRNA [G^{GCC}] y al fragmento de 277 pb correspondiente a la región 5' río arriba del sitio de inicio de la transcripción del tRNA de Gly. Por ejemplo en el caso de EhTRF-like III podría estar implicada en la formación del T-loop y D-loop tal y como sucede con su homóloga humana HsTRF2.
- ‡ El silenciamiento de la expresión de la proteína EhTRF-like III en trofozoitos de *E. histolytica* expuestos a agentes genotóxicos se asocia con la disminución de la viabilidad celular y un mayor número de aductos 8-oxoG y con la fragmentación del DNA del parásito cuando se aplicaban 300 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de radiación UV y H_2O_2 2.5 mM.
- ‡ La proteína EhTRF-like III está involucrada en la supervivencia de *E. histolytica* dado que su sobreexpresión incrementa la viabilidad celular y protege al parásito del daño genotóxico.

13. Perspectivas

- ‡ Determinar la interacción de las proteínas EhTRF-like (EhTRF-like I, EhTRF-like II y EhTRF-like III) con el resto de los arreglos repetidos tipo STR asociados a tRNAs de *E. histolytica*.
- ‡ Detectar las modificaciones postraduccionales que influyen en el cambio de peso de EhTRF-like III y analizar su participación en las funciones de esta proteína.
- ‡ Emplear amibas transfectantes que sobreexpresen o tengan silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III, para inducir la formación del AHA en hámsteres y, compararlas con amibas de la cepa HM1: IMSS (patógena) y de la especie no patógena *E. dispar*. Con la finalidad de identificar si las proteínas EhTRF-like, específicamente EhTRF-like III tienen un rol patogénico en el parásito.
- ‡ Emplear amibas transfectantes que sobreexpresen o tengan silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III para analizar mediante de ensayos Cometa el fraccionamiento del gDNA o bien mediante Cometa-FISH para identificar la susceptibilidad de las regiones repetidas tipo STR asociadas a tRNAs a la ruptura genómica. Con la finalidad de demostrar si la modificación de los niveles de expresión de la proteína EhTRF-Like III previenen o hacen más susceptibles a las regiones de tRNA's a los agentes genotóxicos, principalmente UV.
- ‡ Emplear amibas transfectantes que sobreexpresen o tengan silenciada la expresión de la proteína EhTRF-like III para analizar mediante la técnica de campos pulsados la modificación del “fingerprint” obtenido en este trabajo cuando se someten a los trofozoitos transfectantes a daños genotóxicos. Para corroborar como afecta la modificación de los perfiles de expresión de la proteína EhTRF-like III a la integridad de los cromosomas del parásito (ver Anexo).
- ‡ Emplear el protocolo descrito para la obtención de “fingerprint” de *E. histolytica*, para identificar los posibles *loci* de los fragmentos repetidos tipo STR asociados a tRNAs, mediante Southern Blot (ver Anexo).

14. Bibliografía

1. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *NIAID Biodefense Research Agenda for Category B and C priority Pathogens*.
2. *Guidelines for drinking-water quality*. (World Health Organization, 2017).
3. Bakker-Grunwald, T. & Wöstmann, C. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitology Today* **9**, 27–31 (1993).
4. Lösch, F. Massenhafte Entwicklung von Amöben im Dickdarm. *Archiv f. pathol. Anat.* **65**, 196–211 (1875).
5. Anane, S. & Khaled, S. *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar*. *Annales de biologie clinique* **63**, 7–13 (2005).
6. Guillen, N. Dynamique du cytosquelette durant l'invasion des tissus par *Entamoeba histolytica*. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités* **10**, 121–135 (1999).
7. Acuna-Soto, R. Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *The American Journal of Gastroenterology* **95**, 1277–1283 (2000).
8. Sudip Ghosh. Molecular Epidemiology of *Entamoeba spp.*: Evidence of a Bottleneck (Demographic Sweep) and Transcontinental Spread of Diploid Parasites. *Journal of Clinical Microbiology* 3815–3821 (2000).
9. Loftus, B. *et al.* The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**, 865–868 (2005).
10. Grant, J. R. & Katz, L. A. Phylogenomic Study Indicates Widespread Lateral Gene Transfer in *Entamoeba* and Suggests a Past Intimate Relationship with Parabasalids. *Genome Biol Evol* **6**, 2350–2360 (2014).
11. Elisabeth Labruyère. AMIBIASE.
12. Fiches modèles OMS d'information a l'usage des prescripteurs: Médicaments utilisés en parasitologie - Deuxième édition: Protozoaires: Amibiase et giardiase.
<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2923f/2.html>.
13. General de Epidemiología & (DGE). *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. 19 (2020).
14. Fleming, R. *et al.* Clinical manifestations and endoscopic findings of amebic colitis in a United States-Mexico border city. *BMC research notes* **8**, 781 (2015).
15. DefuncionesRegistradas2019.pdf.
16. *Amebiasis*. vol. 2 (Imperial College Press, 2000).

17. Walsh, J. A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. *Reviews of infectious diseases* **8**, 228–238 (1986).
18. Ramos, F. *et al.* *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Experimental parasitology* **110**, 327–330 (2005).
19. Leber, A. L. Intestinal Amebae. *Clinics in Laboratory Medicine* **19**, 601–619 (1999).
20. Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C. & Tannich, E. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA and cell biology* **12**, 925–933 (1993).
21. Shabardina, V., Kischka, T., Kmita, H., Suzuki, Y. & Makałowski, W. Environmental adaptation of *Acanthamoeba castellanii* and *Entamoeba histolytica* at genome level as seen by comparative genomic analysis. *International journal of biological sciences* **14**, 306–320 (2018).
22. LANKESTER, E. R. The Amoebae Living in Man. *Nature* **104**, 369–370 (1919).
23. Henri GALLIARD. LE PROFESSEUR ÉMILE BRUMPT (1877-1951). *ANNALES DE PARASITOLOGIE HUMAINE ET COMPARÉE* (1952) doi:10.1051/parasite/1952271005.
24. Clark, C. G. & Diamond, L. S. Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *The Journal of eukaryotic microbiology* **44**, 142–154 (1997).
25. Silberman, J. D., Clark, C. G., Diamond, L. S. & Sogin, M. L. Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular biology and evolution* **16**, 1740–1751 (1999).
26. Ponce-Gordo, F. & Martínez-Díaz, R. A. On the identification of some *Entamoeba* species. Comments on a recent paper. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **57**, 207 (2007).
27. Stensvold, C. R., Lebbad, M. & Clark, C. G. Genetic characterisation of uninucleated cyst-producing *Entamoeba spp.* from ruminants. *International journal for parasitology* **40**, 775–778 (2010).
28. DOBELL, C., NEAL, R. A. & HOARE, C. A. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. XII. Bacterial factors influencing the life history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitology* **42**, 16–39 (1952).
29. Manna, D. *et al.* An NAD⁺-dependent novel transcription factor controls stage conversion in *Entamoeba*. *eLife* **7**, e37912 (2018).
30. Coppi, A., Merali, S. & Eichinger, D. The Enteric Parasite *Entamoeba* Uses an Autocrine Catecholamine System during Differentiation into the Infectious Cyst Stage. *J. Biol. Chem.* **277**, 8083–8090 (2002).

31. Krishnan, D. & Ghosh, S. K. Cellular Events of Multinucleated Giant Cells Formation During the Encystation of *Entamoeba invadens*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, (2018).
32. Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A. & Singh, U. A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology* **11**, 898–910 (2009).
33. Weedall, G. D. *et al.* Genomic diversity of the human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Genome biology* **13**, R38 (2012).
34. Petri, W. A. Protozoan parasites that infect the gastrointestinal tract. *Current opinion in gastroenterology* **16**, 18–23 (2000).
35. Arellano-Aguilar, G., Marín-Santillán, E., Castilla-Barajas, J. A., Bribiesca-Juárez, M. C. & Domínguez-Carrillo, L. G. Breve historia del absceso hepático amebiano, con un caso ilustrativo. *Revista de gastroenterología de México* **82**, 344–348 (2017).
36. Ali, I. K. M. *et al.* Tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *PLoS neglected tropical diseases* **2**, e219 (2008).
37. Miyauchi, T., Takiya, H., Sawamura, T. & Murakami, E. Cardiac tamponade due to intrapericardial rupture of an amebic liver abscess. *The Japanese journal of thoracic and cardiovascular surgery: official publication of the Japanese Association for Thoracic Surgery = Nihon Kyobu Geka Gakkai zasshi* **53**, 206–209 (2005).
38. Maldonado-Barrera, C. A. *et al.* Clinical case of cerebral amebiasis caused by *E. histolytica*. *Parasitology research* **110**, 1291–1296 (2012).
39. Diamond, L. S. & Clark, C. G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *The Journal of eukaryotic microbiology* **40**, 340–344 (1993).
40. Chacín-Bonilla, L. Amibiasis. *Investigacion clinica* **51**, 239–256 (2010).
41. Dobell, C. The Amoebae Living in Man: A Zoological Monograph. *Nature* 369–370 (1919).
42. Shimokawa, C. *et al.* *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *The Journal of infectious diseases* **206**, 744–751 (2012).
43. Verweij, J. J. *et al.* Short communication. *Tropical medicine & international health: TM & IH* **8**, 1153–1156 (2003).
44. Moncada, D., Keller, K. & Chadee, K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infection and immunity* **71**, 838–844 (2003).

45. Kato, K. *et al.* Sialic acid-dependent attachment of mucins from three mouse strains to *Entamoeba histolytica*. *Biochemical and biophysical research communications* **436**, 252–258 (2013).
46. McGuckin, M. A., Thornton, D. J. & Whitsett, J. A. Mucins and Mucus. in *Mucosal Immunology* 231–250 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-415847-4.00014-8.
47. Lidell, M. E., Moncada, D. M., Chadee, K. & Hansson, G. C. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9298–9303 (2006).
48. Welter, B. H., Goldston, A. M. & Temesvari, L. A. Localisation to lipid rafts correlates with increased function of the Gal/GalNAc lectin in the human protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *International journal for parasitology* **41**, 1409–1419 (2011).
49. Santi-Rocca, J. *et al.* The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cellular microbiology* **10**, 202–217 (2008).
50. Betanzos, A. *et al.* The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PloS one* **8**, e65100 (2013).
51. Saha, A., Gaurav, A. K., Bhattacharya, S. & Bhattacharya, A. Molecular Basis of Pathogenesis in Amoebiasis. *Curr Clin Micro Rpt* **2**, 143–154 (2015).
52. Moncada, D., Keller, K. & Chadee, K. *Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and immunity* **73**, 3790–3793 (2005).
53. Mortimer, L. & Chadee, K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology* **126**, 366–380 (2010).
54. Riekenberg, S. *et al.* The beta-N-acetylhexosaminidase of *Entamoeba histolytica* is composed of two homologous chains and has been localized to cytoplasmic granules. *Molecular and biochemical parasitology* **138**, 217–225 (2004).
55. Faust, D. M. & Guillen, N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection* **14**, 1428–1441 (2012).
56. Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
57. Gilchrist, C. A. *et al.* A Multilocus Sequence Typing System (MLST) reveals a high level of diversity and a genetic component to *Entamoeba histolytica* virulence. *BMC Microbiol.* **12**, 151 (2012).

58. Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H. & Nozaki, T. Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitology International* **59**, 75–81 (2010).
59. Clark, C. G. *et al.* New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**, 2235–2239 (2006).
60. McClintock, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* **26**, 234–282 (1941).
61. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology* **239**, 197–201 (1972).
62. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **25**, 585–621 (1961).
63. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology* **41**, 181–190 (1973).
64. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–413 (1985).
65. Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154–157 (1984).
66. Blackburn, E. H. Telomeres. *Cell* **77**, 621–623 (1994).
67. Palm, W. & Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics* **42**, 301–334 (2008).
68. Meyne, J., Ratliff, R. L. & Moyzis, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 7049–7053 (1989).
69. Krtolica, A. & Campisi, J. Cancer and aging. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**, 1401–1414 (2002).
70. Campisi, J. Aging, tumor suppression and cancer. *Mechanisms of ageing and development* **126**, 51–58 (2005).
71. Watson, J. M. & Riha, K. Comparative biology of telomeres. *FEBS letters* **584**, 3752–3759 (2010).
72. Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M. & Dontsova, O. A. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry Moscow* **75**, 1563–1583 (2010).
73. Eun, H.-M. DNA Polymerases. in *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* 345–489 (Elsevier, 1996). doi:10.1016/b978-012243740-3/50009-0.

74. Clark, D. P. & Pazdernik, N. J. DNA Synthesis In Vivo and In Vitro. in *Biotechnology* 97–130 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/b978-0-12-385015-7.00004-1.
75. Tan, R. & Lan, L. Guarding chromosomes from oxidative DNA damage to the very end. *Acta Biochim Biophys Sin* **48**, 617–622 (2016).
76. Court, R., Chapman, L., Fairall, L. & Rhodes, D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep.* **6**, 39–45 (2005).
77. Zellinger, B. & Riha, K. Composition of plant telomeres. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1769**, 399–409 (2007).
78. Koliada, A. K., Krasnenkov, D. S. & Vaiserman, A. M. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? *Front. Genet.* **6**, (2015).
79. Oganessian, L. & Karlseder, J. Telomeric armor: the layers of end protection. *J. Cell. Sci.* **122**, 4013–4025 (2009).
80. Zeiger, A. M. *et al.* Genetic Determinants of Telomere Length in African American Youth. *Sci Rep* **8**, 13265 (2018).
81. Blackburn, E. H., Epel, E. S. & Lin, J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* **350**, 1193–1198 (2015).
82. Lira, C. B. B. *et al.* LaTBP1: A *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates in vivo with telomeres and GT-rich DNA using a Myb-like domain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**, 399–409 (2007).
83. Kwok, C. K. & Merrick, C. J. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends in Biotechnology* **35**, 997–1013 (2017).
84. Gomez, D. E. *et al.* Telomere structure and telomerase in health and disease. *International Journal of Oncology* **41**, 1561–1569 (2012).
85. Rhodes, D., Fairall, L., Simonsson, T., Court, R. & Chapman, L. Telomere architecture. *EMBO Rep* **3**, 1139–1145 (2002).
86. Hewitt, G. *et al.* Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* **3**, 708 (2012).
87. Fumagalli, M. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* **14**, 355–365 (2012).
88. Behravan, E. *et al.* Telomere shortening associated with increased levels of oxidative stress in sulfur mustard-exposed Iranian veterans. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **834**, 1–5 (2018).

89. Casas-Vila, N., Scheibe, M., Freiwald, A., Kappei, D. & Butter, F. Identification of TTAGGG-binding proteins in *Neurospora crassa*, a fungus with vertebrate-like telomere repeats. *BMC Genomics* **16**, 965 (2015).
90. de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* **19**, 2100–2110 (2005).
91. Bandaria, J. N., Qin, P., Berk, V., Chu, S. & Yildiz, A. Shelterin Protects Chromosome Ends by Compacting Telomeric Chromatin. *Cell* **164**, 735–746 (2016).
92. Xin, H., Liu, D. & Songyang, Z. The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol* **9**, 232 (2008).
93. O'Connor, M. S., Safari, A., Xin, H., Liu, D. & Songyang, Z. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 11874–11879 (2006).
94. Rajavel, M., Mullins, M. R. & Taylor, D. J. Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1844**, 1550–1559 (2014).
95. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* **17**, 1195–1214 (2003).
96. Fouquerel, E. *et al.* Targeted and Persistent 8-Oxoguanine Base Damage at Telomeres Promotes Telomere Loss and Crisis. *Molecular Cell* **75**, 117-130.e6 (2019).
97. Rochette, P. J. *et al.* UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2786–2794 (2003).
98. Barnes, R. P., Fouquerel, E. & Opresko, P. L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of Ageing and Development* **177**, 37–45 (2019).
99. Lustig, A. *et al.* Long term effects of radiation exposure on telomere lengths of leukocytes and its associated biomarkers among atomic-bomb survivors. *Oncotarget* **7**, (2016).
100. Aiub, C. A. F., Mazzei, J. L., Pinto, L. F. R. & Felzenszwalb, I. Participation of BER and NER pathways in the repair of DNA lesions induced at low N-nitrosodiethylamine concentrations. *Toxicology Letters* **154**, 133–142 (2004).
101. Redrejo-Rodríguez, M. *et al.* New Insights in the Removal of the Hydantoin, Oxidation Product of Pyrimidines, via the Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways. *PLoS ONE* **6**, e21039 (2011).

102. Chinyengetere, F. & Jamieson, E. R. Impact of the Oxidized Guanine Lesion Spiroiminodihydantoin on the Conformation and Thermodynamic Stability of a 15-mer DNA Duplex [†]. *Biochemistry* **47**, 2584–2591 (2008).
103. White, B., Tarun, M. C., Gathergood, N., Rusling, J. F. & Smyth, M. R. Oxidised guanidinohydantoin (Gh^{ox}) and spiroiminodihydantoin (Sp) are major products of iron- and copper-mediated 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine oxidation. *Mol. BioSyst.* **1**, 373–381 (2005).
104. Ozturk, N. Phylogenetic and Functional Classification of the Photolyase/Cryptochrome Family. *Photochem Photobiol* **93**, 104–111 (2017).
105. Kumar, P., Swain, M. M. & Pal, A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **73**, 82–98 (2016).
106. Olivieri, F. *et al.* DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflamma-miRNAs on the stage of inflamm-aging. *Oncotarget* **6**, (2015).
107. Hanaoka, S., Nagadoi, A. & Nishimura, Y. Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. *Protein Science* **14**, 119–130 (2009).
108. Diotti, R. & Loayza, D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* **2**, 119–135 (2011).
109. M.Stansel, R. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO Journal* **20**, 5532–5540 (2001).
110. Muraki, K., Nyhan, K., Han, L. & Murnane, J. P. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front. Oncol.* **2**, (2012).
111. Chen, L.-Y., Liu, D. & Songyang, Z. Telomere Maintenance through Spatial Control of Telomeric Proteins. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 5898–5909 (2007).
112. Erdel, F. *et al.* Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. *Cell Reports* **18**, 41–53 (2017).
113. Wai, L. K. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review. *MedGenMed* **6**, 19 (2004).
114. Willhoeft, U. & Tannich, E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **99**, 41–53 (1999).
115. Clark, C. G. *et al.* Structure and Content of the *Entamoeba histolytica* Genome. in *Advances in Parasitology Volume 65* vol. 65 51–190 (Elsevier, 2007).

116. Clark, C. G., Ali, I. K. M., Zaki, M., Loftus, B. J. & Hall, N. Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology* **146**, 24–29 (2006).
117. Weedall, G. D. & Hall, N. Evolutionary genomics of *Entamoeba*. *Research in microbiology* **162**, 637–645 (2011).
118. Willhoeft, U., Hamann, L. & Tannich, E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infection and immunity* **67**, 5925–5929 (1999).
119. Ali, I. K. M. *et al.* Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 285–289 (2007).
120. Lorenzi, H. *et al.* Genome wide survey, discovery and evolution of repetitive elements in three *Entamoeba* species. *BMC genomics* **9**, 595 (2008).
121. Pritham, E. J., Feschotte, C. & Wessler, S. R. Unexpected diversity and differential success of DNA transposons in four species of *Entamoeba* protozoans. *Molecular biology and evolution* **22**, 1751–1763 (2005).
122. Ali, I. K. M., Zaki, M. & Clark, C. G. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5842–5847 (2005).
123. Borbolla-Vázquez, J., Orozco, E., Betanzos, A. & Rodríguez, M. A. *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasites Vectors* **8**, 219 (2015).
124. Foda, B. M. & Singh, U. Dimethylated H3K27 Is a Repressive Epigenetic Histone Mark in the Protist *Entamoeba histolytica* and Is Significantly Enriched in Genes Silenced via the RNAi Pathway. *J. Biol. Chem.* **290**, 21114–21130 (2015).
125. Meneses, E. *et al.* The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* **455**, 32–42 (2010).
126. Rendón-Gandarilla, F. J. *et al.* Telomeric Repeat-Binding Factor Homologs in *Entamoeba histolytica*: New Clues for Telomeric Research. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 341 (2018).
127. Azuara-Liceaga, E. *et al.* The Sole DNA Ligase in *Entamoeba histolytica* Is a High-Fidelity DNA Ligase Involved in DNA Damage Repair. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 214 (2018).
128. Diamond, L. S., Harlow, D. R. & Cunnick, C. C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 431–432 (1978).

129. Lezin, G., Kosaka, Y., Yost, H. J., Kuehn, M. R. & Brunelli, L. A One-Step Miniprep for the Isolation of Plasmid DNA and Lambda Phage Particles. *PLoS ONE* **6**, e23457 (2011).
130. Nagata, Y. *et al.* Quantification of picogram levels of specific DNA immobilized in microtiter wells. *FEBS Letters* **183**, 379–382 (1985).
131. López-Casamichana, M., Orozco, E., Marchat, L. A. & López-Camarillo, C. Transcriptional profile of the homologous recombination machinery and characterization of the EhRAD51 recombinase in response to DNA damage in *Entamoeba histolytica*. *BMC Molecular Biol* **9**, 35 (2008).
132. Struthers, L., Patel, R., Clark, J. & Thomas, S. Direct Detection of 8-Oxodeoxyguanosine and 8-Oxoguanine by Avidin and Its Analogues. *Analytical Biochemistry* **255**, 20–31 (1998).
133. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M. & Nozaki, T. Rab5-associated Vacuoles Play a Unique Role in Phagocytosis of the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **279**, 49497–49507 (2004).
134. Morf, L., Pearson, R. J., Wang, A. S. & Singh, U. Robust gene silencing mediated by antisense small RNAs in the pathogenic protist *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Research* **41**, 9424–9437 (2013).
135. Lorenzi, H. A. *et al.* New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS neglected tropical diseases* **4**, e716 (2010).
136. Tawari, B. *et al.* Patterns of Evolution in the Unique tRNA Gene Arrays of the Genus *Entamoeba*. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 187–198 (2007).
137. Zomerdijk, J. C. B. M., Kieft, R. & Borst, P. A ribosomal RNA gene promoter at the telomere of a mini-chromosome in *Trypanosoma brucei*. *Nucl Acids Res* **20**, 2725–2734 (1992).
138. Rodriguez-Centeno, J., Manguán-García, C., Perona, R. & Sastre, L. Structure of *Dictyostelium discoideum* telomeres. Analysis of possible replication mechanisms. *PLoS ONE* **14**, e0222909 (2019).
139. Scherf, A. Plasmodium telomeres: a pathogen's perspective. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 409–414 (2001).
140. Pastor-Palacios, G., Azuara-Liceaga, E. & Brieba, L. G. A Nuclear Family A DNA Polymerase from *Entamoeba histolytica* Bypasses Thymine Glycol. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e786 (2010).
141. Conte, F. F. & Cano, M. I. N. Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *International Journal for Parasitology* **35**, 1435–1443 (2005).

142. Lustig, A. J. Hypothesis: Paralog Formation from Progenitor Proteins and Paralog Mutagenesis Spur the Rapid Evolution of Telomere Binding Proteins. *Front. Genet.* **7**, (2016).
143. Lane, M. D. & Seelig, B. Advances in the directed evolution of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* **22**, 129–136 (2014).
144. Abhyankar, M. M. *et al.* Characterization of an *Entamoeba histolytica* High-Mobility-Group Box Protein Induced during Intestinal Infection. *Eukaryotic Cell* **7**, 1565–1572 (2008).
145. Jia, J., Zhang, L., Liu, Z., Xiao, X. & Chou, K.-C. pSumo-CD: predicting sumoylation sites in proteins with covariance discriminant algorithm by incorporating sequence-coupled effects into general PseAAC. *Bioinformatics* **32**, 3133–3141 (2016).
146. Audagnotto, M. & Dal Peraro, M. Protein post-translational modifications: In silico prediction tools and molecular modeling. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **15**, 307–319 (2017).
147. Zhao, J. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 3017–3033 (2007).
148. Mitchell, T. R. H., Glenfield, K., Jeyanthan, K. & Zhu, X.-D. Arginine Methylation Regulates Telomere Length and Stability. *MCB* **29**, 4918–4934 (2009).
149. Cain, J. A., Solis, N. & Cordwell, S. J. Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics* **97**, 265–286 (2014).
150. Nera, B., Huang, H.-S., Lai, T. & Xu, L. Elevated levels of TRF2 induce telomeric ultrafine anaphase bridges and rapid telomere deletions. *Nat Commun* **6**, 10132 (2015).
151. Smogorzewska, A. *et al.* Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1659–1668 (2000).
152. van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* **92**, 401–413 (1998).
153. Morgan, R. G. *et al.* Induced Trf2 deletion leads to aging vascular phenotype in mice associated with arterial telomere uncapping, senescence signaling, and oxidative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **127**, 74–82 (2019).
154. Sun, L. *et al.* Targeted DNA damage at individual telomeres disrupts their integrity and triggers cell death. *Nucleic Acids Res* **43**, 6334–6347 (2015).
155. Coluzzi, E., Leone, S. & Sgura, A. Oxidative Stress Induces Telomere Dysfunction and Senescence by Replication Fork Arrest. *Cells* **8**, 19 (2019).

156. Nandi, N. *et al.* Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology* **156**, 1926–1941 (2010).
157. Elias, R. J., McClements, D. J. & Decker, E. A. Antioxidant Activity of Cysteine, Tryptophan, and Methionine Residues in Continuous Phase β -Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 10248–10253 (2005).
158. Ezeriņa, D., Takano, Y., Hanaoka, K., Urano, Y. & Dick, T. P. N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H₂S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chemical Biology* **25**, 447-459.e4 (2018).
159. Kerksick, C. & Willoughby, D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *J Int Soc Sports Nutr* **2**, 38 (2005).
160. Kim, J.-H., Jang, H.-J., Cho, W.-Y., Yeon, S.-J. & Lee, C.-H. In vitro antioxidant actions of sulfur-containing amino acids. *Arabian Journal of Chemistry* **13**, 1678–1684 (2020).
161. Crabbe, L., Cesare, A. J., Kasuboski, J. M., Fitzpatrick, J. A. J. & Karlseder, J. Human Telomeres Are Tethered to the Nuclear Envelope during Postmitotic Nuclear Assembly. *Cell Reports* **2**, 1521–1529 (2012).
162. Wood, A. M. *et al.* TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nat Commun* **5**, 5467 (2014).

15 Anexo

Medio de Cultivo para <i>E. histolytica</i> & <i>E. dispar</i> .			Buffer Fosfato Salino †.		Medio TYI-S33	
Medio TYI-S33.			PBS		Oxidante	
Sal	Cbp. 1 Litro*.	Cbp. 4 Litros*.	Sal	Cbp. 1Litro*	Componentes.	Cbp 6mL.
Biosate.	34.48 gr.	137.92 gr.	NaCl.	80 gr.	Medio TYI-S33	5,9984
Glucosa Anhidro.	10.45 gr.	41.83 gr.	KCL.	2 gr.	basal.	mL.
NaCl.	2.29 gr.	9.19 gr.	Na ₂ HPO ₄	14.4 gr.	H ₂ O ₂ (Sigma).	1,6 µl †.
KH ₂ PO ₄ .	0.69 gr.	2.76 gr.	KH ₂ PO ₄	2.4 gr.		
K ₂ HPO ₄ .	1.14 gr.	4.59 gr.			† para una concentración de [0.4mM]	
L(+) Ascórbico.	0.28 gr.	1.149 gr.	† [10 x]			
L(-) Cisteína.	1.435 gr.	5.74 gr.	*Ajustar a pH 6.8 para lavados de cultivos celulares y a 7.4 para lavados experimentales.			
Citrato Férrico †.	0.028 gr.	0.114 gr.				
*Ajustar a pH 6.8, filtrar con membrana de 0.45 µm, alícuotar, esterilizar mediante autoclave, cubrir las alícuotas con papel aluminio y guardar a -20° C hasta su uso. † Pesar con sumo cuidado						

Medio de Cultivo para <i>Escherichia coli</i> .					
Medio LB †.		Medio LB-Agar †.		Ampicilina	
Sal	Cbp. 1 Litro*.	Sal	Cbp. 1 Litro*.	Stock	Solución de
Peptona.	10 gr.	Peptona.	10 gr.	[50 mg/mL]	trabajo.
Extracto de Levadura.	5 gr.	Extracto de Levadura.	5 gr.		[50-125 µg/mL]
NaCl.	5 gr.	NaCl.	5 gr.		en agua. Estévil.
		Agar.	1.2%		

* Alicuotar en volúmenes apropiados para un solo uso y esterilizar mediante autoclave.

† Se agregó ampicilina [100 µg/mL] una vez que el medio estuviera a 37° C para hacer el medio selectivo.

Extracción de pDNA.			
Buffer Extracción.			
Sal.	Stock.	Cbp 50 mL.	Concentración Final.
Sucrosa.	5%.	2.5 gr.	5%.
EDTA.	[0.5 M].	4.0 mL.	[20-50 mM].
Tris †.	[1.5 M].	1.67 mL.	[50 mM].
NH ₄ Cl.	[1 M].	37.5 mL.	[750 mM]
Tritón.	[X100].	250 µl.	0.5%.
CaCl.	[1 M].	2 mL.	[20-50 mM].
Lisozima.	[0.1 gr/mL]	50 µl	[100 µg/mL].
RNasa A.	[1 gr/mL]	1.25 µl	[25 µg/mL].

† Ajustar a pH 8.0

Electroforesis para Ácidos Nucléicos.			
Buffer TBE		Buffer TAE	
Sal	Cbp. 1 Litro*.	Sal	Cbp. 1 Litro*.
Tris Base.	108 gr.	Tris Base.	48.4 gr.
Ácido Bórico.	55 gr.	Na ₂ EDTA•(2H ₂ O).	7.44 gr.
EDTA †	40 mL.	Ácido Acético Glacial.	10.34 mL.

*[10x]. † pH 8.0, [0.5M]

Restricción de pDNA.			
Sal †.	Stock.	Cbp 50 µl.*	Cf.
Agua Libre de Nucleasas.	-	Cbp 49 µl.	-
Buffer CutSmart.	[10x]	5 µl.	[1x].
BSA.	12 mg.	1 µl.	[0.1 µg/µl].
Enzima	200U/ µl.	1 µl.	10 U
pDNA	[1 µg].	Cbp [1 µg].	20 ng.

*Cbp necesario para 1 reacción. † Adicionar los componentes en este orden estricto.

Diálisis de Proteína.		
Buffer de Recambio.		
Sal.	Stock.	Cbp 1 litro.
Tris-HCL †	[25 mM]	3.94 gr.
NaCl	[30 mM]	1.75 gr

† pH 7.5

Reacción para la Secuenciación de DNA.			
Componentes †.	Stock.	Cbp 20 µl.*	Concentración Final.
Agua Libre de Nucleasas.	-	Cbp 20 µl.	-
Oligonucleótidos Específicos.	[100 nM]	1 µl.	[1x].
DNA	[500 ng-1ug].	Cbp [500 ng].	20 ng.
Buffer de secuenciación BigDye TM Terminator v1.1.	[5x]	2 µl	[0.5x].
BigDye TM Terminator v3.1 Ready Rection	-	4 µl.	-

*Cbp necesario para 1 reacción. † Adicionar los componentes en este orden estricto.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).								
Buffer de Unión de DNA.				Buffer de Bloqueo de DNA.			Buffer TE-100*	
Componente.	Stock	Cbp 50 µl.	Cf.	Sal	Cf.	Cbp 200 µl**	Sal	Cbp 200 µl**.
dsDNA	-	[25 µg]	[500 ng/µl]	BSA	3%	6 µg.	TrisHCL	10 mM.
PBS †.	-	Cbp 50 µl.	-	Tween 20	0.5%	1 µg.	EDTA †	100 mM.
MgCl ₂	[1 M]	5 µl.	[0.1 M]	PBS †.	Cbp 100 µl	Cbp 100 µl	† pH8.0	
† [1x].				*Cbp/pozo.			*Se emplea para PFGE.	

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).								
BDG.			Espermidina		Buffer Binding		Buffer de Bloqueo de Proteína.	
Componente.	C. f	Cbp	Componente.	C. f	Sal	Cbp 20 µl*.	Componente.	Cbp 200 µl*.
Hepes	[24 mM]		Espermidina	[1mM]	Buffer BDG [2X]	10 µl.	Leche descremada.	2%
Glicerol	20%				Espermidina	4 µl.	Tween 20	0.5%
EDTA	[0.1mM]				Proteína	Cbp [1.5 µg]	† [1x]	
MgCl ₂	[8mM]							
KCl	[20mM]							
DTT	[2mM]							
					*Cbp/pozo			

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).				
Buffer de Ab.			Buffer de Citratos †	
Sal.	Cbp 5 mL.	Cbp 3 mL.	Sal	Cbp 50mL*
BSA.* / Leche descremada † .	1%.*	2,5%. †	Na ₂ HPO ₄	[0.2 M].
Tween 20	0,1%	0,1%	Ácido Cítrico	[0.1 M].
PBS ‡	Cbp 5 mL.	Cbp 3 mL.	*Ajustar pH a 5.0	
Ab primario		Ab Secundario		† Inmediatamente antes de su uso agregar 40 µl de H ₂ O ₂ al 30% por cada 100 mL de [0.05 M] de Buffer de Citratos.
α -His. (1:5000)	α -EhTRF like III. (1:5000)	α -IgG-HRP. (1:3000)		
‡ 1X				

Reacción RT-PCR.			
Componentes † .	RT; Cbp 1 Rxn.	PCR, Cbp 1 Rxn.*	Concentración Final.
Agua DEPC.	Cbp 12 µl ¹ / 1 µl ² .	Cbp 50 µl.	-
Mezcla de dNTPs [10mM].	2 µl.	1 µl.	[1.6 mM] ¹ , [0.2 mM] ² .
Oligonucleótidos [10 µM] (Fw/Rv).	1 µl.	1 µl.	[0.8 µM] ¹ , [0.2 µM] ²
RNA libre de DNA	[500 ng]	-	-
Buffer de Síntesis de cDNA [5x].	4 µl.	-	[1x]
DTT [0,1 M].	1 µl.	-	[5 mM].
RNase OUT [40 U/µl].	1 µl.	-	[2 U/µl].
ThermoScript™ RT [15 U/µl].	1 µl.	-	[0.75 U/µl].
RNase H	1 µl.	-	-
cDNA	-	2,1 µl.	-
MgCl ₂ [25.0mM].	-	1 µl.	[80 nM].
Buffer GoTaq [5x].	-	5 µl.	[0.5x]
Taq Polimerasa.	-	1 µl.	-

1 Cbp para la desnaturalización, 2 Cbp para la mezcla de la reacción *Se emplea agua inyectable. † Adicionar los componentes en este orden estricto.

Extracción de Proteínas TRIzol Reagent.			
Buffer de Lavado † .		Buffer de Resuspensión † .	
Sal.	Cbp 10 mL.	Sal.	Cbp 10 mL.
Hidrocloruro de Guanidina.	[0.3 M]	SDS.	0.1 gr (1%)
Etanol Grado Biología Molecular	9.5 mL (95%)	Lauril Sarcosinato de Sodio.*	[62.5 mM]
† No se requiere de filtración.		*Ajustar pH 8.0-8.8.	

Separación de Proteínas por Electroforesis SDS-page de Una Dimensión.					
30% Acrilamida/0.8% bisacrilamida.		[4x] Tris-CL/SDS pH6.8.		[4x] Tris-CL/SDS pH8.8.	
Sal	Cbp. 100ml*	Sal	Cbp. 100ml. †	Sal	Cbp. 500ml. ‡
Acrilamida.	30 gr.	Tris Base.	6.05 gr [0.5 M].	Tris Base	91 gr [1.5 M].
N,N'metilenobisacrilamida.	0.8 gr.	SDS.	0.4 gr (0.4%).	SDS	2 gr (0.4%).
*Filtrar la solución con una membrana de 0.45 µm y almacenar a 4° C en oscuridad. El reactivo debe desecharse después de 30 días ya que la acrilamida se hidroliza gradualmente a ácido acético y amonio.		† Ajustar el pH a 6.8, filtrar la solución con una membrana de 0.45 y adicionar el SDS. El reactivo se debe almacenar a 4° C y desecharse después de 30 días.		‡ Ajustar el pH a 8.8, filtrar la solución con una membrana de 0.45 y adicionar el SDS. El reactivo se debe almacenar a 4° C y desecharse después de 30 días.	

Separación de Proteínas por Electroforesis SDS-page de Una Dimensión.										
Gel Separador Desnaturalizante*.										
Stock.	Concentración Final de Acrilamida en el gel separador (%).									
	5	6	7	7.5	8	9	10	12	13	15
30% Acrilamida/0.8% bisacrilamida (mL).	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50
[4x] Tris-CL/SDS. †	3.75									
H2O (mL).	8.75	8.25	7.75	7.50	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75
10% (p/v) Persulfato de Amonio.	50 µl.									
TEMED.	10 µl.									
						*Cbp 2 geles.		† Ajustar a pH 8.8		

Separación de Proteínas por Electroforesis SDS-page de Una Dimensión.			
Gel Concentrador Desnaturalizante.		Porcentaje de Resolución de Acrilamida.	
Stock	Cbp 2 geles.	Porcentaje	Resolución
30% Acrilamida/0.8% bisacrilamida.	650 µl	5-7.	29-150 kDa.
[4x] Tris-CL/SDS. †	1.25 mL.	8-10.	14-66 kDa.
H ₂ O.	3.05 mL	13-15.	<36 kDa.
10% (p/v) Persulfato de Amonio.	25 µl.	18-20.	<20 kDa.
TEMED.	5 µl.		

† Ajustar a pH 8.8

Electroforesis de Proteínas.			
Buffer de Corrida.		Buffer de Carga.	
Sal.	Cbp 1 L.*	Sal.	Cbp 5 mL.*
Tris Base.	30,2 gr.	Tris HCl. †	0,6 [1M].
Glicina.	144 gr.	Glicerol.	50%.
SDS.	10 gr.	SDS.	10%.
		2-β Mercaptoetanol.	0,5 mL.
		Azul de Bromofenol.	1%

† pH 6.8 *[10x]

Electroforesis de Proteínas.				
Tinción del Gel.				
Azul de Coomasie. †		Buffer Desteñidora.	Rápida.	Lenta.
Componente.	Cbp 1 L.*	Componente.	Cbp 1 L.*	Cbp 1 L.*
Metanol.	90%.	Ácido Acético Glacial.	10%.	10%
Azul de Coomasie.	0,25%.	Metanol.	50%.	5%
Ácido Acético Glacial.	10%.			

† Tiempo Mínimo de Tinción 1 hora Máximo de Tinción 2 horas.

*Filtrar con un papel Whatman N° 1 y dejar agitando toda la noche protegido de la luz o dejar en reposo una semana antes de usar.

Inmunodetección (Western Blot).					
Buffer de Transferencia.		Buffer de Bloqueo.		Buffer de Lavado.	
Sal.	Cbp 1 L.	Sal.	Cbp 50 mL.	Componente.	Cbp 1 L.
Tris Base.	3,03 gr. (0,3%).	PBS.*	47,4 mL (99,9%).	PBS	999 mL. (99,9%).
Glicina.	14,41 gr. (1,4%).	Tween 20	100 µl (0.1%).	Tween 20.	1 mL. (0,1%)
Metanol	200 mL. (20%).	Leche descremada	2,5 gr.(5%).		

Inmunodetección (Western Blot).		
Buffer de Ab.		
Componente.	Cbp Ab primario.	Cbp 5 mL.
BSA.* / Leche descremada †	1%.*	2,5%. †
Tween 20	0,1%	0,1%
PBS ‡	Cbp Ab primario.	Cbp 5 mL.
Ab primario		Ab Secundario
α -PCNA.	α -EhTRF like III.	α -IgG-HRP.
1:3000	1:7500	1:5000
*Ab primario. † Anticuerpo Secundario. ‡ [1x]		

Inmunofluorescencia.					
Buffer de Lavado. †		RNasa A. †		Buffer de NH ₄ Cl †	
Componente	Cbp 1 L.	Componente	Cbp 50 mL.	Componente.	Cbp 50 mL.
PBS ‡.	Cbp 1 L.	RNasa A.	[100 µg/mL].	NH ₄ Cl.	[50mM].
		PBS. ‡	Cbp 50 mL.	PBS. ‡	Cbp 50 mL.

† Filtrar con membrana de 0.22 µm en campana de flujo laminar. ‡ [1x]

Inmunofluorescencia.					
Buffer de Bloqueo. †		Avidina-FITC. †		Buffer de Ab-Primario. †	
Componente	Cbp 100 mL.	Componente	Cbp 50 µl.*	Componente.	Cbp 100 µl.*
PBS ‡.	99 mL.	Buffer de Bloqueo.	49 µl.	Buffer de Bloqueo.	99 µl.
BSA	1 g	Avidina-FITC.	1:50.	α -EhTRF like III.	1:100.

† Filtrar con membrana de 0.22 µm en campana de flujo laminar. ‡ [1x] *Para un cubreobjetos

Inmunofluorescencia.	
Buffer de Ab-Secundario. †	
Componente.	Cbp 100 µl.*
Buffer de Bloqueo.	Cbp 100 µl.
α -IgG-conejo-Alexa-546	1:100.

† Filtrar con membrana de 0.22 µm en campana de flujo laminar.
*Para un cubreobjetos

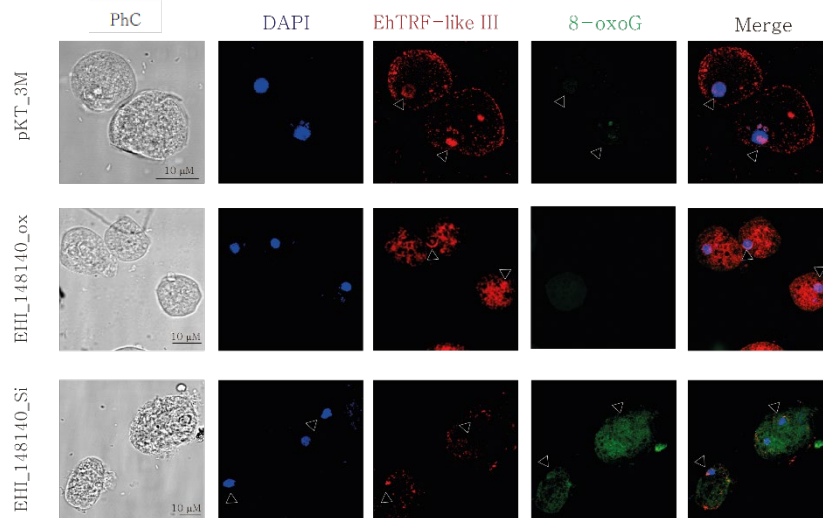


Figura S1. Localización del aducto 8-oxoG y de la proteína EhTRF-like III en trofozoitos transfectados y empleados como control para H₂O₂. Trofozoitos transfectados y empleados como control de H₂O₂, se sometieron a inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo anti-EhTRF-like III acoplado a Alexa-546 (rojo). Adicionalmente, la formación del aducto se detectó con avidina-FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoitos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: micronúcleos.

FITC (verde). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (azul). La morfología de los trofozoitos se observó mediante campo claro (PhC). Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal. Cabezas de flecha: micronúcleos.

15.1 Electroforesis en campos pulsados

15.1.1 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae fue cultivada en condiciones de esterilidad en medio YPG. A partir de un vial se inocularon 50 mL de medio líquido y se dejó creciendo ON a 37° C con agitación constante (200 rpm en una incubadora (New Brunswick Scientific), se preservó el vial en placas con YPG-Agar incubadas ON a 37° C. El cultivo fue detenido en fase logarítmica (O.D 0.1-0.5) y se empastillaron por centrifugación a 19,000 RCF durante 5 minutos a 4° C, al concluir el programa de centrifugación se decantó el sobrenadante y se prosiguió con el protocolo para inmovilizar DNA en mini bloques de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) para emplearlos en el protocolo de electroforesis en campos pulsados (PFGE).

15.1.1 Inmovilización de DNA para PFGE.

Para determinar un patrón de corrimiento específico en *E. histolytica* se empleó PFGE. Para ello 6x10⁷ trofozoitos de *E. histolytica* posterior al tratamiento fueron cosechados e incubados en solución hipertónica [0.5M NaCl; 0.05M EDTA; 0.01M Tris; pH7.0] durante 5 minutos al concluir la incubación se cosecharon los trofozoitos y estos se inmovilizaron en agarosa LMA, de acuerdo a la regla 1x10⁸ células por cada 1mL de agarosa LMA al 2% disuelta en solución hipertónica + 125mM EDTA, la mezcla trofozoitos-agarosa LMA se dejó solidificar en moldes y al concluir el procedimiento se cortaron minibloques los cuales se dejaron en solución de tratamiento NDSU [0.01M Tris; 0.1M EDTA; 4mM Urea, pH9.5] (20 minibloques/10mL) a 45° C ON.

Posteriormente se retiró la solución de tratamiento y lavaron los minibloques con agua estéril, al concluir este primer lavado se prosiguió a incubar 2 veces los minibloques con solución de diálisis TE-100 [10mM Tris; 100mM EDTA, pH8.0](20 minibloques/10mL) a 45° C durante 30 minutos. Los minibloques se mantuvieron en solución de diálisis hasta su uso. Los minibloques fueron resueltos en Buffer TBE 0.5X a 20° C un gel de agarosa al 1.5% disuelta en TBE 0.5X, bajo los siguientes parámetros de corrida 180 pulsos de 40 segundos cada uno.

15.2 Resultados.

Se pudo determinar que bajo las condiciones descritas previamente se obtuvo un patrón de corrimiento electroforético característico para *E.histolytica* (Fig. S2), en dicho corrimiento electroforético se observaron 14 bandas de alta talla molecular las cuales se encuentran entre 0.3 Mb y 1.9 Mb (Fig. S1A). Este patrón se vio modificado cuando los trofozoitos de *E. histolytica* fueron sometidos a tratamiento con estrés oxidativo con 5 mM de H₂O₂ encontrándose que gran parte del DNA de los trofozoitos de *E. histolytica* no fue capaz de resolverse, probablemente por rupturas de cadena sencilla provocadas por el tratamiento, así mismo se observó que el DNA que se resolvió se encontró con tallas menores a 0.3 mb, las cuales podrían ser cromosomas de menor talla o bien fragmentos aleatorios del genoma (Fig. S1B).

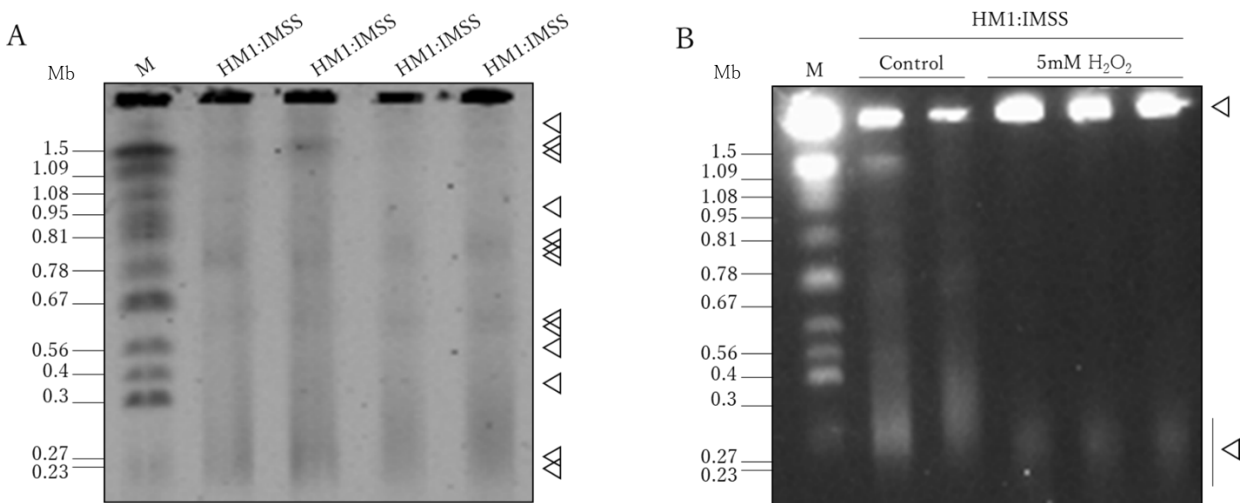


Figura S2. "Fingerprint" de *E. histolytica*. A) Patrón de corrimiento para *E. histolytica* en el cual se observan 13 bandas 4 de las cuales se encuentran en regiones de alta compactación. B) Trofozoitos de *E. histolytica* tratados con 5mM de H₂O₂ en donde se observa como gran parte del genoma no logró salir del minibloque (flecha superior) y se observa solo bandas un una zona de baja compactación (flecha inferior), M marcador de talla molecular de *Saccharomyces cerevisiae*.