

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

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis de la expresión de los genes regulados
por EhMybS3 en *Entamoeba histolytica***

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A :

LANDY MARLENE ROJAS AVILÉS

DIRECTORA: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

CODIRECTORA: Dra. Elizabeth Jaqueline Castañeda Ortiz

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, junio de 2024

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

Presidenta: Dra. Silvia Castellanos Castro

Secretaria: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Vocal: Dra. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

Directora

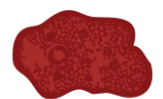
Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Codirectora

Dra. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz

Universidad Autónoma de la Ciudad de México



Entamoeba histolytica

LECTORES DE TESIS

Dra. Lilia López Cánovas

Posgrado en Ciencias Genómicas

UACM

Dra. Ángeles Tecalco Cruz

Posgrado en Ciencias Genómicas

UACM

Dra. Silvia Castellanos Castro

Academia de Biología

UACM



Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del posgrado en Ciencias Genómicas en el plantel del Valle de la UACM bajo la dirección de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga en codirección con la Dra. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz. Este trabajo forma parte del proyecto “*Control co-transcripcional de genes relacionados a la virulencia y el enquistamiento de Entamoeba*” (CF-2019-194163), aprobado en la convocatoria Ciencia de Frontera 2019.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por brindarme la oportunidad de concluir satisfactoriamente mis estudios académicos y permitirme elaborar mi tesis.

A la Dra. Elisa I. Azuara Liceaga por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio de investigación. Por su dedicación, paciencia y enseñanza, ya que sin su ayuda no hubiese logrado llegar hasta aquí. Su apoyo y orientación incondicional han sido fundamentales para el éxito de este proyecto.

A la Dra. Elizabeth J. Castañeda por su apoyo en los experimentos, orientación experta y paciencia incondicional a lo largo de este proceso. Sus valiosos comentarios y sugerencias han sido cruciales para dar forma y mejorar este trabajo. Asimismo, agradezco por los buenos momentos y risas compartidas.

A la Dra. Patricia Cuellar Silva por su apoyo en los experimentos y por sus consejos constructivos, ya que fueron esenciales para mi tesis, así como todos los momentos divertidos que pasamos en el laboratorio.

A la Dra. Abigail Betanzos Fernández del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular por su ayuda en la observación de las muestras por medio de microscopía confocal e interpretación de resultados.

Al M. en C. Carlos Ernesto Martínez Rodríguez-Academia de Matemáticas CCyT UACM por su ayuda en los análisis *in silico* e interpretación de resultados.



A mis amigos y compañeros de laboratorio por los trabajos realizados en conjunto, los momentos y risas compartidas.

A mis padres por su amor, apoyo y comprensión. Todo este esfuerzo es gracias a ustedes.

A mis hermanos Luis, Mariana, Dania, Brenda y Karina, por impulsarme a perseguir mis metas y nunca abandonarlas.

A mis sobrinos Felipe, Fernanda, Donovan e Ivanna, por ser mi mayor motivación para seguir adelante y enseñarme lo bonita que es la vida.

A Enrique Villalobos y Viridiana Castañeda por sus ocurrencias y apoyo incondicional.

A Josué Moctezuma por tu comprensión, por animarme a seguir adelante y por estar en los momentos buenos y malos.

A mi gatita bigotes, a Tomito y a Alpha por acompañarme en las noches de desvelo y darme tanto amor.



DEDICATORIA

A mis queridos padres,

A lo largo de mi vida, me han guiado con amor, han sido mi ejemplo de dedicación y han compartido conmigo las alegrías y los desafíos que la vida me ha presentado.

Mamá, Alejandra Marcela Avilés Hernández, tu paciencia infinita y tus palabras de ánimo han sido mi luz en los momentos oscuros. Gracias a ti, sé que los sueños sí se cumplen, siempre y cuando me aferre a ellos y nunca me rinda. Eres mi motivo para seguir adelante luchando, siempre serás mi mayor inspiración y mi mayor apoyo. Dedico esta tesis a ti, no solo como símbolo de mi agradecimiento, sino también como un testimonio del impacto profundo que has tenido en mi vida y mi educación. Te amo infinitamente, mamá.

Papá, Mario Rojas Flores, siempre fuiste una persona trabajadora que nunca se dio por vencido, gracias por ser mi guía y mi ejemplo para seguir. Gracias por enseñarme que en esta vida hay que ser fuertes y guerreros hasta el último día de nuestras vidas. Tus enseñanzas permanecerán en mi corazón toda mi vida, iluminando mi camino y recordándome la importancia del sacrificio. Dedico esta tesis a tu memoria, con todo el amor y gratitud que siempre te tendré. Te amo y te amaré siempre.

Gracias por creer en mí cuando dudaba de mis propias habilidades y por alentarme incluso cuando los obstáculos parecían insuperables. Son lo que más amo en la vida y mi mayor orgullo.

Con todo mi amor,

Marlene



ÍNDICE

1- RESUMEN	15
2- INTRODUCCIÓN	16
2.1- Transcripción	16
2.2- Factores de transcripción (TF)	17
2.2.1- Estructura de los factores de transcripción	19
2.2.2- Activación de los factores de transcripción	21
2.3- <i>Entamoeba histolytica</i> : Antecedentes históricos y taxonomía	22
2.4- Epidemiología de <i>E. histolytica</i>	24
2.5- Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	26
2.6- Genoma de <i>E. histolytica</i>	29
2.7- Genes relacionados con factores de virulencia	32
2.8- Transcripción en Amiba	34
2.8.1. Factores de transcripción en <i>E. histolytica</i>	35
3- ANTECEDENTES PARTICULARES	37
3.1. Factores de transcripción Myb	37
3.2. Familia EhMyb en <i>E. histolytica</i>	39
3.3. Proteínas EhMybSHAQKYF como factores de transcripción	40
3.4. Cambios de expresión de la familia de factores de transcripción EhMybSHAQKYF	43
3.5. Factor de transcripción EhMybS3	46
4- HIPÓTESIS	49
5- JUSTIFICACIÓN	49
6- OBJETIVOS	49
6.1- Objetivo General	49
6.2. Objetivos particulares	49
7- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	50
8- MATERIALES Y MÉTODOS	51
8.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de EhMybS3, identificación de PTM e interactoma	51
8.2. Análisis ontológico (GO) del interactoma de EhMybS3	52
8.3. Clasificación de genes blanco del factor de transcripción EhMybS3 de acuerdo con su nivel de expresión basal	52
8.4. Identificación de las secuencias conservadas en los promotores de genes regulados por EhMybS3 de acuerdo con sus patrones de expresión	52
8.5. Análisis de la expresión del gen <i>ehmybs3</i> y sus genes blanco en condiciones de colonización intestinal, enquistamiento - desenquistamiento y virulencia	53



8.6. Plásmidos empleados para sobreexpresar el factor de transcripción EhMybS3	53
8.7. Obtención de DNA plasmídico	55
8.8. Obtención de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresan el factor de transcripción EhMybS3.	56
8.8.1. Transfección transitoria	56
8.8.2. Transfección estable	56
8.9. Análisis de la expresión de <i>ehmybs3</i> y sus genes blanco	57
8.9.1. Extracción de DNA genómico	57
8.9.2. Aislamiento de RNA de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresan a EhMybS3	58
8.9.3. Tratamiento con DNasa I y obtención de cDNA	58
8.9.4. Diseño de oligonucleótidos	59
8.9.5. RT-PCR semicuantitativa	60
8.9.6. Ensayo de RT-qPCR	61
8.10. Aislamiento de proteínas	62
8.11. Ensayo de Inmunodetección	63
8.12. Ensayo de Inmunofluorescencia para determinar la sobreexpresión de EhMybS3	64
8.13. Ensayo de eritrofagocitosis de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3	65
8.14. Efecto citopático de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3	66
9- RESULTADOS	68
9.1. Caracterización <i>in silico</i> de la proteína EhMybS3	68
9.2. Análisis de PTMs de EhMybS3	68
9.3. Análisis <i>in silico</i> del interactoma de EhMybS3	73
9.4. Genes modificados al sobreexpresar al factor de transcripción EhMybS3	76
9.5. Análisis Ontológico (GO) de los genes que modificaron su expresión en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> que sobreexpresan a EhMybS3	80
9.6. Identificación de las redes de regulación transcripcional de los genes regulados por EhMybS3 mediante inferencia bayesiana	84
9.7. Identificación de secuencias conservadas en los promotores de genes regulados por EhMybS3 de acuerdo con sus patrones de expresión	86
9.8. Análisis de los patrones de expresión de los genes blanco de	88



expresión baja y moderada en diferentes condiciones.

9.9. Determinar la expresión de los genes blanco al sobreexpresar EhMybS3 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	95
9.9.1. Análisis del vector de expresión pKT3M y pKT3M-EhMybS3	95
9.9.2. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>ehmybs3</i> en trofozoítos transfectados	96
9.9.3. Localización subcelular de EhMybS3 en trofozoítos transfectados	98
9.9.4. Análisis de la expresión de los genes blanco de EhMybS3.	101
9.10. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3 sobre células epiteliales y eritrofagocitosis.	102
10. Discusión	104
11. Conclusiones	111
12. Bibliografía	112



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i>	24
Tabla 2. Resumen de estadísticas genómicas de organismos unicelulares seleccionados con genomas secuenciados	32
Tabla 3. Familia EhMybSHAQKYF de <i>E. histolytica</i>	42
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes analizados.	60
Tabla 5. Componentes de la reacción para la RT-qPCR	61
Tabla 6: Caracterización <i>in silico</i> del gen y la proteína EhMybS3	68
Tabla 7. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en EhMybS3	69
Tabla 8: Aminoácidos susceptibles a glicosilación en EhMybS3	72
Tabla 9. Anotación y función molecular de las proteínas que interactúan con EhMybS3	75
Tabla 10: Lista de genes regulados positivamente por la sobreexpresión de EhMybS3	77
Tabla 11: Lista de genes regulados negativamente por la sobreexpresión de EhMybS3	78
Tabla 12. Identificación <i>in silico</i> de secuencias consenso de motivos conservados en genes de cada clase de expresión	87



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representativo del proceso de la transcripción	17
Figura 2. Esquema de un factor de transcripción prototípico	19
Figura 3. Estructura de los dominios de unión a DNA de los factores de transcripción	20
Figura 4. Distribución geográfica de los casos de abscesos hepáticos y amebiasis intestinal en México	25
Figura 5. Quistes de <i>E. histolytica</i>	27
Figura 6. Trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	28
Figura 7. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	29
Figura 8. Organización general del genoma de <i>E. histolytica</i> HM-1: IMSS	31
Figura 9. Factores de transcripción en parásitos protozoarios	36
Figura 10. Tipos de proteínas Myb	38
Figura 11. Proteínas EhMyb en <i>E. histolytica</i>	40
Figura 12. Proteínas EhMybSHAQKYF en <i>E. histolytica</i>	43
Figura 13. Patrón de expresión de los genes <i>ehmybs</i> de <i>E. histolytica</i>	44
Figura 14. Patrón de expresión de los genes <i>ehmybs</i> de <i>E. histolytica</i> en diferentes condiciones	45
Figura 15. Estructura EhMybS3	46
Figura 16. Sobreexpresión de la proteína EhMybS3 en <i>E. histolytica</i>	48
Figura 17. Construcción y representación esquemática del vector de clonación pKT3M	54
Figura 18. Condiciones para la síntesis de cDNA	59
Figura 19. Condiciones de amplificación para la RT-PCR semicuantitativa	61
Figura 20. Condiciones de amplificación para la RT-qPCR	62
Figura 21. Sitios potenciales de fosforilación en la secuencia de aminoácidos de EhMybS3	69
Figura 22. Sitios susceptibles a SUMOilación	71



Figura 23. Sitios de O-glicosilación previstos en la proteína EhMybS3	72
Figura 24. Proteína EhMybS3 de <i>E. histolytica</i> .	73
Figura 25. Interactoma <i>in silico</i> de la proteína EhMybS3	74
Figura 26. GO de la función molecular y proceso biológico de los genes regulados positivamente por EhMybS3	82
Figura 27. GO de la función molecular y proceso biológico de los genes regulados negativamente por EhMybS3	84
Figura 28. Clasificación de la expresión de los genes que modularon su expresión al sobreexpresar el factor de transcripción <i>ehmybs3</i>	85
Figura 29. Cambios en la expresión de los genes blanco de EhMybS3 en un modelo murino	90
Figura 30. Cambios en la expresión de los genes blanco de EhMybS3 en medio Robinson	92
Figura 31. Cambios en la expresión de los genes blanco de EhMybS3 en diferentes condiciones de cultivo	94
Figura 32. Caracterización de los plásmidos pKT3M y pKT3M- <i>ehmybs3</i> usados para transfección	95
Figura 33. Análisis de la expresión de <i>ehmybs3</i> en trofozoítos transfectados	97
Figura 34. Inmunodetección de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados	98
Figura 35. Localización de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados transitoriamente	99
Figura 36. Localización de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados establemente y seleccionados a 20 µg/mL	100
Figura 37. Análisis de la expresión de los genes <i>cilicina-2</i> y <i>filamina</i>	102
Figura 38. Efecto de la sobreexpresión de EhMybS3 sobre las propiedades de virulencia de los trofozoítos transfectados	103



ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AMV	Virus de mieloblastosis aviar, <i>del inglés "avian myeloblastosis virus"</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados centígrados
CTD	Dominio carboxilo terminal, <i>del inglés carboxyl terminal domain</i>
CP	Cisteína peptidasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico, <i>del inglés Deoxyribonucleic acid</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato
DBD	Dominio de unión a DNA, <i>del inglés "DNA-binding domain"</i>
DBD-MYB	Dominio de unión al DNA MYB
ERM	Elemento de reconocimiento a Myb
GO	Ontología de genes, <i>del inglés Gene Ontology</i>
HLH	Proteínas hélice-giro-hélice, <i>del inglés Helix-Loop-Helix proteins</i>
hpt	Horas post transfección
h	Hora
Inr	Secuencia iniciadora de la transcripción independiente de la caja TATA
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
Mm	Micrómetro
mM	Micromolar
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mL	Mililitros
µL	Microlitros
µg	Microgramos
µM	Micromolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>del inglés Polymerase Chain Reaction</i>
PTMs	Modificaciones postraduccionales, <i>del inglés post-translational modifications</i>
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos, <i>del inglés phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA	Ácido ribonucleico, <i>del inglés Ribonucleic acid</i>



RNA pol	RNA polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa, <i>del inglés Reverse transcriptase</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa, <i>del inglés Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SUMO	Pequeño modificador similar a la ubiquitina, <i>del inglés Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SDS-PAGE	Geles desnaturizantes de poliacrilamida, <i>del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
s	Segundos
TA	Temperatura ambiente
TATA	Secuencia de unión a TBP
TF	Factor de transcripción, <i>del inglés "transcription factor"</i>
TYI	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero bovino utilizado para cultivar <i>E. histolytica</i>
tRNA	RNA de transferencia, <i>del inglés Transfer RNA</i>
SNPs	Polimorfismo de nucleótido único, <i>del inglés Single Nucleotide Polymorphism</i>
WB	Western Blot



1. RESUMEN

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito responsable de la amebiasis, una enfermedad intestinal que afecta a millones de personas en todo el mundo. El genoma de *E. histolytica* incluye genes que codifican para proteínas asociadas con la patogenicidad, invasión de tejidos y evasión del sistema inmunológico. Las proteínas Myb son factores de transcripción (TF) que desempeñan un papel crucial en el control de diversas funciones celulares, como la conversión de trofozoíto a quiste, la proliferación y la virulencia. En *E. histolytica*, se han identificado TF EhMyb, que desempeñan un papel importante en la regulación génica de la amiba y se encuentran clasificados en tres familias; de las cuales, la familia EhMybSHAQKYF está implicada con la regulación de la expresión de genes relacionados con la patogenicidad y el enquistamiento. El TF EhMybS3 es un miembro específico de esta familia, por lo que en este trabajo realizamos una caracterización de EhMybS3. Primeramente, se realizó un análisis *in silico* de modificaciones postraduccionales (PTM) de la proteína EhMybS3 identificando posibles sitios de fosforilación, SUMOilación y glicosilación. También se predijo su interactoma con el cual se identificaron proteínas implicadas en la transcripción, ubiquitinación y respuesta al choque térmico. Por otro lado, se hizo un análisis ontológico de los 97 genes que modificaron su expresión cuando EhMybS3 se sobreexpresa. Considerando este análisis, se seleccionaron los genes *cilicina-2* y *filamina* para validarse. Por lo que, de manera experimental, se sobreexpresó al gen *ehmybs3* en trofozoítos de *E. histolytica* para observar y corroborar el efecto de la sobreexpresión de EhMybS3 en los genes seleccionados. Esta modulación fue evidenciada mediante ensayos de RT-qPCR. Por otra parte, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular de EhMybS3, así como ensayos de citopatogenicidad y de fagocitosis, revelando que la sobreexpresión de EhMybS3 afecta significativamente la capacidad patogénica de los trofozoítos, sugiriendo un papel crucial de este TF en la virulencia de *E. histolytica*.



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Transcripción

La transcripción es un evento que ocurre durante el proceso de expresión de los genes. Este proceso es crucial para controlar la activación y la inhibición de genes y posteriormente determinar la identidad y el estado de la célula (Young, *et al.*, 2011).

La transcripción comienza cuando la enzima RNA polimerasa (RNA pol) se une río arriba de la cadena de DNA molde en el extremo 5' del promotor del gen que se está transcribiendo y cataliza la producción de un RNA complementario utilizando el DNA como molde (Fig.1) (Clancy, *et al.*, 2008).

Cabe señalar que existen tres tipos de RNA polimerasas en las células eucariotas.

- RNA pol I: Transcribe genes que codifican rRNA.
- RNA pol II: Transcribe mRNA que sirve como molde para la producción de proteínas durante la traducción.
- RNA pol III: Transcribe genes de rRNA, tRNA y RNA regulatorios pequeños.

Posteriormente, cuando comienza la transcripción, se produce el alargamiento de la cadena donde la RNA pol lee la cadena molde y agrega nucleótidos al extremo 3' de la cadena de RNA que recién se forma (Fig.1) (Izban, *et al.*, 1992).

La transcripción finaliza cuando la enzima RNA pol alcanza un triplete de bases que se leen como una señal de "stop". En procariotas las secuencias *stop* se ubican cerca de los extremos de las secuencias no codificantes durante la terminación de la transcripción (Clancy, *et al.*, 2008), mientras que en eucariotas esto depende del tipo de RNA pol utilizada: para genes dependientes de RNA pol I, la terminación está mediada por factores de



terminación similares a la terminación bacteriana dependiente de Rho. Para genes dependientes de RNA pol III, la terminación ocurre después de la transcripción de una secuencia de terminación con un tramo de poliuracilo, similar a la terminación independiente de Rho procariota. La terminación de los transcritos dependientes de RNA pol II es más compleja porque puede extenderse hasta el final de la secuencia no codificante, o la terminación implica una ruptura en la secuencia de RNA que se produce en la secuencia consenso (Nabavi, *et. al.*, 2008) y el mRNA maduro se poliadenila en el extremo 3', generando una cola poli(A) (Logan, *et. al.*, 1987; Clancy, *et al.*, 2008). El mRNA resultante es una copia monocatenaria del gen, que a continuación debe traducirse en una molécula de proteína (Alberts *et. al.*, 2002).

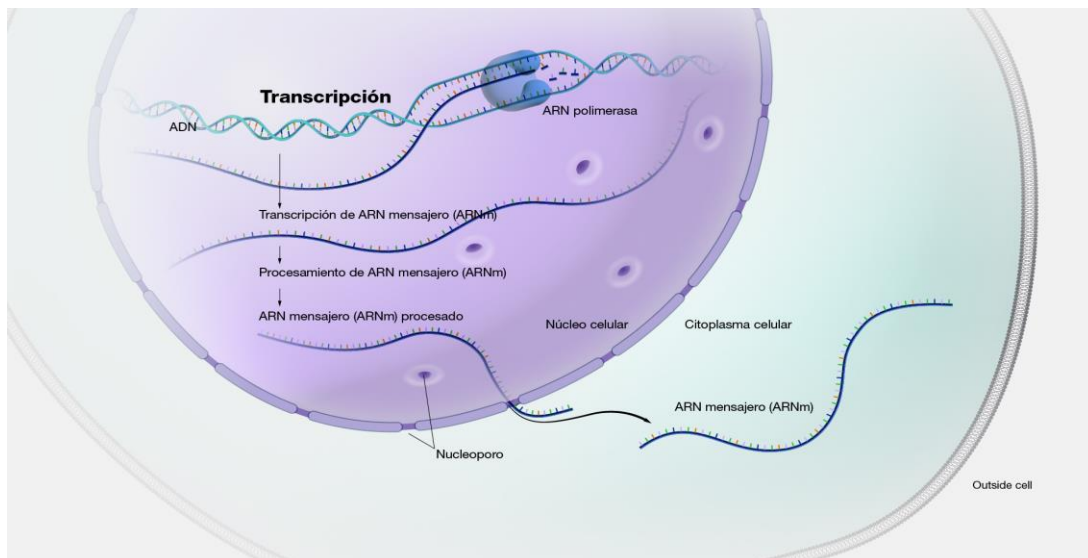


Figura 1. Diagrama representativo del proceso de la transcripción. La RNA polimerasa inicia la transcripción uniéndose a la secuencia promotora del DNA y desenrollando la hélice en esa región, a medida que la transcripción avanza, cada nucleótido se agrega al extremo de la cadena de mRNA. Imagen obtenida de Genome.gov (s/f).

2.2. Factores de transcripción (TF)

Los TF canónicos son proteínas que se unen de manera específica a secuencias reguladoras del DNA (potenciadores o silenciadores), normalmente localizadas en la región 5'- río arriba de la secuencia codificante de los genes blancos. Sin embargo, investigaciones recientes han encontrado muchos casos

donde estos TF se unen a secuencias que no coinciden con sus motivos típicos, lo que se denomina unión no canónica (Samee, *et al.*, 2023).

Estas proteínas pueden modificar la velocidad de transcripción, provocando un aumento o una disminución de la transcripción de genes, y la síntesis de proteínas para regular la función celular (Adcock, *et al.*, 2009).

Por lo tanto, para que un gen sea transcrito a mRNA es necesario que los TF en conjunto con la RNA pol II, se unan a sitios específicos del DNA en las regiones reguladoras del gen para inducir su expresión. Sin embargo, se sabe que las PTM de los TF, como lo son la fosforilación, acetilación y la metilación, pueden modular la capacidad de unión al DNA, o bien, la actividad transcripcional de estas proteínas (Perkins, *et al.*, 2006).

Los TF cumplen dos criterios principales: 1) **unión al DNA en una secuencia específica:** los TF deben tener la capacidad de reconocer y unirse al DNA según su secuencia de una manera específica y con alta afinidad; 2) **regulación de la transcripción:** los TF también deben tener la capacidad de regular la transcripción a partir de las diferentes interacciones proteína-proteína con proteínas de la maquinaria general de transcripción, modificadores de cromatina o bien otros TF y así influir en si un gen se transcribe (es decir, si se sintetiza RNA a partir de ese gen) o no (Fig.2) (Lambert, *et al.*, 2018)



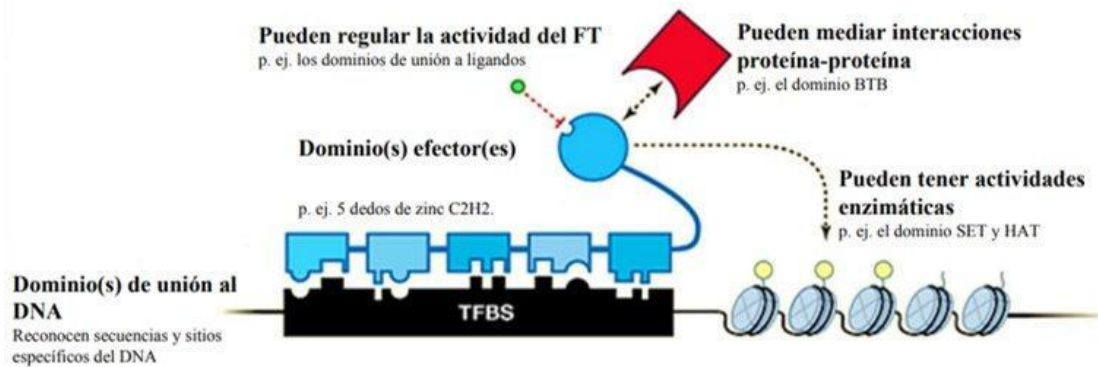


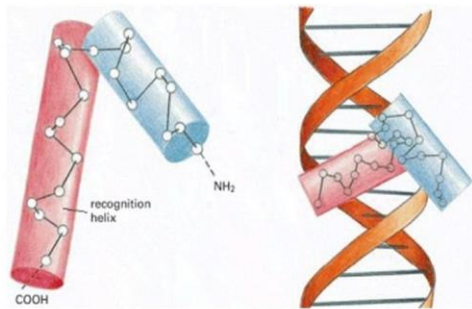
Figura 2. Esquema de un factor de transcripción prototípico. Diagrama de un TF hipotético. El diagrama muestra los dominios efectores que posee un TF canónico. El dominio efector y el dominio de unión al DNA se muestran en azul. Los dominios SET en proteínas modulan la organización de la cromatina y, como resultado, controlan transcripcionalmente los estados activados o reprimidos. Los dominios efectores controlan la actividad del TF al interactuar con sus ligandos, facilitan las interacciones proteína-proteína o tienen actividad enzimática. Imagen obtenida de Lambert, *et al.*, 2018.

2.2.1. Estructura de los factores de transcripción

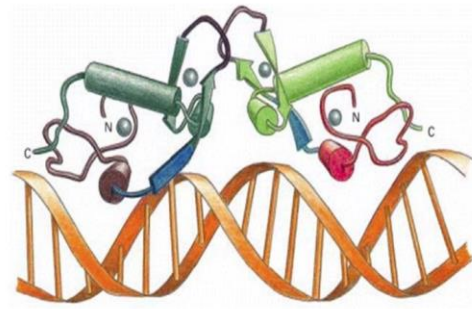
Los TF tienen regiones conocidas como dominios de unión al DNA (DBD) que les permiten reconocer y unirse a secuencias específicas. Estos dominios a menudo contienen motivos estructurales característicos como: **1) hélice-vuelta-hélice:** Fue el primer motivo proteico de unión al DNA identificado en proteínas bacterianas y desde entonces se ha descubierto en cientos de proteínas de unión al DNA tanto de eucariotas como de procariontes. Consta de dos α -hélices unidas por un loop de aa que provoca un giro/vuelta en cada una de las hélices, debido a las interacciones entre las dos hélices se mantienen en un ángulo fijo, facilitando la unión al DNA blanco. (Fig.3A); **2) dedo de zinc:** Contiene dos láminas β antiparalelas que forman una horquilla y una α -hélice estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y por uno o más iones de zinc. (Fig.3B); **3) zipper de leucina:** Contiene dos segmentos peptídicos con una conformación de α -hélice, uno de cada monómero se une para formar una espiral corta. Por un lado, estas α -hélices interactúan entre sí gracias a la unión entre cadenas laterales de aa hidrofóbicos de leucina que las ayuda a mantenerse unidas y, por el otro, lo hacen con secuencias específicas de bases

en el surco mayor del DNA a través de enlaces de hidrógeno y una región hidrofóbica responsable de la dimerización. (Fig.3C); **4) hélice-bucle-hélice (HLH):** Compuesta de dos α -hélices, es decir, una α -hélice corta unida por un bucle a otra α -hélice más larga, formando homodímeros o heterodímeros, en cualquier caso, dos α -hélices que se extienden desde la interfaz de dimerización establecen contactos específicos con el DNA. (Fig. 3D) (Alberts, *et al.*, 2002).

A. Hélice-Vuelta-Hélice



B. Dedos de Zing



C. Zipper de Leucina



D. Hélice-Bucle-Hélice

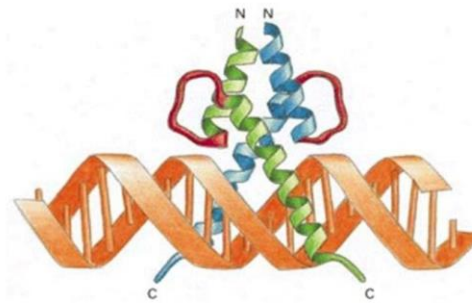


Figura 3. Estructura de los dominios de unión a DNA de los factores de transcripción. **A) Hélice-vuelta-hélice:** α -hélice C-terminal (rojo) interaccionando con el surco mayor del DNA (naranja). Círculos blancos denotan el carbono central de un aminoácido. En azul se muestra la α -hélice N-terminal. **B) Dedos de zinc:** Los átomos de Zn^{+2} se muestran en círculos pequeños grises; uno estabiliza la hélice de reconocimiento del DNA que se muestra en marrón en una subunidad y rojo en la otra, y el otro estabiliza un bucle (violeta). **C) Zipper de leucina:** Dimerización de dos cadenas polipeptídicas unidas (verde) por cadenas laterales de leucinas. **D) Hélice-bucle-hélice:** dimerización de dos cadenas polipeptídicas (verde y azul) separadas por un bucle (rojo). Para todas las imágenes la estructura de DNA se muestra en naranja. Imagen obtenida de Alberts B, *et al.*, 2002.

Estos motivos permiten el reconocimiento de las proteínas con el DNA con alta especificidad y afinidad a las secuencias que reconocen.

2.2.2. Activación de los factores de transcripción

Los TF interpretan directamente el genoma realizando el primer paso en la decodificación de la secuencia de DNA. Muchos TF participan como "reguladores maestros" o "genes selectores", donde ejercen control sobre los procesos que especifican el tipo celular y los patrones de desarrollo (Lee, *et al.*, 2013). También pueden ser capaces de controlar vías específicas como las de la respuesta inmune, debido a que desempeñan un papel importante en la coordinación de los mecanismos de defensa del cuerpo (Singh, *et al.*, 2014). Las mutaciones en los TF o en los sitios de unión pueden generar una gran cantidad de enfermedades humanas, por lo que determinar cómo se ensamblan los TF para reconocer los sitios de unión y controlar la transcripción es crucial para comprender sus roles fisiológicos, decodificar sus propiedades funcionales específicas en los genomas y mapear cómo se generan los programas de expresión altamente específicos en organismos complejos.

Algunos TF se producen de manera inactiva. Se pueden activar ya sea dentro del núcleo, cuando ya se encuentran unidos al DNA; o bien, dentro del citoplasma, a partir del reconocimiento de señales de localización nuclear (NLS) para ser transportados al núcleo (Ito, *et al.*, 2006).

Una forma en que los TF se regulan es respondiendo a señales celulares, como señales extracelulares (hormonas o factores de crecimiento) o señales intracelulares (vías de señalización). Algunos de los ejemplos de vías de señalización que activan los TF incluyen la señalización a través de TGF- β , que conduce a la activación de TF de la familia SMAD (Derynck, *et al.*, 2019) o la señalización Jak-STAT, que activa STAT-TF (O'Shea, *et al.*, 2015). Por otro lado, un ejemplo de TF que se inactivan mediante vías de señalización es la familia FOXO. En ausencia de insulina, los TF FOXO se unen al DNA y activan la expresión génica. Sin embargo, en presencia de insulina, los TF FOXO sufren



fosforilaciones por cinasas río abajo de la vía de señalización PI3K-AKT, lo que ocasiona la ausencia de los TF en el núcleo y la represión de genes diana (Webb, *et al.*, 2014).

Otros mecanismos de activación de TF son mediante las PTM como fosforilaciones, SUMOilaciones, ubiquitinaciones, acetilaciones, glicosilaciones o metilaciones. Sin embargo, la fosforilación se ha estudiado más en situaciones que requieren una regulación rápida de la actividad del TF en respuesta a señales detectadas por receptores en la superficie celular (Karin, *et al.*, 1995). Las proteínas cinasas añaden grupos fosfatos a residuos de aa específicos del TF, alterando su conformación y actividad (Weidemüller, *et al.*, 2021).

La activación de TF es un proceso dinámico y regulado que permite a las células responder a señales externas y mantener la homeostasis de la expresión génica.

2.3. *Entamoeba histolytica*: Antecedentes históricos y taxonomía.

La palabra *amiba* proviene del latín *amoeba*, del griego *amoibe*, que significa cambio, alternancia o transformación (forma y/o movilidad). Entre el grupo de amibas, se sabe que al menos ocho especies de *Entamoebidae* infectan a los humanos, incluida *Entamoeba histolytica* (McGrath, *et al.*, 2001).

E. histolytica fue identificada por el médico ruso Friedrich Aleksandrovich Lösch en 1875. Friedrich observó amibas en las heces y el tejido intestinal de los pacientes durante un brote de disentería en San Petersburgo, Rusia, en donde originalmente llamó a la amiba "*Amoeba coli*" porque se encontraba en el colon (Benchimol, *et al.*, 2005).

Más tarde, en 1891, Councilman y Lefleur descubrieron datos clínicos y patológicos que conectaban a *E. histolytica* y la disentería amebiana como una entidad separada que se caracterizaba por una ulceración del colon sin la



producción de productos inflamatorios. Además, demostraron que los abscesos hepáticos frecuentemente agravaban las enfermedades intestinales, extendiéndose en ocasiones a los pulmones (Councilman, *et al.*, 1891).

En 1893, en Alemania, Quincke y Roos hallaron al parásito en su forma de quiste (Quincke, *et al.*, 1893). Sin embargo, Walter y Sellards en 1913 brindaron una descripción del número y características de los núcleos de *E. histolytica* (Anderson, *et al.*, 1953), así como determinaron que los portadores asintomáticos son los reservorios y responsables de la transmisión, junto con un subconjunto de individuos de alto riesgo. También encontraron que la enfermedad se transmite a través de quistes y no mediante trofozoítos (Walker, *et al.*, 1913).

En 1993, *E. histolytica* se describió formalmente y se distinguió de *E. dispar*, tras la acumulación de datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos (Novati, *et al.*, 1996).

El protozoario *E. histolytica* es un parásito que provoca proteólisis y lisis de tejidos y puede inducir la apoptosis de la célula huésped. Además, es uno de los varios protozoarios anaeróbicos que carecen de retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, citoesqueleto microtubular y mitocondrias canónicas, pero poseen mitosomas (Santos, *et al.*, 2022). Debido a estas características, se clasificó taxonómicamente a *E. histolytica* en el phylum *Sarcomastigophora*, subfilo *Sarcodina*, clase *Lobosa*, orden *Amoebida* y familia *Entamoebidae* (Leber, *et al.*, 2007). Pertenece a la superclase *Rhizopoda*, que significa "pies en forma de raíz", atribuido a su morfología, ya que es un eucarionte unicelular sin forma fija (pleomorfo) y carente de flagelo capaz de emitir prolongaciones de su citoplasma llamados pseudópodos, utilizados para la locomoción y alimentación de estos microorganismos (Tabla 1).



Tabla 1: Clasificación taxonómica de *E. histolytica*.

Dominio	Eucariota
Filo	Amoebozoa
Subfilo	Conosa
Familia	Entamoebidae
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>
Reino	Protista
Subreino	Protozoo
Phylum	Sarcomastigophora
Superclase	Rhizopoda
Clase	Archamoebae

2.4. Epidemiología de *E. histolytica*

La amebiasis intestinal es una infección gastrointestinal causada por *E. histolytica*, puede causar colitis, disentería aguda (diarrea con sangre y moco) o diarrea crónica cuando invade la pared del colon (Nowak, *et al.*, 2015). El hígado también puede infectarse a través del torrente sanguíneo, incluso, puede extenderse al cerebro, los pulmones u otros órganos. Los signos y síntomas clínicos de la amebiasis pueden ser extraintestinales o intestinales, según el órgano afectado (Espinosa, *et al.*, 2000).

Según la OMS, se estima que alrededor de 500 millones de personas a nivel mundial pueden estar infectadas con alguna especie de la familia *Entamoeba*. Sin embargo, únicamente el 10% se encuentra infectada con *E. histolytica* (Carrero, *et al.*, 2020). La infección inicia al ingerir alimentos o agua contaminados con quistes de *E. histolytica*. Estos quistes son resistentes y pueden permanecer en el ambiente por mucho tiempo, por lo que es importante mantener medidas adecuadas de higiene para evitar propagar la infección, sin embargo, esto representa un riesgo sustancial en países sin saneamiento adecuado de los suministros de aguas municipales. (Arellano, *et al.*, 2017).



México es considerado un país endémico de amebiasis porque existe un número importante de portadores asintomáticos que son capaces de eliminar la infección espontáneamente, posteriormente reinfectarse y así entrar en un ciclo asintomático. Únicamente un 10% desarrolla amebiasis intestinal invasiva. Actualmente existen 28,747 casos de amebiasis intestinal y 152 casos de absceso hepático amebiano en la República Mexicana, según los datos registrados de la Semana Epidemiológica 16 del Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Chiapas, Guerrero, México, Oaxaca, Tabasco y Veracruz son los estados con mayores tasas de amebiasis entre hombres y mujeres (Fig.4).

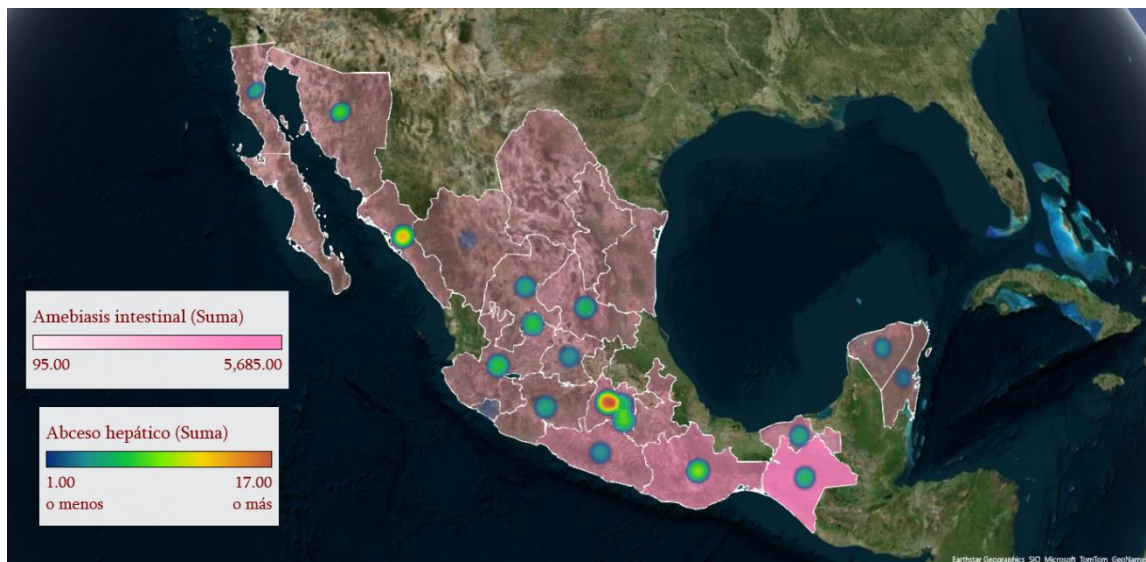


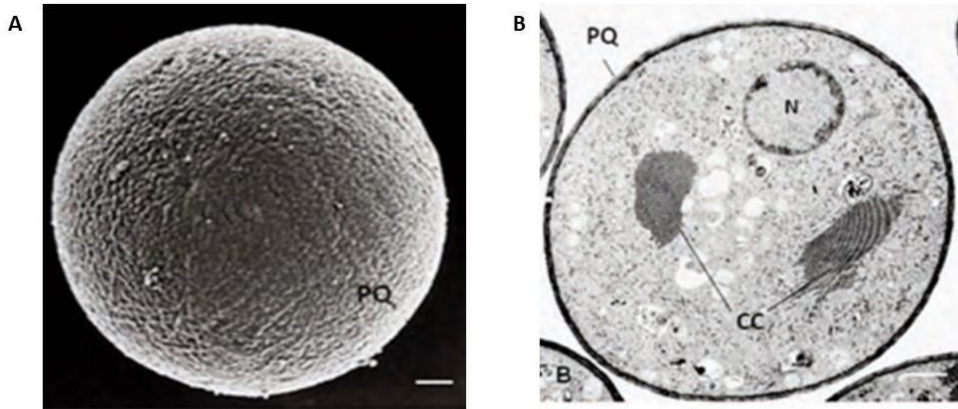
Figura 4. Distribución geográfica de los casos de abscesos hepáticos y amebiasis intestinal en México. En el mapa se muestra la distribución de los casos de abscesos hepáticos y amebiasis intestinal notificados en México de enero a abril del 2024. Imagen de elaboración propia basada en información de la semana epidemiológica 16 del año 2024 del Boletín Epidemiológico SINAVE/DGE/Salud 2024.

2.5. Ciclo de vida de *E. histolytica*

El parásito protozoario *E. histolytica* tiene dos estadios: la forma infecciosa quística responsable de la propagación del parásito, y la etapa de trofozoíto invasivo presente en el lumen intestinal (Shirley, *et al.*, 2018).

Los quistes tienen forma esférica y miden entre 10 y 20 μm (Fig.5A). Estos quistes poseen una capa gruesa compuesta de quitina: un polímero de carbohidratos formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unida a β -1,4 (GlcNAc) que se forma en la superficie de la amiba durante el proceso de enquistamiento (Samuelson, *et al.*, 2011). Los quistes poseen entre 1 a 4 núcleos en su citoplasma (Fig.5B), esto depende de su nivel de madurez. También contienen cuerpos cromatoides y una baja cantidad de vacuolas (Fig.5B) (El-Dib, *et al.*, 2022). Estos quistes son producidos en gran cantidad tanto por personas infectadas como por portadores asintomáticos de la enfermedad. Los quistes se excretan en las heces del huésped y se transfieren a otro ser humano por vía fecal-oral, a través de la ingestión de alimentos, agua contaminada o contacto persona-persona. Cuando los quistes son ingeridos por un humano, llegan al tracto digestivo, donde los jugos gástricos del estómago rompen la pared de los quistes y liberan a los trofozoítos, que son otra forma del parásito (Chávez, *et al.*, 2013).





5. Quistes de *E. histolytica*. A) Microscopía de barrido de la superficie rugosa de la pared del quiste B) Citoplasma del quiste con núcleo (N), vacuolas, dos cuerpos cromosómicos (CC) y pared del quiste (PQ) teñido con rojo de rutenio. Imagen elaborada con datos obtenidos de Chávez, et al., 2013.

Los trofozoítos de *E. histolytica* varían en tamaño entre 10 y 60 μm (Sodeman, et al., 1996). Son pleomórficos, ya que su forma cambia constantemente debido a la fluidez del citoplasma, la plasticidad de la membrana plasmática y la capacidad de reorganizar el citoesqueleto (Cuellar, et al., 2020; Chávez, et al., 2013). Estos trofozoítos tienen la capacidad de moverse con ayuda de proyecciones citoplasmáticas llamadas pseudópodos (Fig.6A), los cuales utilizan para obtener alimento mediante los mecanismos de pinocitosis; absorción de líquidos del exterior al citoplasma en forma de vesículas (Corona, et al. 2023) y fagocitosis mediante la captura de sólidos (Chávez, et al., 2013).

Además, los trofozoítos tienen un núcleo esférico de 4 a 7 μm (Fig.6B). El RNA se encuentra en la periferia del núcleo y el DNA en el centro del núcleo. En el núcleo también se pueden ver esférulas nucleares (Chávez, et al., 2013).

Los trofozoítos metaquísticos derivan de la desenquistación en el intestino delgado del quiste maduro que tiene cuatro núcleos (tetranucleado), dando lugar a ocho amébulas que se alimentan y crecen hasta transformarse en trofozoítos maduros que migran y se establecen en el colon. Allí, como comensales, los trofozoítos se adhieren a la mucosa intestinal y se alimentan

de bacterias y restos celulares; luego se dividen, o bien, se enquistan en un proceso estimulado por condiciones luminares no favorables para los trofozoítos. De esta manera, el trofozoíto reduce su tamaño, compactando su DNA en un único núcleo (uninuclear) generando un prequiste, el cual entra en proceso de división nuclear, convirtiéndose en un quiste tetranucleado. Estos quistes serán excretados en las heces, contaminando agua o alimentos, para posteriormente infectar a nuevos hospedadores, repitiendo así el ciclo de vida (Fig. 7) (Guillén, *et al.*, 2021).

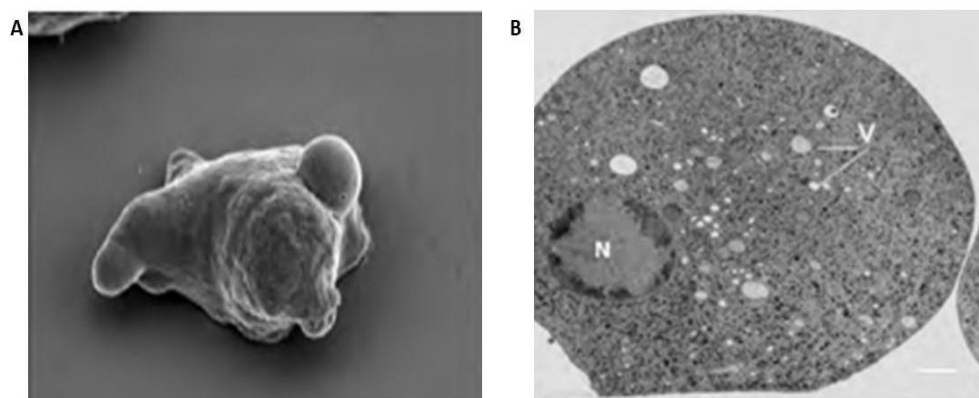


Figura 6. Trofozoítos de *E. histolytica*. A) Trofozoíto observado mediante microscopía electrónica de barrido. B) Microscopía electrónica de transmisión: Corte fino de un trofozoíto en el que se aprecia el núcleo (N) y vacuolas (V). Imagen elaborada con datos obtenidos de Chávez, et al., 2013.

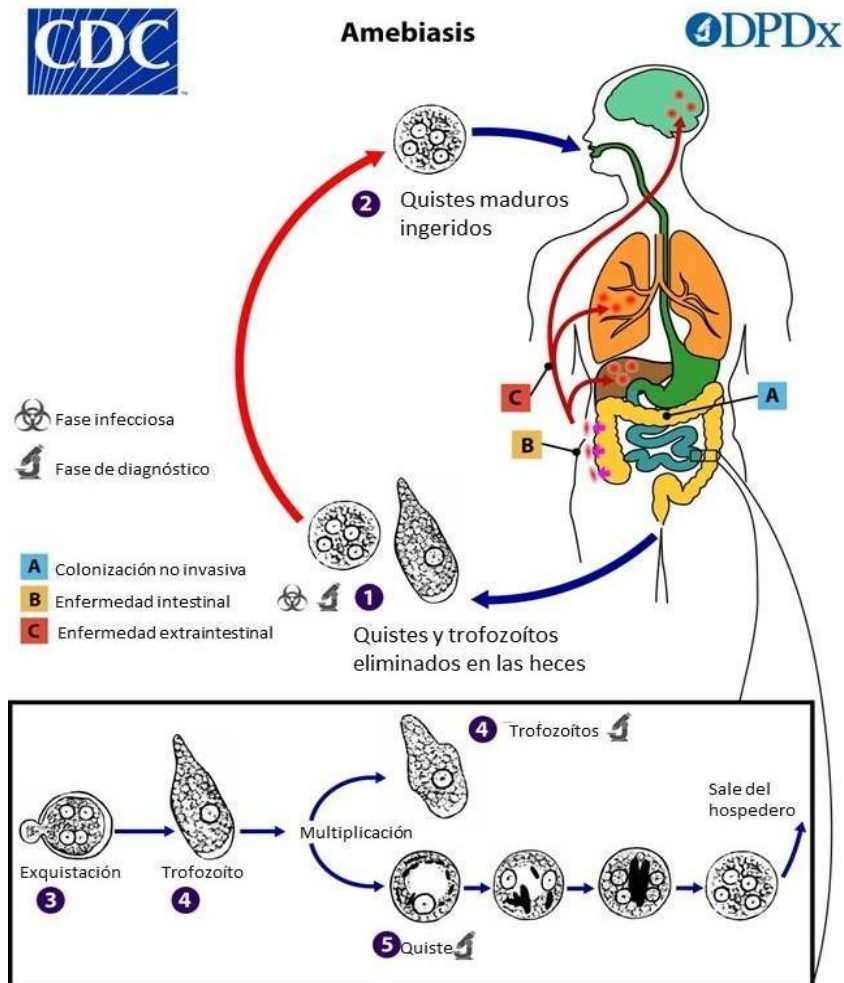


Figura 7. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El parásito tiene dos estadios: el quiste (forma de resistencia), que ingresa al huésped a través de agua o alimentos contaminados, y el trofozoíto (forma invasiva). La colonización no invasiva (A) ocurre en el colon, donde en algunos casos la ameba provoca amebiasis intestinal sintomática (B). Puede además diseminarse a otros órganos provocando infecciones extraintestinales (C), como en el hígado, los pulmones y el cerebro, donde pueden formar abscesos. Bajo ciertas condiciones el trofozoíto se enquista y los quistes son liberados en las heces. Imagen obtenida de CDC *Public Health Image Library*, 2015.

2.6. Genoma de *E. histolytica*

Durante el proyecto del genoma *E. histolytica*, contribuyeron varios centros de investigación, los cuales eligieron la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* para su secuenciación, para lo cual se emplearon células criopreservadas de la década de 1970, con la finalidad de obtener DNA lo más cercano posible a la cepa original aislada en 1967. Esta secuenciación la realizaron mediante el método

de shotgun de genoma completo, se generaron varias bibliotecas de DNA con insertos de diferentes tamaños, por lo que se obtuvieron secuencias de cada fragmento de DNA clonado de ambos extremos generando muchas lecturas. En total lograron ensamblar 450,000 lecturas de secuencias cortas en *contigs* grandes, resultando 1,819 fragmentos genómicos (Clark, *et al.*, 2007). La publicación de Loftus se describe como el "primer borrador" de la secuencia completa del genoma con un tamaño de 23,361,983 pb (Loftus, *et al.*, 2005). El nivel de anotación es similar a publicaciones anteriores de otros genomas que se centraron en proporcionar una comprensión e importancia fundamental del genoma (Adams, *et al.*, 2000) (Tabla 2). Sin embargo, en 2010, se realizó un nuevo ensamblaje y anotación del genoma de *E. histolytica*, esto con la finalidad de reducir errores. Este reensamblaje revela un tamaño del genoma de 20,799,072 pb (aprox. 20 Mb) de secuencia organizada en 1,496 andamios, y un contenido de 8,201 genes, de los cuales, el 49.7% codifican para proteínas que se conoce su función (Lorenzi, *et al.*, 2010). Entre estos genes están incluidos genes de virulencia y TF canónicos relacionados con la maquinaria de transcripción basal; un 24.4% de los genes contienen intrones múltiples (Tabla 2). Se han identificado 897 familias proteicas con 4,564 proteínas y aproximadamente 479 proteínas que no comparten homología con proteínas conocidas, por lo que podrían ser específicas del género *Entamoeba* (Lorenzi, *et al.*, 2010; Loftus, *et al.*, 2005). Por otro lado, el 20% del DNA celular total en *E. histolytica* corresponde a episomas de 24 kb que portan genes de rRNA. Estos episomas contienen dos unidades de transcripción organizadas en una configuración de repetición invertida, inusual en comparación con los genes de rRNA de otros organismos (Bhattacharya, *et al.*, 1998). Tiene un alto contenido de A + T (aprox. 75%), y está distribuido en 38 cromosomas que varían de tamaño entre 0.3 y 2.2 Mbp debido a la expansión y contracción de las repeticiones subteloméricas (Fig.8). Los extremos de algunos cromosomas pueden tener conjuntos de genes de tRNA (Kawano, *et al.*, 2020). Estos genes de tRNA están organizados en una matriz lineal. Esta matriz indica la



presencia de genes de tRNA idénticos en ambos extremos del mismo clon, así como múltiples unidades repetidas de lecturas de secuencias individuales. La región adyacente a la matriz de tRNA no contiene genes que codifican proteínas, pero puede contener elementos transponibles incompletos y otras secuencias repetitivas, lo cual corresponde a la ubicación de los telómeros. Se estima que el genoma de *E. histolytica* contiene aproximadamente 4,500 genes de tRNA en total, es decir, alrededor del 10% de las lecturas de secuencia del genoma contiene genes de tRNA (Clark, *et al.*, 2007).

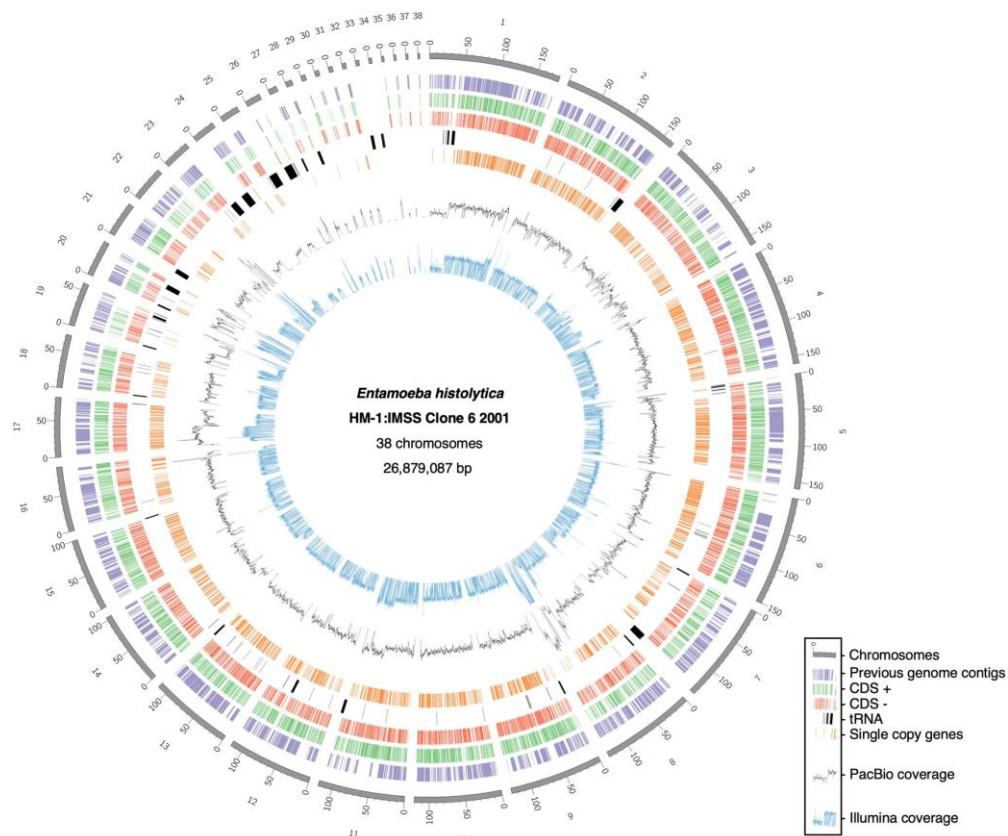


Figura 8. Organización general del genoma de *E. histolytica* HM-1: IMSS. Imagen que representa la organización del genoma la cual muestra los cromosomas (gris), los contigs del genoma anterior (morado), secuencias codificantes + hebra (verde), genes de tRNA (negro), genes de copia única (naranja), cobertura de lectura de PacBio (línea negra) y cobertura de lectura de Illumina (línea azul). Imagen obtenida de Kawano-Sugaya, *et al.*, 2020.



Tabla 2. Resumen de estadísticas genómicas de organismos unicelulares seleccionados con genomas secuenciados.

Contenido del genoma	<i>E. histolytica</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tamaño del genoma (Mb)	20.8	22.8	12.5
Contenido G+C (%)	24.2	19.4	38
Número de genes	8,201	5,268	5,538
% DNA codificante	49.7	52.6	70.5
% Genes con intrones	24.4	54	5

Tabla elaborada con datos obtenidos de Clark, *et al.*, 2007.

2.7. Genes relacionados con Factores de virulencia

La virulencia de *E. histolytica* es una característica importante de la capacidad para causar enfermedades en los seres humanos, así como su capacidad de invasión y destrucción de tejidos es fundamental para su patogenicidad. La identificación y comprensión de los factores de virulencia son importantes para el desarrollo de estrategias terapéuticas y preventivas contra la amebiasis intestinal y el absceso hepático (Trejos, *et al.*, 2009). Por lo que, desde el año 1975, se han reportado diversos factores de virulencia utilizados por *E. histolytica*, que le permiten ser patógeno y llevar a cabo una invasión exitosa en el colon y otros tejidos fuera del intestino (Espinosa, *et al.*, 2000). Estos factores juegan un papel importante en la penetración y daño causado por los trofozoítos en los tejidos del huésped.

Para que *E. histolytica* pueda colonizar e invadir el intestino del huésped, se debe llevar a cabo la adherencia del trofozoíto con las células diana. Durante esta adherencia, participan lectinas como la lectina Gal/GalNAc que media la adherencia del trofozoíto al epitelio intestinal del huésped. La unión de los residuos de Gal/GalNAc en las glucoproteínas de la mucosa intestinal,



contrarresta la resistencia de la mucosa y facilita la invasión. Por otro lado, las lectinas Gal/GalNAc también son responsables de la citotoxicidad directa en células como los hepatocitos (Petri, *et al.*, 1987). Esto se manifiesta por cambios morfológicos y la inducción de apoptosis en células del huésped dañadas, lo que indica su papel en la patogénesis del absceso hepático (Clancy, *et al.*, 2008).

Después de que *E. histolytica* se une a las células humanas, se produce la lisis celular que produce edema, ampollas y lisis de las células diana, dejando los parásitos intactos. Esta lisis celular es provocada por amebaporos, una familia de tres isoformas A, B y C (Hecht, *et al.*, 2004; Solaymani, *et al.*, 2008). El amebaporo es un péptido compuesto de 77 residuos de aa; estos polipéptidos transmembranales son liberados mediante fagosomas que contienen bacterias capaces de combatir el crecimiento de microorganismos fagocitados (Andra, *et al.*, 2003). Se ha reportado que los trofozoítos de *E. histolytica* que carecen de la isoforma amebaporo A, ya sea provocada por la inhibición antisentido de la traducción (Bracha, *et al.*, 1999) o por silenciamiento epigenético del gen codificante (Bracha, *et al.*, 2003), pierden su virulencia, lo que indica que estas isoformas son indispensables en la patogénesis del parásito.

El genoma de *E. histolytica* contiene aproximadamente 50 genes de cisteína peptidasa (CP), otro importante factor de virulencia del parásito. Estudios reportados han demostrado que la sobreexpresión de CP aumenta la actividad citopática del parásito y provoca abscesos hepáticos amebianos graves en animales de experimentación (Stanley, *et al.*, 1995; Tillack, *et al.*, 2006). Por lo que, estas enzimas endopeptidasas ayudan a los parásitos a causar daño tisular en la colitis amebiana y la inflamación intestinal. Esto sugiere que estas enzimas utilizan un mecanismo novedoso en su patogenicidad, ya que poseen actividad enzimática de la enzima convertidora de interleucina-1-beta (IL-1 β) (Seydel, *et al.*, 1997; Zhang, *et al.*, 2000).

En conjunto, estos mecanismos y factores de virulencia permiten a *E. histolytica*



invadir con éxito los tejidos del huésped, causando la enfermedad característica de la amebiasis.

2.8. Transcripción en Amiba

La transcripción en *E. histolytica* está regulada por la RNA polimerasa II, la cual presenta características únicas en comparación con otros organismos eucariotas. Una de estas características, es que presenta resistencia a la α -amanitina, una toxina que inhibe la RNA pol II en otros eucariotas (Lioutas, *et al.*, 1995). Esta resistencia está relacionada con diferencias estructurales específicas en la subunidad más grande (RPB1), particularmente en el bloque de homología F (Quon, *et al.*, 1996). Estas diferencias se deben a que el dominio C-terminal (CTD) del RPB1 de la RNA pol II difiere de la secuencia consenso encontrada en otros eucariotas. Aunque carece de la repetición heptapeptídica común en otros organismos, es rica en prolina/serina y tiene potencial para una fosforilación extensa. Esto sugiere que las PTM del CTD podrían desempeñar un papel crucial en la regulación de la transcripción y las interacciones proteína-proteína (Yeo, *et al.*, 2003).

Durante la transcripción de *E. histolytica*, algunos análisis de los promotores de los genes revelaron la presencia de tres motivos conservados en su región reguladora (McCoy, *et al.*, 2004). El primer elemento es la secuencia T/ATTTAAA denominada caja TATA amebiana y se encuentra a -30 pb desde el codón de inicio, este elemento participa en el inicio de la transcripción; el segundo elemento es la secuencia G/CAAC/G o AAAGAACT, denominada elemento GAAC. Esta secuencia generalmente se ubica entre -30 y 14 desde el codón de inicio y afecta el nivel de expresión sin alterar el sitio de inicio de la transcripción; y el tercer elemento es la secuencia ATTC (Inr-box) en el sitio de inicio de la transcripción (Narayanasamy, *et al.*, 2018). El motivo GAAC es de particular interés ya que se especula que es el sitio de unión para una proteína de unión al DNA alternativa en el complejo de preiniciación.



2.8.1. Factores de transcripción en *E. histolytica*

Los TF juegan un papel importante en la supervivencia y activación celular. En *E. histolytica* se han identificado varios TF incluyendo la proteína de unión a la caja TATA (EhTBP) (Dios-Bravo, *et al.*, 2005) y las proteínas relacionadas EhEBP1 y EhEBP2 (Schaenman, *et al.*, 2001) GATA, HSF (Iyer, *et al.*, 2008), la proteína similar a p53 (Mendoza, *et al.*, 2003) y EhMyb-dr (Ehrenkauffer, *et al.*, 2009). Los TF en *Entamoeba* regulan la expresión génica de varios aspectos importantes de la biología de las amibas, incluida la virulencia, la respuesta al estrés oxidativo y la transición de trofozoíto a quiste.

Los eucariotas se caracterizan por una amplia diversidad de TF específicos. Esta diversidad es evidente en la superfamilia de dominios de unión al DNA (DBD) que poseen estos TF (Coulson, *et al.*, 2001; Lespinet, *et al.*, 2002; Babu, *et al.*, 2004). Diferentes linajes de eucariotas han desarrollado sus conjuntos únicos de TF con distintos DBD.

Los TF específicos que son más frecuentes pueden variar entre los principales linajes eucariotas: En amebas como *Entamoeba* y *Dictyostelium*, los TF que predominan son los MYB y bZIP, respectivamente. En plantas multicelulares, los TF con DBD que más se destacan son MYB, MADS, bHLH, VP1 y Apetala2 (AP2); en los animales, los TF que contienen homeodominios y dedos de zinc C₂H₂ son dominantes; en los protozoos *Trichomonas* los DBD más prevalentes son MYB, e IBD; en los hongos, los TF con dedos de zinc binucleares C₆ prevalecen (Fig.9) (Iyer, *et al.*, 2008). La presencia de ciertos DBD, como el dedo binuclear C₆, estaba anteriormente restringida a los hongos. Esto sugiere que algunos DBD tienen patrones de distribución limitada en el árbol evolutivo de la vida (Babu, *et al.*, 2004).

Existe una restricción general en la cantidad de TF necesarios para regular un proteoma de un tamaño determinado, a pesar de la amplia variedad de TF específicos que se encuentran en varios linajes. Es decir, la cantidad de TF



necesarios para controlar la expresión génica parece estar inversamente correlacionada con el tamaño del proteoma de un organismo (su conjunto de genes que codifican proteínas). Esta limitación sugiere que se requiere una cantidad específica de TF para regular la transcripción de genes dentro de un proteoma. Aunque existe una restricción general en el número total de TF, diferentes superfamilias de TF se han expandido de forma independiente en cada linaje principal de eucariotas. Esta expansión independiente ha llevado a la evolución de un conjunto diverso de TF dentro de cada linaje, aunque cumplen funciones regulatorias similares (Iyer, *et al.*, 2008).

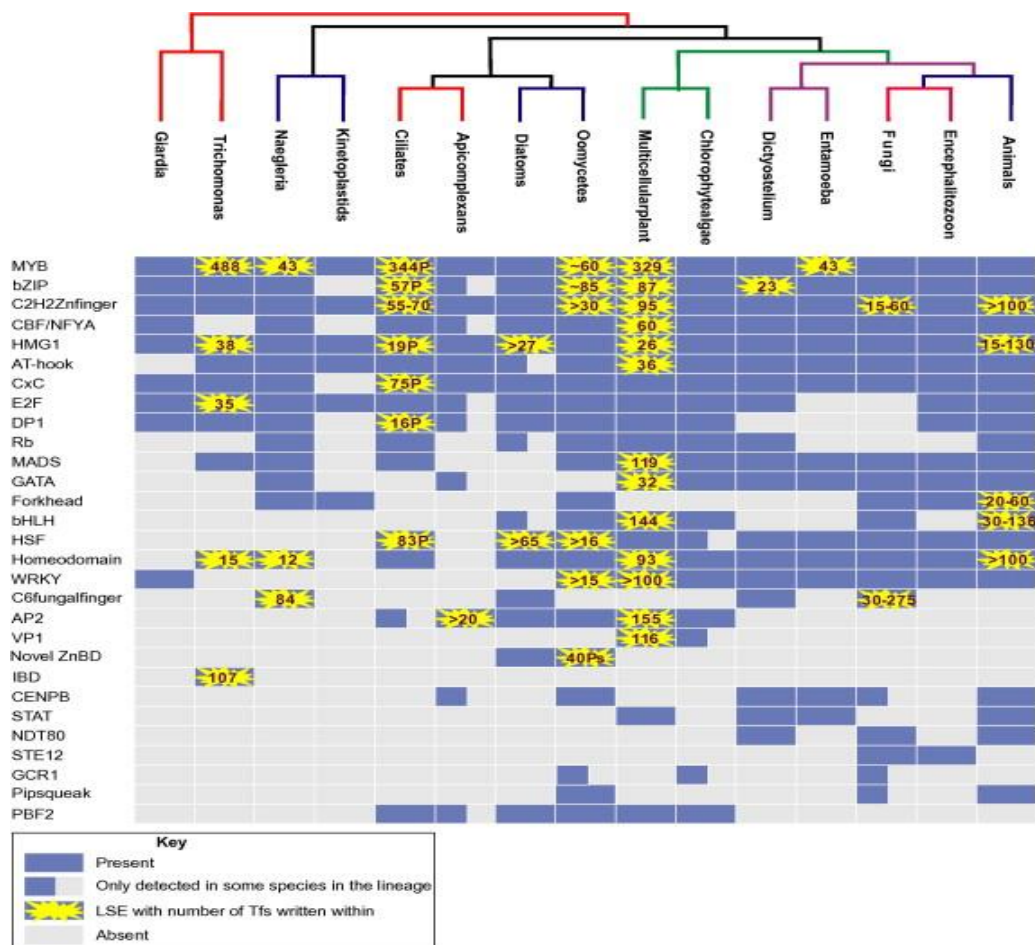


Figura 9: Factores de transcripción en parásitos protozoarios. Distribución de los TF entre especies eucariotas. La clave debajo de la distribución proporciona las anotaciones utilizadas para describir presencia, ausencia o expansiones específicas de linaje (LSE) en TF. Imagen obtenida de Iyer, *et al.*, 2008.



3. Antecedentes Particulares

3.1. Factores de transcripción Myb

Los TF Myb son una de las familias de TF más abundantes y de las más estudiadas desde su descubrimiento en el genoma del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) hace aproximadamente 35 años (Klempnauer, *et al.*, 1982). Desde entonces, se han identificado diversas proteínas con DBD-MYB en los protozoarios (Meneses, *et al.*, 2010), hongos (Morrow, *et al.*, 1993), insectos (Katzen, *et al.*, 1985) y plantas (Jin, *et al.*, 1999). Estas proteínas controlan diversas funciones, como la conversión de etapas, el destino celular, proliferación, entre otros, dependiendo del organismo (Ehrenkauffer, *et al.*, 2009).

Los TF Myb se caracterizan por tener un dominio altamente conservado DBD-MYB de aproximadamente 50-53 aminoácidos de longitud. Estos TF MYB son clasificados en cuatro subfamilias denominadas 1R-MYB, 2R-MYB, 3R-MYB y 4R-MYB, según el número de repetidos en el dominio de unión al DNA (Fig.10) (Sakura, *et al.*, 1989). El DBD contiene tres residuos de triptófano espaciados y conservados que forman un núcleo hidrófobo que estabiliza la estructura de las tres hélices (Fig.10) (Ogata, *et al.*, 1994).



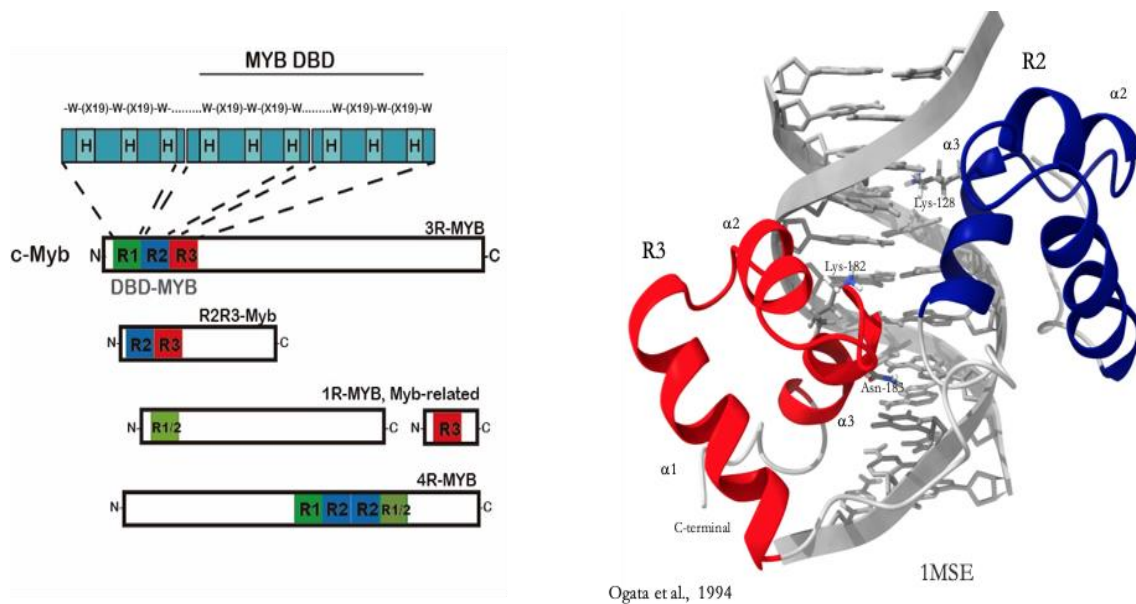


Figura 10. Tipos de proteínas Myb. Izquierda: Esquema que muestra las diferentes clases de proteínas Myb presentes en los organismos eucariontes dependiendo del número de secuencias repetidas (R1, R2, R3). Derecha: Estructura tridimensional de los repetidos R2 y R3 al unirse al Elemento de Reconocimiento a Myb (ERM). Imagen elaborada por la Dra. Elisa I. Azuara Liceaga a partir de Arratia y Aguirre, 2013.

La segunda y tercera hélice de cada repetido forma una estructura de hélice-vuelta-hélice. Sin embargo, la tercera hélice en cada repetido funciona como una hélice de reconocimiento debido a que tiene la capacidad de unirse al surco mayor del DNA en la secuencia conservada C/TAACG/TG la cual se denomina Elemento de Reconocimiento a Myb (ERM). El extremo C-terminal de las proteínas MYB funciona como dominios de activación y presentan una variabilidad entre las proteínas MYB, lo que ocasiona las diversas funciones reguladoras de estos TF (Aguirre, *et al.*, 2013).

El Myb TF más estudiado es el proto-oncogén c-Myb que contiene un DBD (Biedenkapp, *et al.*, 1988), el cual reconoce e interacciona con secuencias específicas del DNA y activa la expresión de cientos de genes diana específicos y juega un papel importante en la regulación génica que afecta la proliferación, diferenciación y destino celular (Zhou, *et al.*, 2011). La característica más singular de c-Myb es su capacidad para convertirse en una proteína oncogénica. Es posible que c-Myb contribuya al desarrollo de células cancerosas porque ciertas mutaciones pueden alterar completamente la

actividad y especificidad de c-Myb (Liu, *et al.*, 2006). Debido a estas mutaciones, c-Myb se considera el homólogo celular del oncogén v-myb que se encuentra en el virus de la AMV (Gonda, *et al.*, 1983).

3.2. Familia EhMyb en *E. histolytica*

El genoma de *E. histolytica* contiene 34 ORF que codifican para 32 proteínas DBD-Myb, debido a que dos de ellos están duplicados y dos genes tienen versiones truncadas. Estas proteínas se clasificaron en tres subfamilias mediante un análisis filogenético (Fig.11) (Meneses, *et al.*, 2010):

- **Familia I (EhMybR2R3):** Contiene 14 proteínas R2R3 DBD-Myb con la mayor similitud con el c-Myb DBD humano. Se asemeja a la arquitectura del dominio R2R3 identificada en las proteínas que contienen DBD-Myb en plantas.
- **Familia II (proteínas de unión teloméricas):** Consta de 3 proteínas similares a las proteínas de unión teloméricas humanas (Rhodes, *et al.*, 2002)
- **Familia III (EhMybSHAQKYF):** Contiene 9 proteínas similares a las SHAQKYF-Myb que se encuentran en plantas (Rose, *et al.*, 1999), algas (Yoshioka, *et al.*, 2004) y *D. discoideum* (Fukuzawa, *et al.*, 2006).
- **Proteínas relacionadas con Myb:** Se hallaron tres genes que no se agruparon dentro de ninguna de las tres familias, pero que codifican para proteínas que contienen DBD-Myb. Entre ellas se encuentra una proteína con alta identidad con la proteína CDC5, involucrada en *splicing*.



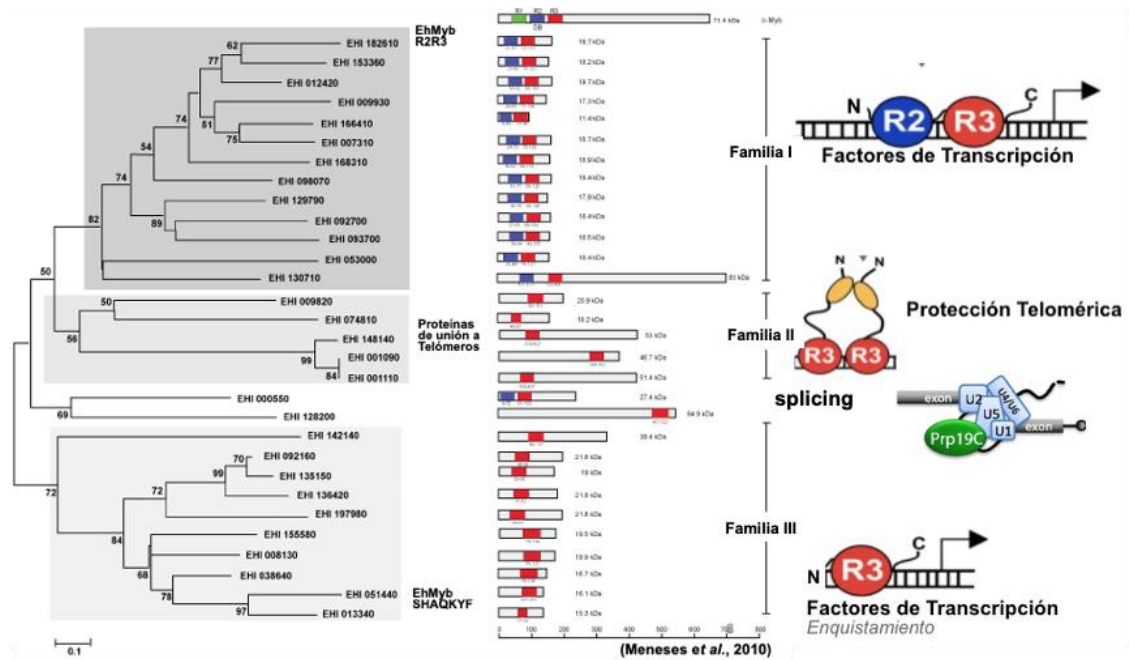


Figura 11. Proteínas EhMyb en *E. histolytica*. A) Árbol filogenético de las proteínas que contienen el dominio DBD-Myb en *E. histolytica*. Los números en los nodos indican el porcentaje de soporte de arranque (1000 réplicas), únicamente se muestran proporciones de arranque N50%. Los recuadros en gris indican los genes clasificados en las 3 familias halladas. La barra de escala en la parte inferior izquierda, indica las 0,1 sustituciones de aa estimadas por sitio. Diagrama de proteínas DBD-Myb. Repetición R1, verde; R2, azul; R3, rojo. Se indican los números de acceso de las proteínas y su masa molecular (kDa) y representación esquemática de las tres familias clasificadas. Imagen elaborada por la Dra. Elisa I. Azuara Liceaga mediante datos obtenidos de Meneses, *et al.*, 2010.

Mediante ensayos EMSA se determinó que el DBD-Myb de las proteínas de la familia I (EhMybR2R3) tiene especificidad de unión al ERM C/TAACG/TG canónico, así como los identificados en los promotores de los genes de *E. histolytica*, donde el repetido R3 interacciona con la secuencia C/TAAC y el repetido R2 interacciona con la secuencia G/TG (Meneses, *et al.*, 2010). En cambio, la familia 3 (EhMybSHAQKYF) es capaz de reconocer diversas secuencias consenso debido a la divergencia que existe en su tercer α -hélice en la repetición R3 (Cárdenas, *et al.* 2021).

3.3. Proteínas EhMybSHAQKYF como Factores de transcripción

Como se describió anteriormente, EhMybSHAQKYF (EhMybS) es una familia que contiene DBD-Myb en *E. histolytica* (Meneses, *et al.*, 2010). Esta familia de

TF contiene un único repetido (R1) y exhibe una secuencia [ST]HAQK[YF]F conservada en la tercera α -hélice en donde el tercer triptófano está sustituido por una alanina, de ahí el origen de su nombre SHAQKYF.

Las proteínas MybSHAQKYF se han descrito desde hace tiempo en plantas como *Arabidopsis thaliana*, donde participa en procesos celulares como el desarrollo o la regulación del ciclo circadiano (Carré, *et al.*, 2002). En algas como *Chlamydomonas reinhardtii* (Yoshioka, *et al.*, 2004) y amibas como *E. histolytica*, donde participan su desarrollo y diferenciación del trofozoíto a quiste (Ehrenkauf, *et al.*, 2009).

Las proteínas MybSHAQKYF no siempre reconocen la misma secuencia de DNA en la región promotora (Prouse, *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *Arabidopsis* la secuencia AAAATATCT es reconocida por las proteínas CCA1, LHY y RVE del promotor TOC1 (Wang, *et al.*, 1997). *E. histolytica* reconoce secuencias ricas en C como CCCCCC (Ehrenkauf, *et al.*, 2009) y *D. discoideum* la secuencia CACCCAC (Fukuzawa, *et al.*, 2006). Esta diferencia de reconocimiento va a depender tanto del gen como del organismo (Prouse, *et al.*, 2012).

El genoma de *E. histolytica* contiene 9 genes *ehmybs* (*ehmybs1- ehmybs9*); con una longitud de aproximadamente 399-624 pb, que codifican para proteínas de aprox. 132-189 aa con un peso molecular de 15.3-21.8 kDa y su pI es básico en todas las proteínas (Tabla 3). Tres de estas proteínas (EhMybS7, EhMybS8 y EhMybS9) presentan variaciones en la secuencia de aa de su motivo conservado [ST]HAQK[YF]F, donde la serina es reemplazada por una treonina, lo cual les proporciona un motivo THAQKYF (Fig.12) (Cárdenas, *et al.*, 2021).



Tabla 3. Familia EhMybSHAQKYF de *E. histolytica*.

Nombre	Longitud del gen (pb)	Peso molecular de la proteína (kDa)	pI	Anotación
EhMybS1	570	21.8	10.1	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family
EhMybS2	498	18.9	10.2	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family
EhMybS3	534	20	9.6	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family
EhMybS4	624	21.8	10.3	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family
EhMybS5	558	19.9	9.2	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family
EhMybS6	554	19.5	7.9	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family
EhMybS7	402	16.1	10.1	Proteína hipotética
EhMybS8	399	15.3	10.1	Proteína hipotética
EhMybS9	517	16.7	7.8	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family

*Datos obtenidos de la base de datos AmoebaDB

Por otro lado, el análisis *in silico* reveló que algunas proteínas EhMybS muestran la presencia de dominios relacionados con el complejo SWI/SNF, como es el caso de la proteína EhMybS3 (Cárdenas, *et al.*, 2021). Los dominios SWI/SNF están asociados con la capacidad de interactuar con la cromatina, lo que sugiere que estas proteínas pueden estar involucradas en el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina y de esta manera activar la transcripción (Boyer, *et al.*, 2002). También, un alineamiento *in silico* de las 9 proteínas EhMybS, c-Myb humana y ARR10/RVE *A. thaliana*, reveló que la primer α -hélice de todos los organismos tienen un triptófano (W) conservado. Sin embargo, la segunda α -hélice está menos conservada debido a que solamente EhMybS1-3 y c-Myb lo presentan. Curiosamente, en la tercera α -hélice donde se encuentra la secuencia conservada Q[VI]R[ST]HAQK[YF]F (motivo SHAQKYF), únicamente c-Myb conserva este triptófano, pero *E. histolytica* lo sustituye por una alanina y *A. thaliana* por una leucina, sin embargo, esto no altera su capacidad de unirse al DNA (Saikumar, *et al.*, 1990).



En general, los residuos conservados en todos los organismos son fenilalanina (F), isoleucina (I) y alanina (A). (Fig.12) (Cárdenas, *et al.*, 2021).

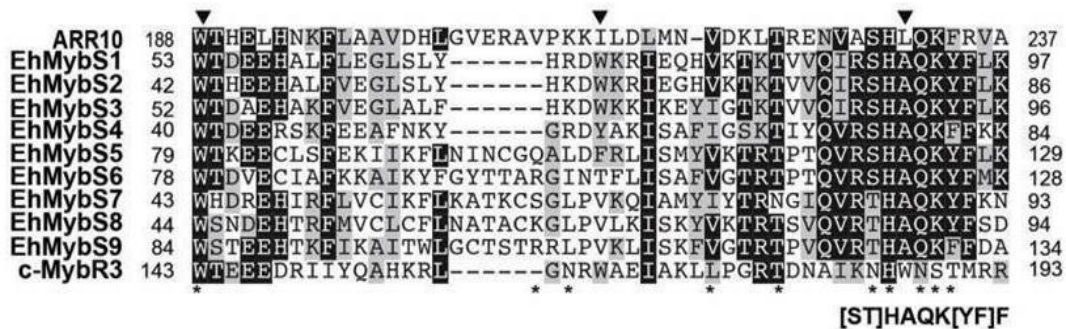


Figura 12. Proteínas EhMybS en *E. histolytica*. A) Alineamiento de la secuencia del Myb-DBD de las 9 proteínas EhMybS, c-Myb canónico humano y ARR10 de *A. thaliana*, mediante la herramienta BioEdit. Los residuos de aminoácidos idénticos y similares están sombreados en recuadros negros y grises, respectivamente. Las puntas de flecha indican a los residuos de triptófano conservados. Los asteriscos indican los residuos de ARR10 que interactúan con su secuencia blanco. Los números indican la posición Myb-DBD de cada proteína mostrada en el alineamiento. Imagen obtenida de Cárdenas, *et al.*, 2021.

3.4. Cambios de expresión de la familia de factores de transcripción EhMybS

Estudiar los patrones de expresión génica en diferentes condiciones es muy importante, ya que ayuda a comprender mejor la patogénesis, la biología y la fisiología de los parásitos. También ayuda a entender procesos como colonización y la invasión intestinal, así como el proceso de transición de trofozoíto a quiste. Para comprender mejor el papel de los TF EhMybS en la adaptación del parásito al huésped, se realizó un análisis *in silico* de sus patrones de expresión en diferentes condiciones.

En condiciones basales los genes de mayor expresión fueron *ehmybs2*, *ehmybs5*, *ehmybs1* y *ehmybs4* (60.7 y 36.83 TPM, respectivamente). Los genes que tienen una menor expresión basal en condiciones basales de cultivo son *ehmybs3*, *ehmybs6*, *ehmybs7*, *ehmybs8* y *ehmybdr* (Fig.13).

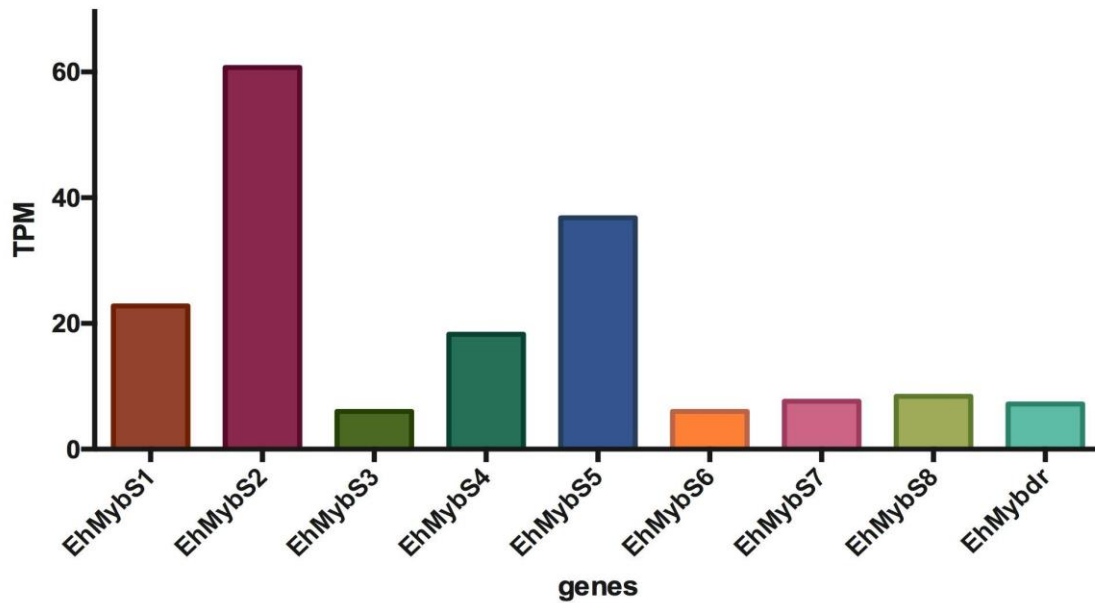


Figura 13. Patrón de expresión de los genes *ehmybs* de *E. histolytica*. Niveles de expresión de los 9 genes *ehmybs* en condición basal obtenidos del transcriptoma para *E. histolytica* HM1:IMSS mediante secuenciación Illumina RNA-seq de cultivo axénico recolectado después de 48 horas por Shabardina, *et al.*, 2018. Datos obtenidos de la base de datos Amoebadb.

Por otro lado, se analizaron los niveles de expresión de los genes de la familia *ehmybs* a partir de transcriptomas obtenidos por microarreglos o por RNAseq los cuales se encuentran en la base de datos AmoebaDB bajo diferentes condiciones: a) clonas de *E. histolytica* HM1: IMSS (virulenta) y Rahman (no virulenta); b) Colonización e invasión intestinal en un modelo murino; c) Modelo de enquistamiento cultivando a los trofozoítos en medio de Robinson; d) Modelo de Virulencia en explante de colon; e) estrés inducido por privación de suero y posteriormente su restauración y f) durante un choque térmico.

Durante el evento de colonización intestinal y la adaptación de enquistamiento/ desenquistamiento, se observa que durante el día 1 de colonización intestinal los genes *ehmybs2*, *ehmybs4* y *ehmybs7* son los que aumentaron su expresión significativamente. En el día 29 de invasión intestinal se observó que además de los genes antes descritos el gen *ehmybs3* también aumentó su expresión (Fig.14 A). Durante el modelo de enquistamiento se observó que los genes *ehmybs1*, *ehmybs3*, *ehmybs5*, *ehmybs6* y

ehmybdr son los que inducen su expresión (Fig.14 A). Las clonas de *E. histolytica* HM1: IMSS (virulenta) y Rahman (no virulenta) mostraron que *ehmybs2* y *ehmybs7*, se regulan positivamente (Fig.14B), indicando que estos genes podrían desempeñar un papel crucial en la capacidad del parásito para causar enfermedad en el huésped. Los genes *ehmybs1*, *ehmybs3* y *ehmybs4* se expresaron más abundantemente durante la interacción con el explante de colon (Fig.14B). Durante la privación de suero los genes *ehmybs4*, *ehmybs6*, *ehmybs8*, *ehmybdr* y *ehmybs3* son los que se expresan más abundantemente (Fig.14B). Sin embargo, durante un choque térmico los genes aumentaron su expresión son *ehmybs1*, *ehmybs2*, *ehmybs5* y *ehmybs7*.

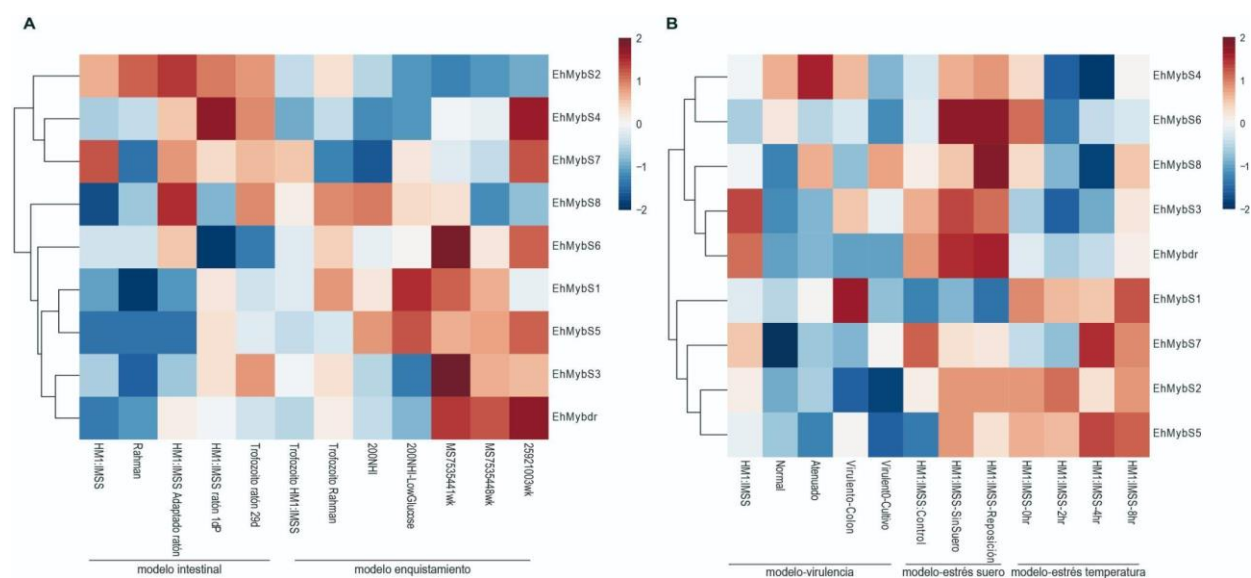


Figura 14. Patrón de expresión de los genes *ehmybs* de *E. histolytica* en diferentes condiciones. Los niveles de expresión se obtuvieron con base en los transcriptomas publicados en la base de datos AmoebaDB. A) Análisis transcriptómicos obtenidos por medio de microarreglos: Trofozoítos *E. histolytica* aislados del colon de ratones infectados, de cultivo *in vitro* y de amibas aisladas del intestino en los días 1 y 29 después de la infección (Gilchrist, *et al.* 2006) y parásitos *E. histolytica* en un modelo de enquistamiento cultivados en medio de Robinson durante 1-8 semanas del enquistamiento-desenquistamiento (Ehrenkauf, *et al.*, 2007). B) Análisis transcriptómicos obtenidos por medio de RNAseq: Efecto del estrés inducido por ausencia de suero, se muestran los datos de condiciones normales; sometido a inanición de suero durante 24 h; y repuesto con suero durante 2 h, después de la inanición (Naiyer *et al.*, 2019); Expresión obtenida de las cepas de *E. histolytica* virulentas (HM1:IMSS) y no virulentas (Rahman) mediante Illumina RNA-Seq (Hon, *et al.*, 2013).



De manera interesante, el gen *ehmybs3* reveló cambios significativos en la expresión en las condiciones relacionadas con la virulencia y la interacción con las células epiteliales intestinales mostrando que su sobreexpresión en condiciones de colonización intestinal puede proporcionar información útil sobre cómo los parásitos interactúan con el entorno intestinal del huésped. Así mismo este gen aumenta su expresión durante el enquistamiento, lo cual también permite proponer que pudiera estar involucrado en este proceso.

3.5. Factor de transcripción EhMybS3

El gen *ehmybs3* tiene una longitud de 534 pb y codifica para la proteína EhMybS3. Este TF consta de 177 aa y contiene un dominio DBD-Myb de 53 aa (AmoebaDB ID: EHI_136420). Tiene un PM de 20 kDa con un pI de 9.6 (Tabla 3). La estructura tridimensional de EhMybS3 muestra que está formada por tres α -hélices estabilizadas por un núcleo hidrofóbico que las mantiene unidas (Fig.15A). Este núcleo hidrofóbico está caracterizado por contener residuos de aa como: Trp52, Phe60, Val61, Leu64, Trp71, Ile74, Ile78, Ile86, His89, Ala90 y Tyr93. Sin embargo, la fenilalanina (Phe) puede ser reemplazada por una leucina (Leu) (Fig. 15D) (Cárdenas, *et al.* 2021).

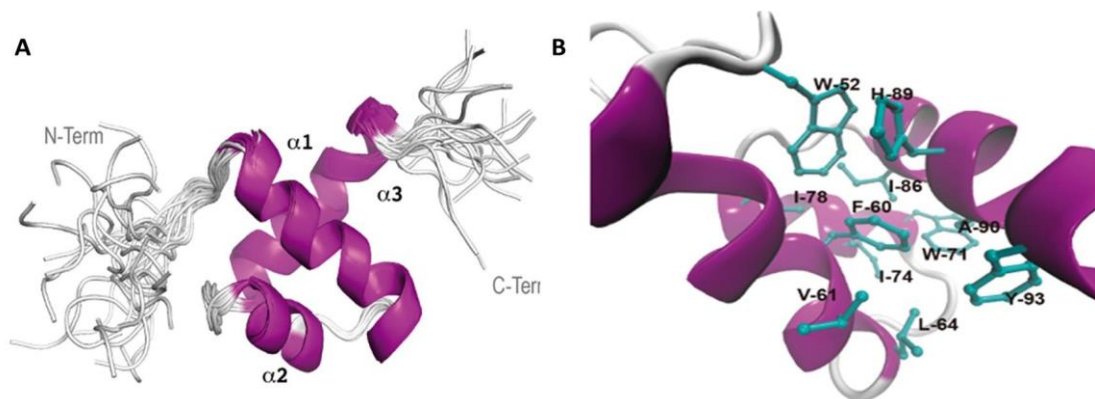


Figura 15. Estructura EhMybS3. A) Estructura de RMN de EhMybS3 representando la hélice 1 (Thr53 a Phe67); hélice 2 (Asp70 a Gly79) y hélice 3 (Val83 a Leu97). B) Las tres hélices estabilizadas por un núcleo hidrofóbico formado por los residuos Trp52, Phe60, Val61, Leu64, Trp71, Ile74, Ile78, Ile86, His89, Ala90 y Tyr93. Imagen obtenida de Cárdenas, *et al.*, 2021.

Por otro lado, se ha determinado que *E. invadens* tiene como ortólogo de la proteína EhMybS3 a la proteína EIN_031250. Se sabe que esta proteína EIN_031250 está implicada en procesos de enquistamiento-desenquistamiento (Ehrenkaufner, *et al.*, 2013), por lo que probablemente EhMybS3 también podrían estar involucradas en esta red transcripcional asociada con la conversión de trofozoíto a quiste, y tener participación en la modificación de la estructura de la cromatina, debido a que presenta dominios relacionados con el complejo SWI/SNF (Cárdenas, *et al.*, 2021).

Otro ensayo realizado por el M. en C. Helios Cárdenas, demostró que al clonar el gen *ehmybs3* en el vector pKT3M (Fig.16A) y transfectarlo en trofozoítos de forma estable, se generó una proteína de fusión Myc-EhMybS3 sobreexpresada en estas células (Fig.16B), la cual al hacer un ensayo de inmunodetección, se observó que EhMybS3 se localizaba en el núcleo de los trofozoítos. El peso molecular de la proteína detectada mediante un ensayo de inmunodetección fue de 24 kDa (Fig. 16C). También aisló el mRNA para un análisis transcriptómico a través de un microarreglo que dio como resultado la identificación de 97 genes que modificaron su expresión. De los cuales: 40 genes se regularon positivamente y 57 genes se regularon negativamente (tesis del M. en C. Helios Cárdenas en proceso). La mayoría de estos genes están implicados en procesos relacionados con el citoesqueleto, la transducción de señales, la respuesta al estrés y la adhesión.



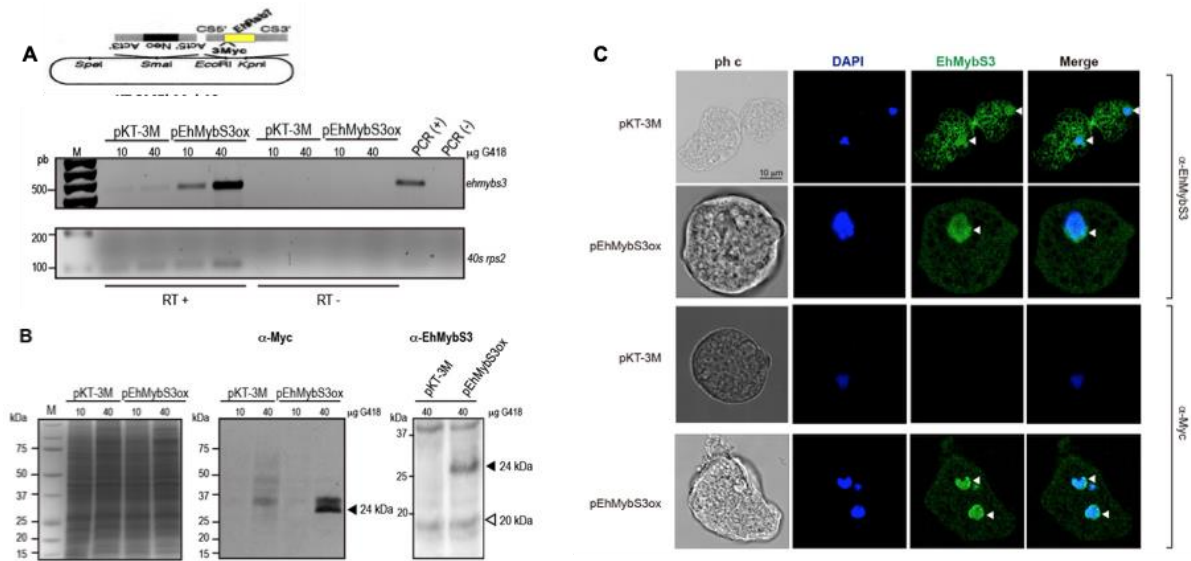


Figura 16. Sobreexpresión de la proteína EhMybS3 en *E. histolytica*. (A) Análisis de RT-PCR del gen *ehmybs3* en trofozoítos transfectados de forma estable con el plásmido vacío pKT-3M o pEhMybS3ox. Se utilizó como control el gen de la subunidad *rsp2* del ribosomal 40s. (B) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra extractos totales de trofozoítos transfectados (plásmido vacío pKT-3M o pEhMybS3ox). Se transfirió un gel duplicado a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un WB usando anticuerpos α -Myc y α -*ehmybs3*. (C) Los trofozoítos transfectados se procesaron para Inmunofluorescencia y se incubaron con los anticuerpos α -*ehmybs3* o α -Myc, seguidos por el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a FITC. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las preparaciones se visualizaron mediante microscopía confocal. Puntas de flecha: ubicación de *ehmybs3* en los núcleos. ph c, contraste de fase. Imagen obtenida de la tesis del M. en C. Helios Cárdenas.

Para comprender mejor el papel de este TF, así como la función de los genes que se están modificando y los procesos biológicos con los que están asociados, proponemos en este estudio analizar con más profundidad a la proteína EhMybS3 y los patrones de expresión de sus genes blanco en *E. histolytica*.

4. Hipótesis

La sobreexpresión del factor de transcripción EhMybS3 afecta la expresión de sus genes blanco y las propiedades de virulencia de *E. histolytica*.

5. Justificación

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amebiasis intestinal, la cual es la segunda causa de mortalidad ocasionada por un protozooario parásito. La regulación de la expresión génica es relevante para modular la relación huésped-parásito y tiene un papel fundamental en la regulación de la virulencia y el enquistamiento. Los factores de transcripción EhMybS modulan su expresión en diferentes condiciones relacionadas con el ciclo de vida de este parásito, específicamente el factor de transcripción EhMybS3 modula genes relacionados con la resistencia al estrés. Por lo que el estudio de EhMybS3 proporcionará información relevante sobre su papel en el control transcripcional.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

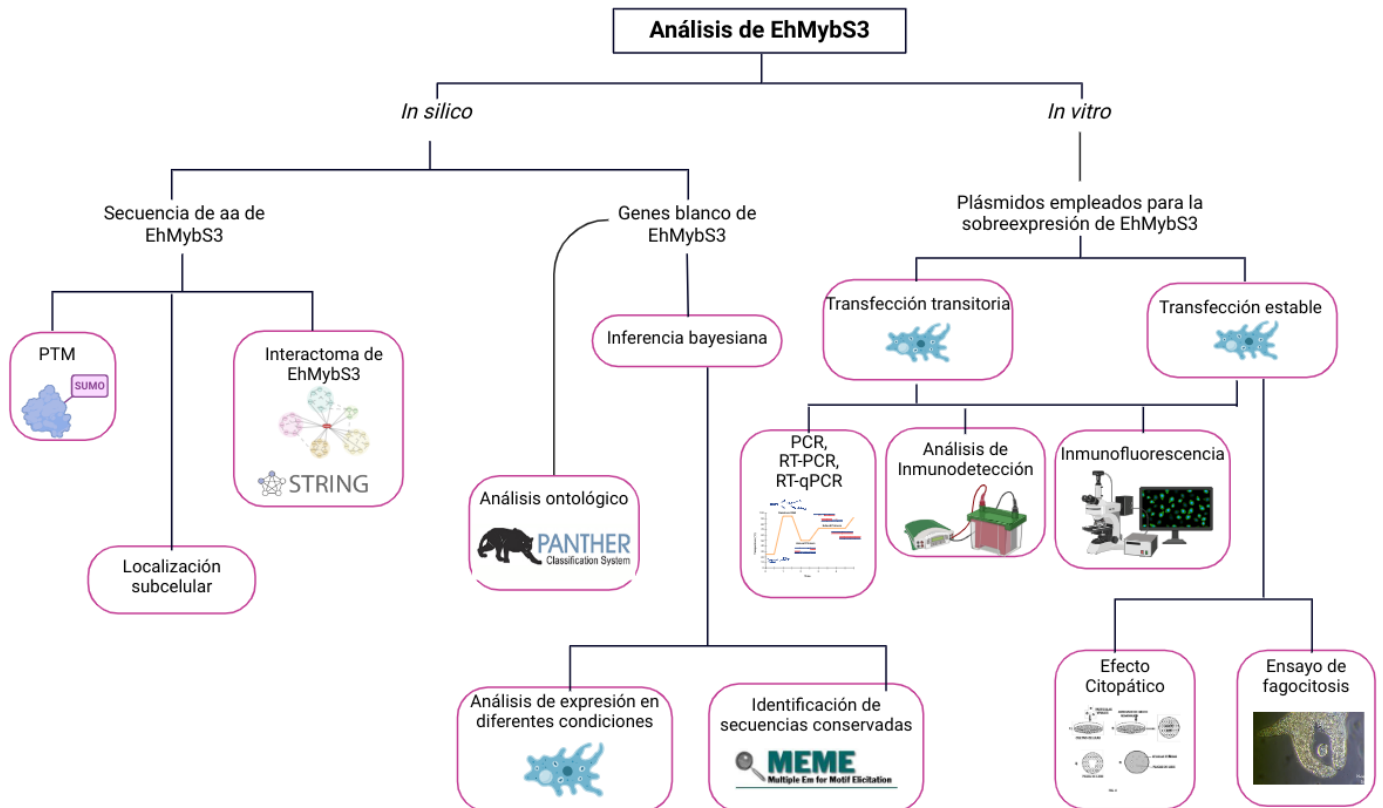
Analizar el efecto de la sobreexpresión de EhMybS3 sobre sus genes blanco y las propiedades de virulencia de *E. histolytica*.

6.2. Objetivos particulares

1. Caracterizar *in silico* la proteína EhMybS3.
2. Analizar los patrones de expresión de *ehmybs3* y sus genes blanco en condiciones basales y en diferentes eventos relacionados con los procesos biológicos relevantes para el parásito *E. histolytica*.
3. Buscar secuencias conservadas en los promotores de los genes blanco de EhMybS3.
4. Determinar la expresión de los genes blanco al sobreexpresar EhMybS3 en trofozoítos de *E. histolytica*.
5. Analizar el efecto de la sobreexpresión de EhMybS3 en las propiedades de virulencia de *E. histolytica*.



7. Estrategia experimental



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de EhMybS3, identificación de PTM e interactoma

A través de la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app/>), se obtuvieron las secuencias del gen y la proteína EhMybS3 al introducir su número de acceso (EHI_136420). La secuencia de la proteína se descargó en formato FASTA. Posteriormente, utilizando el servidor Expasy (<https://www.expasy.org/>), se llevó a cabo el análisis del PM y el pI de la proteína.

Para identificar las PTM de la proteína EhMybS3, se utilizaron las siguientes herramientas:

1. NetPhos-3.1-services
(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3>):
Empleado para determinar los residuos susceptibles a fosforilación, utilizando los parámetros preestablecidos.
2. JASSA V4 (<http://www.jassa.fr>): Utilizado para identificar los residuos susceptibles de SUMOilación, con la configuración de parámetros preestablecidos.
3. YinOYang1.2-DTU
(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/YinOYang-1.2/>):
Empleado para determinar los residuos susceptibles a glicosilación, seleccionando los parámetros "yin-yang site predictions" y "show all S/T residues".

En cuanto al análisis de interacción proteína-proteína, se llevó a cabo a través del servidor STRING (versiones 10.5, 11 y 12) (<https://string-db.org>), ingresando el número de acceso de la proteína EhMybS3 (EHI_136420) y seleccionando el organismo *E. histolytica*. Se establecieron como parámetros un puntaje de interacción de confianza media (0.400) como valor de corte y un

número máximo de no más de 10 interactuantes.

8.2. Análisis ontológico (GO) del interactoma de EhMybS3

Para el análisis ontológico (GO) en función molecular y proceso biológico de los genes blanco regulados por EhMybS3 de acuerdo con la clasificación de sus patrones de expresión, se utilizó el servidor PantherDB (<http://www.pantherdb.org>), donde se introdujo la lista de genes del microarreglo realizado por el M. en C. Helios Cárdenas (Tablas 10 y 11).

8.3. Clasificación de genes blanco del factor de transcripción EhMybS3 de acuerdo con su nivel de expresión basal

Para analizar los patrones de expresión de los genes blanco del TF EhMybS3 se analizó el transcriptoma de trofozoítos en condiciones basales de cultivo publicado por Shabardina, *et al.*, 2018, en la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>). Los valores de expresión basal en transcritos por millón (TPM) se procesaron de la siguiente forma: 1) Se aplicó la transformación \log_2 de los TPM; 2) Se obtuvo la media (\bar{x}) de los datos; 3) Cada dato se normalizó con la siguiente ecuación: $x = (\log_2 - \bar{x}^2) / \text{sd}$. Una vez normalizados se clasificaron de acuerdo con sus niveles de expresión (expresión muy baja, baja, moderada, alta y muy alta) de acuerdo con la estrategia reportada por Naiyer, *et al.*, 2019. Para ello, se contó con la ayuda del M. en C. Carlos Martínez, Profesor de la Academia de Matemáticas, Plantel Casa Libertad, UACM.

8.4. Identificación de las secuencias conservadas en los promotores de genes regulados por EhMybS3 de acuerdo con sus patrones de expresión

Dentro de la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>) se descargaron las secuencias en formato Fasta de las regiones promotoras de los genes regulados por EhMybS3, clasificados por sus patrones de expresión (muy baja, baja, moderada, alta y muy alta). Para ello, se obtuvieron las

regiones promotoras a partir de 100 nucleótidos río arriba del ATG y +40 nucleótidos río abajo, con el fin de identificar motivos conservados en estas regiones utilizando la herramienta MEME-SUITE Version 5.5.4 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) y como parámetro un tamaño de 6-12 nucleótidos para cada motivo.

8.5. Análisis de la expresión del gen *ehmybs3* y sus genes blanco en condiciones de colonización intestinal, enquistamiento -desenquistamiento y virulencia

Para el análisis de expresión del gen *ehmybs3* y sus genes blanco en diferentes condiciones utilizando datos de diferentes estudios transcriptómicos, se empleó la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>). Se ingresaron los números de acceso del gen *ehmybs3* (EHI_136420) y de sus genes blanco para su análisis a través del transcriptoma de *E. histolytica* obtenido durante la colonización intestinal, el cual fue reportado por Gilchrist, *et al.*, 2006 mediante Microarreglos. Además, se analizaron los transcriptomas de *E. histolytica* cultivados en medio Robinson durante 1 a 8 semanas como un modelo de enquistamiento, obtenido por Ehrenkauf, *et al.*, 2007, y el transcriptoma de *E. histolytica* en diferentes cultivos relacionados con la virulencia mediante RNA-seq realizado por el autor Hon, *et al.*, 2013.

Los datos recopilados se visualizaron en un mapa de calor a través del servidor Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/>). Se seleccionó el método de enlace promedio (Average Linkage) para calcular la agrupación jerárquica, y se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson como método para calcular la distancia entre filas y columnas.

8.6. Plásmidos empleados para sobreexpresar el factor de transcripción EhMybS3

Los plásmidos pKT3M (Saito-Nakano, *et al.*, 2004) y pKT3M-*ehmybs3* fueron proporcionados por la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga (Posgrado en Ciencias



Genómicas-UACM). El grupo de trabajo de la Dra. Azuara clonó la secuencia completa del gen *ehmybs3* (EHI_136420) en el plásmido pKT3M, utilizando los sitios de restricción *Sma*I y *Xho*I. La construcción pKT3M-*ehmybs3* contiene dos promotores: el promotor de actina, que permite la expresión del gen de resistencia a neomicina, y el promotor de cisteína sintasa, que controla la expresión del gen *ehmybs3*. Esta construcción incluye una etiqueta 3X-Myc en el extremo 5' del gen *ehmybs3* (Fig. 17), lo que permite la expresión de proteínas etiquetadas con el tag de Myc.

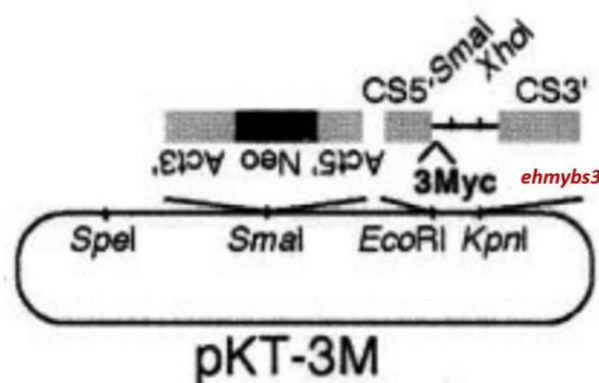


Figura 17 . Construcción y representación esquemática del vector de clonación pKT3M. Plásmido derivado de pBluescript KS II. Contiene el promotor de cisteína sintasa (CS), gen de actina (Act) y gen de resistencia a neomicina (Neo). La etiqueta 3-Myc está ubicada en el extremo 5'. El gen *ehmybs3* se clonó entre los sitios de restricción *Sma*I y *Xho*I. Imagen obtenida de Saito-Nakano, *et al.*, 2004.

La expansión y transformación de los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* se realizó en bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α . Inicialmente, las células competentes de *E. coli* DH5 α se descongelaron en hielo y se dividieron en alícuotas de 50 μ L, a las cuales se les agregaron 20 ng de cada uno de los plásmidos (pKT3M y pKT3M-*ehmybs3*). La transformación de las bacterias se llevó a cabo mediante un choque térmico en un baño de agua a 42°C durante 30 s. Luego, se incubó en hielo durante 3 min y se añadieron 250 μ L de medio LB temperado para incubar a 37°C con agitación a 200 rpm durante 1 h. Después de la incubación, se sembraron 50 μ L de cada transformación en cajas de Petri con medio LB-agar que contenía ampicilina (100 μ g/mL), y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, en condiciones de

esterilidad, se seleccionó una colonia de la caja de Petri utilizando un asa bacteriológica, y se transfirió a un tubo con 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL), dejándolo incubar en agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, en condiciones de esterilidad, se transfirió el contenido de los tubos a matraces de Erlenmeyer con 100 mL de medio LB y ampicilina (100 µg/mL), para incubar a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Para la cosecha de las bacterias, se centrifugó el inóculo en tubos falcón de 50 mL estériles a 6,000 rpm durante 5 min a 4°C para obtener la pastilla, la cual se congeló a -20°C o se procesó según fuera necesario.

8.7. Obtención de DNA plasmídico

El DNA plasmídico de pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* se extrajo de las pastillas obtenidas de las bacterias transformadas utilizando el kit QIAGEN® Plasmid Plus Midi. Las pastillas se resuspendieron en 10 mL de buffer P1 con la ayuda de un vórtex. A continuación, se agregaron 10 mL de buffer P2 de lisis, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min a TA, observándose una coloración azulada en la mezcla. Después de la incubación, se añadieron 10 mL de buffer P3 frío, se mezcló hasta perder el tono azulado y se incubó durante 15 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 30 min a 4°C para separar la fase acuosa que contenía el DNA y el precipitado de proteínas. Por otro lado, se equilibró una columna del kit QIAGEN® para cada plásmido con 10 mL de buffer de equilibrio (QBT). Una vez equilibradas, se transfirió cuidadosamente el sobrenadante de cada muestra en su columna correspondiente, permitiendo que las columnas se vaciaran por gravedad. Luego, se lavaron las columnas dos veces con 15 mL de buffer QC para eliminar contaminantes. Después de los lavados, las columnas se colocaron en tubos falcón de 50 mL nuevos con 10 mL de isopropanol, y se añadieron 15 mL de buffer QF por las columnas para realizar la precipitación del DNA. Finalmente, el DNA se centrifugó a 8,000 rpm durante 30 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y las pastillas resultantes se



lavarón con 2 mL de etanol al 70%. Después de retirar el etanol, las muestras se dejaron secar a TA. Posteriormente, se resuspendieron en 100 μ L de H₂O inyectable.

Inmediatamente, se cuantificó el DNA plasmídico a través del NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™) y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%. El DNA plasmídico se almacenó a 4°C hasta su uso.

8.8. Obtención de trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresan el factor de transcripción EhMybS3.

8.8.1. Transfección transitoria. Se cultivaron $\sim 1 \times 10^6$ trofozoítos de *E. histolytica* en tubos de vidrio pequeños a 37° C por 30 min. Por otro lado, en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo, se adicionó 5 μ g del plásmido + 150 μ L de medio TYI-S-33 sin suero + 5 μ L de Superfect (QIAGEN®), se mezclaron con ayuda de un vórtex durante por 10 s y se incubaron por 10 min a TA. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 1 mL de medio TYI-S-33 con suero templado. Estas mezclas se adicionaron a los trofozoítos pegados a los tubos y se complementó con 1 mL de medio TYI-S-33 completo y se incubaron a 37°C de forma horizontal durante 10 min. Después de la incubación, se adicionaron 6 mL de medio TYI-S-33 completo y se incubaron por 3 h a 37°C / 5% CO₂ de forma horizontal. Los tubos se envolvieron en aluminio para evitar derrame de medio y contaminación. Posteriormente, los tubos se incubaron 10 min en hielo para que las amibas se despegarán, para poder transferirlas a tubos grandes de vidrio para llevar el cultivo a 10 mL de medio. Los trofozoítos se cosecharon a las 24, 48 y 72 hpt.

8.8.2. Transfección estable.

Para la transfección estable se siguió el protocolo descrito por Bettadapur, *et al.*, 2020, para ello se cultivaron trofozoítos crecidos en fase logarítmica en una caja de cultivo de 25 cm². Las células se cosecharon, se resuspendieron en medio M199 (Sigma Aldrich) a una concentración de 2.5×10^5 células/mL.



Posteriormente, se preparó 10 µg de DNA plasmídico en un total de 200 µL de medio M199s (sin suero bovino adulto) en un criotubo de 2 mL y se añadió 37.5 µL de Attractene Transfection Reagent (QIAGEN®) a cada tubo. Se incubó la mezcla de DNA-Attractene durante 10-15 min para permitir la formación de complejos de transfección de DNA. Finalmente, se agregaron las células, se mezcló bien y se incubaron las amibas a 37°C durante 3 horas. Al cabo de ese tiempo, se añadió el contenido de los criotubos a una caja de cultivo de 25 cm² que contenía 60 mL de medio TYI-S-33 completo con suero bovino. Transcurridas 24 h, los trofozoítos se seleccionaron con el antibiótico G-418 (Life technologies, un análogo de neomicina) a una concentración de 1 µg/mL a las 24 hpt. La concentración del antibiótico se aumentó gradualmente considerando la confluencia de los cultivos (80%) y se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una concentración de 20 µg/mL de G-418.

8.9. Análisis de la expresión de *ehmybs3* y sus genes blanco

8.9.1. Extracción de DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico (DNAg), se empleó el kit Wizard® Genomic DNA (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. En primer lugar, los trofozoítos de HMI:IMSS *E. histolytica* (4×10^6) fueron cosechados mediante centrifugación a 1,800 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue retirado, y a la pastilla resultante se le añadieron 600 µL de solución de lisis de núcleos (NLS), la cual fue mezclada con la misma micropipeta hasta obtener una mezcla homogénea, evitando la pérdida de muestra. Después, se añadieron 3 µL de RNasa, mezclando por inversión de 2 a 5 veces de manera suave, seguido de una incubación de 30 min a 37°C, y posteriormente, una incubación de 5 min a TA. Luego, se incorporaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas (PPS), agitándolo con un vórtex durante 20 s e incubándolo en hielo durante 5 min. Se llevó a cabo una

centrifugación a 13,000 rpm por 4 min a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo con 600 µL de isopropanol previamente añadidos. Se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm a 4°C, y la pastilla resultante se lavó con 600 µL de etanol al 70%. Después del lavado, se retiró el etanol y se permitió que la pastilla se secase. Una vez seca, se resuspendió con 100 µL de agua estéril. Finalmente, el DNAg se cuantificó utilizando el NanoDrop™ de Thermo Fisher Scientific™. La muestra se almacenó a 4°C hasta su utilización.

8.9.2. Aislamiento de RNA de trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresan a EhMybS3

Los trofozoítos cosechados a las 24, 48 y 72 hpt fueron centrifugados a 1,800 rpm durante 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se añadió 1 mL de Trizol (Invitrogen). Los trofozoítos se resuspendieron y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo a los tubos, los cuales se agitaron por 30 s y luego se incubaron durante 5 min a TA. Una vez completado el tiempo de incubación, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a otro tubo y se le añadieron 500 µL de isopropanol frío, agitándolo por inversión. Luego, se incubó durante 10 min a TA y se centrifugó a 11,000 rpm a 4°C durante 20 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75% para el lavado, centrifugándolo a 11,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente, el RNA se resuspendió en 50 µL de agua inyectable estéril y la muestra se cuantificó mediante NanoDrop™ de Thermo Fisher Scientific™. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta su uso.

8.9.3. Tratamiento con DNasa I y obtención de cDNA

Para el tratamiento con DNasa I, se añadió 1 µg de RNA a un volumen de 8 µL con H₂O inyectable estéril. Se agregaron 1 µL de DNasa I y 1 µL de buffer



10x, seguido de una incubación de 30 min a 37°C. Después de la incubación, se añadió 1 µL de DNasa stop y se incubó durante 10 min a 65°C para inactivar la DNasa I.

En cuanto a la síntesis del cDNA, se empleó 1 µg de RNA previamente tratado con DNasa I. Se agregó 1 µL de oligo dT (Promega), llevando la mezcla a un volumen final de 5 µL, y se incubó a 65 °C durante 5 min, seguido de una incubación a 4 °C durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 3 µL de buffer Improm 5x, 2 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dNTPs, 1 µL de RNAsin, 2 µL de H₂O y 1 µL de RT, llevando la reacción a un volumen final de 15 µL. Finalmente, la reacción se procesó en un termociclador con las condiciones descritas en la figura 18, y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

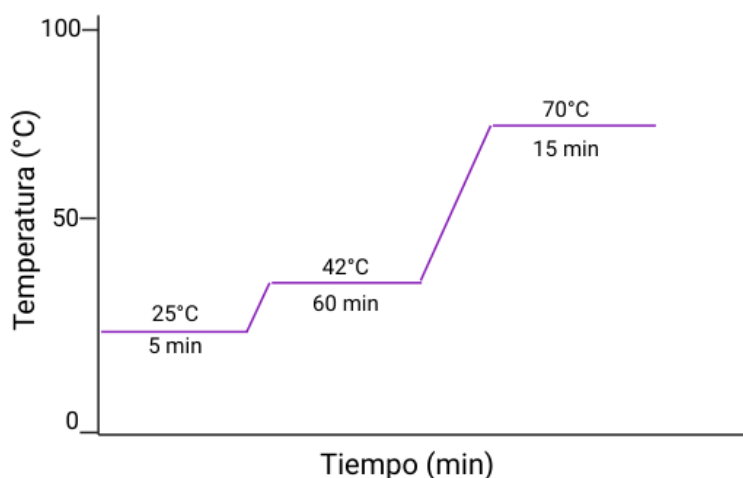


Figura 18. Condiciones para la síntesis de cDNA. Representación gráfica de la temperatura (°C) y tiempo (min) en el que se realiza la amplificación de cDNA.

8.9.4. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para analizar la expresión del gen *ehmybs3* (EHI_136420) y dos de sus genes blanco seleccionados, *cilicina-2* (EHI_080100) y *filamina* (EHI_104630). Para ello, se descargaron las secuencias de nucleótidos de la base de datos AmoebaDB y se empleó el programa *Primer designing tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

En la tabla 4 se muestran los oligonucleótidos diseñados que amplifican fragmentos menores a 220 pb y que fueran específicos para los genes.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes analizados.

ID	Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Tm (°C)	Tamaño
EHI_136420	<i>ehmybs3</i>	S CCACAACCATTTACCTTAACTC	55	118 pb
		AS CATTGTAGAGTCTCCAATGTG	55	
EHI_080100	<i>cilicina-2</i>	S AGT AAA CAA CAA AAG GAG AATA	55	217 pb
		AS TAC GGA TGA AAC GCA TAA AC	55	
EHI_104630	<i>filamina</i>	S TAC GGA TGA AAC GCA TAA AC-3	55	208 pb
		AS TTC CAC AAG TAC CAG GAA AA	55	
EHI_020280	<i>40S ribosomal protein S2, putative (s2 40s)</i>	S GAGATCACAACGGTCATGCT	55	189 pb
		AS GTGACACGAACTGAACCACA	55	

8.9.5. RT-PCR semicuantitativa

Los ensayos de RT-PCR en tiempo final se llevaron a cabo utilizando 500 ng de cDNA previamente tratado con DNase I y con DNAg utilizado como control. Se añadió 1x de PCR Máster Mix (Promega) junto con 0.15 µM de cada oligonucleótido, aforando la reacción a un volumen final de 12.5 µL con H₂O libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación se detallan en la figura 19. Como control negativo, se empleó la misma reacción con el RNA tratado con DNase I. Para el análisis de los productos amplificados, se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x teñido con GelRed (Biotium).

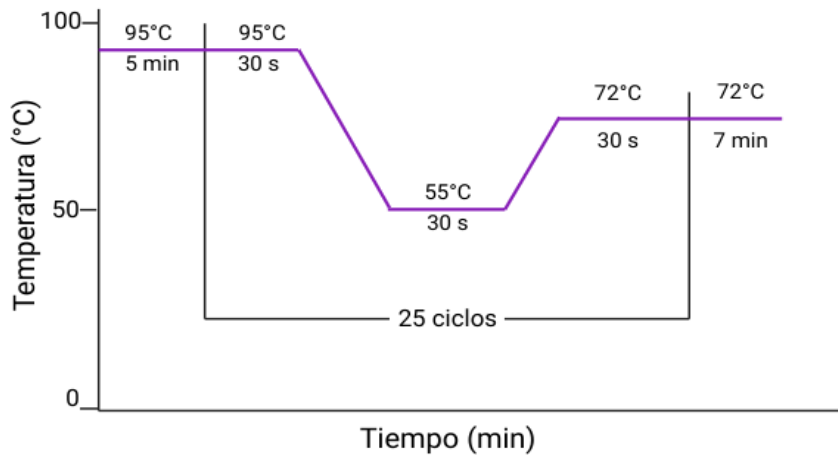


Figura 19. Condiciones de amplificación para la RT-PCR semicuantitativa. Representación gráfica del número de ciclos, temperatura (°C) y tiempo (min) en el que se realiza la amplificación de genes.

8.9.6. Ensayo de RT-qPCR

En primer lugar, se descongeló el Máster Mix 2x QuantiFast SYBR Green PCR (QIAGEN®), así como las muestras de RNA tratado con DNase I, los primers y H₂O libre de RNase. Posteriormente, se preparó una mezcla específica para cada muestra en placas para PCR de 96 pozos, siguiendo las indicaciones detalladas en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la reacción para la RT-qPCR

Volumen Reacción	
Componentes	Placa 96 pozos
2x QuantiFast SYBR Green PCR Máster Mix	12.5 µL
Primer sentido	1 µL
Primer antisentido	1µL
Templado RNA	50 ng
QuantiFast RT mix	0.25 µL
H ₂ O libre de RNase	Variable
Volumen final de la reacción	25 µL

Después de montar la placa de 96 pozos con las muestras, se colocó la placa de PCR en el equipo de tiempo real (Applied Biosystems). A continuación, se programó el termociclador con las condiciones detalladas en la figura 20. Además, se llevó a cabo un análisis de la curva de disociación (Melting curve) de los productos de PCR para confirmar la ausencia de subproductos de amplificación o dímeros de los oligonucleótidos.

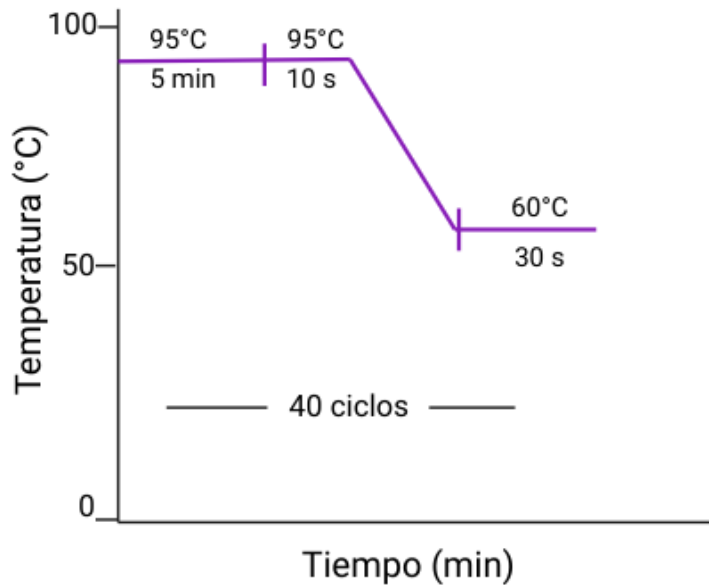


Figura 20. Condiciones de amplificación para la RT-qPCR. Representación gráfica del número de ciclos, temperatura (°C) y tiempo (min) en el que se realiza el ciclado de la amplificación de los genes de interés.

8.10. Aislamiento de proteínas

Para precipitar las proteínas EhMybS3 sobreexpresadas a partir de la transfección transitoria y estable, se añadió 1.5 mL de isopropanol por cada 1 mL de trizol para la homogenización inicial de cada muestra, incubando durante 20 min a TA. Después de la incubación, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C para obtener la pastilla y decantar el sobrenadante. Para el lavado de la pastilla de proteína obtenida, se añadieron 2 mL de solución 0.3M de clorhidrato de guanidina en 95% de etanol, incubando durante 20 min

a TA, seguido de una centrifugación a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C y decantando el sobrenadante; este procedimiento se repitió en tres ocasiones. Posteriormente, se agregaron 2 mL de etanol absoluto a la pastilla de proteína, agitándolo con ayuda de un vórtex durante 10 s y dejándolo incubar durante 20 min a TA. Después de la incubación, se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C para decantar el lavado con etanol. Por último, se dejó secar la pastilla y se resuspendió con 200 µL de SDS al 1% mediante el uso de un vórtex. Para determinar el rendimiento de la proteína, se midió la concentración de las proteínas mediante el ensayo de DC Protein Assay (BioRad).

8.11. Ensayo de Inmunodetección

Para el análisis de la proteína EhMybS3 sobreexpresada a partir de las transfecciones transitoria y estable, se llevó a cabo la electroforesis desnaturizante en una dimensión en geles SDS-PAGE al 12% a 100V. Se utilizó el marcador Dual color Precision Plus Protein™ (BIO-RAD) como referencia de los PM de las proteínas. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie y se capturaron con el fotodocumentador Chemi-Doc XRS (BIO-RAD). Para el análisis de WB, los geles se sumergieron en un buffer de transferencia [48 mM Tris, 39 mM Glicina, 0.04% SDS, y 20% Metanol], al igual que las membranas de nitrocelulosa y el papel Whatman. Se formó un "sándwich" con papel-membrana-gel-papel y se colocó en una cámara de transferencia (BIO-RAD) del lado del cátodo durante 60 min. Posteriormente, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau al 0.1% (Sigma), se lavaron con agua destilada para retirar la tinción y se bloquearon con leche Svelty (Nestlé) al 5% en PBS-Tween 20 al 0.1% a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.1%, se secaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para el análisis de las proteínas obtenidas a partir de trofozoítos obtenidos de



las transfecciones transitoria y estable, las membranas se incubaron con el anticuerpo α -*ehmybs3* obtenido en conejo empleando la proteína recombinante EhMybS3 (no comercial, 1:1000). Como control de carga, se utilizó el anticuerpo comercial α -actina (Sigma, 1:1000). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en constante agitación. Al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 y se incubaron con un anticuerpo secundario α -conejo (Santa Cruz, 1:5000) durante 2 horas, cubiertas de la luz. Se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno, y los resultados se capturaron en el fotodocumentador Chemi-Doc XRS (BIO-RAD) después de incubar durante 5 min con el reactivo luminata Forte Western HRP substrate (Merk).

8.12. Ensayo de Inmunofluorescencia para determinar la sobreexpresión de EhMybS3

En placas de cultivo de 12 pozos se colocaron cubreobjetos esterilizados y sobre ellos se añadieron $\sim 8 \times 10^5$ trofozoítos por pozo resuspendidos en 800 μ L de medio TYI-S-33 complementado con suero, sin que se desborden del cubreobjetos y se dejaron incubar por 30 min a 37°C para permitir la adhesión de las amibas. Para la fijación, se retiró el medio sin tocar el cubreobjetos y se agregó ~ 1 mL de etanol absoluto previamente enfriado por pozo y se dejó incubar a 4°C por 30 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS pH 6.8 filtrado y se añadió 1 mL de cloruro de amonio (NH_4Cl) 50 mM e incubó a 37 °C por 30 min. Después de la incubación, se retiró el cloruro de amonio y las preparaciones se bloquearon con 1 mL de BSA al 1% a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se retiró el BSA y se realizaron tres lavados con PBS pH 6.8 filtrado. En cámara húmeda, se incubaron los cubreobjetos toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario α -myc de ratón (Invitrogen, 1:250) para las muestras de transfección transitoria. Para las muestras de transfección estable, α -*ehmybs3* de conejo (no comercial, 1:250) + H4K20me3 (Abcam, 1:100) y α -EhMybS3 de conejo (no comercial, 1:250) + H3K27 (Abcam, 1:100). Después de tres lavados con PBS pH 6.8 filtrado, las preparaciones se incubaron 2 h a 37°C



cubiertos de la luz con el anticuerpo secundario α -FITC AffiniPure™ acoplado a ratón a una concentración 1:100 (Jackson ImmunoResearch) para las muestras de transfección transitoria y para las muestras de transfección estable, el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:150). Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS pH 6.8 filtrado y se incubaron con el marcador nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) por 10 min a TA y cubiertas de la luz. A continuación, se llevaron a cabo dos lavados con PBS pH 6.8 filtrado. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos, utilizando el preservador de fluorescencia Vectashield. Las muestras se fijaron al portaobjetos con esmalte de uñas y se analizaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss (LS700), con la ayuda de la Dra. Abigail Betanzós Fernández empleando el programa ZEN Light Edition en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

8.13. Ensayo de eritrofagocitosis de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3

Los trofozoítos transfectados establemente y seleccionados con 20 μ m/mL de G418 (pKT3M y pKT3M-*ehmybs3*) fueron tratados durante 10 min en hielo para promover su desprendimiento del tubo y realizar el conteo en la cámara de Neubauer empleando la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{No. amibas en los 4 cuadrantes}}{4} \right) \times (10,000) = \text{amiba/mL}$$

Los eritrocitos obtenidos de una muestra de sangre humana fueron lavados tres veces con solución fisiológica (concentración isotónica de cloruro de sodio NaCl al 0.9 %) mediante centrifugaciones a 3,500 rpm por 5 min entre cada lavado. Posteriormente, se tomaron 10 μ L de eritrocitos lavados y se diluyeron en 1 mL de solución fisiológica para contarlos en una cámara de Neubauer



usando la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{No. Eritrocitos en los 5 cuadrantes}}{4} \right) \times (10,000 \times 100) = \text{eritrocitos/mL}$$

La cinética de eritrofagocitosis se realizó poniendo a interactuar 250,000 trofozoítos de *E. histolytica* con 6,250,000 eritrocitos en 900 μL de medio TYI-S-33 sin suero a 37 °C por 0, 30 y 60 min, y como control se utilizó la misma cantidad de trofozoítos de amibas, pero en condición basal sin contacto con eritrocitos. Finalizado, el tiempo de interacción, se hicieron dos lavados con agua estéril y un lavado con PBS pH 6.8 a 4 °C para causar la hemólisis de los eritrocitos no fagocitados mediante centrifugaciones a 2,000 rpm por 5 min. Por último, se añadió 250 μL de ácido fórmico (CH_2O_2) para medir la absorbancia de las muestras a 400 nm en un espectrofotómetro. Estos análisis se realizaron con la ayuda de la Dra. Patricia Cuellar Silva, investigadora en Estancia Postdoctoral en el Posgrado en Ciencias Genómicas.

8.14. Efecto citopático de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3

Las células MDCK (8×10^4 células/pozo) se crecieron a confluencia en placas de 48 pozos y se incubaron con 250,000 trofozoítos transfectados establemente y seleccionados con 20 $\mu\text{g/mL}$ de G418 (pKT3M y pKT3M-*ehmybs3*) por pozo, los cuales se resuspendieron previamente en 200 μL de PBS pH 6.8 a 37°C por 30 min. Posteriormente, las placas se incubaron en hielo durante 15 min para interrumpir la acción citopática de los trofozoítos. A continuación, los trofozoítos se removieron con extensivos lavados con PBS pH 6.8 frío. La monocapa resultante se fijó con 100 μL de formaldehído al 4% durante 10 min a TA y se lavó tres veces con PBS pH 6.8 frío. Por último, se agregaron 100 μL de cristal violeta al 1% y se incubaron por 10 min. Después se hicieron dos lavados con 200 μL de buffer de boratos 0.01 M y el resultado se capturó en el fotodocumentador Chemi-Doc XRS (BIO-RAD). El colorante se extrajo de las células agregando 200 μL de HCl 0.1 N y pasando la muestra a placas de ELISA



de 96 pozos con tapa y la placa se cuantificó mediante espectrofotometría en placas de ELISA a una longitud de onda de 660 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Como control de no destrucción de las monocapas, las células no se trataron con trofozoítos, solo se incubaron con PBS pH 6.8 frío. Estos análisis se realizaron con la ayuda de la Dra. Patricia Cuellar Silva, investigadora en Estancia Postdoctoral en el Posgrado en Ciencias Genómicas.



9. Resultados

9.1. Caracterización *in silico* de la proteína EhMybS3

El gen *ehmybs3* tiene una longitud de 534 pb y no presenta intrones. Este gen sintetiza una proteína que pertenece a la familia EhMybSHAQKYF, la cual tiene un dominio Myb-DBD altamente conservado y estructurado. La proteína EhMybS3 tiene 177 aminoácidos con una masa molecular de 20 kDa; su punto isoelectrico (pI) es de 9.6.

Determinar las características anteriores es crucial porque determinan el comportamiento y la solubilidad de la proteína, las interacciones con otras moléculas, los procedimientos de purificación y el comportamiento en diversos entornos biológicos (Tabla 6)

Tabla 6: Caracterización *in silico* del gen y la proteína EhMybS3

Gen <i>ehmybs3</i>	
Tamaño de secuencia genómica	534 pb
Tamaño del transcrito	534 pb
Número de intrones	0
Proteína EhMybS3	
Tamaño de la proteína	177 aa
Peso molecular	20 kDa
Punto Isoeléctrico (pI)	9.6

Datos obtenidos mediante la base de datos AmoebaDB y Cárdenas, *et al.*, 2021.

9.2. Análisis de PTMs de EhMybS3

Para caracterizar con mayor profundidad al TF EhMybS3, es esencial comprender su regulación, función en la expresión génica y su importancia en procesos biológicos y patológicos. Para ello, se realizaron análisis de las posibles modificaciones postraduccionales, incluidas fosforilaciones, SUMOilaciones y glicosilaciones.

El análisis *in silico*, a través del servidor NetPhos 3.1, de las fosforilaciones que puede sufrir el TF EhMybS3, arrojó que al menos 44 residuos de aa son susceptibles a esta modificación. De estos, 26 corresponden a residuos de serina, 14 de treonina y 4 de tirosina (Tabla 7, Fig.21). La fosforilación de estos

residuos es común en las proteínas Myb y pueden tener un impacto significativo en su actividad y función. En el caso de EhMybS3, se observó que los residuos de serina son los más propensos a ser fosforilados. Esto podría indicar que estas fosforilaciones pueden activar o desactivar a EhMybS3, o puede influir en la capacidad para unirse al DNA y regular la expresión génica.

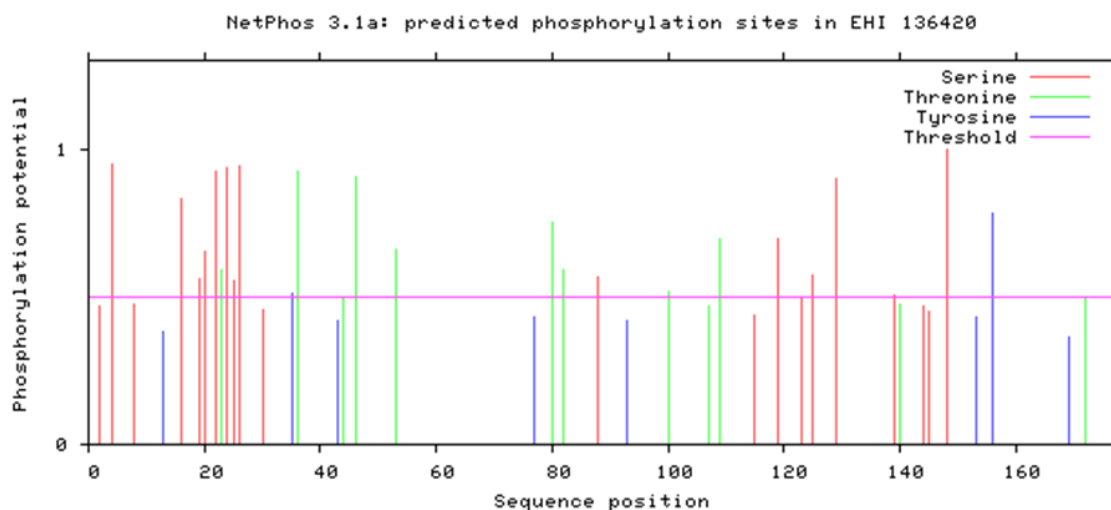


Figura 21. Sitios potenciales de fosforilación en la secuencia de aminoácidos de EhMybS3. La fosforilación en EhMybS3 se encontraron utilizando el servidor NetPhos 3.1 Server- DTU. Valor de corte: 0-5.

Tabla 7. Aminoácidos susceptibles a fosforilación en EhMybS3

Residuo	Posición	Cinasa	Score	Umbral
QYPLSPGSS	16	GSK3, cdk5, p38MAPK	0.550-0.691	0.5
SPGSSQSTS	20	DNAPK, ATM	0.614-0.651	0.5
GSSQSTSSS	22	PKC	0.545	0.5
SSQSTSSSP	23	cdc2	0.591	0.5
SQSTSSSPL	24	cdc2	0.521	0.5
QSTSSSPLP	25	PKC	0.551	0.5
STSSSPLPS	26	GSK3, cdk5, cdc2	0.515-0.539	0.5
DRLVYTKKQ	35	EGFR	0.512	0.5
RLVYTKKQR	36	PKC	0.923	0.5

QYTITKKRE	46	PKC	0.905	0.5
REVTDAEH	53	PKG, CKII	0.513-0.662	0.5
EYIGTKTVV	80	PKC	0.749	0.5
IGTKVVQI	82	PKC	0.594	0.5
VQIRSHAQK	88	PKC	0.564	0.5
KLNKTAPPQ	100	PKG	0.520	0.5
PFTLTPLKN	109	cdk5, p38MAPK	0.547-0.574	0.5
SVQQSIKS	119	PKC	0.695	0.5
SCPPSPQFH	129	GSK3, cdk5	0.540-0.645	0.5
HIGDSTNGI	139	PKC	0.502	0.5
SSAFSPVRD	148	cdk5	0.630	0.5
DYADYIQID	156	INSR, EGFR	0.517-0.558	0.5

Tabla elaborada con datos obtenidos del servidor NetPhos 3.1 (2023).

Por otro lado, los resultados obtenidos tras el análisis de SUMOilaciones (Small Ubiquitin-like Modifier), demostró que la secuencia de aa de EhMybS3 posee 3 sitios susceptibles a SUMOilación (Fig.22A). La barra en color rojo indica la secuencia “Consensus direct”, esta secuencia de aa es reconocida por la maquinaria celular para llevar a cabo la SUMOilación. De manera interesante, también se encontró una secuencia SIM resaltado en color verde (Fig.22A y B), que nos indica un motivo que le permite a EhMybS3 reconocer y unirse a proteínas SUMOiladas para llevar a cabo diversas funciones celulares.

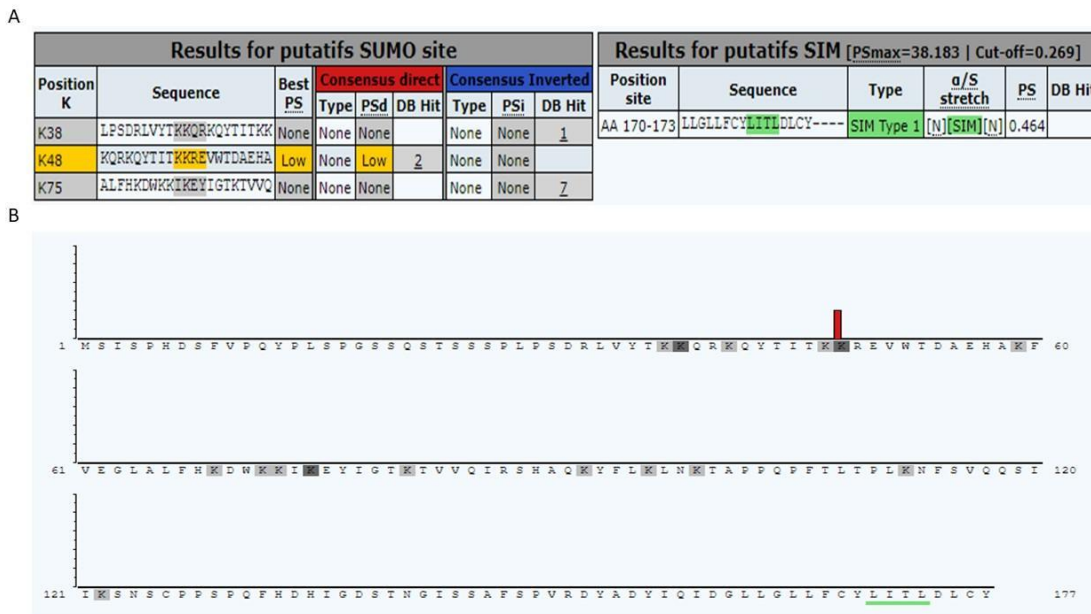


Figura 22. Sitios susceptibles a SUMOilación en la proteína EhMybS3. Se utilizó el servidor JASSA V4 para identificar SUMOilaciones en EhMybS3. A) Tabla de resultados de los sitios putativos SUMO y tabla de resultados de los sitios putativos SIM. B) El rectángulo vertical (azul) indica el sitio susceptible a SUMO, la línea horizontal (verde) indica el motivo SIM, los cuadrados grises indican las lisinas (K) y los cuadrados negros indican las lisinas susceptibles a SUMOilación en la secuencia de aminoácidos de EhMybS3.

Por último, el análisis de glicosilaciones indicó que hay 32 sitios susceptibles a O-GlucosilNAcetilación (O-GlcNAc). Sin embargo, sólo siete sitios superaron el umbral especificado (0.5). Los residuos de Ser/Thr que se predice que estarán O-GlcNAcylados están marcados con un asterisco (*) tanto en el residuo como en la columna Yin-Yang (Fig.23; Tabla 8). Estos sitios pueden ser modificados de manera reversible y dinámica por grupos O-GlcNAc en diferentes momentos, lo que indica que la adición y eliminación de azúcares; particularmente en los residuos de aminoácidos 16 y 19, puede afectar la función y regulación de EhMybS3.

Tabla 8. Aminoácidos susceptibles a glicosilación en EhMybS3

Residuo	Posición	Score	Sitio Yin-Yang	Umbral
S	16	0.7144	*	0.5
S	19	0.5692	*	0.5
S	20	0.6868	-	0.5
T	23	0.5644	-	0.5
S	25	0.5012	-	0.5
S	119	0.5310	-	0.5
S	144	0.5313	-	0.5

Tabla elaborada con datos obtenidos del servidor YinOYang1.2-DTU Health Tech (2023)

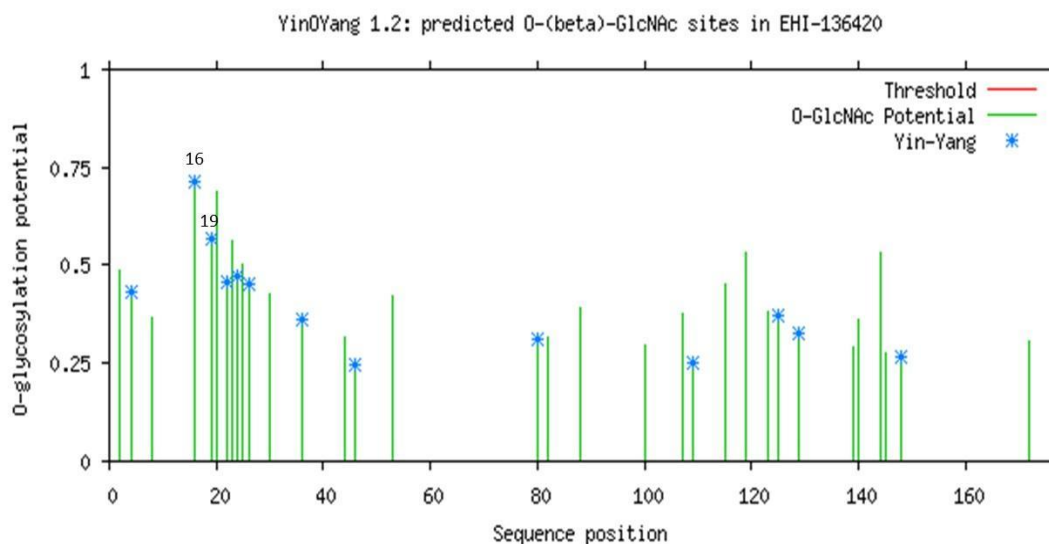


Figura 23. Sitios de O-glicosilación previstos en la proteína EhMybS3. El potencial de modificación de O-GlcNAc de cada residuo Ser y Thr se muestra mediante líneas verticales verdes, y los sitios Yin-Yang que se predijeron positivamente se muestran con asteriscos azules en la parte superior. Los números en la parte superior indican los sitios Yin-Yang conservados. El perfil se predijo con el servidor YinOYang1.2-DTU Health Tech, utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos obtenida en AmoebaDB.

Con los resultados obtenidos tras los análisis realizados elaboramos un esquema de la proteína EhMybS3 donde se muestra que esta proteína tiene residuos susceptibles a fosforilaciones, SUMOilaciones y glicosilaciones, por lo podrían estar involucrados en regular su actividad y localización celular (Fig. 24).

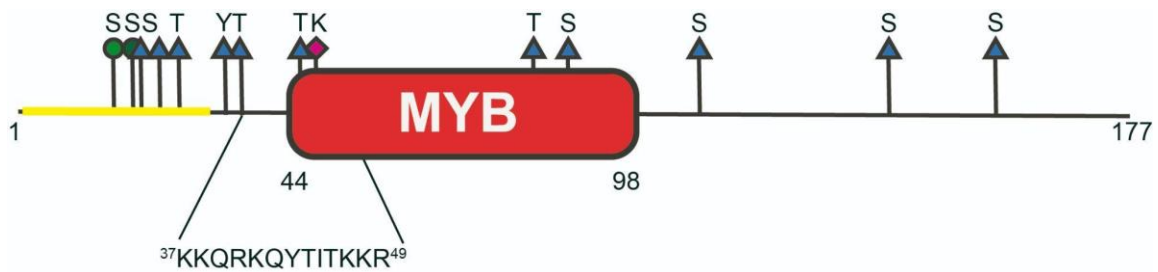


Figura 24. Proteína EhMybS3 de *E. histolytica*. Esquema de la proteína donde se muestran su dominio Myb (rojo). En la parte superior se indican sus posibles modificaciones post-traduccionales: Verde, glicosilación; azul: fosforilación, rosa: SUMOilación y NLS a la señal de localización nuclear. En amarillo se muestra una región que se predice intrínsecamente desordenada. La señal de localización nuclear se determinó empleando NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>). El esquema se realizó empleando "MyDomains" (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/>).

9.3. Análisis *in silico* del interactoma de EhMybS3

Los dominios de unión al DNA en un TF tienen como función principal, reconocer una secuencia específica del DNA. Sin embargo, las regiones intrínsecamente desordenadas pueden estar involucradas en llevar a cabo interacciones proteína-proteína. Para determinar qué otras proteínas predichas se encuentran interaccionando con EhMybS3, se realizó un análisis *in silico* mediante el servidor STRING. El interactoma arrojó un total de 31 nodos, 221 aristas y un valor p de enriquecimiento $PPI < 2.13e-06$. (Fig.24). Como era de esperarse, el interactoma reveló que EhMybS3 interacciona con diversas proteínas relacionadas a la transcripción, debido a que este conjunto desempeña un papel central en la regulación de la expresión génica y, por lo tanto, estas interacciones permiten que las células respondan dinámicamente a diversas condiciones asegurando que los genes se expresen de manera coordinada y controlada para llevar a cabo funciones biológicas esenciales.

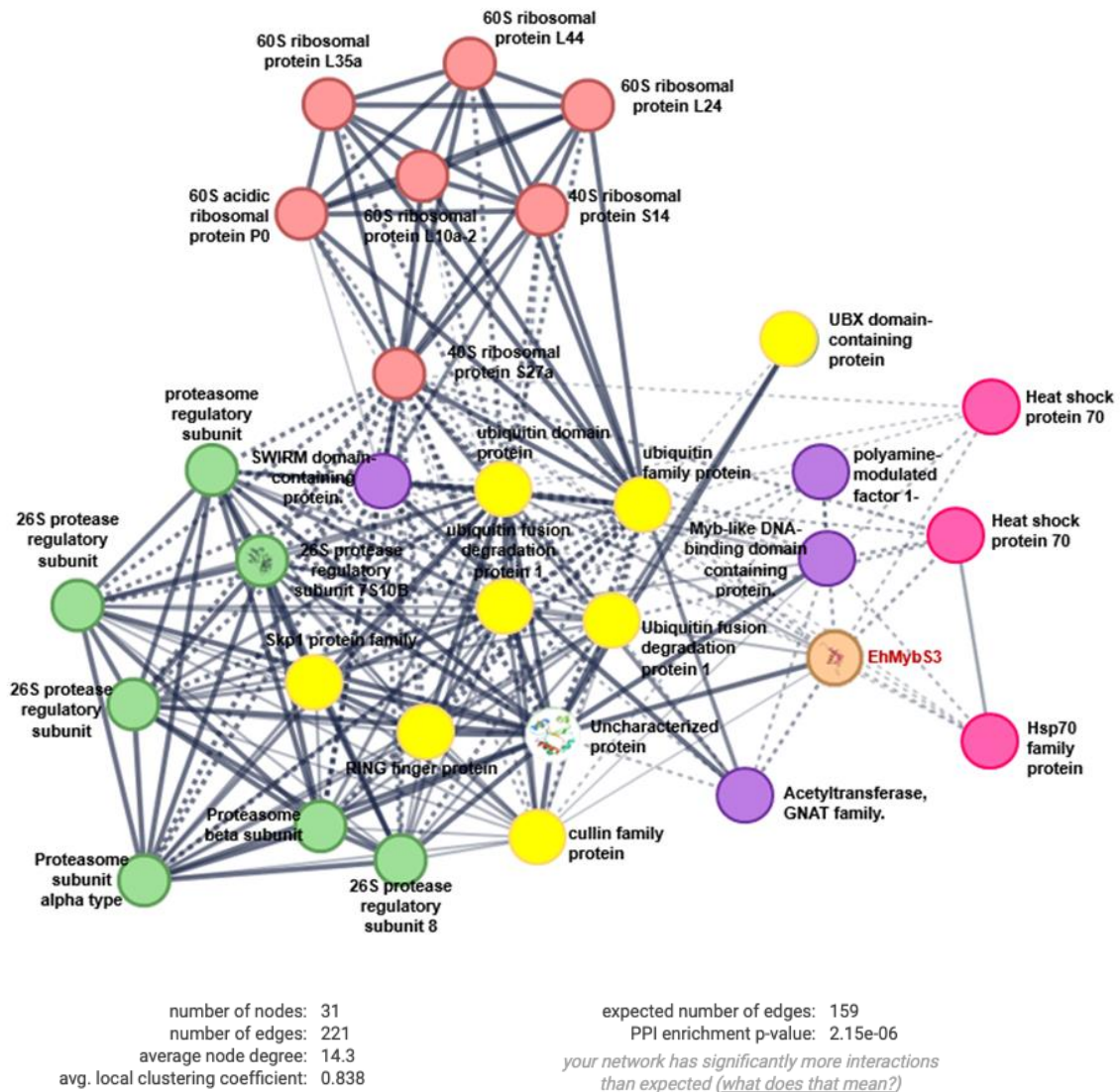


Figura 25. Interactoma *in silico* de la proteína EhMybS3. Las esferas representan las proteínas que interactúan con la proteína EhMybS3 (naranja) y que participan en diversos procesos como: transcripción (morado); ribosomal (rojo); ubiquitinación (amarillo); proteasoma (verde); choque térmico (rosa) y proteínas hipotéticas (blanco). Número de nodos: 31, número de aristas: 221, valor p de enriquecimiento PPI < 2.13e-06.

Es interesante notar que se predicen interacciones con proteínas involucradas en la transcripción, como es la acetiltransferasa GNAT, proteína con dominio de unión a DNA MYB y una proteína que contiene el dominio SWIRM. Por otro lado, también se observaron interacciones con proteínas del proteasoma, por ejemplo: la subunidad reguladora del proteasoma, la subunidad alfa tipo 6 y 7 del proteasoma y algunas subunidades regulatorias de la proteasa 26S.



Además, se encontraron varias proteínas relacionadas con la ubiquitinación, incluida la proteína que contiene el dominio UBX; la proteína con dedo RING; la proteína de la familia cullin; la proteína de la familia Mov34/MPN/PAD-1, entre otras.

Asimismo, EhMybS3 también interactúa con proteínas ribosomales como la proteína ribosomal 40S, la proteína ribosomal 60S ácida P0 y varias proteínas ribosomales 60S, así como proteínas involucradas en el choque térmico, por ejemplo: proteínas de choque térmico 70 (Tabla 9).

Tabla 9. Anotación y función molecular de las proteínas que interactúan con EhMybS3

Gen ID	Anotación
Transcripción	
EHI_087430	Proteína que contiene el dominio SWIRM
EHI_140660	Acetiltransferasa, familia GNAT
EHI_133220	Proteína con dominio de unión a DNA MYB
EHI_140300	Proteína de unión al factor 1 modulado por poliaminas
Ubiquitinación	
EHI_103510	Proteína con dominio de ubiquitina, putativa
EHI_013080	Proteína de la familia de ubiquitina, putativa
EHI_055390	Proteína que contiene el dominio UBX
EHI_050500	Proteína de la familia Mov34/MPN/PAD-1
EHI_125920	Proteína homóloga 1 de degradación por fusión de ubiquitina
EHI_151630	Proteína con dedo RING, putativa
EHI_078420	Proteína de la familia cullin
EHI_152700	Familia de proteínas Skp1
Proteínas Ribosomales	
EHI_036530	Proteína S27a del ribosoma 40S, putativa
EHI_074090	Proteína S14 del ribosoma 40S, putativa
EHI_135790	Proteína L10a del ribosoma 60S, putativa
EHI_175460	Proteína P0 ácida del ribosoma 60S, putativa
EHI_030760	Proteína L24 del ribosoma 60S, putativa
EHI_171300	Proteína L44 del ribosoma 60S, putativa
EHI_049000	Proteína L35a del ribosoma 60S, putativa

Choque térmico

EHI_197860	Proteína de choque térmico 70, putativa
EHI_148990	Proteína de choque térmico 70, putativa
EHI_111080	Familia de proteínas hsp70
Proteasoma	
EHI_120650	Subunidad reguladora del proteasoma, putativa
EHI_187600	Subunidad regulatoria de proteasa 26S, putativa
EHI_080890	Subunidad regulatoria de proteasa 26S, putativa
EHI_194070	Subunidad regulatoria de proteasa 26S S10B, putativa
EHI_153190	Subunidad alfa tipo 6 del proteasoma, putativa
EHI_148040	Precursor de la subunidad beta tipo 7-B del proteasoma
EHI_160570	Subunidad regulatoria de proteasa 26S 8, putativa

Estos resultados indican que EhMybS3 es un componente que forma parte de una compleja red de mecanismos reguladores que las células utilizan para regular la expresión génica, adaptarse a su entorno, y mantener la homeostasis celular.

9.4. Genes modificados al sobreexpresar al factor de transcripción EhMybS3

En el laboratorio 2 de la Dra. Elisa I. Azuara, el M. en C. Helios Cárdenas realizó un análisis de microarreglo para determinar qué genes modulaban su expresión al sobreexpresar EhMybS3 de *E. histolytica*. El microarreglo determinó un total de 97 genes, de los cuales: 57 se regulan negativamente (Tabla 10) y 40 son regulados positivamente. (Tabla 11).

La sobreexpresión de EhMybS3 reguló una variedad de genes en diferentes categorías funcionales. Por ejemplo, los genes cuya expresión aumentó están implicados en la traducción de proteínas como la proteína S3a del ribosoma 40S. Además, se identificaron genes relacionados con la respuesta al estrés, como la proteína de choque térmico 70 y hsp70A2. También se identificaron genes involucrados en la transducción de señales, como la proteína de repetición anquirina. Se encontraron genes relacionados con el metabolismo, como la *dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa*. Finalmente, se identificaron genes que

codifican para proteínas relacionadas con citoesqueleto, como la *profilina*. En cuanto a la virulencia, se destacó el gen precursor de *amebaporina A* y la *cilicina-2* (Tabla 10).

Tabla 10: Lista de genes regulados positivamente por la sobreexpresión de EhMybS3

Gene ID	Anotación	FC
Traducción (7)		
EHI_050280	Proteína ribosomal S3a de 40S, putativa	1.45125
EHI_189940	Proteína ribosomal L34 de 60S	1.450066
EHI_181180	Proteína ribosomal L2/L8 de 60S, putativa	1.423582
EHI_158270	Proteína ribosomal L37 de 60S	1.392665
EHI_127330	Proteína ribosomal L17, putativa	1.365633
EHI_124300	Proteína ribosomal L11, putativa	1.344126
EHI_161970	leucil-tRNA sintetasa, putative	1.335546
Respuesta al estrés (5)		
EHI_192440	Proteína de choque térmico 70, hsp70A2	1.502985
EHI_076480	Proteína de choque térmico 101	1.365263
EHI_199590	Proteína de choque térmico de 70 kDa	1.331361
EHI_052860	Proteína de choque térmico 70	1.299646
EHI_071590	Proteína isomerasa de disulfuro	1.352641
Transducción de señales (9)		
EHI_174100	Proteína de repetición de anquirina	1.356629
EHI_012380	GTPasa de la familia Rab	1.34537
EHI_146500	Proteína putativa activadora de Rho GTPasa	1.341964
EHI_098280	Proteína 2 del tipo 14-3-3	1.319327
EHI_097060	Proteína que interactúa con Dab2	1.472792
EHI_201410	Precursor de proteoglicano-4, putativo	1.472499
EHI_020350	Proteína que contiene el dominio de fibronectina tipo III	1.452584
EHI_038440	Proteína que contiene el dominio de cierre de cremallera de glicina	1.385498
EHI_161000	Proteína de la familia de fosfatasa de serina/treonina	1.593509
Metabolismo (3)		
EHI_125700	dTDP-D-glucosa 4,6-deshidratasa, putativa	1.426523
EHI_095320	proteína asociada a la replicación	1.366202
EHI_130700	enolasa, putativa	1.369307
Transcripción (4)		
EHI_136420	Proteína de unión al DNA Myb, familia SHAQKYF	18.693139
EHI_049790	Proteína que contiene el dominio bromo	1.343748
EHI_007350	Adaptina proteína 2 asociada a la capa de unión al oído	1.503667
EHI_192520	Coactivador de la transcripción, putativo	1.309257
Citoesqueleto (2)		
EHI_176140	Profilina, putative	1.652785
EHI_080100	Cilicina-2, putative	1.710069

Virulencia (2)		
EHI_159480	Péptido formador de poros ameobapore A	1.541621
EHI_144270	Proteína de la familia AIG1	1.507844
Ubiquitinación (2)		
EHI_166800	Ubiquitina, putativa	1.444049
EHI_119370	Proteína que contiene el dominio SPRY	1.477503
Enzimática (2)		
EHI_042170	Dipeptidasa aminoacil-histidina, putativa	1.381395
EHI_169840	Sintasa secundaria de tiamina-fosfato	1.319478
Hipotéticas (4)		
EHI_196780	Proteína hipotética	3.302002
EHI_020980	Proteína hipotética	1.628494
EHI_011830	Proteína hipotética	1.345222
EHI_154580	Proteína hipotética	1.321963

*Datos obtenidos del microarreglo realizado por el M. en C. Helios Cárdenas.

En cuanto a los genes que se expresaron negativamente durante la sobreexpresión de EhMybS3, se identificaron genes implicados en la traducción, como el gen que codifica la proteína ribosomal L22 del 60S. La sobreexpresión de EhMybS3 también afectó genes relacionados con funciones nucleares, como la partición cromosómica. Además, se encontraron genes implicados en el metabolismo, como la proteína de unión al oxisterol, y genes del citoesqueleto, como la *filamina* (Tabla 11).

Tabla 11: Lista de genes regulados negativamente por la sobreexpresión de EhMybS3

Gene ID	Anotación	FC
Traducción (6)		
EHI_141940	Proteína ribosomal L22 de 60S	-1.63
EHI_146570	Proteína ribosomal S19 de 40S, putativa	-1.60
EHI_182590	Proteína ribosomal S30, putativa	-1.47
EHI_047810	Ligasa de lisina-tRNA	-1.72
EHI_148820	Proteína ribosomal S24, putativa	-1.46
EHI_148230	Proteína ribosomal L37a de 60S, putativa	-1.34
Citoesqueleto (8)		
EHI_199000	Proteína con dominio de homología de calponina	-1.41
EHI_136150	Proteína asociada a la adenilil ciclasa	-1.40
EHI_158570	Actobindina, putativa	-1.40
EHI_174910	Subunidad de 21 kDa del complejo ARP2/3	-1.35
EHI_005020	Subunidad beta de la proteína F-actina	-1.35
EHI_140720	Cadena pesada de miosina	-1.34
EHI_049920	Proteína de la familia de tubulina	-1.32

EHI_104630	Filamina 2, putativa	-1.31
Núcleo (6)		
EHI_155530	Proteína de partición cromosómica	-1.66
EHI_001400	Proteína RAD23, putativa	-1.47
EHI_183240	Dominio de motivo de reconocimiento de RNA	-1.37
EHI_158940	Factor de unión a la caja G, putativo	
EHI_092080	Tricohialina	-1.32
EHI_110740	Proteína asociada al axonema mst101	-1.53
Metabolismo (5)		
EHI_074110	Proteína unida a oxisterol, putativa	-1.57
EHI_039190	Aldosa reductasa, putativa	-1.44
EHI_082530	Carboxilasa de acetil-coA, putativa	-1.40
EHI_106690	Aspartil aminopeptidasa, putativa	-1.39
EHI_049670	Proteína asociada al axonema mst10	-1.40
Transducción de señales (7)		
EHI_047750	Proteína unión a nucleótidos, putativa	-1.51
EHI_183260	Repetición rica en leucina	-1.47
EHI_127410	Proteína con dominio de cinasa	-1.42
EHI_033250	Proteína unión a poliadenilato	-1.50
EHI_131140	Proteína con dominio PX	-1.31
EHI_054800	Proteína con dominio variante sh3	-1.30
EHI_084660	Proteína con dominio de tipo B de saposina	-1.42
Adhesión (6)		
EHI_025700	Proteína rica en serina, treonina e isoleucina	-1.43
EHI_172850	Antígeno de superficie ariel1, putativo	-1.39
EHI_035690	Subunidad de 35 kDa de la lectina inhibible por galactosa	-1.39
EHI_077500	Subunidad de 170 kDa de la adhesina específica para galactosa	-1.37
EHI_080200	Antígeno de superficie ariel1, putativo	-1.33
EHI_015120	Proteína rica en leucina, perteneciente a la familia BspA	-1.29
Reparación (2)		
EHI_133530	Reparación de rotura de doble cadena de DNA, ATPasa Rad50	-1.73
EHI_022130	Reparación de rotura de doble cadena de DNA, ATPasa Rad50	-1.34
Metabolismo (1)		
EHI_041480	Proteína similar a la mucina 1	-1.31
Transcripción (3)		
EHI_154200	Nucleasa sbcCD subunidad C	-1.54
EHI_081110	Proteína con dominio de la subunidad alfa de tfiie	-1.38
EHI_011400	Fosfoproteína asociada al factor de transcripción TATA-binding	-1.35
Hipotéticas (12)		

EHI_183250	Proteína hipotética	-1.68
EHI_109920	Proteína hipotética	-1.65
EHI_114770	Proteína hipotética	-1.64
EHI_146110	Proteína hipotética	-1.57
EHI_093740	Proteína hipotética	-1.56
EHI_021190	Proteína hipotética	-1.51
EHI_177190	Proteína hipotética	-1.51
EHI_047800	Proteína hipotética	-1.46
EHI_111550	Proteína hipotética	-1.42
EHI_027370	Proteína hipotética	-1.38
EHI_048240	Proteína hipotética	-1.38
EHI_012020	Proteína hipotética	-1.37

*Datos obtenidos del microarreglo realizado por el M. en C. Helios Cárdenas

Estos resultados ayudan a comprender cómo la sobreexpresión del TF EhMybS3 afecta varios procesos celulares en *E. histolytica*. Este tipo de investigación es esencial para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación génica y las respuestas celulares en esta ameba parásita. Investigaciones adicionales pueden ayudar a dilucidar las funciones específicas de estos genes y cómo contribuyen a la biología y patogenicidad de *E. histolytica*.

9.5. Análisis Ontológico (GO) de los genes que modificaron su expresión en trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresan a EhMybS3.

Con el fin de conocer las funciones moleculares y los procesos biológicos de los genes blanco del TF EhMybS3, se realizó un análisis ontológico (GO). En el análisis de la función molecular de genes regulados positivamente por la sobreexpresión de EhMybS3, se encontró que al 75% (30 genes) no se les pudo asignar una categoría debido a que están anotadas como proteínas hipotéticas. El 7.5% (3 genes), están asociados con actividades de unión (GO:0005488), entre los que se encuentran profilina-1 (EHI_176140), la proteína ribosomal 60S L37-A y L11 (EHI_158270;EHI_124300). El 10% (4 genes) de los productos proteicos tienen actividad catalítica (GO:0003824), es decir, codifican para enzimas que pueden ser cruciales para las vías metabólicas, entre los que se encuentran la

enolasa-1 (EHI_130700), leucina-tRNA ligasa (EHI_161970), proteína disulfuro isomerasa (EHI_071590) y aminoacil-histidina dipeptidasa (EHI_042170). El 2.5% (1 gen) tiene actividad reguladora de la función molecular (GO:0098772), esta categoría indica que el gen desempeña un papel importante en la regulación de las funciones de otras moléculas, como es el gen que codifica para una Rho GTPasa (EHI_146500). Y, por último, el 5% (2 genes) tienen actividad molecular estructural (GO:0005198), es decir, participan en la formación de los componentes estructurales de células y tejidos, tal como el gen que codifica para la proteína ribosomal 60S L11 y L17 (EHI_124300; EHI_127330) (Fig. 25A).

Por otra parte, el análisis del proceso biológico determinó que al 53.8% (28 genes) no se les pudo asignar una categoría debido a que están anotadas como proteínas hipotéticas. Un 7.7% (4 genes) está implicado en la regulación biológica (GO:0065007), tal como el gen que codifica para una Rho GTPasa (EHI_146500), 14-3-3 proteína 2 (EHI_098280), profilina-1 (EHI_176140) y proteína de choque térmico de 70 kDa (EHI_199590). El 17.3% (9 genes) participan en procesos celulares (GO:0009987), algunos de ellos son el gen que codifica para la enolasa 1 (EHI_130700), profilina-1 (EHI_176140) y proteína de choque térmico de 70 kDa (EHI_199590). Mientras que el 5.8% (3 genes) participan en procesos de localización (GO:0051179), como el gen que codifica para la profilina-1 (EHI_176140), Rab GTPasa (EHI_012380) y NECAP PHear (EHI_007350). Además, se encontró que el 9.6% (5 genes) participa en procesos metabólicos (GO:0008152), como enolasa 1 (EHI_130700), proteína receptora serina_treonina cinasa (EHI_174100) y proteína de choque térmico de 70 kDa (EHI_199590). Por último, el 5.8% (3 genes) tales como 14-3-3 proteína 2 (EHI_098280), Rho GTPasa (EHI_146500) y proteína de choque térmico de 70 kDa (EHI_199590), están involucrados en la respuesta al estímulo (GO:0050896), estos podrían implicar reacciones a señales ambientales o modificaciones en el medio ambiente (Fig. 25B).

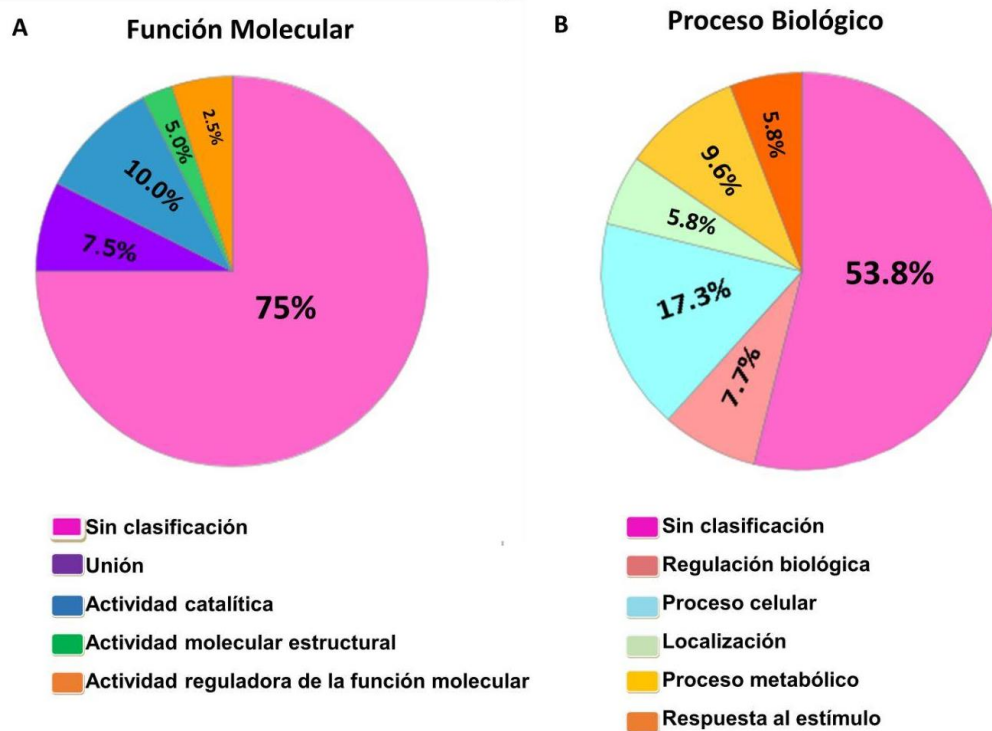


Figura 26. GO de la función molecular y proceso biológico de los genes regulados positivamente por EhMybS3. Gráfica de pastel con la distribución de los genes regulados positivamente por la sobreexpresión de EhMybS3 clasificadas por función molecular y proceso biológico a través del programa Panther DB.

En cuanto a los resultados obtenidos de la función molecular de los genes expresados negativamente, se identificó que el 65.0% (39 genes) no se les pudo asignar una categoría debido a que están anotadas como proteínas hipotéticas. El 21.7% (13 genes) tienen función de unión (GO:000548), entre ellos se encontró el gen que codifica para la proteína asociada a adenilil ciclasa (EHI_136150), cadena beta de tubulina (EHI_049920), RAD23 (EHI_001400) y proteína de unión a poliadenilato (EHI_033250) El 6.7% (4 genes) tienen función catalítica (GO:0003824), como es el gen que codifica para acetil-CoA carboxitransferasa (EHI_082530), aldosa reductasa (EHI_039190) y lisina-tRNA ligasa (EHI_047810). El 5% (3 genes) están involucrados en la actividad molecular estructural (GO:0005198), como es el gen que codifica para la tubulina (EHI_049920), proteína ribosomal 40S S19 (EHI_146570) y proteína ribosómica 60S L22 (EHI_141940). Solamente el 1.7% (1 gen) tiene función de

transporte (GO:0005215), el cual es el que codifica para la proteína fijadora de oxisterol (EHI_074110) (Fig.26A).

En lo referente a procesos biológicos, los genes regulados negativamente resultaron que el 67.2% (43 genes) no se les pudo asignar una categoría ya que están anotadas como proteínas hipotéticas. Sin embargo, el 4.7% (3 genes) participan en la regulación biológica (GO:0065007), como la subunidad beta de la proteína bloqueadora de actina F (EHI_005020), proteína asociada a adenilil ciclasa (EHI_136150) y la proteína con dominio de reconocimiento de RNA (EHI_183240). El 15.6 % (10 genes) están involucrados en procesos biológicos (GO:0009987). Mientras que el 1.6% (1 gen) está implicado en el proceso de desarrollo (GO:0032502), es decir, que este gen puede estar implicado en eventos relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular, tal es el caso del gen que codifica para la subunidad beta de la proteína bloqueadora de actina F (EHI_005020). Además, un 9.4% (6 genes) se clasificaron en procesos metabólicos (GO:0008152), entre ellos se encuentra acetil-CoA carboxitransferasa (EHI_082530), lisina-tRNA ligasa (EHI_047810) y RAD23 (EHI_001400). Y en respuesta al estímulo (GO:0050896), se determinó el 1.6% (1 gen), tal es el gen que codifica la proteína asociada a adenilil ciclasa (EHI_136150) (Fig. 26B).

Los genes clasificados en diversas categorías de función y procesos biológicos proporcionan información valiosa sobre los cambios funcionales que ocurren debido al impacto de la sobreexpresión de este TF.



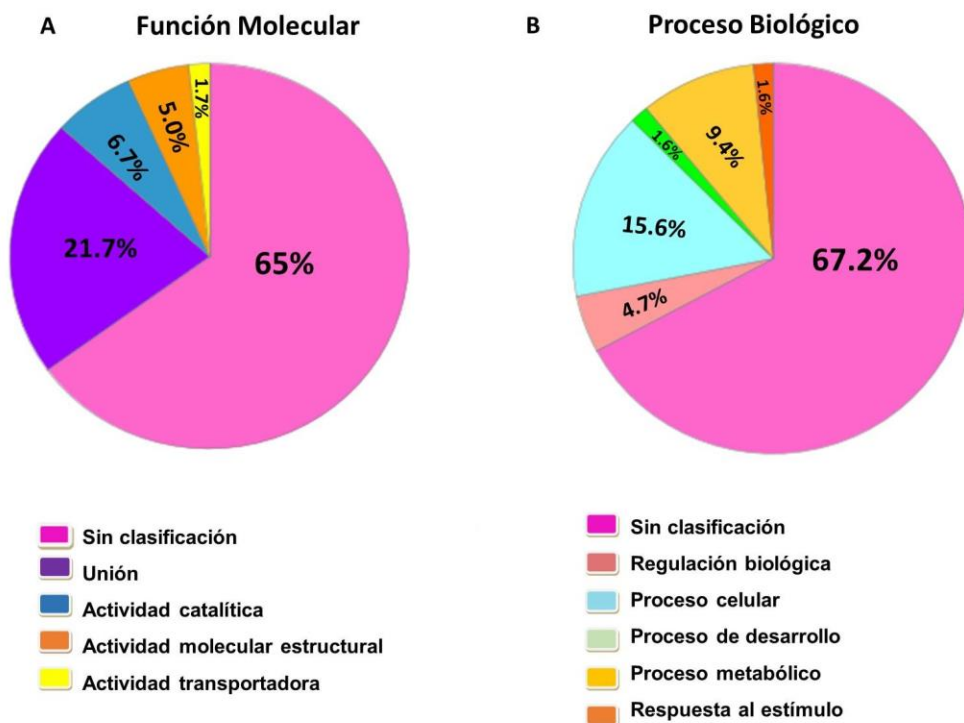


Figura 27. GO de la función molecular y proceso biológico de los genes regulados negativamente por EhMybS3. Gráfica de pastel con la distribución de los genes regulados negativamente por la sobreexpresión de EhMybS3 clasificadas por función molecular y proceso biológico a través del programa PantherDB.

9.6. Identificación de las redes de regulación transcripcional de los genes regulados por EhMybS3 mediante inferencia bayesiana

Empleando la base de datos AmoebaDB se analizó la expresión basal de los genes blanco identificados en el transcriptoma obtenido mediante un microarreglo realizado en el estudio de Cárdenas H. (Tesis de doctorado en proceso). En la base de datos de AmoebaDB se analizaron los 97 genes que cambiaron su expresión, al sobreexpresar a EhMybS3 y se obtuvo el valor en TPM de expresión basal de acuerdo con el transcriptoma de Shabardina, *et al.*, 2018. Posteriormente, se clasificaron por categorías de expresión empleando el valor normalizado del log2 de los TPM. Para realizar una clasificación empleando estadística bayesiana con la finalidad de determinar la

probabilidad de que un gen dado tiene un nivel de expresión específico (Fig. 27) de acuerdo con lo publicado por Naiyer y colaboradores (2019). Este análisis dio como resultado una clasificación de 5 grupos con niveles de expresión: Muy alto (n=5 genes), Alto (n=11 genes), Moderado (n=65 genes), Bajo (n=7 genes) y Muy Bajo (n=8 genes). Tras este análisis, se pudo determinar que el gen de interés *ehmybs3* pertenece al grupo de genes con un nivel de expresión baja en condición basal.

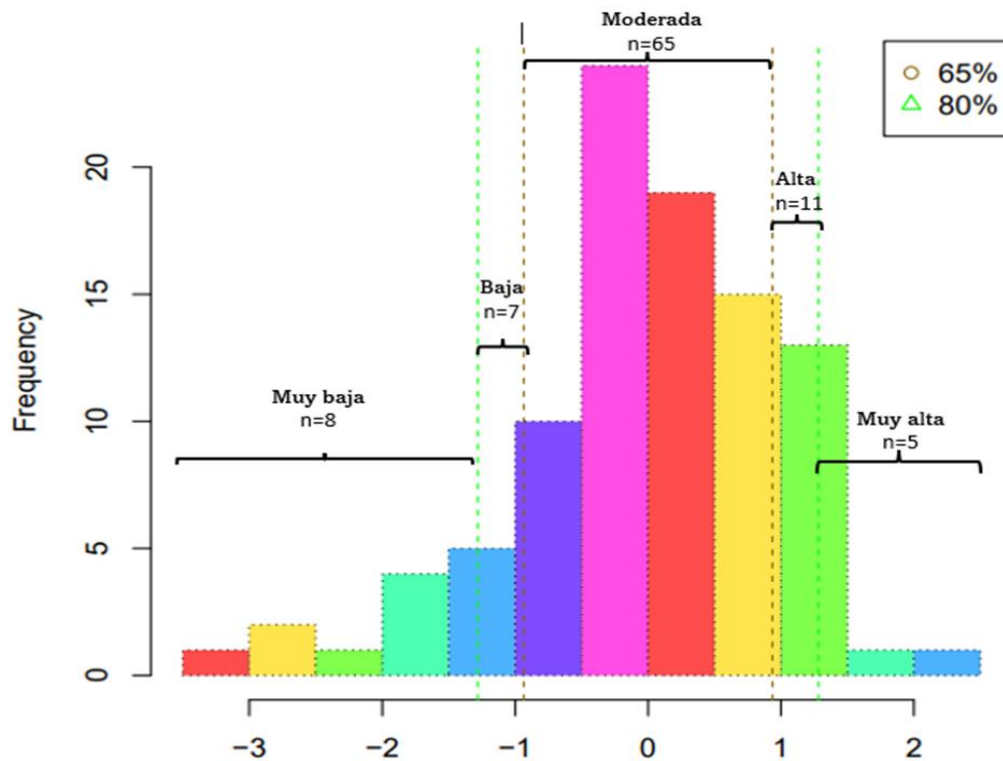


Figura 28. Clasificación de la expresión de los genes que se modularon al sobreexpresar el factor de transcripción *ehmybs3*. Histograma de valores de expresión de los genes blanco regulados por *EhmybS3* organizados en diferentes categorías: Expresión Muy baja, Baja, Moderada, Alta y Muy Alta. Análisis elaborado por el M. en C. Carlos Ernesto Martínez Rodríguez.

Este análisis reveló que el gen *EhMybS3* pertenece al grupo de genes con un nivel de expresión bajo en condiciones basales y nos permitió determinar la clasificación de sus genes blanco para una mayor comprensión.

Estos resultados son importantes para los análisis subsecuentes que nos permitirán determinar cómo la expresión de *ehmybs3* se modula en respuesta a

diferentes estímulos o condiciones experimentales, y cómo esta regulación puede influir en los procesos biológicos en los que participa el gen.
















9.7. Identificación de secuencias conservadas en los promotores de genes regulados por EhMybS3 de acuerdo con sus patrones de expresión

Para comprender la regulación de la expresión génica en *E. histolytica*, se realizó un análisis de identificación de secuencias conservadas en los promotores de genes regulados por EhMybS3, según su patrón de expresión (muy baja, baja, moderada, alta y muy alta) mediante el programa MEME-SUITE (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>).

Las secuencias consenso de los motivos encontrados se recopilaron en la Tabla 12 junto con el nivel de expresión correspondiente; el número de promotores analizados; el número de promotores que contenían la secuencia consenso identificada y el *valor-e* de cada motivo.

Interesantemente se identificó el motivo GAGA en el motivo 2 (M2) en los promotores de genes con un nivel de expresión muy bajo. También se observa que se encuentran conservadas varios elementos como la caja GAAC dentro de estas secuencias: un elemento GAAC asociado en los promotores de genes con expresión moderadamente baja (M4), moderada (M8), moderadamente alta (M10) y muy alta (M13). Así como también se encontraron cajas CAAC asociados con una expresión muy baja (M1), moderadamente baja (M4), moderada (M9) y moderadamente alta (M10); y cuatro cajas GAAG en promotores de expresión muy baja (M2), moderadamente baja (M4,M6), moderada (M7) y moderadamente alta (M10).

Tabla 12. Identificación *in silico* de secuencias consenso de motivos conservados en genes con diferentes niveles de expresión

Número de secuencia	Secuencia consenso del motivo	Número de promotores analizados	Número de promotores que contengan la secuencia consenso del motivo	Valor E	Nivel de expresión basal
M1		8	8	2.1e+001	Muy baja
M2		8	2	1.1e+004	Muy baja
M3		8	2	1.2e+004	Muy baja
M4		7	6	1.5e+002	Moderadamente baja
M5		7	2	2.2e+003	Moderadamente baja
M6		7	7	6.4e+003	Moderadamente baja
M7		65	65	8.1e-022	Moderada
M8		65	30	1.8e-005	Moderada
M9		65	7	5.5e-001	Moderada
M10		11	10	1.3e+001	Moderadamente alta
M11		11	11	2.1e+002	Moderadamente alta
M12		11	7	2.7e+002	Moderadamente alta
M13		5	5	2.5e+002	Muy alta
M14		5	2	1.8e+003	Muy alta
M15		5	2	3.1e+003	Muy alta



En general, la mayoría de los motivos encontrados son ricos en A y ricos en C, consistente con lo que se sabe sobre la transcripción de genes que codifican proteínas en el parásito *E. histolytica*, el cual parece estar controlada por tres elementos que actúan en *cis* contenidos dentro de los 40 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, como lo es el elemento Inr, TATA-box y GAAC-box.

9.8. Análisis de los patrones de expresión de los genes blanco de expresión baja y moderada en diferentes condiciones.

Anteriormente, se llevó a cabo un análisis de los cambios de expresión de la familia de factores de transcripción EhMybSHAQKYF (pág.35-36), centrándose en el gen *ehmybs3* y cómo se relacionan con diversas condiciones cruciales para el parásito *E. histolytica*. De manera interesante, se observó que *ehmybs3* moduló su expresión significativamente en respuesta al enquistamiento, la colonización intestinal y la virulencia, así como el estrés inducido por privación de suero y choque térmico. Esto sugiere que *ehmybs3* puede estar implicado en la regulación de genes relacionados con estas condiciones. Por lo que se decidió analizar los patrones de expresión de los genes blanco que pertenecen a los grupos de expresión baja y moderada según la clasificación bayesiana (anteriormente descrita); considerando que *ehmybs3* pertenece a la categoría de expresión baja, lo que sugiere que podría tener un papel específico en la regulación de genes que normalmente se expresan a niveles similares. El grupo de expresión moderada se incluyó en el análisis, ya que contiene mayor número de genes, lo que indica que *ehmybs3* podría estar involucrado en la regulación de un conjunto más amplio de genes que se expresan a niveles moderados.

Durante la colonización intestinal se observaron genes que aumentan su expresión en comparación con la condición basal (EHI_131140, EHI_104630, EHI_005020, EHI_111550). Estos genes presentan un patrón de expresión

similar a *ehmybS3* y sus productos proteicos tienen funciones relacionadas con la transcripción, traducción, citoesqueleto y transducción de señales. En las tablas 9 y 10 se desglosa la anotación de estos genes. Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de *ehmybs3* en el día 0 adaptado al ratón y el día 1, a comparación con la mayor sobreexpresión en el día 29 de la colonización intestinal (Fig.28).



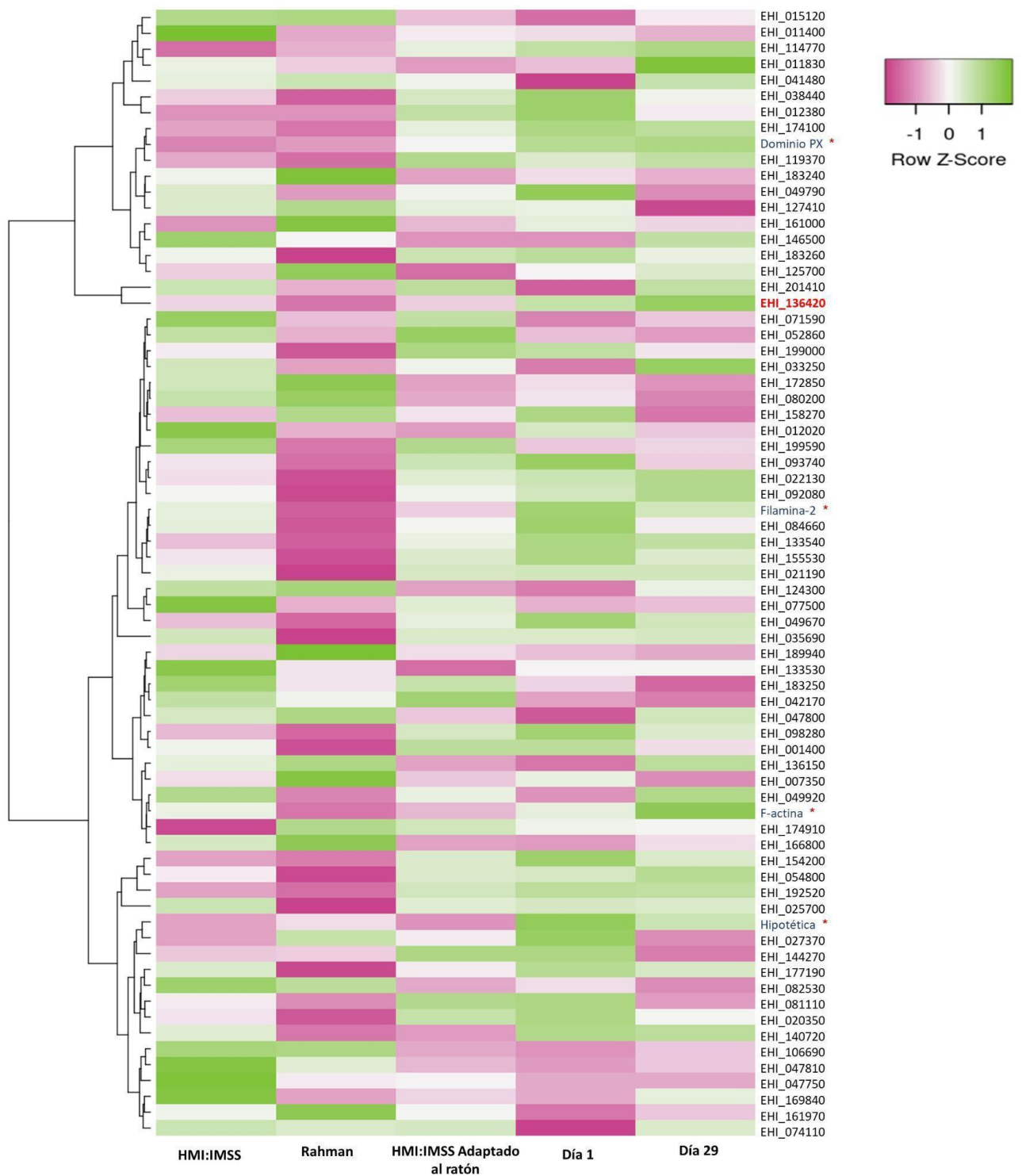


Figura 29. Cambios en la expresión de los genes blanco de EhMybS3 en un modelo murino. Mapa de calor que muestra los niveles de expresión obtenidos de los análisis de transcripción reportados en AmoebaDB durante la interacción de trofozoítos con un modelo murino en la colonización intestinal (Gilchrist, *et al.*, 2006). *ehmybs3* se encuentra de color rojo, los genes que presentan un patrón de expresión similar a *ehmybs3* se indican con asterisco.

De igual modo, se analizaron los niveles de expresión de los genes blanco de



EhMybS3 en condición de enquistamiento/desenquistamiento, donde se observa que *ehmybs3* mantiene una mayor expresión en la semana 1 de enquistamiento en medio Robinson, a comparación con la condición basal y la cepa 200: NIH bajo en glucosa. De igual manera se encontraron genes blanco con una expresión similar a *ehmybs3* (EHI_081110, EHI_015120, EHI_038440, EHI_106690, EHI_119370, EHI_125700, EHI_201410), los cuales, codifican proteínas involucradas en funciones relacionadas con la transcripción, adhesión, metabolismo, citoesqueleto y transducción de señales. En las tablas 9 y 10 se desglosa la anotación de estos genes (Fig. 29).



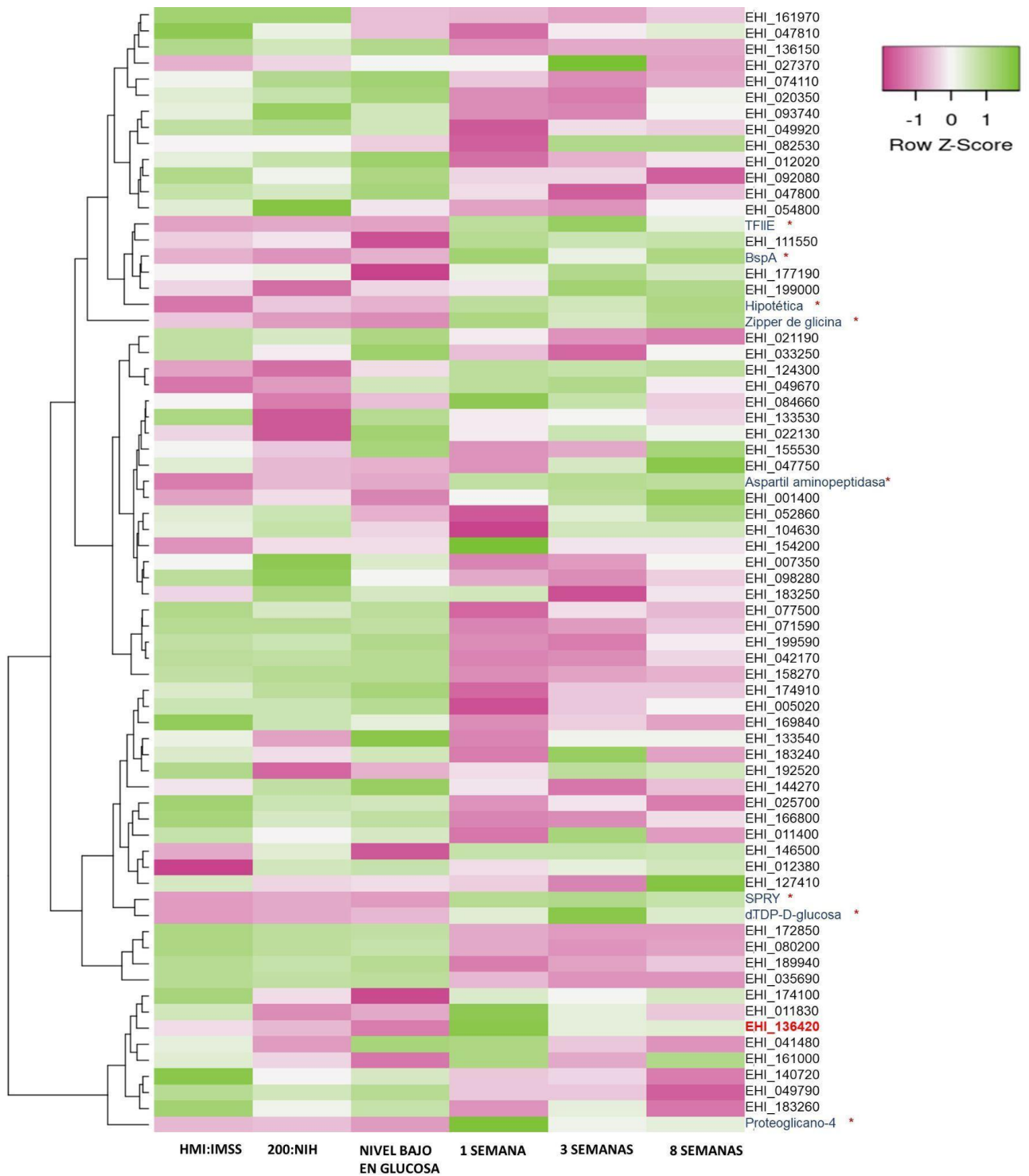


Figura 30. Cambios en la expresión de los genes blanco de EhMybS3 en medio Robinson. Mapa de calor que muestra los niveles de expresión obtenidos del microarreglo del RNA de parásitos *E. histolytica* cultivados en medio de Robinson durante 1-8 semanas del enquistamiento reportados en AmoebaDB (Ehrenkaufner, *et al.*, 2007). *ehmybs3* se encuentra de color rojo, los genes que presentan un patrón de expresión similar a *ehmybs3* se indican con asterisco.



Por último, durante la condición de virulencia en diferentes cultivos, se identificó que una gran cantidad de genes (EHI_052860, EHI_092080, EHI_022130, EHI_110740, EHI_133530, EHI_177190, EHI_015120, EHI_155530, EHI_047810, EHI_001400, EHI_140720, EHI_146500, EHI_081110, entre otros) que participan en procesos como adhesión, transducción de señales, citoesqueleto, transcripción, metabolismo y núcleo, tienen una similitud con la expresión que presenta *ehmybs3* en cepas virulentas en explante de colón, lo cual indica que podrían involucrados en la virulencia para la amiba (Fig. 30).



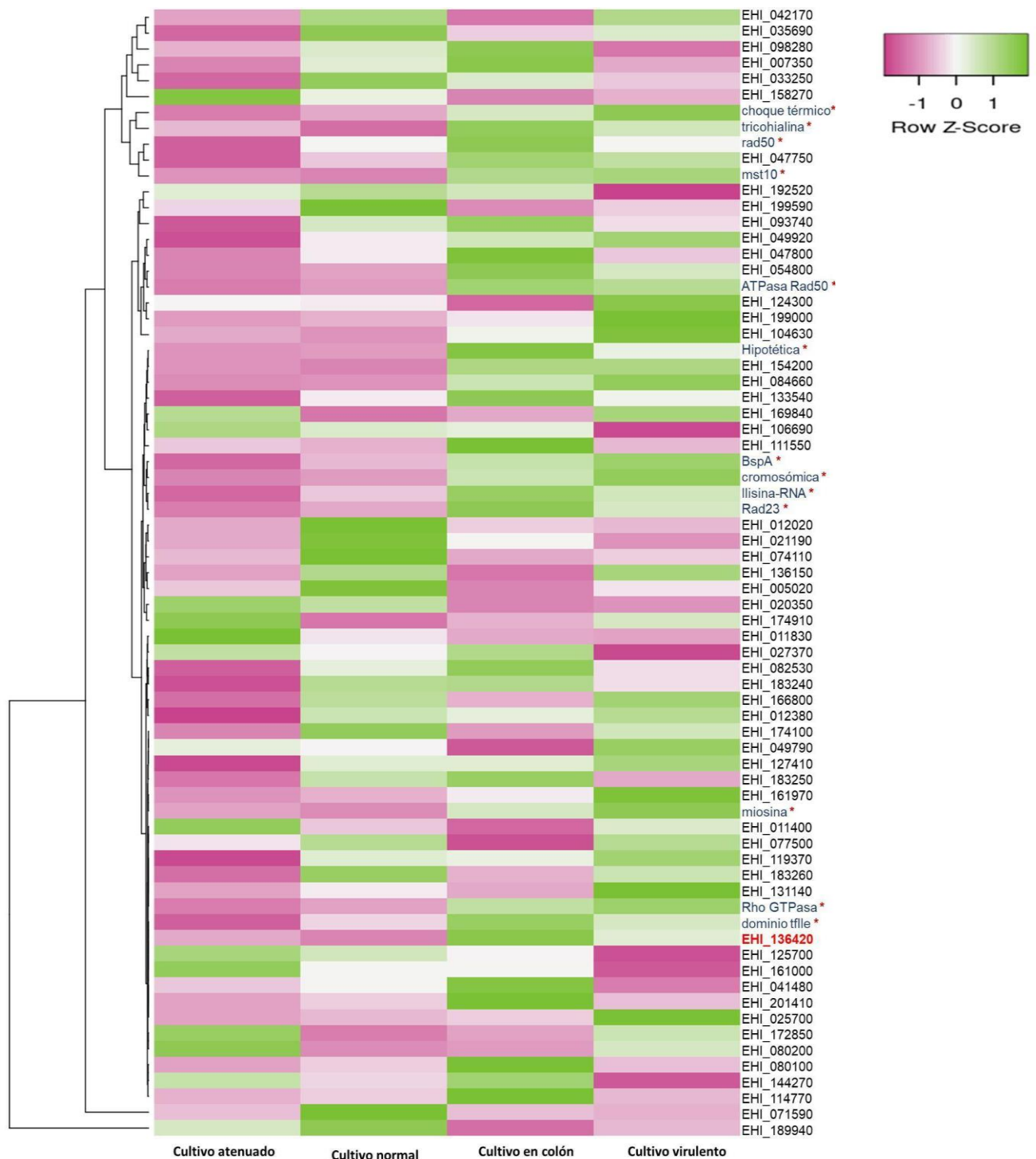


Figura 31. Cambios en la expresión de los genes blanco de EhMybs3 en diferentes condiciones de cultivo. Mapa de calor que representa los niveles de expresión obtenidos mediante Illumina RNA-Seq reportados en AmoebaDB en diferentes cultivos relacionados con la virulencia (Hon, *et al.*, 2013). *ehmybs3* se encuentra de color rojo, los genes que presentan un patrón de expresión similar a *ehmybs3* se indican con asterisco.



En conclusión, es interesante ver cómo la expresión de *ehmybs3* y sus genes blanco varían en diferentes condiciones biológicas, ya que estos hallazgos indican que *ehmybs3* desempeña un papel importante en la regulación de genes relacionados con enquistamiento, colonización intestinal y virulencia en *E. histolytica*.

9.9. Determinar la expresión de los genes blanco al sobreexpresar EhMybS3 en trofozoítos de *E. histolytica*

9.9.1. Análisis del vector de expresión pKT3M y pKT3M-*ehmybs3*

Primeramente, se verificó la integridad de los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* mediante un gel de agarosa al 1%. Este resultado muestra una sola banda que corresponde al DNA plasmídico superenrollado en el carril 1 y carril 2 (Fig.31A). Por otro lado, para verificar la presencia del gen *ehmybs3* en el vector pKT3M, se realizó una restricción utilizando las enzimas *SmaI* y *XhoI* que permitió la liberación de un fragmento de 534 pb correspondiente al tamaño del gen *ehmybs3* (Fig.31B). Estos resultados confirmaron que el gen *ehmybs3* se encuentra clonado en el plásmido pKT3M.

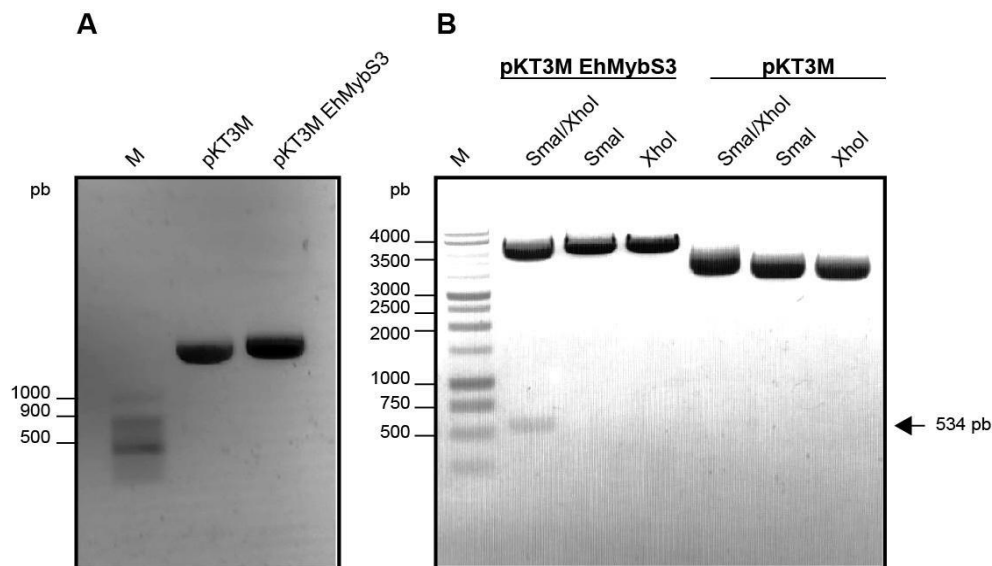


Figura 32. Caracterización de los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* usados para transfección. A) Obtención de los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* por medio de lisis alcalina. B) Análisis por restricción de los plásmidos con las enzimas *SmaI* y *XhoI*. Los plásmidos se corrieron en geles de agarosa al 1%, se tiñeron con GelRed y se visualizaron en un transiluminador. M, marcador de 100 pb.

9.9.2. Análisis de la sobreexpresión del gen *ehmybs3* en trofozoítos transfectados

Los trofozoítos de *E. histolytica* se transfectaron tanto de manera transitoria como estable, con las construcciones pKT3M y pKT3M-*ehmybs3*. En el caso de la transfección transitoria se analizaron diferentes tiempos postransfección (hpt): 24, 48 y 72 para observar la sobreexpresión de *ehmybs3*. Esta sobreexpresión fue evaluada mediante ensayos de RT-PCR y RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar los genes *ehmybs3* y *s2 40s* (control). Para ello, se estandarizaron las condiciones de amplificación de los genes, para lo cual primero se extrajo el RNA total de trofozoítos cultivados en condiciones normales y se llevó a cabo la síntesis de cDNA, seguida de la amplificación mediante PCR. Como resultado, en la figura 32A se muestran amplicones de 189 pb correspondientes al gen *ehmybs3* y de 118 pb para el control *s2 40s*. Estos tamaños concuerdan con los esperados y confirma la expresión de *ehmybs3* en condiciones basales. En este análisis, se incluyeron como controles positivos el DNA genómico (DNAg) y el RNA tratado con DNasa I (RT-), con el propósito de confirmar la ausencia de contaminación en las muestras. Adicionalmente, mediante un análisis de RT-qPCR, se observó un notable aumento de expresión del fold change a las 72 hpt del gen *ehmybs3*, alcanzando aproximadamente un valor de 6, en comparación con las amibas que contenían el vector vacío (pKT3M) y los trofozoítos en condiciones basales, destacando una significativa sobreexpresión de este factor en dicho periodo en comparación con los tiempos de 24 y 48 hpt (Fig.32B). Posteriormente, se realizó otro análisis de RT-qPCR en trofozoítos transfectados establemente para confirmar que la sobreexpresión de *ehmybs3* en condiciones estables y seleccionadas con el antibiótico G-418 (20 µg) (Sigma-Aldrich) (Fig.32C).



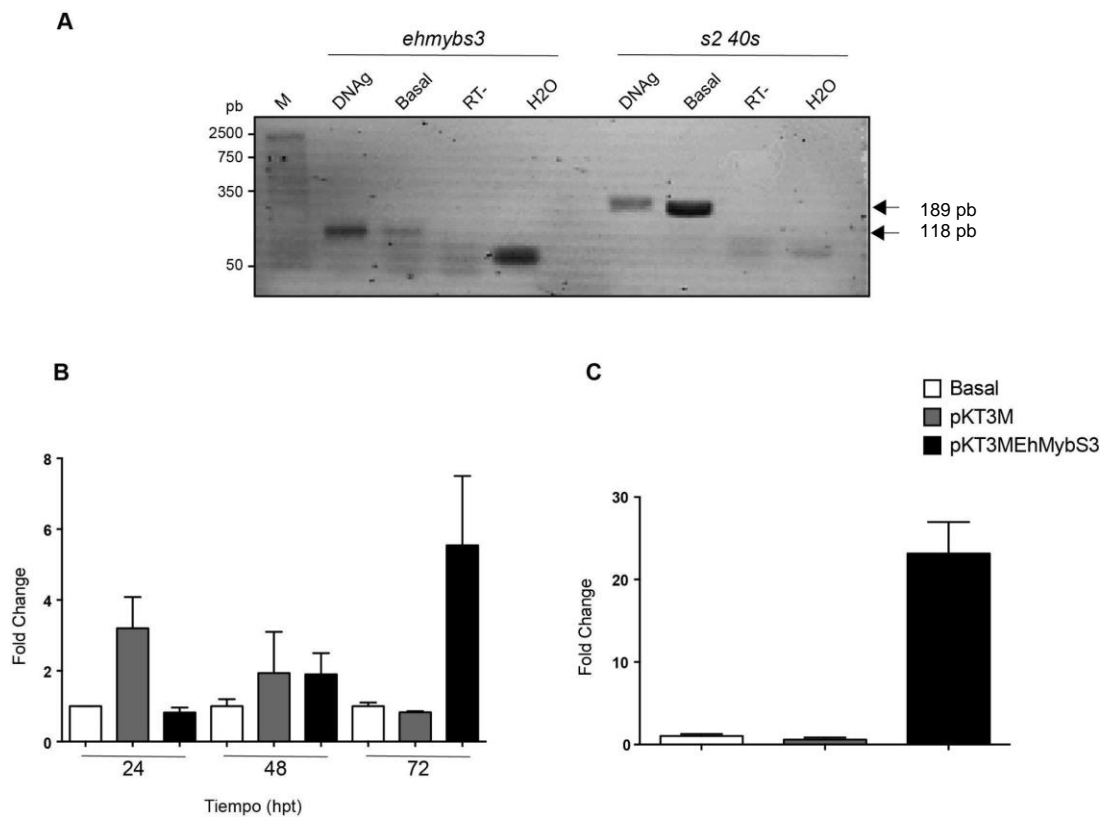


Figura 33. Análisis de la expresión de *ehmybs3* en trofozoítos transfectados. A) RT-PCR en condiciones basales B) RT-qPCR de trofozoítos transfectados de manera transitoria analizados a diferentes intervalos de tiempo y C) RT-qPCR de trofozoítos transfectados establemente y seleccionados con 20 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de G418.

Una vez demostrada la sobreexpresión del gen *ehmybs3*, se realizó un ensayo de inmunodetección con el propósito de corroborar la sobreexpresión de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados de manera estable y seleccionados con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G-418. Se empleó un anticuerpo α -*ehmybs3* (no comercial, 1:1000) para la detección específica de la proteína. Durante el análisis, se generó una imagen de la membrana teñida con Rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales transferidas al gel y verificar la transferencia eficiente de las muestras a la membrana (Fig.33A). En el resultado del gel, se observó una banda distintiva en el carril correspondiente a los trofozoítos transfectados con el vector pKT3M-EhMybS3, indicando una evidente sobreexpresión de la proteína EhMybS3 en comparación con el vector vacío (pKT3M). No obstante, se apreció una diferencia en el tamaño previsto, ya que

se detectó una banda de 25 kDa en lugar de los 20 kDa esperados (Fig.33B).

Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de stripping en la misma membrana y se procedió a incubarla con un anticuerpo α -actina (Sigma, 1:1000), sirviendo esta proteína como control de carga. Los resultados mostraron bandas de 42 kDa en cantidades similares en todas las condiciones analizadas (Fig.33C) lo demuestra que la proteína EhMybS3 se encuentra sobreexpresada y que el resultado obtenido no se debió a un error de carga de proteínas.

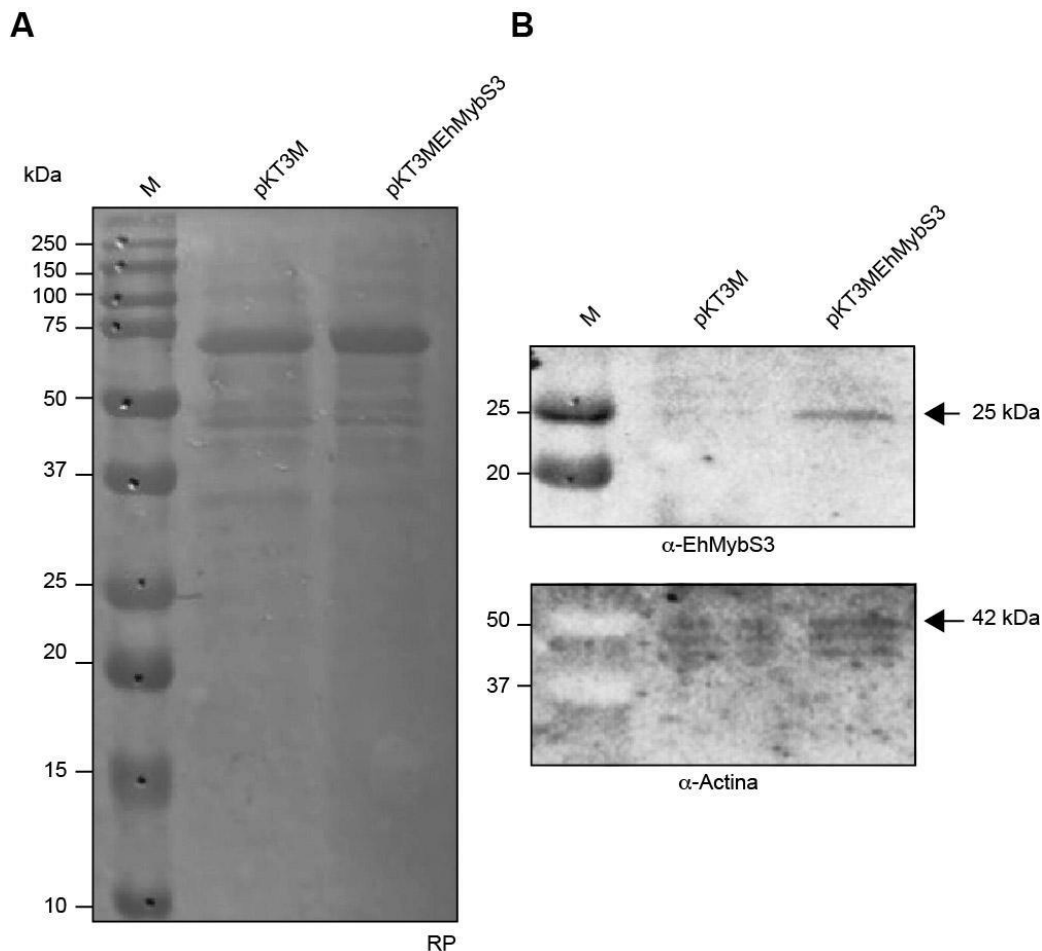


Figura 34. Inmunodetección de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados de manera estable. A) Tinción con rojo ponceau. B) Inmunodetección con el anticuerpo α -*ehmybs3* 1:1000 (no comercial) e Inmunodetección con el anticuerpo α -actina 1:1000 (Sigma).

9.9.3. Localización subcelular de EhMybS3 en trofozoítos transfectados

Mediante un ensayo de inmunofluorescencia se determinó la sobreexpresión de EhMybs3, así como su localización celular. Durante el ensayo se utilizó el anticuerpo α -myc 1:250 (Invitrogen) dirigido contra la etiqueta Myc que está

fusionada a la proteína EhMybS3, la cual permite identificar exclusivamente la expresión de la proteína exógena. En la figura 34 se observa que EhMybS3 se expresa desde las 24 hpt hasta las 72 hpt, en comparación con los trofozoítos transfectados con pKT3M. No obstante, se apreció una mayor intensidad de fluorescencia a las 72 hpt, indicando que la mayor acumulación de la proteína se produce en este intervalo de tiempo. Además, se apreció una colocalización en el núcleo, confirmada mediante la tinción con DAPI, reforzando la asociación de EhMybS3 con en la periferia nuclear. La prominente localización nuclear de EhMybS3 se hace más evidente a las 72 hpt.

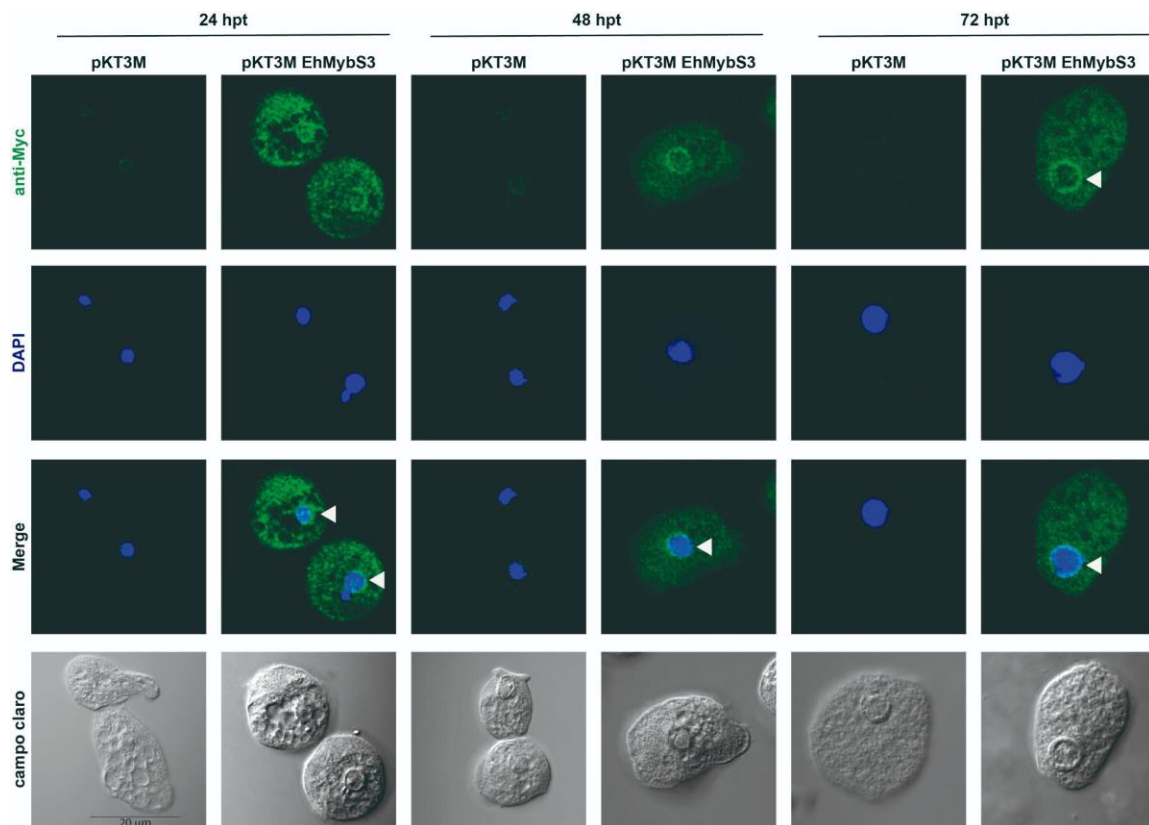


Figura 35. Localización de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados transitoriamente. Inmunofluorescencia de los trofozoítos transfectados transitoriamente con los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* cosechados a las 24, 48 y 72 hpt. Anticuerpo primario: α -myc 1:250 (Invitrogen); anticuerpo secundario α -FITC 1:100 (Jackson ImmunoResearch). La flecha indica los núcleos teñidos con DAPI (azul). Analizado mediante microscopía confocal.

Posteriormente, se llevó a cabo otro ensayo de inmunofluorescencia con trofozoítos transfectados establemente y seleccionados con G-418 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se emplearon anticuerpos α -histona H4K20 1:100 (Abcam), α -histona H3K27 1:100 (Abcam), y α -*ehmybs3* 1:250 (no comercial) específico para la proteína EhMybS3. Las microscopías revelaron que el α -*ehmybs3* colocaliza con las histonas H4K20 y H3K27 (Fig.35). A su vez, estos resultados respaldan la evidencia de la localización subcelular de EhMybS3 en el núcleo debido a su empalme con la tinción DAPI.

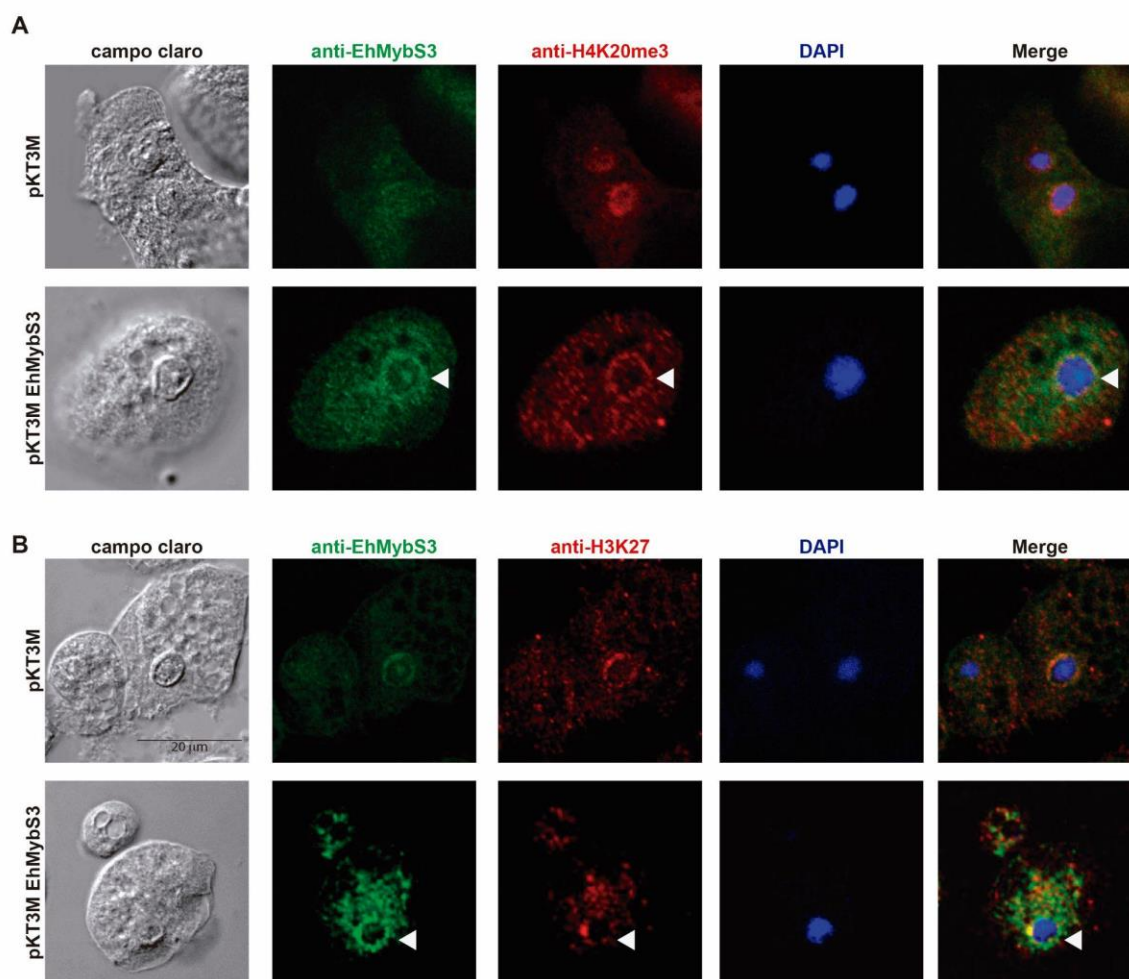


Figura 36. Localización de la proteína EhMybS3 en trofozoítos transfectados establemente y seleccionados a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Inmunofluorescencia de los trofozoítos transfectados establemente y seleccionados a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Anticuerpo primario: α -EhMybS3 1:250 (no comercial)/(verde); H4K20 1:100 (Abcam)/(rojo); α -H3K27 1:100 (Abcam)/(rojo). Anticuerpo secundario α -conejo acoplado a Alexa 488 1:50 (Invitrogen). La flecha indica los núcleos teñidos con DAPI (azul). Analizado mediante microscopía confocal.

9.9.4. Análisis de la expresión de los genes blanco de EhMybS3

A través de un microarreglo realizado por el M. en C. Helios Cárdenas, se identificaron genes cuya expresión se modula al sobreexpresar el TF EhMybS3 (Tablas 9 y 10). Se seleccionaron dos genes para corroborar el efecto de la sobreexpresión de EhMybS3 los cuales fueron *cilicina-2*, cuya expresión aumenta con la sobreexpresión de EhMybS3, y *filamina*, cuya expresión disminuye en esas condiciones. Para validar los resultados del microarreglo, se realizaron RT-PCR y RT-qPCR. En primer lugar, se llevó a cabo una RT-PCR semicuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para los genes *cilicina-2* y *filamina*, utilizando RNA total extraído de trofozoítos en condiciones basales. La amplificación generó productos de 217 pb para *cilicina-2* y 208 pb para *filamina*, concordando con los tamaños esperados, lo que confirmó la especificidad de los oligos (Fig.36A). Procediendo al análisis de RT-qPCR, se utilizaron trofozoítos transfectados transitoriamente a las 72 hpt donde se observó una disminución de la expresión de *filamina* y un ligero aumento en la expresión de *cilicina-2*, con respecto a las amibas que contenían el vector vacío (pKT3M) (Fig.36B). Estos resultados, muestran tendencias similares a los obtenidos en el microarreglo. Por otro lado, los trofozoítos transfectados establemente y seleccionados con 20 µg/mL G-418 mostraron un aumento consistente del fold change de hasta 1.7 para *cilicina-2* y para *filamina* (fold change 0.7) y en comparación con las amibas que contenían el vector vacío (pKT3M), validando así los resultados del microarreglo (Fig.36C).

Estos hallazgos sugieren que la expresión diferencial del gen *cilicina-2* y *filamina* en respuesta a la sobreexpresión de EhMybS3 varía según el método de transfección empleado.



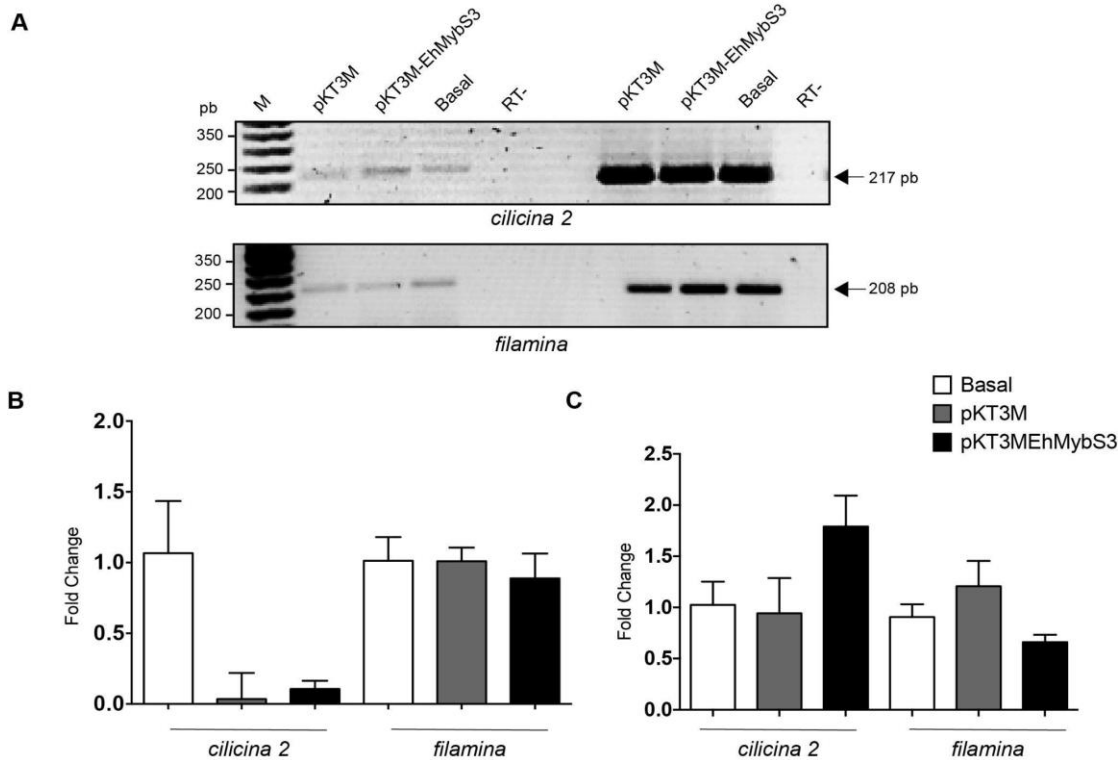


Figura 37. Análisis de la expresión de los genes *cilicina-2* y *filamina*. A) RT-PCR semicuantitativa de los genes blanco de EhMybS3 en condiciones basales de cultivo. El carril 1, 2, 3 y 4, corresponden al gen *cilicina 2* y *filamina*, respectivamente. El carril 5,6,7 y 8 corresponden al gen control (+) *s2 40s*. B) RT-qPCR de los genes blanco de EhMybS3 a partir de RNA de trofozoítos transfectados de manera transitoria analizados a las 72 hpt y C) RT-qPCR de los genes blanco de EhMybS3 a partir de RNA de trofozoítos transfectados establemente y seleccionados con 20 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de G-418 (Sigma-Aldrich).

9.10. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3 sobre células epiteliales y eritrofagocitosis

Por otro lado, se analizó el impacto de los trofozoítos transfectados establemente que sobreexpresan el gen *ehmybs3* en células epiteliales. Estos trofozoítos fueron seleccionados con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G-418 y expuestos a células MDCK durante aproximadamente 30 minutos. Los resultados revelaron que los trofozoítos no transfectados WT causaron un 45% de daño en la monocapa celular, mientras que los trofozoítos pKT3M mostraron un daño del 10%. Notablemente, los trofozoítos que sobreexpresan a la proteína EhMybS3 tuvieron mayor efecto citopático, causando un daño del 45%,

significativamente mayor que los trofozoítos pKT3M, aunque similar al daño causado por los trofozoítos WT (Fig.37A).

Sin embargo, cuando se realizaron los ensayos de eritrofagocitosis los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3 y expuestos a eritrocitos durante intervalos de 0, 15 y 30 min, mostraron un menor porcentaje de eritrofagocitosis, registrando un 1.0%, considerablemente inferior al observado en los trofozoítos pKT3M (Fig.37B), no obstante, estas diferencias no son estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos analizados.

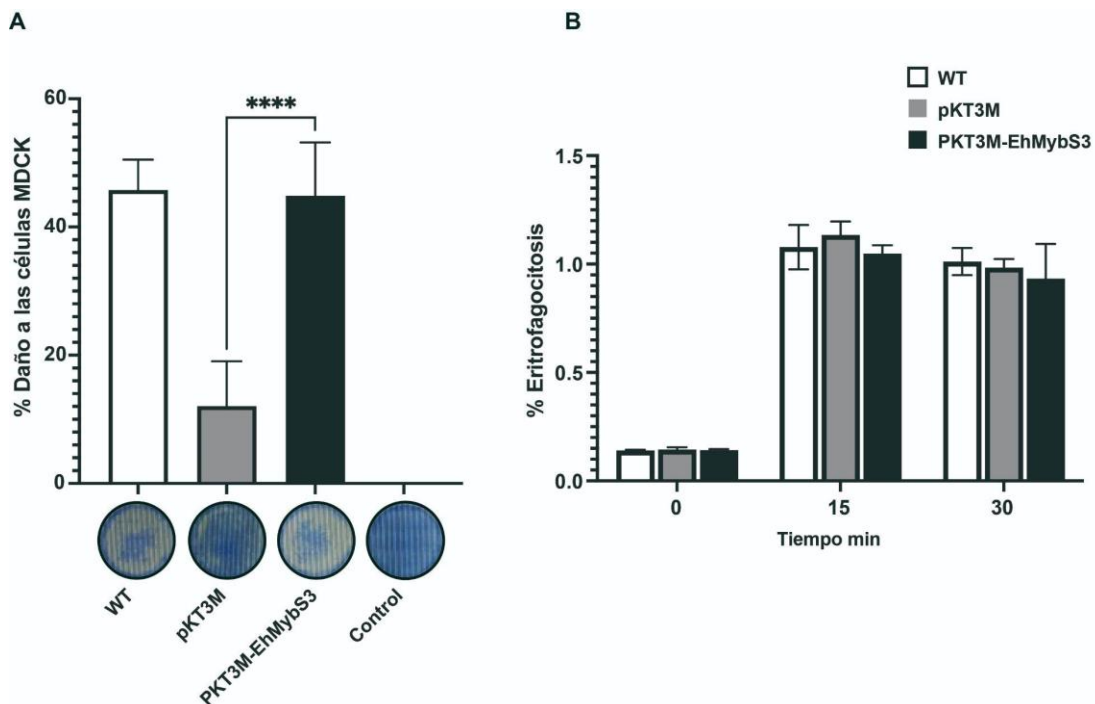


Figura 38. Efecto de la sobreexpresión de EhMybS3 sobre las propiedades de virulencia de los trofozoítos transfectados. A) Análisis de citopatogenicidad de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3. Las monocapas de células MDCK se incubaron con trofozoítos (25,000) sin transfectar (WT) y transfectados establemente y seleccionados con 20 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de G418 con los vectores pKT3M y pKT3M-*ehmybs3*. El daño celular se evaluó mediante tinción con cristal violeta al 1%. El colorante eluido se cuantificó por espectrometría a $\lambda=660$ nm. Diferencia significativa ($p<****0.0001$). B) Análisis de eritrofagocitosis de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMybS3. Los eritrocitos (6,250,000) estuvieron en contacto con trofozoítos (25,000) sin transfectar (WT) y transfectados establemente y seleccionados con 20 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de G418 con los vectores pKT3M y pKT3M-*ehmybs3* durante 0, 30 y 60 min. Las muestras se diluyeron con ácido fórmico y se cuantificaron por espectrometría a $\lambda=400$ nm.

10. Discusión

En el parásito *E. histolytica*, se han identificado y caracterizado varios factores de transcripción, entre los cuales se encuentran EhTBP (de Dios-Bravo, *et al.*, 2005), EhEBP1, EhEBP2 (Schaenman, *et al.*, 2001), ERM-BP (Manna, *et al.*, 2020), EhMybdr y EhMyb10 (Ehrenkaufner, *et al.*, 2009; Meneses, *et al.*, 2010), GATA (Huerta, *et al.*, 2020) y EhPC4 (de la Cruz, *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque se han identificado estos factores de transcripción, sólo se conoce la información detallada sobre los genes blanco de algunos de ellos. Por ejemplo, URE3-BP (Gilchrist, *et al.*, 2008) y EhMyb-dr (Ehrenkaufner, *et al.*, 2009).

EhMybS3

pertenece a la familia Myb, sin embargo, no se sabe mucho sobre sus genes blanco. En este trabajo, se caracterizó al TF EhMybS3, miembro de la familia EhMybS. Se inició con un análisis *in silico* el cual permitió determinar sus posibles modificaciones postraduccionales (PTMs) como es la fosforilación, glicosilación y SUMOilación. Durante la predicción de diferentes PTMs mediante análisis bioinformáticos dirigidos a EhMybS3, se sugiere que la fosforilación podría tener un impacto significativo en la función de EhMybS3, ya que se sabe que c-Myb, un TF relacionado, es fosforilado por la cinasa CK2 en sus serinas 11 y 12. Esta fosforilación afecta la capacidad de c-Myb para regular su unión al DNA (Cures, *et al.*, 2001). Algunas de las cinasas con mayor relevancia que participan en la fosforilación de EhMybS3 es la cinasa C (PKC). La utilización de inhibidores de PKC ha demostrado un papel crucial en el citoesqueleto de actina, lo que afecta la motilidad y la adhesión a células blanco de *E. histolytica*. Además, se ha observado que la actividad de PKC es fundamental en el proceso de eritrofagocitosis por parte de *E. histolytica* (Weikel, *et al.*, 1988; Kawano, *et al.*, 2021); también se hallaron cinasas cdc2. Esta cinasa al asociarse con la ciclina B y formar el complejo cdc2-ciclina B que desempeña un papel central en la coordinación y regulación precisa de los eventos mitóticos durante la fase G2/M del ciclo celular, contribuyendo así a



una replicación del DNA controlada y una división celular adecuada (Peter, *et al.*, 2002; Shen, *et al.*, 2018). También se identificó una cinasa homóloga a la proteína Cdc2, conocida como Cdk5, la cual es una proteína cinasa de serina/treonina dirigida por prolina. A diferencia de su homólogo, Cdk5 no se involucra directamente en la regulación del ciclo celular, sino que desempeña funciones cruciales en diversos procesos celulares, especialmente en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Pao, *et al.*, 2021). Dado que existen cinasas relacionadas con la respuesta a diversas señales celulares, como el estrés, señales de crecimiento y factores inflamatorios, la probabilidad de que EhMybS3 sea fosforilada por estas cinasas sugiere que este TF podría integrar señales diversas, lo cual podría ser crucial para la respuesta adaptativa de *E. histolytica* a su entorno. Por otro lado, otra de las PTM que se analizaron en este trabajo para EhMybS3 fue la SUMOilación. Nuestro grupo de investigación propone que esta PTM pudiera inhibir la actividad de EhMybS3. Este planteamiento se basa tomando en cuenta que c-Myb se sumoila en dos residuos de lisina en su dominio regulador negativo (NRD), lo que provoca una disminución drástica de su actividad (Molvaersmyr, *et al.*, 2010). La SUMOilación regula diversas funciones celulares, incluyendo la actividad de las proteínas, su localización subcelular y sus interacciones con otras moléculas (Han, *et al.*, 2018). En c-Myb, la SUMOilación en dos residuos de lisina, Lys 499 y Lys 523. Este fenómeno conlleva a cambios en la estabilidad, es decir, que podría influir en la velocidad a la que c-Myb es degradada dentro de la célula afectando su tiempo de vida y abundancia en la célula (Bies, *et al.*, 2002). Durante nuestros análisis *in silico*, identificamos sitios de SUMOilación de EhMybS3 en sitios específicos y la presencia de un motivo, lo cual podrían tener importantes implicaciones funcionales, ya que podrían influir en la estabilidad de EhMybS3, sus interacciones con otras proteínas o su participación en procesos celulares específicos. Finalmente, aunque la glicosilación se considera una PTM restringida a proteínas en la superficie celular o en orgánulos intracelulares, estudios han revelado la presencia de



glicosilación en TF nucleares, donde se observó que la glicosilación inhibe la activación transcripcional del TF, pero no afecta su capacidad para unirse al DNA (Jackson, *et al.*, 1988). Este hallazgo sugiere la posibilidad de que esta PTM pueda tener un efecto similar en otros TF. Los posibles sitios glicosilados sugieren la posibilidad de que EhMybS3 podría tener implicaciones significativas en su función y regulación.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis *in silico* para identificar una red de interacciones proteína-proteína de EhMybS3, con el objetivo de identificar asociaciones significativas con diversas proteínas que sugieren su participación en diversos procesos celulares. Este análisis complementa resultados anteriores sobre PTM, en los cuales se observó que EhMybS3 es susceptible a glicosilaciones, fosforilaciones y SUMOilaciones. Estas modificaciones podrían influir en la capacidad en que EhMybS3 interactúa con otras proteínas y, por ende, afectar su función en la regulación de procesos celulares importantes en este parásito. Por otro lado, esto sugiere que estas PTM no solo afectan a EhMybS3, sino que también pueden influir en las proteínas con las que se encuentra interactuando.

Por otro lado, algunos de los TF que se conocen en amibas, han determinado sus genes blanco a través de estrategia de sobreexpresión. Un ejemplo es el TF EhMyb-dr, en el cual se identificaron 117 genes regulados, según el estudio de Ehrenkaufner y colaboradores (2009). En el caso del TF EhMybS3, un microarreglo realizado por el M. en C. Helios Cárdenas (tesis de doctorado en proceso) determinó que la sobreexpresión de EhMybS3 reguló la expresión de 97 genes. Al realizar un análisis comparativo entre EhMyb-dr y EhMybS3, se notó que solo comparten un gen en común. Sin embargo, algunos de los genes regulados por estos dos TF pertenecen a las mismas familias génicas. Este hallazgo destaca que, a pesar de que ambos son TF de la familia Myb, el conjunto de sus genes blanco regulados por cada TF es único, lo que sugiere funciones específicas y diferenciadas en el control de la expresión génica en

amibas.

Adicionalmente, encontramos secuencias putativas en estos genes blanco de EhMybS3, por ejemplo, un motivo GAGA en los genes con un nivel de expresión muy bajo. En *Drosophila*, los factores de unión al motivo GAGA han demostrado desempeñar un papel importante en el crecimiento y desarrollo adecuados (Tsai, *et al.*, 2016), proporcionando una base para especular sobre funciones similares en *E. histolytica*. Esto implica que el motivo GAGA podría estar involucrado en la regulación de genes que son críticos para el crecimiento y desarrollo apropiados de la amiba. También se destacaron varios elementos como la caja GAAC, la cual controla los sitios de inicio de la transcripción independientemente de las regiones TATA e Inr (Singh, *et al.*, 1998). Sin embargo, de manera interesante se identificó una secuencia CACC[T/A]C la cual es similar al motivo CCCCCC identificado por Ehrenkaufner y cols (2009) y que es reconocido por el factor EhMybdr también perteneciente a la familia SHAQKYF el cual regula genes involucrados en la diferenciación de trofozoíto a quiste. Lo cual podría indicar que esta familia podría reconocer variaciones de una secuencia rica en C.

De los 97 genes regulados por la sobreexpresión de EhMybS3, se seleccionaron únicamente dos genes para continuar con los análisis. De los genes que aumentaron su expresión, se eligió a *cilicina-2* (EHI_080100), debido a que contiene dos SNPs (2725C/T y 2730A/G) relacionados con la propensión de *E. histolytica* a causar abscesos hepáticos amebianos, lo que sugiere una posible conexión con factores de virulencia. El gen *cilicina-2* se encuentra en una región corta de DNA contig que no pudo ser ensamblada en un segmento más grande en el genoma de *E. histolytica*, lo que sugiere la posibilidad de su presencia en regiones repetitivas que impiden un ensamblaje inequívoco. Hasta ahora, no se ha identificado ningún homólogo de *E. dispar* para *cilicina-2* (EHI_080100), lo cual hace de este gen un candidato prometedor para investigaciones (Gilchrist, *et al.*, 2012). Por otro lado, de los genes que disminuyeron su



expresión, se eligió el gen *filamina*. Los genes que codifican para proteínas del citoesqueleto, como la filamina, desempeñan un papel esencial en la organización del citoesqueleto de actina, que es una red de filamentos de proteínas que da forma a las células y participa en diversos procesos celulares, incluido el movimiento, la migración y la división celular (Svitkina T, *et al.*, 2018). Se sabe que la formación de urópodos en *E. histolytica* se encuentran mayormente reguladas por redes de actina polimerizada, sostenidas por proteínas de unión a actina pertenecientes a la familia de espectrina (Marquay, *et al.*, 2011). Dentro de esta familia, destacan la α -actinina y las filaminas, que previamente se ha observado que se acumulan en el urópodo, donde interactúan con el dominio COOH-terminal de la lectina Gal/GalNAc (Marion, *et al.*, 2004).

Con el propósito de observar la relación entre *ehmybs3* y los genes *cilicina-2* y *filamina*, se llevó a cabo la transfección del gen *ehmybs3* completo en trofozoítos HMI:IMSS de *E. histolytica*. La confirmación de la sobreexpresión de este TF se realizó mediante pruebas de RT-qPCR e inmunofluorescencia. Se observó una diferencia significativa en la sobreexpresión de *ehmybs3* solo a las 72 hpt, indicando una tendencia al aumento del transcrito con el tiempo de transfección. Este resultado se corroboró mediante RT-qPCR que a las 72 hpt se registra una mayor sobreexpresión del mRNA de *ehmybs3*.

Asimismo, se evaluó el nivel de expresión de EhMybS3 a nivel proteico mediante WB, identificando una banda distintiva en el carril correspondiente de EhMybS3, lo que señala una clara sobreexpresión de la proteína. Sin embargo, se notó una discrepancia en el tamaño previsto, ya que se detectó una banda de 25 kDa en lugar de los 20 kDa teóricamente esperado. Esta variación en el tamaño podría atribuirse a modificaciones postraduccionales, como glicosilación o fosforilación, las cuales tienen el potencial de aumentar el peso molecular aparente de la proteína (Ramazi, *et al.*, 2021; Azure Biosystems, *et al.*, 2021). El análisis *in silico* sugirió que EhMybS3 es propenso a este tipo de



modificaciones, incluyendo fosforilación, glicosilación y SUMOilación. Además, la formación de dímeros o multímeros también podría influir en su movilidad en el gel (Lynch, *et al.*, 2013).

Por otro lado, determinamos que la proteína se localiza principalmente en el núcleo de los trofozoítos, sitio donde los TF ejercen principalmente su función (Liu, *et al.*, 2018). Este resultado fue corroborado utilizando anticuerpos anti-histonas, debido a que las histonas son proteínas estructurales clave que se encuentran asociadas con el DNA en el núcleo de las células (Pan, *et al.*, 2018; van Nuland, *et al.*, 2016; Bernardes, *et al.*, 2020), por lo que la correlación entre EhMybS3 y las histonas validaron y reforzaron su localización nuclear, de manera interesante en la periferia. Posteriormente, mediante ensayos de RT-qPCR, se corroboró que genes *cilicina-2* y *filamina* modifican su expresión al sobreexpresión a EhMybS3. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en microarreglos previamente realizados por el M. en C. Helios Cárdenas (tesis de doctorado en proceso). En conjunto, estos hallazgos confirman que la sobreexpresión del TF EhMybS3 regula la expresión de estos genes, posiblemente a nivel transcripcional. Sería importante validar mediante ensayos CHIP la presencia del factor de transcripción en los promotores de estos genes.

Finalmente, se evaluaron los efectos de la sobreexpresión de EhMybS3 en la virulencia de los trofozoítos, centrándose en dos propiedades: su capacidad eritrofagocítica y su efecto citopático. Nuestros hallazgos revelaron que el aumento de EhMybS3 no ejerce un efecto en la capacidad de los trofozoítos para fagocitar eritrocitos. Este efecto podría estar relacionado a la inhibición de la expresión del gen de la filamina, ya que la función de su producto proteico está relacionada con el citoesqueleto de actina el cual debe ser reorganizado durante la fagocitosis.

Finalmente, la sobreexpresión de EhMybS3 ocasionó un mayor daño a las monocapas de células epiteliales en comparación con los trofozoítos control.



Al revisar los genes que aumentan su expresión cuando EhMybS3 es sobreexpresado, se identificó al gen precursor de péptido formador de poros amoebapore A, lo que sugiere que estas proteínas ayudan a la ameba a formar poros en membranas de células huésped, favoreciendo la lisis e invasión durante la infección. De igual modo, se identificaron 4 genes anotados como hipotéticos los cuales son exclusivos del género *Entamoeba* que podrían tener actividades proteolíticas, por lo que se podría analizar su efecto en experimentos posteriores. Estos datos indican que el aumento en la cantidad de EhMybS3 podría regular genes relacionados con la colonización e invasión intestinal.



11. Conclusiones

- Se identificaron sitios susceptibles a modificaciones postraduccionales en la secuencia de aminoácidos del TF EhMybS3 indicando que pueden influir en su capacidad de unirse al DNA y regular la transcripción, en su capacidad de interactuar con otras proteínas, en su actividad biológica y estabilidad.
- La expresión de EhMybS3 y sus genes blanco varían en diferentes condiciones biológicas. Esto indica que EhMybS3 regula genes asociados con enquistamiento, colonización intestinal y virulencia, sustentando así la adaptación y patogenicidad de *E. histolytica* en diversos entornos y situaciones de colonización.
- Se encontraron motivos GAAC y CACC[T/A]C en los promotores de genes blanco de EhMybS3 potencialmente importantes en la regulación de la expresión génica en este parásito.
- De manera experimental, la sobreexpresión de EhMybS3 moduló la expresión de los genes *cilicina-2* y *filamina* validando los datos reportados en el microarreglo analizado por el M. en C. Helios Cárdenas. Asimismo, la sobreexpresión de EhMybS3 contribuye al daño celular en el ensayo citopático, pero su sobreexpresión parece tener un efecto negativo en la capacidad fagocítica de los trofozoítos lo cual coincide con la disminución en la expresión de filamina. Esto sugiere que EhMybS3 podría tener un papel específico en la regulación de genes relacionados con la virulencia durante la interacción con células intestinales.



12- Bibliografía

1. Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002a). DNA-binding motifs in gene regulatory proteins. Garland Science.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002b). From DNA to RNA. Garland Science.
4. Anderson HH, Bostick WL, Johnstone HG. Amebiasis. 1st Ed. Springfield (Ill): Charles C Thomas Publisher; 1953, p 3-11.
5. Ankri, S. (2021). Entamoeba histolytica – gut Microbiota interaction: More than meets the eye. *Microorganisms*, 9(3), 581. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030581>
6. Aufricht, C. (2005). Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 20(6), 707–713. <https://doi.org/10.1007/s00467-004-1812-6>
7. Bernardes, N. E., & Chook, Y. M. (2020). Nuclear import of histones. *Biochemical Society transactions*, 48(6), 2753–2767. <https://doi.org/10.1042/BST20200572>
8. Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 148, 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
9. Bekri, S. (2006). Importance of glycosylation in enzyme replacement therapy. Oxford PharmaGenesis
10. Bies, J., Sramko, M., & Wolff, L. (2013). Stress-induced phosphorylation of Thr486 in c-Myb by p38 mitogen-activated protein kinases attenuates conjugation of SUMO-2/3. *The Journal of biological chemistry*, 288(52), 36983–36993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.500264>
11. Bies, J., Markus, J., & Wolff, L. (2002). Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 8999–9009. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110453200>
12. Binarová, P., & Tuszynski, J. (2019). Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. *Cells*, 8(10), 1294. <https://doi.org/10.3390/cells8101294>
13. Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., Tan, S., Denu, J. M., & Peterson, C. L. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Molecular Cell*, 10(4), 935–942. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00634-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00634-2)
14. Burgess, S. L., & Petri, W. A., Jr. (2016). The intestinal bacterial microbiome and *E. histolytica* infection. *Current Tropical Medicine Reports*, 3(3), 71–74. <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0083-1>
15. Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M., & Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Molecular Microbiology*, 34(3), 463–472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01607.x>
16. Bracha, R., Nuchamowitz, Y., & Mirelman, D. (2003). Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 295–305. <https://doi.org/10.1128/ec.2.2.295-305.2003>
17. Carre, I. A. (2002). MYB transcription factors in the Arabidopsis circadian clock. *Journal of Experimental Botany*, 53(374), 1551–1557. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf027>



18. Carrero, J. C., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Unzueta, J., León-Sicairos, N., & de la Garza, M. (2020). Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 310(1), 151358. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>
19. Councilman, W. T., Lafleur, H. A. I. "Amoebic dysentery".; In: The Johns Hopkins Hospital Reports. Vol. II. Rep. Pathol. 7:(7-9) 395-548, 1891.
20. Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(10), 769-776. <https://doi.org/10.1038/35096075>
21. Cures, A., House, C., Kanei-Ishii, C., Kemp, B., & Ramsay, R. G. (2001). Constitutive c-Myb amino-terminal phosphorylation and DNA binding activity uncoupled during entry and passage through the cell cycle. *Oncogene*, 20(14), 1784-1792. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204345>
22. Chaikuad, A., Pilka, E. S., De Riso, A., von Delft, F., Kavanagh, K. L., Vénien-Bryan, C., Oppermann, U., & Yue, W. W. (2012). Structure of human aspartyl aminopeptidase complexed with substrate analogue: insight into catalytic mechanism, substrate specificity and M18 peptidase family. *BMC structural biology*, 12, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-12-14>
23. Chandra, M., Chin, Y. K.-Y., Mas, C., Feathers, J. R., Paul, B., Datta, S., Chen, K.-E., Jia, X., Yang, Z., Norwood, S. J., Mohanty, B., Bugarcic, A., Teasdale, R. D., Henne, W. M., Mobli, M., & Collins, B. M. (2019). Classification of the human phox homology (PX) domains based on their phosphoinositide binding specificities. *Nature Communications*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09355-y>
24. Chang, C. Y., Hsieh, Y. C., Wang, T. Y., Chen, Y. C., Wang, Y. K., Chiang, T. W., Chen, Y. J., Chang, C. H., Chen, C. J., & Wu, T. K. (2010). Crystal structure and mutational analysis of aminoacylhistidine dipeptidase from *Vibrio alginolyticus* reveal a new architecture of M20 metallopeptidases. *The Journal of biological chemistry*, 285(50), 39500-39510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139683>
25. Chávez, B. (2013). *Entamoeba histolytica*: La estructura interna de un destructor por naturaleza. *Ciencia*, (8), 1-8. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/64_2/PDF/EntamoebaHistolytica.pdf
26. Chávez-Rios, R., Arias-Romero, L. E., Almaraz-Barrera, M. de J., Hernández-Rivas, R., Guillén, N., & Vargas, M. (2003). L10 ribosomal protein from *Entamoeba histolytica* share structural and functional homologies with QM/Jif-1: proteins with extraribosomal functions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(2), 151-160. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00332-8](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00332-8)
27. Cheng, X. J., Hughes, M. A., Huston, C. D., Loftus, B., Gilchrist, C. A., Lockhart, L. A., Ghosh, S., Miller-Sims, V., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr, & Tachibana, H. (2001). Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infection and immunity*, 69(9), 5892-5898. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5892-5898.2001>
28. Chen, Y., Cao, F., Wan, B., Dou, Y., & Lei, M. (2012). Structure of the SPRY domain of human Ash2L and its interactions with RbBP5 and DPY30. *Cell research*, 22(3), 598-602. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.9>
29. Clark, C. G., Alsmark, U. C. M., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noël, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., ... Hall, N. (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *En Advances in Parasitology Volume 65* (pp. 51-190). Elsevier.
30. Da, G., Lenkart, J., Zhao, K., Shiekhattar, R., Cairns, B. R., & Marmorstein, R. (2006). Structure and function of the SWIRM domain, a conserved protein module found in chromatin regulatory complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*



- the United States of America, 103(7), 2057–2062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510949103>
31. de Dios-Bravo, G., Luna-Arias, J. P., Riverón, A. M., Olivares-Trejo, J. J., López-Camarillo, C., & Orozco, E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants *in vitro*. *The FEBS Journal*, 272(6), 1354–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04566.x>
 32. de la Cruz, O. H., Muñoz-Lino, M., Guillén, N., Weber, C., Marchat, L. A., López-Rosas, I., Ruíz-García, E., Astudillo-de la Vega, H., Fuentes-Mera, L., Álvarez-Sánchez, E., Mendoza-Hernández, G., & López-Camarillo, C. (2014). Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*. *Journal of proteomics*, 111, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.041>
 33. Derynck, R., & Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science Signaling*, 12(570). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav5183>
 34. Diamond, L. S., & Clark, C. G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 19251. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(3), 340–344. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04926.x>
 35. Díaz-Hernández, M., Javier-Reyna, R., Sotto-Ortega, I., García-Rivera, G., Montaña, S., Betanzos, A., Zanatta, D., & Orozco, E. (2021). Protein SUMOylation is crucial for phagocytosis in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5709. <https://doi.org/10.3390/ijms22115709>
 36. Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40, 169–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
 37. Dubik, M., Pilecki, B., & Moeller, J. B. (2022). Commensal intestinal protozoa – underestimated members of the gut microbial community. *Biology*, 11(12), 1742. <https://doi.org/10.3390/biology11121742>
 38. DuPont, H. L., & Pickering, L. K. (1980). Amebiasis. En *Infections of the Gastrointestinal Tract* (pp. 21–46). Springer US.
 39. D'Cruz, A. A., Babon, J. J., Norton, R. S., Nicola, N. A., & Nicholson, S. E. (2013). Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/pro.2185>
 40. Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 11(6), 898–910. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01300.x>
 41. El-Dib, N. A., & Khater, M. M. (2022). *Entamoeba*. En *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 492–512). Elsevier.
 42. Espinosa-Cantellano, M., & Martínez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 318–331. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.318>
 43. Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, 11(6), 898–910. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01300.x>
 44. Fukuzawa, M., Zhukovskaya, N. V., Yamada, Y., Araki, T., & Williams, J. G. (2006). Regulation of *Dictyostelium* prestalk-specific gene expression by a SHAQKY family MYB transcription factor. *Development (Cambridge, England)*, 133(9), 1715–1724. <https://doi.org/10.1242/dev.02327>
 45. Gaudet, P., Logie, C., Lovering, R. C., Kuiper, M., Lægreid, A., & Thomas, P. D. (2021). Gene Ontology representation for transcription factor functions. *Biochimica et*



- Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms, 1864(11-12), 194752. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2021.194752>
46. Gebauer, F., & Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(10), 827-835. <https://doi.org/10.1038/nrm1488>
 47. Gilchrist, C. A., Holm, C. F., Hughes, M. A., Schaenman, J. M., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *The Journal of biological chemistry*, 276(15), 11838-11843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007375200>
 48. Gilchrist, C. A., Baba, D. J., Zhang, Y., Crasta, O., Evans, C., Caler, E., Sobral, B. W., Bousquet, C. B., Leo, M., Hochreiter, A., Connell, S. K., Mann, B. J., & Petri, W. A. (2008). Targets of the *Entamoeba histolytica* transcription factor URE3-BP. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(8), e282. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000282>
 49. Hernández de la Cruz, O., Marchat, L. A., Guillén, N., Weber, C., López Rosas, I., Díaz-Chávez, J., Herrera, L., Rojo-Domínguez, A., Orozco, E., & López-Camarillo, C. (2016). Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*. *Scientific reports*, 6, 19611. <https://doi.org/10.1038/srep19611>
 50. Hopfner, K.-P., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P., & Tainer, J. A. (2000). Structural biology of Rad50 ATPase. *Cell*, 101(7), 789-800. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80890-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80890-9)
 51. Huerta, M., Reyes, L., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Betanzos, A., Díaz-Hernández, M., Galindo, A., Bolaños, J., Cárdenas, H., Azuara-Liceaga, E., Chávez-Munguía, B., & Orozco, E. (2020). A noncanonical GATA transcription factor of *Entamoeba histolytica* modulates genes involved in phagocytosis. *Molecular microbiology*, 114(6), 1019-1037. <https://doi.org/10.1111/mmi.14592>
 52. Huby, R. D., Dearman, R. J., & Kimber, I. (2000). Why are some proteins allergens?. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 55(2), 235-246. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.2.235>
 53. Izban, M. G., & Luse, D. S. (1992). Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *The journal of biological chemistry*, 267(19). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1618865/>
 54. Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S. K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., & Bansal, K. C. (2012). Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-544>
 55. Karin, M., & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology: CB*, 5(7), 747-757. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00151-5)
 56. Kaur, D., Agrahari, M., Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2022). The non-LTR retrotransposons of *Entamoeba histolytica*: genomic organization and biology. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 297(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01843-5>
 57. Kim, S., Jeon, T. J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J. J., & Bowie, J. U. (2005). Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14278-14283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501234102>
 58. Leber, A. L., & Novak-Weekley, S. (2011). Intestinal and Urogenital Amebae, Flagellates, and Ciliates. En *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 2149-2171). Wiley. <https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch137>



59. Lioutas, C., & Tannich, E. (1995). Transcription of protein-coding genes in *Entamoeba histolytica* is insensitive to high concentrations of α -amanitin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73(1-2), 259-261. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00101-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00101-6)
60. Liu, F., Lei, W., O'Rourke, J. P., & Ness, S. A. (2006). Oncogenic mutations cause dramatic, qualitative changes in the transcriptional activity of c-Myb. *Oncogene*, 25(5), 795-805. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209105>
61. Lim, P. S., Sutton, C. R., & Rao, S. (2015). Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. *Immunology*, 146(4), 508-522. <https://doi.org/10.1111/imm.12510>
62. Liu, Y., Li, P., Fan, L., & Wu, M. (2018). The nuclear transportation routes of membrane-bound transcription factors. *Cell communication and signaling : CCS*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0224-3>
63. Lorenzi, H. A., Puiu, D., Miller, J. R., Brinkac, L. M., Amedeo, P., Hall, N., & Caler, E. V. (2010). New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(6), e716. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000716>
64. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., ... Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433(7028), 865-868. <https://doi.org/10.1038/nature03291>
65. Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, J. E., Jr, & Shenk, T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23), 8306-8310. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8306>
66. Lynch, M. (2013). Evolutionary diversification of the multimeric states of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.1310980110>
67. Marquay Markiewicz, J., Syan, S., Hon, C.-C., Weber, C., Faust, D., & Guillen, N. (2011). A proteomic and cellular analysis of uropods in the pathogen *Entamoeba histolytica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e1002. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001002>
68. Marion, S., Tavares, P., Arhets, P., & Guillén, N. (2004). Signal transduction through the Gal-GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 135(1), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.012>
69. Manna, D., Lozano-Amado, D., Ehrenkauf, G., & Singh, U. (2020). The NAD⁺ Responsive Transcription Factor ERM-BP Functions Downstream of Cellular Aggregation and Is an Early Regulator of Development and Heat Shock Response in *Entamoeba*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 363. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00363>
70. Mendoza, L., Orozco, E., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., García, E., & Gariglio, P. (2003). Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology (Reading, England)*, 149(4), 885-893. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25892-0>
71. Montes, A. M. S., Rodríguez, A. S. S., & Borunda, J. A. (s/f). Regulación de la expresión génica. En *McGraw Hill Medical*.
72. Molvaersmyr, A. K., Saether, T., Gilfillan, S., Lorenzo, P. I., Kvaløy, H., Matre, V., & Gabrielsen, O. S. (2010). A SUMO-regulated activation function controls synergy of c-Myb through a repressor-activator switch leading to differential p300 recruitment. *Nucleic acids research*, 38(15), 4970-4984. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq245>



73. McGrath, K. A., & Blachford, S. (2001). *The gale encyclopedia of science* (2nd ed). Gale Group.
74. Nagwa. (s/f). *Lesson explainer: Transcription*. Nagwa.com. Recuperado el 24 de noviembre de 2023, de <https://www.nagwa.com/en/explainers/918139172415/>
75. Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2001). Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*, 1(6), 735–747. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200106\)1:6<735::AID-PROT735>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200106)1:6<735::AID-PROT735>3.0.CO;2-8)
76. Nestler, E. J., & Greengard, P. (1999). *Protein Serine-Threonine Phosphatases*. Lippincott-Raven
77. Nishizuka Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* (New York, N.Y.), 233(4761), 305–312. <https://doi.org/10.1126/science.3014651>
78. Novati, S., Sironi, M., Granata, S., Bruno, A., Gatti, S., Scaglia, M., & Bandi, C. (1996). Direct sequencing of the PCR amplified SSU rRNA gene of *Entamoeba dispar* and the design of primers for rapid differentiation from *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, 112(4), 363–369. <https://doi.org/10.1017/s0031182000066592>
79. Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., & Nishimura, Y. (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, 79(4), 639–648. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90549-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90549-5)
80. O’Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
81. Pao, P.-C., & Tsai, L.-H. (2021). Three decades of Cdk5. *Journal of Biomedical Science*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00774-y>
82. Pan, M.-R., Hsu, M.-C., Chen, L.-T., & Hung, W.-C. (2018). Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(2), 209–223. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2596-8>
83. Pearson, R. J., & Singh, U. (2010). Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation: *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cellular Microbiology*, 12(12), 1681–1690. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01524.x>
84. Petri, W. A., Chapman, Snodgrass, T., Mann, B. J., Broman, J., & Ravdin, J. I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *The journal of biological chemistry*, 264(5). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2536731/>
85. Peter, M., Le Peuch, C., Labbé, J. C., Meyer, A. N., Donoghue, D. J., & Dorée, M. (2002). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO reports*, 3(6), 551–556. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf111>
86. Prouse, M. B., & Campbell, M. M. (2012). The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.010>
87. Quincke HI, Roos E. Ueber amoeben-enteritis. *Wien Med Wchnschr* 1893; 30: 1089-1094.
88. Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., & Dwek, R. A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science* (New York, N.Y.), 291(5512), 2370–2376. <https://doi.org/10.1126/science.291.5512.2370>
89. Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2021, baab012. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
90. Samee, M. A. H. (2023). Noncanonical binding of transcription factors: time to revisit specificity? *Molecular Biology of the Cell*, 34(9). <https://doi.org/10.1091/mbc.e22-08-0325>



91. Saikumar, P., Murali, R., & Reddy, E. P. (1990). Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8452–8456. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8452>
92. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., & Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the Enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49497–49507. <https://doi.org/10.1074/jbc.m403987200>
93. Santos, H. J., & Nozaki, T. (2022). The mitosome of the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*: A peculiar and minimalist mitochondrion-related organelle. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69(6). <https://doi.org/10.1111/jeu.12923>
94. Santiago, A., Carbajal, M. E., Benítez-King, G., & Meza, I. (1994). *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Experimental parasitology*, 79(3), 436–444. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1105>
95. Seydel, K. B., Li, E., Swanson, P. E., & Stanley, S. L., Jr. (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infection and Immunity*, 65(5), 1631–1639. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1631-1639.1997>
96. Singh, U., & Rogers, J. B. (1998). The novel core promoter element GAAC in the hgl5 gene of *Entamoeba histolytica* is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21663–21668. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21663>
97. Sumimoto, H., Ohkuma, Y., Sinn, E., Kato, H., Shimasaki, S., Horikoshi, M., & Roeder, R. G. (1991). Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature*, 354(6352), 401–404. <https://doi.org/10.1038/354401a0>
98. Shen, Y., Sherman, J. W., Chen, X., & Wang, R. (2018). Phosphorylation of CDC25C by AMP-activated protein kinase mediates a metabolic checkpoint during cell-cycle G2/M-phase transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5185–5199. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.001379>
99. Shirley, D.-A. T., Farr, L., Watanabe, K., & Moonah, S. (2018). A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7), ofy161. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>
100. Stanley, S. L., Jr, Zhang, T., Rubin, D., & Li, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity*, 63(4), 1587–1590. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1587-1590.1995>
101. Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U., & Silver, P. A. (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. *Molecular Biology of the Cell*, 11(11), 3777–3789. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3777>
102. Svitkina T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(1), a018267. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>
103. (S/f) Post-translational modifications. (2021, enero 16). Azure Biosystems. <https://azurebiosystems.com/western-blotting-applications/post-translational-modifications/>
104. Tillack, M., Nowak, N., Lotter, H., Bracha, R., Mirelman, D., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2006). Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.04.009>



105. van Nuland, R., & Gozani, O. (2016). Histone H4 Lysine 20 (H4K20) Methylation, Expanding the Signaling Potential of the Proteome One Methyl Moiety at a Time. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 15(3), 755–764. <https://doi.org/10.1074/mcp.R115.054742>
106. Verma, K., Srivastava, V. K., & Datta, S. (2020). Rab GTPases take centre stage in understanding *Entamoeba histolytica* biology. *Small GTPases*, 11(5), 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>
107. Wang, D., & Farhana, A. (2023). *Biochemistry, RNA Structure*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644425/>
108. Wang, Z. Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M. S., & Tobin, E. M. (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *The Plant Cell*, 9(4), 491–507. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.491>
109. Walker EL, Sellards AW. Experimental entamoebic dysentery. *Philipp J Sci* 1913; 8:253-331.
110. Webb, A. E., & Brunet, A. (2014). FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.003>
111. Weidemüller, P., Kholmatov, M., Petsalaki, E., & Zaugg, J. B. (2021). Transcription factors: Bridge between cell signaling and gene regulation. *Proteomics*, 21(23–24). <https://doi.org/10.1002/pmic.202000034>
112. Weikel, C. S., Murphy, C. F., Orozco, E., & Ravdin, J. I. (1988). Phorbol esters specifically enhance the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, 56(6), 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/iai.56.6.1485-1491.1988>
113. Weber, C., Guigon, G., Bouchier, C., Frangeul, L., Moreira, S., Sismeiro, O., Gouyette, C., Mirelman, D., Coppee, J. Y., & Guillén, N. (2006). Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell*, 5(5), 871–875. <https://doi.org/10.1128/EC.5.5.871-875.2006>
114. Yeo, M., Lin, P. S., Dahmus, M. E., & Gill, G. N. (2003). A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates Serine 5. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 26078–26085. <https://doi.org/10.1074/jbc.m301791200>
115. Yoshioka, S., Taniguchi, F., Miura, K., Inoue, T., Yamano, T., & Fukuzawa, H. (2004). The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene *Cah1*, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii* [W]. *The Plant Cell*, 16(6), 1466–1477. <https://doi.org/10.1105/tpc.021162>
116. Young, R. A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144(6), 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>
117. Zarubin, T., & Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 15(1), 11–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290257>
118. Zhou, Y. (2011). Myb proteins: angels and demons in normal and transformed cells. *Frontiers in Bioscience*, 16(1), 1109. <https://doi.org/10.2741/3738>

