

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“El factor de transcripción EhGATA en la regulación de la
expresión de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* y sus efectos
en la virulencia de *Entamoeba histolytica*”**

TESIS

Que presenta:

L. C. G. Luz Virginia Reyes González

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directoras de tesis

**Dra. María Esther Orozco Orozco
Dra. Cecilia Bañuelos Barrón**

Asesoras de tesis

**Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano
Dra. Abigail Betanzos Fernández**

Ciudad de México

septiembre de 2020

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco y de la Dra. Cecilia Bañuelos Barrón, en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular de CINVESTAV-IPN.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de una beca (CVU 926106 y matrícula 181220012) para realizar los estudios de Maestría.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas, me permito expresar mis más sinceros y profundos agradecimientos a todas aquellas personas que con su apoyo facultaron la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Ma. Esther Orozco Orozco, por su confianza hacia mi trabajo y la gran oportunidad que me brindó para poder desarrollarme como una mujer científica. También le agradezco sobre todo por su dedicación, motivación y por ser un gran ejemplo de lo que es uno capaz de lograr con esfuerzo y pasión.

Agradezco enormemente a la Dra. Cecilia Bañuelos Barrón por enseñarme y dedicarme su valioso tiempo durante el desarrollo de este trabajo, así como su seguimiento y supervisión constante y consejos certeros para concluir este proyecto.

Le doy gracias a la Dra. Guillermina García Rivera por su gran apoyo y valiosa compañía e interesarse en este proyecto y a la Dra. Miriam Huerta Pérez por su valiosa enseñanza y por confiar en mí, sin ustedes no lo hubiera logrado.

También agradezco a mis asesoras las doctoras Ana Lorena Gutiérrez Escolano y Abigail Betanzos Fernández por su disposición y aportes a este trabajo, además, por haberme enseñado muchas cosas en el ámbito académico y de la vida.

A Tomás Sánchez, a la Dra. Rosario Javier Reyna y Alejandrina que son parte importante en este trabajo, por brindarme los materiales de laboratorio y por su actitud siempre positiva hacia mí, y su ayuda durante este periodo en la maestría.

Quisiera agradecer la amistad de mis compañeros de laboratorio que me apoyaron y me dieron momentos gratos.

Agradezco a mi esposo y a mi grandiosa familia por toda su ayuda, comprensión y paciencia y darme ánimos para seguir mis sueños.

A mi hijo Leonardo

Te dedico este trabajo, ya que llegaste a mi vida dándome razones para salir adelante y porque sé que cuando seas grande te darás cuenta de que tu madre no se rindió a pesar de las adversidades, de que espero que tú también nunca te rindas por alcanzar tus sueños y que fuiste la causa que me motivó a luchar y concluir este proyecto

Te amo

CONTENIDO

Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
<i>Abstract</i>	12
Introducción	
Generalidades de la amibiasis.....	13
Epidemiología de la amibiasis.....	13
<i>Entamoeba histolytica</i>	14
Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	15
Patogénesis de <i>E. histolytica</i>	16
Transcripción en eucariotas.....	23
Factores de transcripción.....	28
Principales familias de factores de transcripción.....	30
Regulación de la transcripción en eucariotas.....	32
Antecedentes directos	
Regulación de la expresión génica en <i>Entamoeba histolytica</i>	35
Factores de transcripción GATA en eucariotas.....	39
Factor de transcripción EhGATA en <i>Entamoeba histolytica</i>	41
Justificación	50
Hipótesis	51
Objetivos	52
Objetivo general.....	52
Objetivos particulares.....	52

Estrategia experimental	53
Materiales y métodos	54
- Análisis <i>in silico</i>	54
- Cultivos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	54
- Diseño de oligonucleótidos.....	54
- Inmunoprecipitación de la cromatina y PCR cuantitativa en tiempo real (ChIP-qPCR).....	56
- Intento de de silenciamiento del gen <i>Ehgata</i>	57
- Transformación de células competentes.....	59
- Extracción de plásmidos (método lisis-alcalina).....	59
- Sobreexpresión del factor de transcripción EhGATA.....	60
- Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	61
- Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	61
- Ensayo de Western blot.....	61
- Ensayos de Inmunofluorescencia.....	62
- Curva de crecimiento.....	63
- Obtención de eritrocitos humanos.....	62
- Ensayos de eritrofagocitosis y adhesión.....	64
- Tinción de Novikoff.....	64
- Extracción de RNA total de amiba.....	65
- qRT-PCR.....	65
- Análisis estadístico.....	66
Resultados	67
- Caracterización <i>in silico</i> de las regiones promotoras de los genes <i>Ehvps32</i> y <i>Ehadh</i> de <i>E. histolytica</i>	67
- Unión de EhGATA a secuencias consenso presentes en los promotores <i>Ehvps32</i> y <i>Ehadh</i>	69

- Intento de silenciamiento del gen <i>Ehgata</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	73
- Sobreexpresión de la proteína EhGATA en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	74
- Localización de EhGATA en trofozoítos que sobreexpresan esta proteína.....	77
- Efecto de la sobreexpresión de EhGATA en la proliferación de los trofozoítos.....	79
- Propiedades de virulencia de los trofozoítos NeoGATA: Adhesión y fagocitosis.....	80
- Niveles de expresión de EhADH y EhVps32 en los trofozoítos NeoGATA.....	82
Discusión	86
Conclusiones	94
Perspectivas	95
Bibliografía	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas biológicas de <i>E. histolytica</i>	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	16
Figura 3. Esquema de un promotor eucariota.....	28
Figura 4. Análisis <i>in silico</i> y filogenético de EhGATA.....	42
Figura 5. Análisis de la estructura tridimensional de EhGATA.....	43
Figura 6. Expresión y localización celular de EhGATA en <i>E. histolytica</i>	45
Figura 7. Unión específica de EhGATA al DNA.....	46
Figura 8. Predicción de genes diana putativos que contienen secuencias consenso de unión para proteínas GATA.....	47
Figura 9. Estrategia experimental.....	53
Figura 10. Estructura de la región promotora de los genes <i>Ehvps32</i> y <i>Ehadh</i>	69
Figura 11. Esquema de los sitios de amplificación de las regiones promotoras de <i>Ehvps32</i> y <i>Ehadh</i>	71
Figura 12. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en combinación con experimentos de PCR en tiempo real (ChIP-qPCR).....	72
Figura 13. Intento de silenciamiento de <i>Ehgata</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	73
Figura 14. Análisis de la integridad de los plásmidos pNeo y pNeo <i>Ehgata</i>	75
Figura 15. Determinación de los niveles de expresión de la proteína EhGATA en los trofozoítos Neo y NeoGATA.....	77

Figura 16. Localización celular de EhGATA en los trofozoítos	
Neo y NeoGATA.....	78
Figura 17. Curvas de crecimiento de los trofozoítos Neo y NeoGATA.....	79
Figura 18. Eficiencias de adhesión y eritrofagocitosis en los trofozoítos	
Neo y NeoGATA.....	81
Figura 19. Expresión de EhADH y EhVps32 en los trofozoítos	
Neo y NeoGATA.....	85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias consenso para factores de transcripción	
en <i>E. histolytica</i>	38
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para las	
regiones promotoras de <i>Ehvps32</i> y <i>Ehadh</i>	55

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ChIP	Del inglés <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
DAPI	Diclorohidrato de 4', 6-diamidino-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAC	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácetico
ESCRT	Del inglés Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Fig	Figura
FT	Factor de transcripción
h	Hora
H3	Histona 3
Input	Cromatina no inmunoprecipitada
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PIPES	Piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNA _n s	RNA nuclear pequeño
RNA _{pol}	RNA polimerasa
RNA _r	RNA ribosomal
RNA _t	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SDS	Duodecilsulfato sódico
SP	Suero pre-inmune
TA	Temperatura ambiente
U/ml	Unidades por mililitro
µl	Microlitros

RESUMEN

La amibiasis, infección en los humanos causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*, constituye la tercera causa de muerte producida por parásitos a nivel mundial. Como en otros microorganismos eucariotas, la regulación génica a nivel transcripcional es un evento crítico para la expresión de algunos factores de virulencia que le permiten a la amiba invadir a su hospedero. Recientemente, se identificó que *E. histolytica* posee un gen que codifica para un factor de transcripción de la familia de proteínas GATA (EhGATA). En este trabajo, se amplió la caracterización funcional de la proteína EhGATA mediante el estudio del fenotipo y las propiedades de virulencia de una población de amibas que sobreexpresan esta proteína. También, se identificaron *in silico*, posibles secuencias de reconocimiento y unión a EhGATA presentes en el genoma de la amiba y se demostró que EhGATA se une a las regiones promotoras de los genes *Ehadh* y *Ehvps32*, cuyos productos se relacionan con la fagocitosis. En conjunto, nuestros resultados señalan que la proteína EhGATA regula la expresión de genes asociados con la fagocitosis y posiblemente, de otros genes esenciales para *E. histolytica*.

ABSTRACT

Amoebiasis, the infection in humans caused by the protozoan *E. histolytica*, is the third leading cause of death by parasites worldwide. As in other eukaryotic microorganisms, transcriptional gene regulation is a critical event for the expression of some virulence factors that allow trophozoites to invade its host. Recently, *E. histolytica* was identified as possessing a gene that encodes for a transcription factor of the GATA protein family (EhGATA). In this work, the functional characterization of the EhGATA protein was expanded by studying the phenotype and virulence properties of a population of trophozoites overexpressing this protein. Also, we identified *in silico*, possible sequences of recognition and binding to EhGATA present in the *E. histolytica* genome, and it was shown that EhGATA joins the regions promoting the *Ehadh* and *Ehvps32* genes, whose products are related to phagocytosis. Taken together, our results indicate that the EhGATA protein regulates the expression of genes associated with phagocytosis, and possibly other genes essential to *E. histolytica*.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la amibiasis

La amibiasis es una infección en el ser humano causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Este parásito puede vivir en el intestino grueso (colon) sin causar ningún daño, pero en ocasiones puede provocar diarrea, colitis o disentería aguda. Se estima que alrededor de 50 millones de personas al año se infectan con este parásito (Olivos et al., 2011). La infección se adquiere por la ingesta de alimentos o agua contaminados, aunque también es posible que se transmita de persona a persona por contacto bucal o rectal de un paciente infectado (Olivos et al., 2011). Una de las mayores complicaciones de la amibiasis es el absceso hepático, resultado de la diseminación del parásito al hígado; si bien *E. histolytica* también puede alcanzar pulmones y cerebro (Zaragozano et al., 2000).

Los síntomas clínicos de la amibiasis son náuseas, diarrea (heces blandas con moco y ocasionalmente con sangre), pérdida de peso, dolor abdominal, fiebre, vómito y gases excesivos o dolor rectal al defecar (Olivos et al., 2011).

Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis tiene una amplia dispersión mundial y una alta prevalencia, además, es una infección que se encuentra sobrestimada, en cuanto al número de personas infectadas, ya que es frecuente que en lugar de *E. histolytica*, se detecten en las heces otras amibas de especies no patógenas, como *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*. Se calcula que el 10% de la población mundial está infectada por la dupla *E. histolytica/E. dispar*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ocurren 500 millones de nuevas infecciones por año, y aproximadamente, 70 mil a 100 mil muertes a causa de esta enfermedad (Trejos et

al., 2009). África es la región del mundo más afectada por esta infección. En América Latina la amibiasis es endémica, fundamentalmente en México, Brasil y Ecuador. En México, la tasa de incidencia de la amibiasis intestinal entre 2016 y 2017 fue de 220 mil 361 casos (Ángulo, 2018).

Entamoeba histolytica

E. histolytica es un organismo unicelular con ciclo de vida bifásico, es decir, presenta dos etapas biológicas, en las cuales su morfología es diferente: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto (Fig.1 A), que habita, se nutre y multiplica dentro del intestino del hospedero es capaz de destruir cualquier tipo de célula y casi cualquier tejido (Chávez et al., 2013). El trofozoíto mide entre 20 y 40 micrómetros y es pleomórfico, es decir, cambia de forma continuamente debido a la fluidez de su citoplasma. Este dinamismo, le permiten moverse y desplazarse eficientemente sobre cualquier superficie formando proyecciones del citoplasma llamadas pseudópodos, que además son determinantes para su nutrición (Chávez et al., 2013).

Los pseudópodos participan en la captura del alimento mediante el mecanismo celular conocido como fagocitosis, en el cual se produce la ingesta de desechos, bacterias y otros componentes grandes. Estos productos entran a la célula cuando la membrana produce una invaginación, generando una vesícula llamada fagosoma, que contiene enzimas hidrolíticas. Existe otro mecanismo donde no es necesaria la formación de los pseudópodos, pero si es importante para el desarrollo y la captura de nutrientes para la amiba y se conoce como pinocitosis. En este caso se ingiere fluido extracelular que contiene moléculas, el cual entra a la célula dentro de una vesícula, sin mezclarse con el citoplasma (Alberts, 2004).

Los trofozoítos presentan un núcleo esférico que mide de 4 a 7 micrómetros de diámetro. En cultivo, que es la forma en la que se mantienen los trofozoítos en el laboratorio para fines de investigación, este parásito tiene dos o más núcleos; sin embargo, la mayor parte de las veces, en condiciones normales, los trofozoítos únicamente tienen un núcleo (Chávez et al., 2013). Por su parte, el citoplasma del

trofozoíto presenta numerosas vacuolas, que están limitadas por una membrana. Éstas llevan a cabo funciones específicas durante los eventos de pinocitosis y fagocitosis, así como en la fusión de vacuolas (Avalos et al., 2015).

El quiste (Fig.1 B), que es la forma resistente del parásito contra el ambiente externo, es responsable de iniciar la infección en nuevos hospederos cuando los quistes son ingeridos al consumir agua o alimentos contaminados (Trejos et al., 2009). En el citoplasma del quiste se presentan de uno a cuatro núcleos, dependiendo de su estado de madurez; sin embargo, hay pocos estudios sobre el proceso de enquistamiento de la amiba, ya que no se ha podido cultivar esta fase *in vitro*, limitando así su estudio (Chacín, 2013).

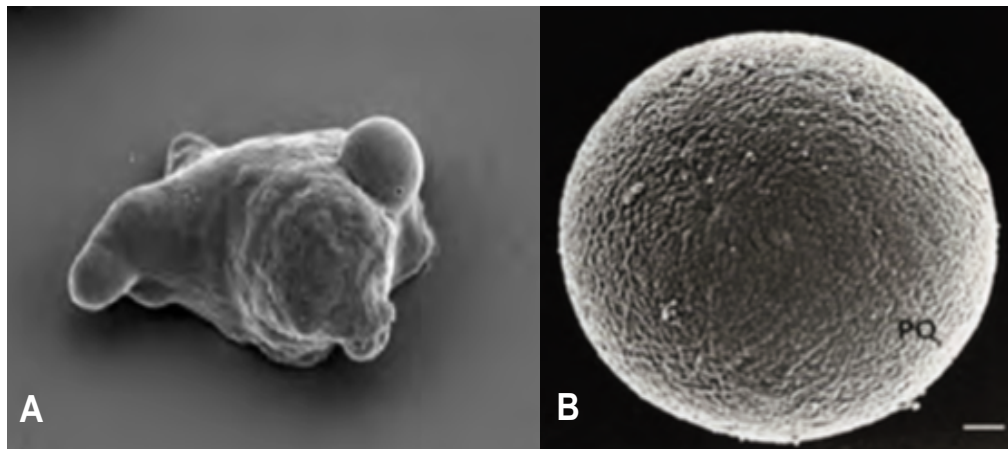


Figura 1. Etapas biológicas de *E. histolytica*. Micrografías de A) Trofozoíto y B) Quiste [Tomado y modificado de Chávez et al., 2013].

Ciclo de vida de *E. histolytica*

La parasitosis se adquiere al ingerir los quistes, que corresponden a la fase infectiva de *E. histolytica* para el ser humano. Cuando el quiste es ingerido, viaja por el aparato digestivo y llega al íleon, donde desenquista y se convierte en un protoplasto desnudo tetranucleado, que va a dar lugar a la formación de ocho trofozoítos metaquísticos; éstos migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal, donde son capaces de producir desde síntomas leves hasta disentería grave. Cuando el trofozoíto invade el epitelio intestinal, puede diseminarse a través del torrente sanguíneo, originando lesiones extraintestinales, principalmente en el

hígado y con menos frecuencia, en pulmón, cerebro, órganos genitales, bazo y riñón (Campos et al., 2011). Alternativamente, bajo condiciones que aún se desconocen, los trofozoítos se enquistan, salen al medio externo con las heces y así pueden contaminar el agua o los alimentos, ampliando el alcance de la infección a otros individuos y completando así su ciclo de vida (Melgoza, 2018) (Fig. 2).

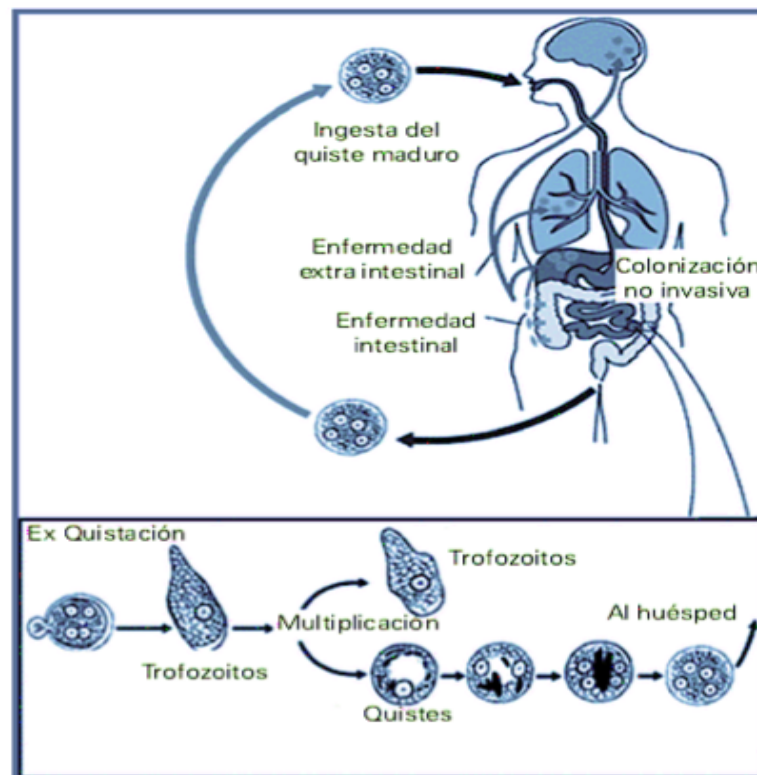


Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica* [Tomado y modificado de Campos et al., 2011].

Patogénesis de *E. histolytica*

La virulencia de *E. histolytica* es intrínseca y depende de la capacidad infecciosa (colonización del intestino) y la capacidad invasiva (diseminación y destrucción de tejidos del hospedero). De hecho, este parásito se caracteriza por su extraordinaria capacidad de invadir y destruir los tejidos del hospedero (Trejos et al., 2009). El mecanismo patogénico de *E. histolytica* sobre su célula blanco, se divide

principalmente en tres etapas: adhesión, citólisis y fagocitosis (Martínez et al., 1985; Ravdin, 1986).

Adhesión

La adhesión es el primer evento que se requiere para dar inicio a la invasión intestinal por los trofozoítos de *E. histolytica*. Consiste en el contacto y la unión a las células blanco. Para llevar a cabo este mecanismo específico se requieren moléculas de superficie del parásito llamadas adhesinas y receptores presentes en las células blanco (Ravdin et al., 1986). Algunas moléculas de *E. histolytica* involucradas en el contacto inicial con la célula blanco, incluyen a las lectinas Gal/GalNAc (Petri et al., 1987), una proteína de superficie celular de 220 kDa (Rosales et al., 1987), el complejo EhCPADH de 124 kDa (García et al., 1999), una proteína rica en lisina y ácido glutámico (KERP1) (Jurillo et al., 2011), la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFO) (Pineda et al., 2010) y la proteína romboide de *E. histolytica* (EhROM1) (Baxt et al., 2010).

De las proteínas que participan en la adhesión, las lectinas, que se localizan en la membrana plasmática de la amiba, son mediadoras importantes en el contacto del parásito a células epiteliales, eritrocitos y neutrófilos, componentes de la matriz extracelular (MEC), entre otros (Rodríguez et al., 1989). Además, las lectinas participan en la histólisis y la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero, a través de la unión a factores del complemento (Braga et al., 1992).

La lectina Gal/GalNAc interactúa con las glicoproteínas presentes en la membrana de las células del hospedero a través del motivo CRD (Petri et al., 2000) que, curiosamente, presenta similitud en secuencia con regiones del extremo citoplasmático de la integrina beta-2 del hospedero (Vines et al., 1998). Un análisis transcriptómico utilizando trofozoítos de *E. histolytica* confirmó recientemente la participación de esta lectina en la adhesión y otros eventos relacionados con la virulencia del parásito (Naiyer et al., 2019).

La proteína de superficie celular de 220 kDa, rica en residuos hidrofóbicos, interacciona con ácido hialurónico, quitina, N-acetil-galactosamina y galactosa (Rosales et al., 1987). Además, participa en la adhesión de los trofozoítos a células epiteliales de riñón canino (MDCK, por sus siglas *Madin-Darby Canine Kidney*) y a eritrocitos (Rosales et al., 1987; Meza et al., 1987).

Las proteínas EhADH y EhCP112 forman parte del complejo inmunogénico EhCPADH, que se localiza en la membrana plasmática y en las vacuolas citoplasmáticas de *E. histolytica* (García et al., 1999). La producción de anticuerpos monoclonales contra el complejo EhCPADH disminuye la capacidad de los trofozoítos para adherirse a células epiteliales y eritrocitos (García et al., 1999). Particularmente, es en la proteína EhADH donde reside la función de adhesión, razón por la cual se le adjudicó la propiedad de adhesina. Esta proteína contiene un dominio Bro1 localizado en el extremo amino, característico de los miembros de la familia de proteínas ALIX; y un epítipo de adherencia en el extremo carboxilo, que es reconocido por los anticuerpos monoclonales que inhiben la adhesión de *E. histolytica* (Bañuelos et al., 2012). Un estudio donde utilizaron células MDCK para expresar ectópicamente EhADH, mostró que estas células se agregaron y se adhirieron a eritrocitos, debido a las propiedades conferidas de esta adhesina de la amiba (Betanzos et al., 2018). Trofozoítos de *E. histolytica* silenciados en la expresión de *Ehadh* y *Ehcp112*, mostraron una reducción del 65% y 75% de la adhesión, respectivamente, en células del hospedero (Ocádiz et al., 2016). Además, las proteínas recombinantes EhADH y EhCP112 se unen a ciertas proteínas de las uniones intercelulares de células epiteliales y a eritrocitos (Betanzos et al., 2018; Cuellar et al., 2017).

EhROM1 es una serina proteasa (SP) intramembranal, que juega un papel en la proteólisis de proteínas transmembranales. Los trofozoítos silenciados en la expresión de *Ehrom1*, mediante mecanismos epigenéticos, disminuyen la adhesión a células de ovario de hámster chino (CHO) (Baxt et al., 2010). Además, EhROM1 escinde la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNAc, lo que sugiere que existe

un mecanismo de regulación de las lectinas por las SP de *E. histolytica*, durante el contacto con la célula blanco (Betanzos et al., 2019).

Por su parte, KERP1 es una proteína rica en estructuras alfa-helicoidales, organizada como trímero, y se ha demostrado su participación en eventos de adhesión de trofozoítos a células de adenocarcinoma colorrectal de humano (Caco-2) (Seigneur et al., 2005; Perdomo et al., 2013).

Finalmente, la proteína piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO), es una enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato, transfiriendo electrones a la ferredoxina. Esta enzima promueve la activación citotóxica del metronidazol, el fármaco utilizado en el tratamiento contra la amibiasis (Rodríguez et al., 1998). Curiosamente, KERP1 y PFO se localizan en la membrana plasmática de los trofozoítos que se encuentran adheridos a las células Caco-2, próximas al espacio intercelular (Perdomo et al., 2013; Rodríguez et al., 1998).

Citólisis

La citólisis se lleva a cabo cuando el trofozoíto entra en contacto con la célula blanco y ocurre la histólisis; este mecanismo es muy característico de *E. histolytica* (a él debe su nombre), dada su capacidad de destruir los tejidos del hospedero. La citólisis está mediada principalmente por dos tipos de moléculas: las cisteína proteasas (CP) y los péptidos formadores de poros, llamados amebaporos (Keene et al., 1990).

E. histolytica contiene aproximadamente 80 genes que codifican para CP (AmoebaDB, 2020); sin embargo, son pocas las proteínas que se han caracterizado, ya que son difíciles de expresar *in vitro* (Bruchhaus et al., 2003). A la fecha, se han descrito 20 proteínas diferentes (EhCP1-EhCP19 y EhCP112). EhCP1 escinde colágeno, el factor del complemento C3 y C5, IgG, pro-IL-8, pro-IL-1 β y villina (Serrano et al., 2013). EhCP2 degrada colágeno, IgA, IgG, quimiocinas (CCL2, CCL13 y CXCL8), C3 y pro-IL18 (Pertuz et al., 2004). EhCP5 posee

actividad proteolítica sobre mucina, colágeno, IgA, pro-IL-18, hemoglobina, fibrinógeno, albúmina de suero bovino (BSA) y metaloproteasa de matriz humana 3 (MMP3) (Betanzos et al., 2019; Thibeaux et al., 2014).

EhCP1, EhCP2 y EhCP5 son las enzimas responsables de al menos el 90% de la actividad proteolítica de este parásito, y se localizan dentro de las vacuolas digestivas (Bruchhaus et al., 2003; Singh et al., 2004). Además, EhCP5 y EhCP112 se encuentran presentes en la superficie del trofozoíto. Particularmente, la EhCP112 es una molécula capaz de romper monocapas celulares, degradar proteínas de la matriz extracelular, como hemoglobina, y es secretada por los trofozoítos (Ocádiz et al., 2005).

El silenciamiento de los genes *Ehcp112* o *Ehadh* en trofozoítos reduce significativamente el efecto citopático del parásito sobre las células epiteliales (Ocádiz et al., 2013). Además, anticuerpos generados contra el complejo EhCPADH, inhiben la destrucción de las monocapas de células MDCK y Caco-2 y también reducen la capacidad de los trofozoítos para producir abscesos hepáticos en los hámsteres (Martínez et al., 2009; López et al., 2004).

Los amebaporos son proteínas que forman canales iónicos y se insertan en la membrana de la célula blanco, uniéndose con fosfolípidos aniónicos a bajo pH, y ocasionando la degradación de colágeno y oligosacáridos de la matriz extracelular. Estos canales difunden el agua y iones (salida de Na^+ y K^+ y entrada de Ca^{2+}) y otras moléculas pequeñas, provocando un cambio en el medio celular interno, que produce la lisis por choque osmótico (Leippe et al., 1997).

Los amebaporos pertenecen a la familia SAPLIP (por las siglas *Saposin-Like-Protein*), la cual se caracteriza por tener un motivo de seis cisteínas unidas por tres puentes disulfuro (Winkelmann et al., 2006). Los amebaporos comprenden tres isoformas: A, B y C, que se encuentran en proporción de 35:10:1 en trofozoítos que inducen la lisis celular, y difieren en su cinética para formar canales iónicos (Leippe

et al., 1997). En estudios sobre la muerte celular causada por *E. histolytica*, se ha demostrado que la amibiasis invasiva ocurre inicialmente por necrosis lítica mediada por los amebaporos, localizados en los gránulos citoplasmáticos, los cuales son secretados por los trofozoítos después del contacto con la célula blanco (Trejos et al., 2009).

Fagocitosis

En eucariotas, la endocitosis es un mecanismo universal para ingerir nutrientes y mantener el balance celular mediante el direccionamiento de proteínas a las vías de degradación y reciclaje. La endocitosis implica la ingestión de partículas pequeñas (<250 nm) y grandes (>250 nm), incluidas las células. La ingestión de partículas grandes, generalmente se denomina fagocitosis. A diferencia de una endocitosis clásica, la fagocitosis utiliza una maquinaria molecular más compleja, por ejemplo, el anillo contráctil de miosina-actina y los complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés), que modulan varios mecanismos importantes de la remodelación de membranas en las células (Avalos et al., 2018).

En *E. histolytica*, la fagocitosis es un proceso que consiste en la ingestión de fragmentos celulares, células vivas, partículas inertes y glóbulos rojos (eritrofagocitosis). Particularmente, este último, es considerado un indicador de la virulencia del parásito (Huston et al., 2003). En múltiples organismos, la fagocitosis es el paso final en la apoptosis y sirve para limitar la inflamación, previniendo el derrame del contenido intracelular tóxico de las células muertas al medio. En *E. histolytica*, la ingestión de células muertas limita la respuesta inflamatoria del hospedero y permite que el parásito establezca una infección persistente (Huston et al., 2003). Además, varios estudios proponen que los trofozoítos primero matan a las células del huésped, antes de fagocitarlas (Betanzos et al., 2019).

La fagocitosis puede estar mediada por fuerzas electroestáticas, pero también existen mecanismos específicos en los que intervienen diferentes moléculas, como la lectina Gal/GalNAc (Petri et al., 2002), el complejo EhCPADH, las cinasas EhAK1

y EhC2PK (Somlata, 2011), la proteína de unión a calcio EhCaBP1(Sahoo et al., 2004), las proteínas de unión a actina (EhABP) (Marion et al., 2005), pequeñas GTPasas (Nakada et al., 2010) y moléculas de tráfico intracelular (Avalos et al., 2018), entre otras.

Se sabe que la inhibición o disminución de la expresión de la lectina Gal/GalNAc, EhROM1, algunas proteínas de la familia de cinasas transmembranales (EhTMK39, EhTKBI-9 y TMK96 asociada al fagosoma de *E. histolytica* [EhPATMK]), la exoribonucleasa EhRrp6 y la metaloproteasa de superficie EhMSP-1, reducen significativamente la fagocitosis de los trofozoítos de *E. histolytica* (Teixeira et al., 2012), lo que revela su posible participación en este evento.

El complejo EhCPADH se localiza en las copas fagocíticas de trofozoítos durante la eritrofagocitosis (Avalos et al., 2015). Los trofozoítos incubados con un anticuerpo dirigido contra este complejo disminuyen un 41% su tasa de fagocitosis. Por otro lado, eritrocitos pre-tratados con un polipéptido que contiene los últimos 240 aminoácidos de EhADH, son fagocitados de manera deficiente (79% menos), por trofozoítos de *E. histolytica* (García et al., 1999).

Durante la formación de las copas fagocíticas y los fagosomas, la actina lleva a cabo reordenamientos, modulados por las proteínas ABP. Dentro de éstas se encuentra la proteína relacionada con actina ARPC1 (Babuta et al., 2015), la proteína NCABP166 de unión a actina nucleocitoplasmática de 166 kDa (Uribe et al., 2012) y la miosina 1B (Betanzos et al., 2019). Además, la proteína EhCaBP también participa en la remodelación de la actina, durante la deformación de la membrana plasmática (Bhattacharya et al., 2006). De hecho, la interacción de EhCaBP3 y EhARPC2 facilita el reclutamiento de la miosina 1B en la maquinaria de fagocitosis, para promover el cierre de copas fagocíticas y la formación de fagosomas (Babuta et al., 2018).

Adicionalmente, las pequeñas GTPasas contribuyen en la regulación de la actina, además de participar en otros procesos como endocitosis e invasión epitelial (Verma et al., 2018). Por ejemplo, la proteína de unión asociada a Ras, EhRabA, interacciona con la calreticulina e inhibe la eritrofagocitosis (Verma et al., 2018). Mientras que EhRabB se localiza en las copas fagocíticas, durante la fagocitosis (Hernández et al., 2013). Por su parte, EhRho1 modula la fagocitosis, mediante el reclutamiento de formina1 y profilina, promoviendo así la polimerización de actina (Bharadwaj et al., 2018).

Además, *E. histolytica* posee la mayoría los genes que codifican para las subunidades que conforman la maquinaria ESCRT, las cuales participan en la formación de fagosomas. Particularmente, las proteínas del ESCRT-III (EhVps2, EhVps20, EhVps24 y EhVps32) y las proteínas accesorias del ESCRT (EhVps4 y EhADH), han sido caracterizadas *in vitro* mediante la técnica de vesículas unilamelares gigantes (GUV), demostrando su participación en la biogénesis de los llamados cuerpos multivesiculares y en la formación de vesículas intraluminales, importantes en la formación de fagosomas, evidenciando así su participación en la fagocitosis de *E. histolytica* (Avalos et al., 2018,2015; López et al., 2010).

Transcripción en eucariotas

La transcripción es el primer paso de la expresión génica, y consiste en producir una molécula de ácido ribonucleico (RNA) a partir de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Academy, 2020). Las enzimas que llevan a cabo esta actividad son las RNA polimerasas (RNA pol). Los eucariotas poseen tres tipos de RNA pol y cada una transcribe diferentes tipos de genes. La RNA pol I transcribe genes que codifican para RNA ribosomales (RNAr), como 5.8S, 18S y 28S; la RNA pol II se encarga de transcribir los RNA mensajeros (RNAm) y algunos RNA nucleares pequeños (RNAns); y la RNA pol III transcribe los RNA de transferencia (RNAt), el RNAr 5S y algunos RNAns (Alberts, 2004).

La transcripción de un gen ocurre en cuatro etapas: pre-inicio, inicio, elongación y terminación (Lewis, 2008).

El **pre-inicio** es el punto control, donde los factores basales de la transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH) reconocen el DNA molde en la llamada región promotora, para reclutar la maquinaria basal de la transcripción; en este evento se da la interacción entre el DNA y la RNA pol II. En esta fase se forma una burbuja de transcripción por el desenrollamiento local de las cadenas de DNA (Academy, 2020).

Durante el **inicio** de la transcripción, comienza la síntesis de los primeros nueve ribonucleótidos, mientras que la RNA pol II permanece en el promotor. Esta fase es lenta, ya que se produce un RNA corto que se libera, y nuevamente se vuelve a sintetizar el RNA para evitar un evento abortivo (Lewis, 2008). La cadena de RNA se sintetiza en dirección 5' a 3' y se toma como molde la cadena complementaria de DNA, por lo que la hebra recién sintetizada de RNA es idéntica a la cadena codificante. El proceso de inicio concluye cuando la RNA pol II se mueve para sintetizar el RNA y después, es liberada del promotor (Lewis, 2008).

En la **elongación**, la burbuja de transcripción se mueve a lo largo del DNA y la cadena de RNA se extiende, los nucleótidos son añadidos covalentemente al extremo 3' terminal de la cadena de RNA, formando un híbrido de DNA-RNA (Lewis, 2008).

Posteriormente, durante la **terminación**, se desarma la burbuja de transcripción y ya no se pueden añadir más ribonucleótidos. La formación del enlace fosfodiéster se detiene, el híbrido de DNA-RNA se separa y el DNA retorna a su conformación dúplex (Lewis, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el promotor es la región de DNA que contiene las secuencias necesarias para iniciar la transcripción. Por lo tanto, la región

promotora controla cuándo y dónde se expresa un gen de interés. Los promotores se encuentran localizados río arriba del extremo 5' de la cadena codificante y tienen un tamaño aproximado de 100 a 1,000 pares de bases (Claros, 2020).

Dentro de la región promotora se encuentran las secuencias de elementos de respuesta que proporcionan un sitio de unión estable para la RNA pol II y los factores de transcripción (AddGene, 2020). Los factores de transcripción son proteínas que tienen como función reclutar a las RNA polimerasas y a otros factores de transcripción (cofactores de transcripción) para regular y controlar la transcripción. De acuerdo con la literatura, los eucariotas requieren al menos siete factores de transcripción para que la RNA pol II pueda unirse al promotor (Butler et al., 2002).

Las regiones promotoras se distinguen por tres segmentos principales: el promotor central, el promotor proximal y el promotor distal, y están controladas por varias secuencias reguladoras de DNA, que incluyen elementos potenciadores (*enhancers*). Estos elementos son secuencias cortas de nucleótidos localizadas a -200 pares de bases, que aumentan la transcripción de un gen hasta 200 ó 400 veces más que la transcripción basal, alteran la estructura del DNA, ya que inducen el superenrollamiento en la zona del promotor central y aumentan la unión de factores de transcripción. Los potenciadores pueden presentar localizaciones y orientaciones distintas en relación con el promotor, incluso actuar de manera bidireccional entre las cadenas del DNA. Algunos ejemplos de este tipo de secuencias son: la caja CCAAT, que interacciona con el factor de transcripción CP1; el elemento CACCC, que es reconocido por el factor de transcripción Sp1; entre otros (Rodríguez & Borunda, 2018).

Por otra parte, los silenciadores son secuencias cortas de nucleótidos de dos tipos: los elementos silenciadores y los elementos de regulación negativa (*negative regulation elements* NRE). Los silenciadores pueden actuar de diferentes maneras: pueden modificar la estructura de la cromatina, para evitar que se active la

transcripción, reclutar factores de transcripción represores y alterar el proceso de corte y empalme del RNAm, evitando la maduración del RNAm y activando señales que bloqueen la traducción, inactivando así la expresión génica (Rodríguez & Borunda, 2018).

La acción de un potenciador o un silenciador puede inhibirse por la presencia de secuencias aislantes (*insulators*), cuya función es bloquear la transmisión de la señal de un sitio a otro en el DNA, de tal manera que evita interacciones inapropiadas entre dominios de cromatina adyacentes. Un tipo de aislante establece dominios que separan a los potenciadores y promotores, para bloquear su interacción; mientras que un segundo tipo de aislante crea una barrera, para que no se forme la heterocromatina (estado inactivo de transcripción) (Felsenfeld, 2006). Más que barreras físicas, se consideran reguladores, ya que interactúan específicamente con diversas proteínas de la maquinaria de transcripción (Herráez, 2020).

El promotor mínimo se localiza cerca del codón de inicio y contiene el sitio de unión para la RNA pol II, la llamada caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción (TSS). La caja TATA es una secuencia de DNA (5'-TATAAA-3') a la que se pueden unir histonas y factores de transcripción. Las histonas son proteínas que se encargan de empaquetar el DNA en los nucleosomas. La unión de las histonas inhibe la transcripción, mientras que los factores de transcripción la promueven; sin embargo, se han descrito factores que ejercen un efecto inhibitor (Addgene, 2020; Manley et al., 1989).

El promotor proximal se localiza río arriba del promotor central, a una distancia aproximada de 250 pares de bases y contiene elementos reguladores basales. Por ejemplo, el factor de transcripción CTF o NF1 que interactúa con la caja CAAT, siendo el responsable de la eficiencia del promotor; mientras que el factor de transcripción SP1 interactúa con la caja GC y recluta a TFIID (Herráez, 2020). Los promotores que sólo tienen secuencias reconocidas por factores de

transcripción basales y proximales, controlan la expresión de genes constitutivos (*housekeeping*), los cuales se expresan en todas las células del organismo y a la misma velocidad durante todo el ciclo celular, ya que tienen funciones indispensables para la vida de la célula (Herráez, 2020).

El promotor distal se encuentra río arriba del promotor proximal y también contiene elementos reguladores y sitios de unión para factores de transcripción. A diferencia de los promotores proximales, estos factores de transcripción no se expresan constitutivamente, sino que se sintetizan o se activan en momentos específicos o en tejidos particulares. Por ejemplo, los receptores nucleares para hormonas esteroides o tiroideas. La unión de la hormona cambia la conformación del receptor, que actúa como factor de transcripción aumentando su afinidad por ciertos promotores distales, denominados elementos de respuesta a hormonas (HRE). Los productos proteicos de estos genes representan para la célula un mecanismo de respuesta a hormonas (Herráez, 2020).

Los promotores eucariotas son muy complejos, en comparación con los de los procariotas. Abarcan una amplia gama de secuencias de DNA, además, es usual que tengan varios elementos reguladores, como potenciadores. Los promotores eucariotas (Fig. 3) tienen una estructura tan compleja, que el DNA tiende a plegarse sobre sí mismo, lo que explica por qué las secuencias de DNA que están físicamente distantes pueden ser capaces de afectar la transcripción de un gen (AddGene, 2020).

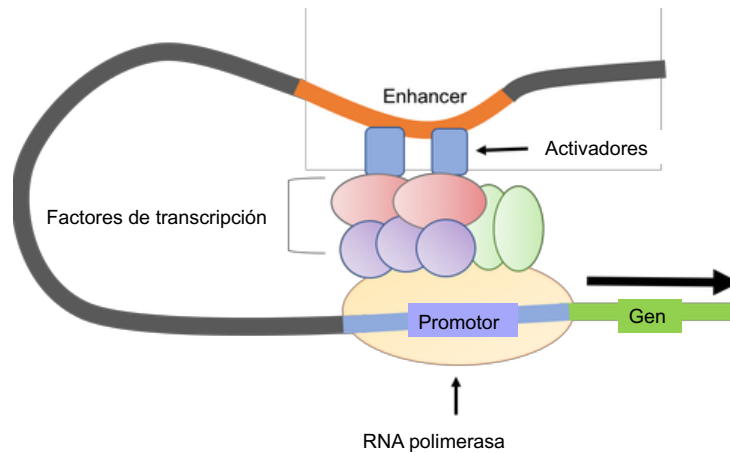


Figura 3. Esquema de un promotor eucariota.

Estructura de un promotor eucariota, compuesto por secuencias reguladoras llamadas *enhancer*, que aumentan la tasa de transcripción y recluta factores de transcripción con función de activar de la transcripción. El promotor puede plegarse sobre si mismo de tal forma que secuencias distantes pueden efectuar cambios en la transcripción de un gen [Tomado y modificado de (AddGene, 2020)].

Factores de transcripción

Los organismos se adaptan a cambios ambientales debido a la alteración en su expresión génica. Dicha expresión, a menudo depende de la regulación de la transcripción de un gen. El control de la transcripción depende de la interacción de moléculas reguladoras específicas, por lo general, factores de transcripción. Los mecanismos relacionados con la regulación en la expresión génica, usualmente permiten asociarlos con procesos biológicos como el desarrollo, el crecimiento, la respuesta a factores ambientales y fármacos terapéuticos, la longevidad y la evolución de las especies (Gómez, 2009). Por tanto, los factores de transcripción están involucrados en una gran cantidad de funciones e interacciones complejas dentro y entre diferentes tipos de células, impactando la fisiología de todo un organismo (Martínez et al., 2020).

Un factor de transcripción es una proteína que se une físicamente al DNA, así como a otras proteínas que le permiten controlar mejor su función en la regulación de la transcripción. Los factores de transcripción actúan en el núcleo; sin embargo,

muchos de ellos pueden permanecer en el citoplasma en forma inactiva hasta que llega una señal celular que los activa e ingresan al núcleo para llevar a cabo su función (Contreras, 2016). La mayoría de los factores de transcripción se unen específicamente a las regiones promotoras del DNA. Varios genes que codifican para proteínas que participan en rutas metabólicas en común pueden tener su transcripción activada mediante un mismo factor de transcripción, que se une a la misma secuencia en la región promotora de los genes (Contreras, 2016).

Dependiendo de la cantidad de RNAs que necesite la célula, los factores de transcripción pueden dividirse en factores de transcripción basales, específicos y genéricos (Gilbert, 2000). Los factores de transcripción basales son esenciales para la transcripción de cualquier gen, por ejemplo, de los genes que codifican para proteínas que participan en la apertura de las cadenas de DNA (Gilbert, 2000).

Los factores de transcripción específicos reconocen promotores particulares de un único tejido. Uno de los factores más conocidos en este sentido, es la familia de proteínas *T-box*, que se une específicamente al promotor de los genes que participan en el desarrollo del corazón (Contreras, 2016), en la llamada caja T, que contiene la secuencia consenso "TCACACCTT". Esta secuencia se puede repetir en un solo promotor y, de hecho, las repeticiones con más de dos secuencias consenso, son las que tienen mayor afinidad por la proteína *T-box* (Conlon, 2002).

Los factores de transcripción genéricos son aquellos que se unen a la región promotora de los genes constitutivos, es decir, de los genes que se transcriben independientemente del tipo celular. Entre los genes que se regulan por este tipo de factores de transcripción se incluye al gen que codifica para la actina, que forma parte importante del citoesqueleto (Contreras, 2016).

Los factores de transcripción contienen los siguientes dominios (Latchman, 1997):

El dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés), que contiene sitios para la unión de otras proteínas, como cofactores de transcripción. Estos sitios se conocen como activadores de la transcripción (Wärnmark et al., 2003).

El dominio de detección de la señal (SSD, por sus siglas en inglés) o también conocido como dominio de unión a ligando, reconoce señales externas y las transmite a la maquinaria de transcripción, ya sea para activarla o para inhibirla (Wärnmark et al., 2003).

El dominio de unión a DNA (DBD, por sus siglas en inglés), el cual tiene la capacidad de unirse a secuencias específicas de DNA. Es un dominio proteico que está plegado y contiene al menos un motivo estructural; puede reconocer la cadena doble o sencilla de DNA o tener una afinidad general hacia el DNA (Latchman, 1997).

Principales familias de factores de transcripción

A continuación, se describirán las familias de factores de transcripción más importantes, clasificadas con base en sus dominios de unión al DNA:

Familia de factores de transcripción con dominios hélice-vuelta-hélice: estas proteínas contienen un dominio que se descubrió en bacterias y normalmente lo tienen las proteínas que funcionan como represoras. Este dominio está constituido por aproximadamente 20 aminoácidos. En el caso de eucariotas, es un homeodominio conformado por 60 aminoácidos (característico de proteínas producidas por los genes homeóticos, *Hox*), que consta de dos hélices; una de ellas reconoce el DNA, mientras que la otra descansa, formando un ángulo a lo largo del DNA. Estos dominios son comunes estos dominios en factores de transcripción que regulan los procesos de desarrollo (Alberts Bruce, 2004). Las proteínas Oct-1 y Oct-2, cuya secuencia de unión al DNA es un octámero, son un ejemplo de esta familia.

Familia de factores de transcripción con dedos de zinc (dominios ZFDB, por sus siglas en inglés): son proteínas con un dominio constituido entre 23 y 28 aminoácidos. Su estructura es estabilizada por iones de zinc, espaciados con histidinas y cisteínas. Los dominios ZFDB adoptan distintas conformaciones, que logran interactuar con el ion de zinc. El tipo más común de este dominio es el que se encuentra conformado por dos cisteínas, dos histidinas, un ion de zinc, con una hélice de reconocimiento al DNA y una hoja beta. Estas estructuras suelen ser repeticiones en tándem, en una misma proteína (Och et al., 2019). Por lo general, el reconocimiento al DNA es de 3 pares de bases y se consigue cuando el ZFDB presenta la hélice hacia el surco mayor del DNA (Puig, 2020). El otro tipo de dominio ZFDB es el C₂H, que refiere a la unión del zinc a dos cisteínas y una histidina, y que interactúa con RNA y proteínas. Estos dominios se han observado en algunas cápsides de retrovirus, participando en el empaquetamiento del material genético viral después de la replicación (Puig, 2020). Los ZFDB C₄ (familia GATA) comprende factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en el desarrollo celular; los factores GATA están implicados en la hematopoyesis (Puig, 2020). Por último, los dominios ZFDB tipo C₃HC₄-C₃H₂C₃, se encuentran presentes durante la reparación del DNA en eucariotas (Puig, 2020). En general, las proteínas que contienen dominios ZFDB, además de su participación en la regulación genética como factores de transcripción, parecen estar involucradas en la homeostasis intracelular de zinc, así como en la apoptosis (Puig, 2020).

Familia de factores de transcripción con cremallera de leucinas: contienen un dominio básico y su estructura está conformada por una alfa hélice, con una leucina cada 7 aminoácidos. Si dos hélices se encuentran una con la otra, se forma una interacción que asemeja los dientes de una cremallera, permitiendo la dimerización de dos proteínas. El reconocimiento del DNA se da gracias a que este dominio es básico y se une al azúcar-fosfato del DNA (Alberts, 2004). La mayoría de las

proteínas que contienen este tipo de dominio, muestran afinidad por la secuencia “ACGT” en el DNA (Medicine, 2020).

Familia de factores de transcripción con dominios tipo hélice-bucle-hélice: son un grupo de proteínas con capacidad de unirse al DNA, en presencia de estructuras helicoidales y también forman dímeros. La mayoría de este grupo de proteínas tiene una región altamente básica, adyacente al motivo de unión al DNA. Se dividen en dos grupos: la clase A, conformada por factores de transcripción de expresión ubicua, como E12/E47 de mamíferos; y la clase B, formada por proteínas que se expresan de manera específica en los tejidos, por ejemplo, Myf5 y MRF4 de mamíferos (Guasconi et al., 2003).

Regulación de la transcripción en eucariotas

Una célula contiene en su genoma la información necesaria para producir miles de proteínas y moléculas de RNA diferentes. Las células expresan típicamente sólo algunos genes. Los diferentes tipos celulares de los organismos pluricelulares se forman porque se expresan diferentes conjuntos de genes. Además, las células pueden cambiar su patrón de expresión génica en respuesta a cambios ambientales, como las señales externas. Aunque en principio todas las etapas en la regulación de la expresión génica tienen un punto control, el más importante de estos es el inicio de la transcripción, pues permite producir el RNA mensajero (RNAm) que llevará a la síntesis de proteínas (Alberts, 2004).

Las células regulan la síntesis de proteínas a través de diferentes mecanismos:

- Modulando cuándo y con qué frecuencia se transcribe un gen (control transcripcional).
- Controlando el modo de maduración y procesamiento de los transcritos primarios de RNAm (control del procesamiento de RNAm).
- Seleccionando los RNAm maduros del núcleo que van a ser exportados al citosol y determinando dónde se van a localizar (control del transporte y localización de RNAm).

- Eligiendo los RNAm citoplásmicos que van a ser traducidos por los ribosomas (control en la traducción).
- Desestabilizando selectivamente algunas moléculas de RNAm citoplásmico (control en la degradación de los RNAm).
- Activando, inactivando, degradando o ubicando de modo selectivo las proteínas ya sintetizadas (control de la actividad proteica) (Alberts, 2004).

En eucariotas, la regulación de la expresión génica es controlada principalmente al inicio de la transcripción. Esta regulación consiste en cambios epigenéticos en el DNA, tales como la acetilación, la metilación y la fosforilación en las histonas, entre otras modificaciones, y también en la interacción del DNA con factores de transcripción -que pueden ser represores o activadores-, acompañados de la maquinaria basal de la transcripción (Tovy, 2010). Los factores de transcripción funcionan como moléculas reguladoras difusibles, es decir, se transcriben en el núcleo, se traducen en el citoplasma y reingresan al núcleo para llevar a cabo su función. La presencia de factores de transcripción en una célula particular en desarrollo depende de la regulación de los genes que los codifican; en consecuencia, son el control clave en el desarrollo (Davidson, 2015). La ocupación del factor de transcripción en una secuencia de DNA depende de dos parámetros: la unión del factor de transcripción al DNA, y la concentración en la cual está presente en el núcleo. Estudios bioquímicos han demostrado que un aspecto importante de la interacción del factor de transcripción con el DNA, es la presencia de dominios básicos, lo cual facilita la identificación de su secuencia blanco en el DNA. Un principio general de la función reguladora de los factores de transcripción en las células es que no funcionan solos, sino junto con otros factores de transcripción y cofactores que se les unen específicamente. Es decir, la regulación de la transcripción requiere una multiplicidad de funciones bioquímicas efectoras (Davidson, 2015).

Así, cuando se alteran los procesos de transcripción y expresión génica, se pueden ocasionar enfermedades en humanos. De tal forma que el entendimiento molecular

de estos procesos puede conducir al diseño de agentes, que alteren mecanismos fisiopatológicos, así como a la inhibición del crecimiento o desarrollo de agentes patogénicos (Weil et al., 2001).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Regulación de la expresión génica en *E. histolytica*

Loftus y col. (2005) publicaron la secuencia del genoma completo de *E. histolytica*, cuyo tamaño es de 23.7 millones de pares de bases, con aproximadamente 9 mil genes. Los genes de *E. histolytica* son generalmente cortos debido a la pérdida de intrones en la mayoría de ellos. Casi todos los genes contienen un exón sencillo; sin embargo, cerca del 25% puede contener intrones y el 6% puede contener dos o más intrones (Loftus et al., 2005). En este protozooario, aún no se ha definido el número de cromosomas, aunque el análisis por video-microscopía para DNA ha permitido estimar la existencia de seis cromosomas y un centro organizador de microtúbulos (Riveron et al., 2000). En otro estudio, mediante el uso de electroforesis en campos pulsados, se identificaron 17 bandas de DNA, de las cuales seis podrían corresponder a cromosomas, dada su hibridación con una sonda telomérica heteróloga (Riveron et al., 2000).

La transcripción es un evento finamente regulado, que faculta un control preciso en espacio y tiempo de la expresión génica. Pese a que este proceso constituye uno de los mecanismos biológicos más estudiados, en *E. histolytica* se conoce muy poco acerca de él y se ha caracterizado un número limitado de moléculas relacionadas. A pesar del escaso conocimiento en torno a la regulación de la transcripción en la amiba, se han descrito algunos genes, como los llamados genes reguladores específicos río arriba (URE1-URE5), involucrados en la patogénesis de *E. histolytica* (Calixto et al., 2011). Así también, se han caracterizado regiones promotoras de genes que son indispensables para la virulencia de este parásito, entre ellos, el promotor (-234 a -196 pb) del gen *Ehpgp1*, cuyo producto tiene un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos (Ramírez et al., 2005). Por su parte, Romero y col. (2007) realizaron análisis, tanto estructurales como funcionales, del promotor del gen *EhrabB* que codifica para una GTPasa Rab, implicada en la fagocitosis. Los estudios *in silico* revelaron que el promotor de *EhrabB* contiene secuencias consenso para el elemento regulador río arriba 1

(URE1), GATA y elementos de choque térmico (HSE); asimismo, los autores demostraron que URE1 y HSE activan la transcripción de *EhrabB* (Romero et al., 2007). En otros estudios realizados por Azuara y col. (2005), se encontró que los genes *Ehadh112* y *Ehcp112*, que codifican para el complejo EhCPADH, están separados por una región no codificante de 188 pares de bases, sugiriendo que esta proximidad lleva a una regulación coordinada para ambos genes. Además, en la región promotora se identificó una caja TATA, una caja GAAC y una secuencia iniciadora (Inr) en la región promotora y se demostró que la activación de la transcripción es regulada por un promotor proximal, en estos dos genes (Azuara et al., 2005).

El primer factor de transcripción descrito en *E. histolytica* fue la proteína de unión a la caja TATA (EhTBP), que además se une a diferentes variantes de dicha secuencia (Dios et al., 2005). Este atributo de EhTBP, parece favorecer la eficiencia del inicio de la transcripción en genes que participan en la virulencia de este parásito. Aunado a esto, se sabe que la amiba tiene dos miembros de la familia TBP (Castañón et al., 2010).

Otros factores de transcripción identificados en *E. histolytica* incluyen al dominio de unión del DNA MYB (EhMybR2R3), presente en proteínas relacionadas con la unión de secuencias teloméricas (Meneses et al., 2010); el factor de inicio de la transcripción del DNA ribosómico (EhTIF-1), que interacciona con la RNA pol I y se expresa exclusivamente en los plásmidos cromosómicos extracelulares de *E. histolytica* (Srivastava et al., 2016); el factor de transcripción sensible al estrés oxidativo (EhHRM), que aumenta su expresión en respuesta a la exposición de H₂O₂ en trofozoítos (Pearson et al., 2012); la proteína de unión al elemento 3 regulador río arriba (EhURE3-BP), que es un factor que provoca la inhibición de calcio (Gilchrist et al., 2010); el factor de transcripción EhP53, que se sobreexpresa cuando los trofozoítos son expuestos a luz ultravioleta, sugiriendo una relación evolutiva con el factor supresor tumoral en mamíferos p53 (Mendoza et al., 2003); el factor de transcripción coactivador positivo (EhCP4), que está funcionalmente

relacionado con la replicación del DNA y la multinucleación, y que además, es el primer factor de la transcripción descrito en amiba, asociado a eventos de poliploidía y estabilidad del genoma (Hernández et al., 2015); y por último, la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (EhSTAT), que son factores inducibles en respuesta a colágeno. Se trata de proteínas citoplasmáticas que después de fosforilarse en residuos de tirosina forman homo- o heterodímeros y se translocan al núcleo, para llevar a cabo su función como factores de transcripción (Cruz et al., 2003).

Algunos factores de transcripción (o las secuencias de unión de factores de transcripción en la región promotora) reportados hasta este momento en *E. histolytica*, se citan en la Tabla 1.

Con base en los estudios más recientes de factores de transcripción en *E. histolytica* y la importancia que se ha visto que tienen en diferentes eventos celulares, se hace evidente la necesidad de profundizar el estudio de la regulación de la expresión génica de este parásito. Principalmente para lograr una mejor comprensión de la regulación de los mecanismos de virulencia y de evasión de la respuesta inmunológica del hospedero.

Tabla 1. Secuencias consenso para factores de transcripción en *E. histolytica*.
[Elaboración propia].

Factor de transcripción	Secuencia consenso	Características	Referencia
EhURE1BP	TCTTAAATATTGGAAC	Se une a la secuencia URE1 y además contiene un motivo Tudor	Calixto et al., 2011
EhTBP	TATTTAAA	Reconoce la caja TATA	Castañon et al., 2010; Dios et al., 2005
STAT	CCT	Es un factor inducible en respuesta a colágeno	Cruz et al., 2003
EhPC4	No determinado	Asociado a eventos de poliploidía y estabilidad en el genoma de <i>E. histolytica</i>	Hernandez et al., 2015
Proteína Enhancer	CCAAT	Regula la expresión del gen <i>Ehpgp1</i>	Marchat et al., 2002
EhP53	CATG	Proteína ancestral de supresor de tumores en mamíferos	Mendoza et al., 2003
URE3-BP	AATATTTTATT	Provoca la inhibición de calcio	Moreno et al., 2009
URE5	CAAAAATAAAA	Regula la expresión del gen <i>Ehpgp1</i>	Ramírez et al., 2005
URE2	GAAGGA	Regula la expresión del gen <i>Ehpgp1</i>	Ramírez et al., 2005
HRM	AAACCTCAATGAAGA	Sensible al estrés oxidativo	Pearson et al., 2012
AP-1	CA	No determinado	Perez et al., 2005
SRV	AAGGAGACAATTA	Secuencia consenso en el promotor del gen <i>Ehadh</i>	Azuara et al., 2010
CREB	TTACTTAA	Secuencia consenso en el promotor del gen <i>Ehadh</i>	Azuara et al., 2010
YY1	CTGCCAAATT	Secuencia consenso en el promotor del gen <i>Ehadh</i>	Azuara et al., 2010
C/EBP	TGTTTGAGTAGTT, ATTGG	Secuencia consenso en el promotor del gen <i>Ehpgp1</i>	Ramírez et al., 2005
HOX	TATTAT, TATTTA	Secuencia consenso en el promotor del gen <i>Ehpgp1</i> y <i>EhrabB</i>	Ramírez et al., 2005; Romero et al., 2007
OCT	TATTTAAT	Secuencia consenso en el promotor del gen <i>Ehpgp1</i>	Ramírez et al., 2005
Myb	C/T AAC C/T G	Relacionado con proteínas de unión a secuencias teloméricas	Meneses et al., 2010
GATA-1	AGATAA	La secuencia consenso en el promotor del gen <i>EhrabB</i> , <i>Ehpgp1</i> , <i>Ehadh</i> y <i>Ehpc112</i>	Romero et al., 2007; Ramírez et al., 2005; Azuara et al., 2010

Factores de transcripción GATA en eucariotas

Las proteínas GATA son factores de transcripción conservados que pertenecen a la familia con dominios tipo ZFDB y reconocen la secuencia consenso de DNA (A/T) GATA (A/G) (Huaqing, 2015). En el humano, la familia de proteínas GATA consta de seis miembros, de los cuales GATA-1, GATA-2 y GATA-3 están implicados en la hematopoyesis; mientras que GATA-4, GATA-5 y GATA-6, se expresan en otros tejidos, incluyendo intestino, corazón y pulmón (Ferreira, 2005).

GATA-1 fue el primer factor de transcripción descrito en esta familia. Esta proteína de 413 aminoácidos contiene dos motivos de dedos de zinc conservados, mediante los cuales interacciona con el DNA. Además, GATA-1 puede interaccionar con otras proteínas, como SP1, CBP/P300, FOG-1, EKLF y el mismo GATA-1 (Martin, 1990). GATA-1 presenta tres dominios: el dominio N-terminal de activación (o represión) y dos dominios ZFDB que se localizan en el N-terminal, y otro en el C-terminal. El ZFDB N-terminal no se une directamente al DNA, pero participa en la estabilidad y especificidad de la unión del ZFDB C-terminal, el cual reconoce la secuencia consenso GATA (Chang, 2002).

GATA-1 y otros miembros de la familia GATA son capaces de unirse a su propio promotor, lo que sugiere que se lleva a cabo una autorregulación a nivel transcripcional (Hannon, 1991). GATA-1 también es regulada a nivel post-traducciona l mediante los procesos de acetilación, fosforilación y sumoilación. La acetilación de GATA-1 en *Gallus gallus domesticus*, aumenta la afinidad de la proteína por el DNA (Boyes, 1998). La combinación de acetilación y fosforilación, provoca la degradación de GATA-1 mediante el proteosoma (Hernández et al., 2006). Los patrones de fosforilación cambian durante la diferenciación de células madre hematopoyéticas (Crossley, 1994); y la sumoilación de GATA-1 es un evento del cual aún se desconocen detalles sobre el mecanismo de regulación (Collavin et al., 2004).

La familia de proteínas GATA son factores de transcripción conservados. El número de genes *gata* y sus productos varía entre especies, así como el número de genes que regulan las proteínas GATA. Identificados por primera vez en *Gallus gallus domesticus* se determinó que los factores de transcripción GATA están ampliamente involucrados en la hematopoyesis (Omischinski, 1993).

En plantas, se ha demostrado la existencia de al menos 28 genes que codifican para proteínas GATA, muchos de ellos involucrados en la regulación de genes dependientes de la luz y la asimilación de nitratos. Particularmente, el factor OsGATA23a aumenta su expresión en respuesta a salinidad y sequía, siendo, por tanto, sensible y responsivo a estrés (Gupta et al., 2017).

Shlyakhover y col. (2018), describieron el papel central de GATA como regulador en la expresión de genes que codifican para receptores fagocíticos, necesarios para la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en los macrófagos embrionarios de *Drosophila melanogaster* (Valanne et al., 2018).

En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* existen 27 genes que codifican para factores de transcripción GATA, entre ellos, ELT3, regula la expresión del colágeno de la cutícula en respuesta a estímulos ambientales (Hive et al., 2020); y egl-27, que participa en el retraso del envejecimiento al promover la resistencia al estrés (Kim et al., 2012).

Las proteínas GATA de hongos tienen características similares con las de plantas y animales, específicamente en los residuos de aminoácidos presentes en el asa de dedo de zinc. Los diversos procesos regulados por esta familia de factores de transcripción incluyen el control del metabolismo del nitrógeno, la regulación circadiana y la producción de sideróforos (Arguello et al., 1998). En *Saccharomyces cerevisiae*, el silenciamiento del factor de transcripción GATA disminuye la expresión basal del gen *ENA1*, que codifica para un transportador de iones de litio

y sodio, esencial para la tolerancia a la sal (Crespo et al., 2001). En *Dictyostelium discoideum*, Gtac regula la dinámica de la expresión génica en el desarrollo temprano y diferenciación terminal (Balaji et al., 2015). Por lo tanto, la familia GATA son factores de transcripción evolutivamente conservados, ya que desempeñan funciones importantes en diferentes aspectos de procesos celulares, en organismos como levaduras y animales. Los modelos experimentales descritos anteriormente permiten tener una visión general de la relevancia de los factores de transcripción GATA en la maduración, supervivencia, proliferación, desarrollo y diferenciación celular, que son críticos para la adaptación de los organismos a su entorno.

Factor de transcripción EhGATA en *E. histolytica*

La relevancia de las proteínas GATA en el parásito protozoario *E. histolytica* es poco conocida (Romero et al., 2007). Sin embargo, recientemente, mediante análisis *in silico* y funcionales realizados por Huerta y col. (2020, en prensa), se encontró que *E. histolytica* tiene un solo gen *gata* (*Ehgata*) de 578 pares de bases, con un intrón de 87 pares de bases (EHI7A_037890).

Este gen codifica para una proteína de 163 aminoácidos, con un peso estimado de 19 kDa, que es mucho menor al rango de pesos moleculares de las proteínas GATA en humano, que oscilan entre los 43 a 60 kDa. La expresión del gen *Ehgata* en *E. histolytica* fue confirmada mediante PCR, usando como molde DNA genómico (DNAg) y DNA complementario (DNAc) de *E. histolytica* y oligonucleótidos específicos, que flanquean al gen *Ehgata*, resultando en la amplificación de dos productos de 579 y 492 pb, respectivamente (Fig. 4A) (Huerta et al., 2020 en prensa).

Profundizando en el análisis estructural de la proteína EhGATA, se identificó que al igual que las proteínas GATA de *S. cerevisiae* y *D. discoideum*, EhGATA contiene solo un dominio ZFDB, a diferencia de las proteínas GATA de *H. sapiens*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* y *Candida albicans*, que contienen dos dominios ZFDB (Fig. 4B). Estudios evolutivos sugieren que en vertebrados GATA surgió de

un ancestro común, en el que se conserva el ZFBD. Este dominio es indispensable y suficiente para que GATA interaccione con el DNA (Ghirlando, 2003).

Otra característica relevante encontrada en la estructura de EhGATA, fue la presencia de un motivo *AT-Hook* (unión inespecífica al DNA), que lo hace inusual, comparado con otras proteínas GATA (Fig. 4D), lo cual señala a EhGATA como un factor de transcripción no canónico (Huerta et al., 2020 en prensa). El motivo *AT-Hook* podría estar reforzando la unión de EhGATA al DNA, como ocurre en algunos polipéptidos quiméricos, que incluyen una región de unión al DNA de algunos factores de transcripción y un motivo *AT-Hook* (Rodríguez et al., 2015).

Mediante análisis filogenéticos (Fig. 4E), se identificó que EhGATA está evolutivamente relacionada con las proteínas GATA de *D. discoideum* y *Schistosoma mansoni* (Huerta et al., 2020 en prensa).

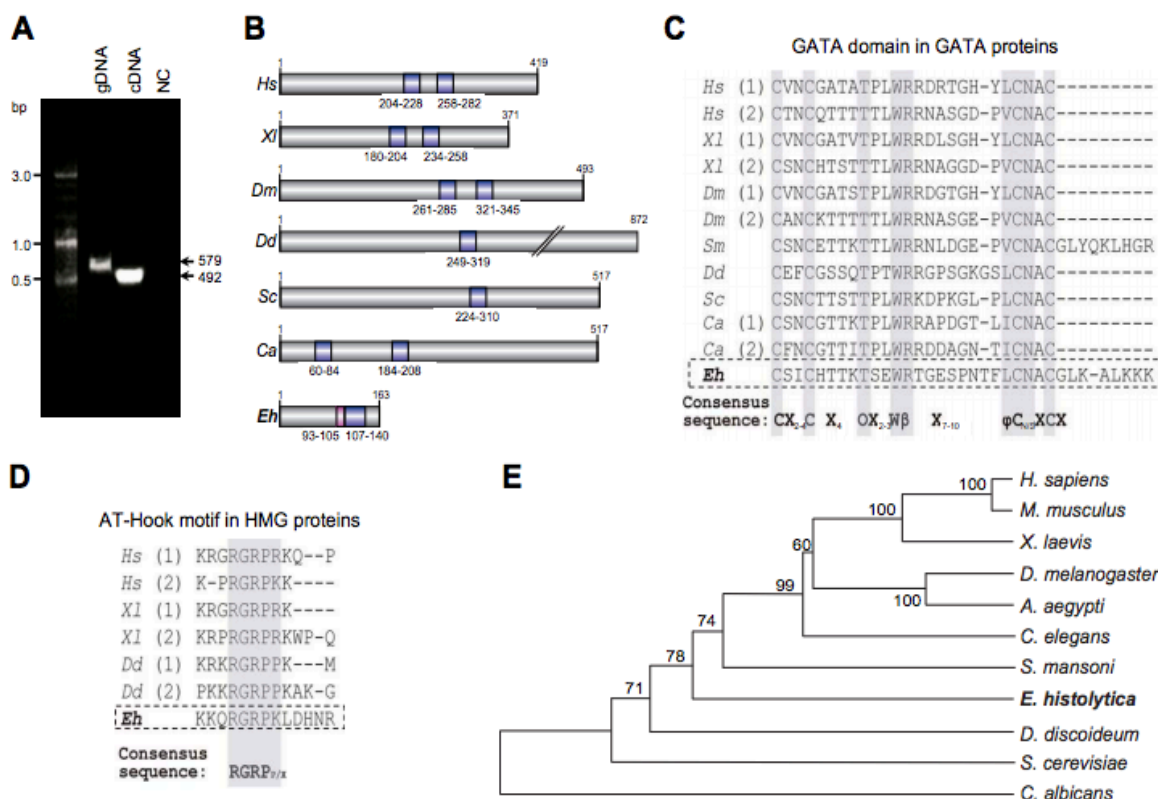


Figura 4. Análisis *in silico* y filogenético de EhGATA. A) Gel de agarosa al 1%, mostrando los amplicones de *Ehgata* obtenidos a partir de DNA genómico (gdDNA) y DNA

complementario (cDNA) usados como moldes para PCR de punto final y oligonucleótidos específicos para *Ehgata*. B) Diagrama que compara los dominios ZFDB (morado) de diferentes organismos y el motivo *AT-Hook* (rosa). C) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos conservados en la familia de proteínas GATA. D) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos conservados para el motivo *AT-Hook* en diferentes organismos. E) Árbol filogenético de las proteínas GATA (Tomado de Huerta et al., 2020, en prensa).

Huerta y col. (2020 en prensa), además, modelaron la estructura tridimensional de EhGATA mediante un análisis *in silico*, utilizando el software Raptor X, que predice estructuras secundarias y terciarias de proteínas. Posteriormente, compararon la estructura tridimensional de EhGATA con el cristal de la proteína GATA-1 de humano (HsGATA), mediante un análisis un programa llamado *Chimera* (Fig.5). Se identificó que el porcentaje de identidad entre las proteínas completas es muy bajo, sin embargo, entre los dominios GATA es del 80%. Por su parte, el motivo *AT-Hook* de EhGATA guarda 60% de identidad con el motivo correspondiente en la proteína HMGA-1 (proteína de grupo de alta movilidad) de humano.

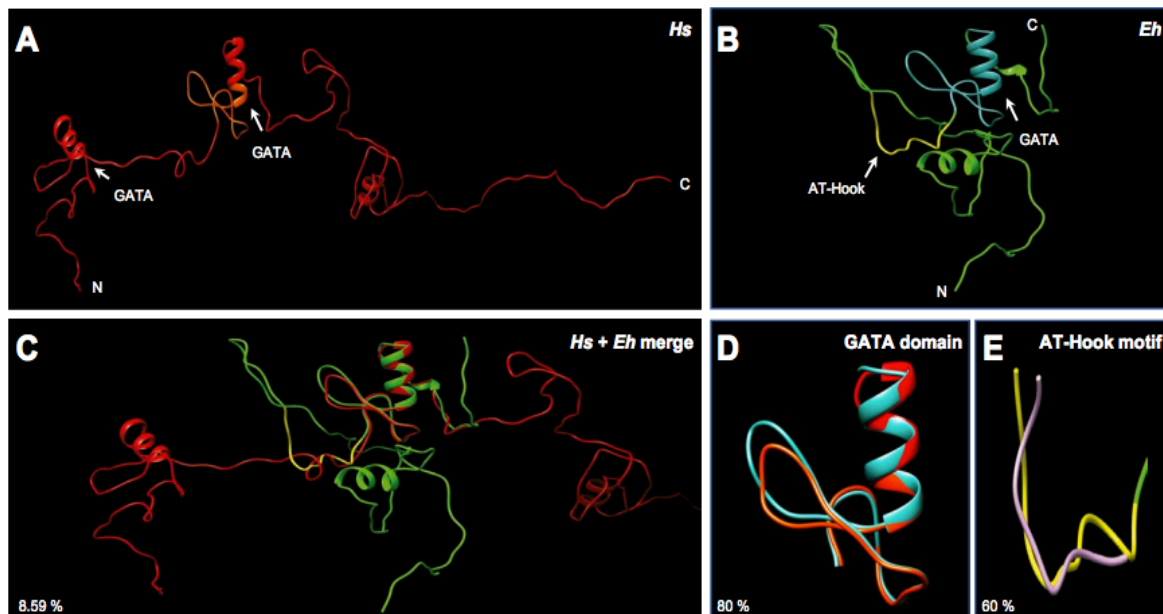


Figura 5. Análisis de la estructura tridimensional de EhGATA. A) Estructura del cristal de GATA-1 de humano. B) Estructura predicha de EhGATA de *E. histolytica*. C) Alineamiento de las estructuras completas de las proteínas GATA-1 y EhGATA. D) Alineamiento estructural del dominio GATA de la proteína HsGATA, comparado con EhGATA. E) Alineamiento estructural del motivo *AT-Hook* de la proteína HMGA-1, comparado con EhGATA (Tomado de Huerta et al., 2020, en prensa).

En los análisis *in silico*, EhGATA también demostró la presencia de señales de localización (NLS) y exportación (NES) nuclear en su secuencia de aminoácidos, así como sitios putativos para modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación, acetilación y sumoilación (Huerta et al., 2020 en prensa). Estos resultados demostraron que la proteína EhGATA predicha comparte características estructurales con otras proteínas GATA, sugiriendo que podría tener una relación funcional con otros miembros de la familia, en otros organismos.

La principal evidencia relacionada con la posible función de EhGATA como factor de transcripción, debía provenir de su localización, por lo que mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunomarcaje, se observó que EhGATA es una proteína que reside en el núcleo de los trofozoítos de *E. histolytica*, aunque también se le localiza en el citoplasma (Fig. 6). De manera muy interesante, se identificó su presencia en la región del núcleo que corresponde a la heterocromatina, lo cual sugiere que EhGATA pudiera estar cumpliendo alguna función en la represión o activación de la transcripción génica (Huerta et al., 2020 en prensa).

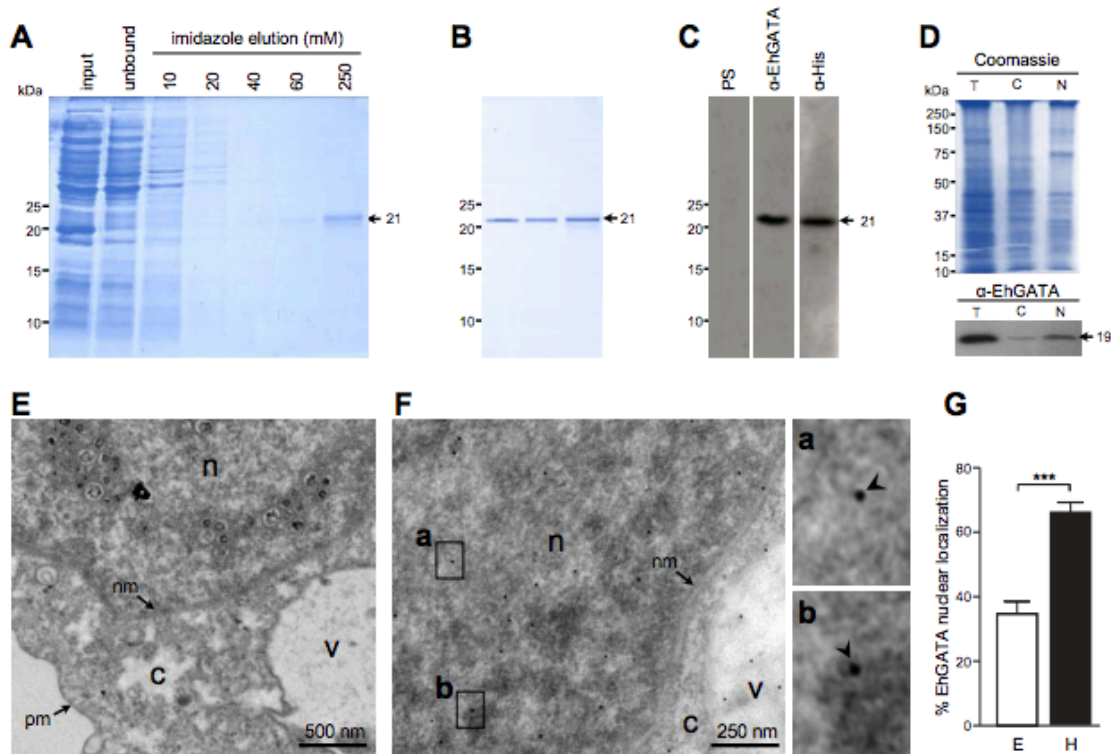


Figura 6. Expresión y localización celular de EhGATA en *E. histolytica*. A) Gel SDS-PAGE donde se separaron electroforéticamente las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la proteína recombinante rEhGATA, expresada en bacterias *E. coli* BL21. B) Gel SDS-PAGE revelando las muestras de rEhGATA que fueron empleadas en los ensayos de Western blot. C) Western blot de muestras de rEhGATA incubadas con suero preinmune (PS), y los anticuerpos α -EhGATA y α -histidinas. D) Identificación de EhGATA en extractos proteicos totales y en las fracciones citoplasmática y nuclear. E y F) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM), mostrando la localización celular de EhGATA inmunomarcada con partículas de oro, (E) es el control (cortes incubados con PS) y (F) los cortes de trofozoítos incubados con los anticuerpos α -EhGATA. Las imágenes en aumento muestran la localización de EhGATA en el núcleo, en la eucromatina (a) y la heterocromatina (b). G) Cuantificación de EhGATA en los compartimentos nucleares; E= eucromatina y H= heterocromatina (Tomada de Huerta et al., 2020 en prensa).

Posteriormente, a través de ensayos de retardamiento electroforético (EMSA, por las siglas *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) (Fig. 7A) y súper-retardamiento electroforético, o *supershift* (Fig. 7B), se demostró que EhGATA se une específicamente a la secuencia GATA consenso (formando un complejo), ya sea utilizando oligonucleótidos sintéticos o extractos nucleares (Fig. 7C). Estos hallazgos proporcionaron evidencia adicional sobre la existencia de una proteína EhGATA en la fracción nuclear de los trofozoítos de *E. histolytica*, capaz

de unirse específicamente al DNA y funcionar presumiblemente como factor de transcripción (Huerta et al., 2020 en prensa).

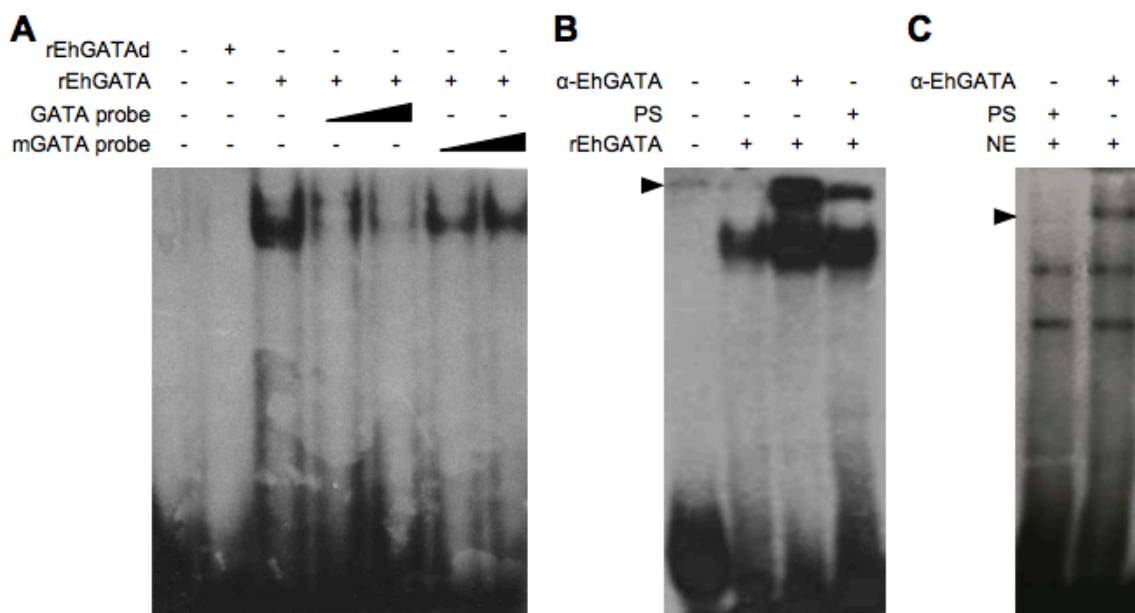


Figura 7. Unión específica de EhGATA al DNA. A) Ensayos tipo EMSA realizados con la sonda GATA (5'-GTTGCAGATAAACATT-3') radiactiva y la proteína recombinante rEhGATA nativa y desnaturalizada por calor. Se muestran los ensayos realizados con concentraciones molares incrementadas, de las sondas mutantes mGATA y sondas no marcadas radiactivamente. B) Ensayos de *supershift*, empleando suero preinmune (PS) y los anticuerpos α-EhGATA. C) Ensayos de *supershift*, empleando extractos nucleares (NE) de trofozoítos, PS y los anticuerpos α-EhGATA. Las cabezas de flecha señalan la formación del complejo EhGATA-DNA (Tomada de Huerta et al., 2020 en prensa).

El escrutinio de los genes que pueden ser modulados por EhGATA, se ha llevado a cabo mediante análisis *in silico*, para identificar secuencias canónicas de unión de proteínas GATA en las regiones promotoras (-500 pb) de genes de *E. histolytica* (Meneses, 2010). A través de esta búsqueda, se encontraron 1,610 genes diana putativos que contienen la secuencia de reconocimiento de las proteínas GATA. Después, mediante el *software* PANTHER, se agruparon los genes predichos en familias de proteínas de *E. histolytica*: proteínas de unión a calcio, chaperonas, proteínas del citoesqueleto, reguladores enzimáticos, hidrolasas, isomerasas, ligasas, liasas, proteínas de tráfico de membranas,

proteínas de unión a ácidos nucleicos, oxido-reductasas y transferasas (Fig. 8) (Huerta et al., 2020 en prensa).

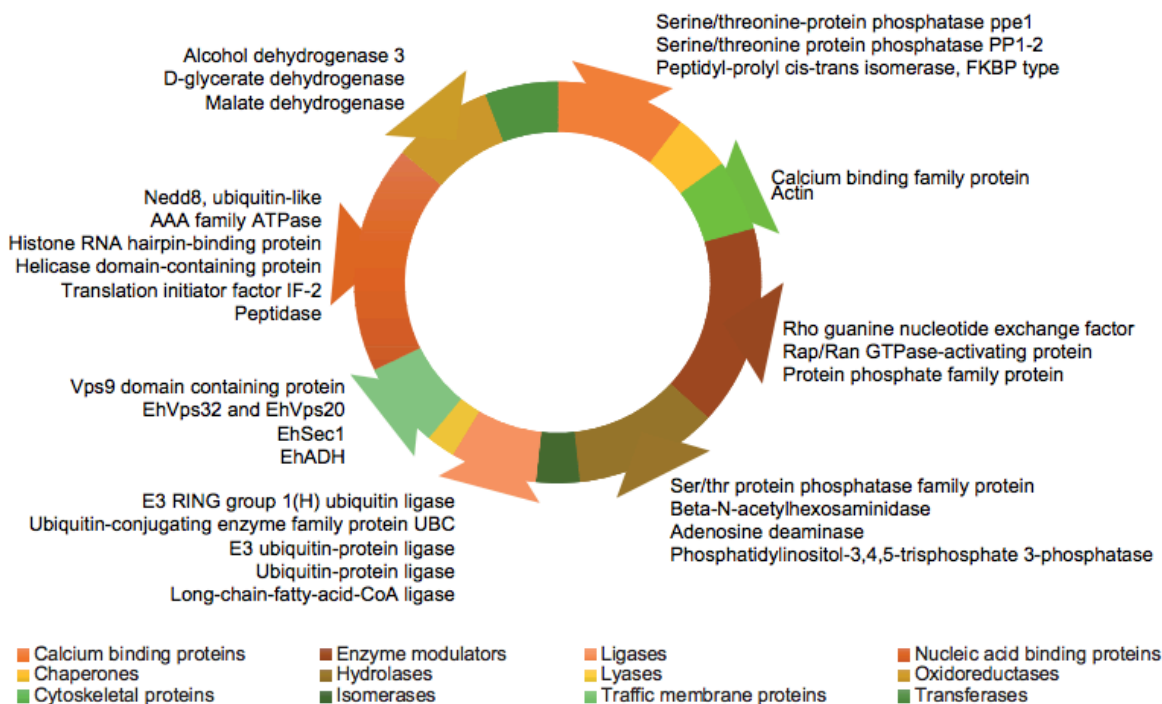


Figura 8. Predicción de genes diana putativos que contienen secuencias consenso de unión para proteínas GATA. La agrupación de los genes se hizo acorde con las familias de proteínas que codifican, utilizando el *software* PANTHER (Tomada de Huerta et al., 2020, en prensa).

En este trabajo, resultó de interés iniciar el estudio de aquellas proteínas que pudieran estar reguladas por EhGATA, como aquellas que participan en el tráfico de membranas y la virulencia del parásito (Fig. 8) (Avalos et al., 2015; Okada et al., 2006; García et al., 1999). Entre estas proteínas se incluyen a la adhesina EhADH y el componente EhVps32 del ESCRT-III, ambos involucrados en la fagocitosis (Bañuelos et al., 2012; Avalos et al., 2015). De acuerdo con trabajos previos, la proteína EhADH contiene un dominio Bro1, característico de las proteínas que son miembro de la familia ALIX, las cuales funcionan como andamios y proteínas multifuncionales (Betanzos et al., 2018). EhADH, además de funcionar en el proceso de adhesión de *E. histolytica*, también es una proteína accesoria del complejo

ESCRT, cuyos componentes son fundamentales durante la fagocitosis (Avalos et al., 2015). Esta proteína se localiza en la membrana citoplásmica y compartimientos endosomales, junto con otros componentes de la maquinaria ESCRT, contribuyendo a la formación de los cuerpos multivesiculares (Bañuelos et al., 2012). Por su parte, Bolaños y col. (2016) demostraron que EhADH se asocia con proteínas del tráfico de colesterol de *E. histolytica* (EhNPC1 y EhNPC2), sugiriendo un papel adicional, relacionado con la absorción y el transporte de colesterol hacia las membranas celulares. Otro estudio reciente, mostró que mediante la utilización de anticuerpos monoclonales contra EhADH (mAbAdh), se inhibe la adhesión de trofozoítos y la fagocitosis en eritrocitos, así como la destrucción de las monocapas de células MDCK (García et al., 1999).

Por otro lado, estudios recientes *in vivo* e *in vitro*, mediante el uso de trofozoítos mutantes de *E. histolytica* y la técnica de vesículas unilamelares gigantes (GUV) con proteínas recombinantes purificadas del ESCRT-III, revelaron que durante la fagocitosis, las proteínas del ESCRT-III residen en las copas fagocíticas y después, se localizan alrededor de los eritrocitos ingeridos. Posteriormente, se les identifica en los fagosomas que contienen eritrocitos, así como en estructuras similares a los cuerpos multivesiculares (Avalos et al., 2015). En las GUV, se demostró que EhVps32 es el componente del ESCRT-III que promueve la formación de los cuerpos multivesiculares. Avalos y col. (2015) proporcionaron, además evidencias de la participación de EhVps32 en la pinocitosis y la fagocitosis. Respecto de esta última, EhVps32 es capaz de formar oligómeros en los fagosomas, sugiriendo que contribuye a la invaginación y escisión de la membrana plasmática, para la formación de vesículas intraluminales. De acuerdo con los resultados abordados anteriormente, el papel clave de EhVps32 en la fagocitosis de *E. histolytica* está respaldado por las siguientes aseveraciones: EhVps32 se localiza en los fagosomas; y además trofozoítos mutantes que sobreexpresan EhVps32, aumenta significativamente la tasa de eritrofagocitosis; en el caso contrario, el silenciamiento de EhVps32 disminuye la tasa de fagocitosis (Avalos et al., 2015).

Curiosamente, EhVps32 y EhADH (como receptor de eritrocitos) interaccionan entre sí, junto con otras proteínas, tales como: la lectina Gal/GalNAc y la actina, durante la fagocitosis de trofozoítos. Además, EhVps32 y EhADH se localizan en los fagosomas ácidos que contienen eritrocitos (Avalos et al, 2015). Por lo tanto, EhADH y EhVps32 pueden tener un papel dinámico en la remodelación de la membrana durante la generación de vesículas intraluminales, en los fagosomas de *E. histolytica*.

Dado que las proteínas EhADH y EhVps32 juegan un papel relevante en diversos procesos relacionados con la virulencia en *E. histolytica*, entre ellos, la fagocitosis, en este trabajo es de gran interés comenzar a conocer los posibles mecanismos de regulación que determinan su expresión. Particularmente, EhGATA se identifica como uno de los candidatos que pudiera estar mediando la expresión de estos y otros genes, a nivel transcripcional.

De esta manera, en este trabajo se profundizó en el estudio y descripción de los mecanismos moleculares relacionados con la regulación génica en *E. histolytica*, lo cual contribuirá con una mejor comprensión de la patogénesis de la amibiasis y en el futuro, a la identificación de nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas para combatirla.

JUSTIFICACIÓN

E. histolytica es el parásito protozoario causante de la amibiasis en humanos, una enfermedad que puede cursar de manera sintomática o asintomática, y que es frecuente en países con altos índices de pobreza y condiciones sanitarias deficientes.

Hasta el momento, son pocos los genes codificantes para factores de transcripción que han sido descritos en *E. histolytica*. Sin embargo, la regulación de la expresión génica mediada por los factores de transcripción, debe ser un evento crítico para la expresión de algunos factores de virulencia que le permiten a la amiba invadir a su hospedero y , evadir la respuesta inmunológica.

Recientemente, se identificó que *E. histolytica* posee un gen que codifica para un posible factor de transcripción de la familia de proteínas GATA. Esta familia de proteínas es muy conservada, ya que se encuentra presente desde eucariotas unicelulares hasta mamíferos, y se ha descrito que participa en la regulación génica de una variedad de procesos celulares, entre ellos la diferenciación celular, el metabolismo, la respuesta a cambios ambientales y la fagocitosis.

Mediante el análisis de regiones promotoras en el genoma de *E. histolytica* (Huerta et al., 2020 en prensa), se presume que EhGATA podría constituir un elemento de regulación, en una gran variedad de genes relacionados con la virulencia de este parásito, siendo de particular interés aquellos que participan en la fagocitosis. En este contexto, las proteínas EhVps32 y EhADH tienen un papel dinámico en la remodelación de la membrana plasmática, durante la generación de vesículas intraluminales en los fagosomas de *E. histolytica*.

Por las contribuciones de las proteínas EhVps32 y EhADH en un evento que ha sido considerado crítico en la virulencia de *E. histolytica*, como lo es la fagocitosis,

se hace necesario iniciar el estudio de la regulación de los genes que las codifican, a nivel transcripcional.

Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con la participación de EhGATA en la regulación génica durante la fagocitosis, sin duda coadyuvará a entender mejor los procesos de patogénesis de *E. histolytica* para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, así como posibles herramientas para controlar la virulencia del parásito y combatir la amibiasis.

HIPÓTESIS

EhGATA participa en la regulación de la expresión de genes relevantes en la virulencia de *E. histolytica*, entre ellos, los genes *Ehvps32* y *Ehadh*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de EhGATA en la regulación de la expresión de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* y determinar sus efectos en la virulencia de *E. histolytica*.

Objetivos particulares

- Caracterizar *in silico* las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* de *E. histolytica*.
- Demostrar que EhGATA se une a los promotores de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*.
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de EhGATA sobre la virulencia de *E. histolytica*.
- Analizar la posible correlación entre la sobreexpresión de EhGATA y la regulación de la expresión de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

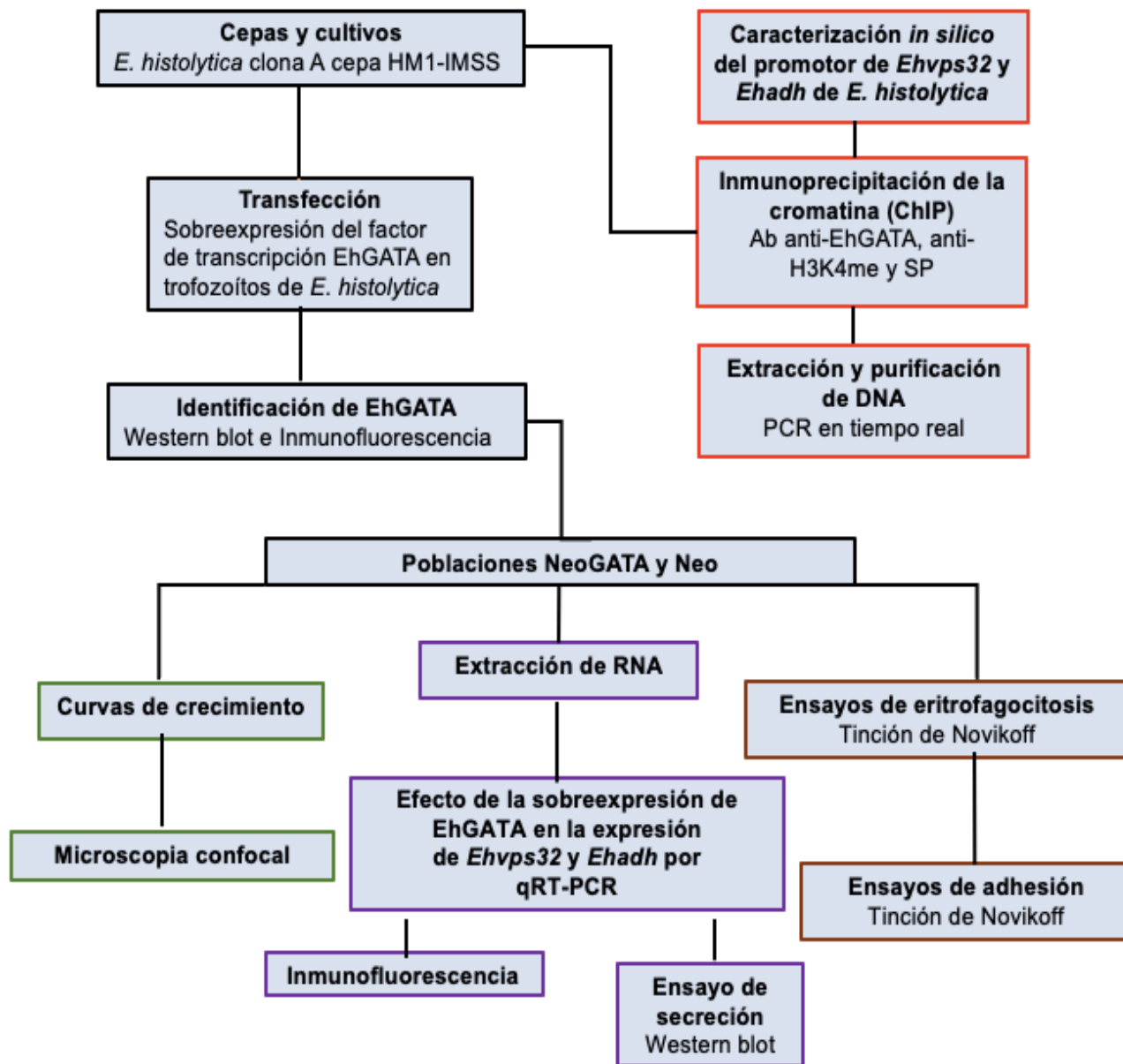


Figura 9. Estrategia experimental. Para demostrar la participación de EhGATA en la regulación de la expresión de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* y determinar sus efectos en la virulencia de *Entamoeba histolytica*, se diseñó una estrategia experimental ordenada en secciones, de acuerdo con los objetivos de este trabajo. Los recuadros remarcados en rojo representan las estrategias abordadas para demostrar *in silico* y experimentalmente que EhGATA se une a la secuencia canónica de reconocimiento de la familia de factores de transcripción GATA, en los promotores de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* de *E. histolytica*. Los recuadros remarcados en negro representan las estrategias realizadas para la obtención de una población de trofozoítos que sobreexpresen EhGATA. Los recuadros remarcados en verde y café, representan las estrategias para determinar el efecto de la sobreexpresión de EhGATA sobre la virulencia de *E. histolytica*. Por último, los recuadros remarcados en morado son las metodologías que se utilizaron para analizar la posible correlación entre la sobreexpresión de EhGATA y la regulación de la expresión de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico*

Para el análisis *in silico* para la caracterización de los promotores del gen *Ehvps32* (EHI_169820) y *Ehadh* (EHI_181220) de *E. histolytica*, se realizó como primer paso la obtención de la secuencia completa del contig donde se localizan cada una de las regiones codificantes de éstos genes, usando la base de datos AmoebaDB <https://amoebadb.org/amoeba/>. Posteriormente se localizaron las regiones promotoras (-1000 pb) con el software editor de plásmidos *ApEPlasmid* (Davis, 2019) y, por último, se buscaron las secuencias consenso reportadas para GATA y para otros factores de transcripción de amiba (Tabla 1) y otros eucariontes (Santa Cruz Biotechnology., 2019) con el software *GENTle* (GENTle, 2019).

Cultivos de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

La clona A cepa HM1:IMSS (Orozco et al., 1985) fue cultivada axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 (TYI-S) (Diamond et al., 1987), suplementado con 20% de suero bovino (ECHITEC-BIO; GIBCO, Invitrogen), 6% de vitaminas de Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de penicilina (Lakside) y 1.4 mg/ml de estreptomycin (Lakside). Una vez que los cultivos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, los trofozoítos se despegaron mediante incubación en hielo durante 10 min. Los trofozoítos se cosecharon mediante una centrifugación a 1,700 rpm durante 7 min a 4°C. Posteriormente, se resuspendió la pastilla de trofozoítos en un volumen deseado para llevar a cabo la cuantificación del número de amibas por mililitro, mediante el conteo de células en la cámara de Neubauer, empleando la siguiente fórmula:

Amibas/ml: amibas (sumatoria de los cuatro cuadrantes) /4 x Factor de dilución

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por RT-qPCR de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*, y para el ensayo de ChIP usando PCR en tiempo real, se utilizó el programa PRIMER 3 <http://primer3.ut.ee/>. A los oligonucleótidos diseñados

se les realizó un análisis de BLAST con el programa BLASTn-NCBI https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch con el objetivo de corroborar que las secuencias de los oligonucleótidos sean específicas para cada región de los genes de interés. Las características, así como las secuencias de los pares de oligonucleótidos utilizados, se muestran en la tabla 2. Para estar seguros de la integridad de los oligonucleótidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para las regiones promotoras de *Ehvps32* y *Ehadh*.

Oligonucleótidos	secuencia	Tamaño y región de amplificación
Promotor <i>Ehvps32</i> (dos sitios) GATA-A (GA)	5' TTTTAAATTTTGGAAATGGTGAA 3' 5' TTTCTTCTGAACCAAGACATTTT 3'	184 pb (-180 a 4)
Promotor <i>Ehvps32</i> GATA-B (GB)	5' ATGAAGAAGCCTCAAGGGAAG 3' 5' CAACAAAATTCCACCATTCCA 3'	133 pb (-226 a -93)
Promotor <i>Ehvps32</i> (dos sitios) GATA-C (GC)	5' CTGCAGGGTTCCAACAATTC 3' 5' CCCTTGAGGCTTCTTCATTG 3'	198 pb (-564 a -336)
Promotor <i>Ehadh</i> (dos sitios) Adh-GA	5' CAACCTATGTCCAATTCTACAATCA 3' 5' TCTGCAGGATCTGACTTTCTCA 3'	283 pb (-247 a 36)
Promotor <i>Ehadh</i> Adh-GB	5' GATGGGGTGAAGGAGACAAT 3' 5' TCCTGAAACACATGAACTACAAA 3'	182 pb (-599 a -781)
ORF- <i>Ehvps32</i>	5' CAGGAGCTGCTCAACATTTAAAGA 3' 5' AGCTGCAGCAAAAGACCTGG 3'	154 pb
ORF- <i>Ehadh</i>	5' TGTTGTTGCATGGCTCTAGG 3' 5' TAGTTGGGCACAATCTGCTG 3'	126 pb

Inmunoprecipitación de la cromatina y PCR cuantitativa en tiempo real (ChIP-qPCR)

Para llevar a cabo el entrecruzamiento (*crosslink*) y estabilizar las interacciones DNA-proteína y proteína-proteína presentes en la cromatina de los trofozoítos de *E. histolytica*, se trataron 1.3×10^7 trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento con formaldehído al 1% durante 20 min a temperatura ambiente (TA) en agitación suave. Para detener el entrecruzamiento se añadió 10% de glicina durante 5 minutos a TA en agitación suave, se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 1,700 rpm por 7 min a 4°C y la pastilla de trofozoítos se resuspendió en un buffer de lisis celular (PIPES 5 mM con pH 8.0, KCl 85 mM y NP-40 al 0.5%). Después se incubaron en hielo por 10 min y cada 3 min durante este tiempo se mezclaron por inversión. Se centrifugaron a 1,700 rpm por 7 min a 4 °C y la pastilla se resuspendió en buffer de lisis de núcleos (Tris-HCl 50 mM con pH 8.1, EDTA 10 mM y SDS al 1%). Se incubó en hielo durante 10 min; para fragmentar la cromatina se sonicaron las muestras durante 15 ciclos (10 seg encendido/ 50 seg apagado) al 60% de amplitud (Sonics vibra cell TM). Se extrajo la cromatina fragmentada y no fragmentada por el método de fenol: cloroformo: isoamílico y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

La cromatina fragmentada se inmunoprecipitó con 4 µg de suero preinmune (SP) como control negativo, y con anticuerpo policlonal de conejo anti- Histona 3 lisina4 trimetilada (α -H3K4me; Abcam) como control positivo y el anticuerpo policlonal de rata anti-EhGATA proporcionado por Huerta y col. (2020 en prensa). Como Input se usó cromatina sin inmunoprecipitar para el control positivo de la qPCR. Las muestras se incubaron a 4 °C toda la noche en agitación rotatoria.

Las muestras inmunoprecipitadas se lavaron con buffer RIPA (Tris-base 50 mM con pH 8.0, NaCl 150 Mm, SDS al 0.1%, desoxicolato de sodio al 0.5% y NP-40 al 1%), después se hicieron dos lavados en buffer de alto contenido de sales (Tris-base 50 mM con pH 8.0, NaCl 500 mM, SDS al 0.1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, EDTA 1 mM y NP-40 al 1%) y un lavado con buffer de LiCl (Tris-base 10 mM con pH 8.0, LiCl 250 mM, SDS al 0.1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, EDTA 1 mM y NP-40 al 1%) por último, dos lavados con buffer TE (Tris-HCl 10 mM con pH 8.0 y EDTA 1

mM con pH 8.0). Todos los buffers se suplementaron con inhibidores de proteasas Complete® (Roche) y 10 mg/ml de PMSF. Entre cada uno de los lavados se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. Los complejos DNA-proteína se trataron con 0.5 µg/ml de RNAsa durante 1 hora a 37 °C; para revertir el entrecruzamiento las muestras se incubaron a 65 °C toda la noche. Para eliminar las proteínas de las muestras, se adicionaron 10 µg/ml de Proteinasa K (Invitrogen) y se incubaron durante 2 horas a 42 °C. Posteriormente, se purificó el DNA utilizando el kit ChIP DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) con las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría a 260/280 en el equipo Nanodrop y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La qPCR se hizo mediante el sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems) usando 10 ng de DNA de ChIP como molde para la reacción de PCR y los oligonucleótidos diseñados específicamente para diferentes secuencias presentes en los promotores de *Ehvps32* y *Ehadh* (ver tabla 2). Las condiciones del ciclado para la qPCR fueron: un paso de desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguido por 50 ciclos (15 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C y 30 seg a 72 °C) y al final se adicionó un paso de disociación. Las PCRs se hicieron por duplicado y se tomaron los valores Ct (threshold cycle) normalizando con el control de amplificación del SPI. Para el análisis de la expresión diferencial se calculó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se utilizaron dos muestras independientes de DNA de ChIP con su replica técnica para el análisis de qPCR.

Intento de silenciamiento del gen *Ehgata*

Para intentar silenciar la expresión del gen *Ehgata*, se utilizó la estrategia de RNA de doble cadena (dsRNA) (Solis et al., 2009). Se amplificó por PCR un fragmento de 400 pb del gen *Ehgata* y se clonó en el plásmido pL4440 para producir dsRNA, cabe señalar que las construcciones fueron proporcionadas por la Dra. Miriam Huerta.

Se usaron células competentes *E. coli* HT115 deficiente en RNAsa III, para llevar a cabo la transformación con DNA plasmídico recombinante mediante choque térmico a 42 °C durante 60 segundos, después se incubaron con medio LB a 37 °C durante

2 horas; las células se sembraron en placas de agar LB que contenían ampicilina (100 µg /ml), tetraciclina (10 µg /ml) incubadas a 37 °C durante toda la noche.

Para la inducción de los dsRNA, se tomaron 5 ml de cultivo y se agregaron a un matraz con 500 ml de medio LB suplementado con ampicilina-tetraciclina en agitación a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, se empastillaron las muestras en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 2,500 rpm por 10 min. La pastilla se resuspendió con el reactivo Trizol® (calculado de la siguiente manera: 1 ml de Trizol por cada 50 ml de cultivo), se homogenizó la mezcla con micropipeta (en este paso se pueden almacenar a -70 °C). Se incubaron 5 min a TA, seguido se agregaron 30 µl de cloroformo, se homogenizó la mezcla en vortex a velocidad media. Se incubó 3 min a TA y se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se formaron dos fases, se separó la fase orgánica o superior a un tubo estéril de 1.5 ml y se adicionaron 80 µl de isopropanol a TA mezclando suavemente por inversión; las muestras se incubaron por 10 min a TA, después se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 75%, en agua con DEPC 0.1% v/v. Se mezcló por inversión, luego se centrifugó 5 min a 13,000 rpm y se repitió el lavado con etanol al 75%. Se retiró el exceso de etanol con la micropipeta, la pastilla se resuspendió en 15 µl de agua DEPC, el RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop y la integridad se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Para la purificación de los dsRNA, el RNA total obtenido, se le dio un tratamiento con RNAsa y DNAsa incubado a 37 °C durante 45 min, después se agregó 100 µl de isopropanol y se incubó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 75% y se resuspendió en agua libre de nucleasas y para ver la integridad del los dsRNA se corrió un gel de agarosa la 1% teñido con bromuro de etidio. Los dsRNA específicos fueron introducidos a los trofozoítos mediante “soaking” a una concentración de 32 µg/ml de dsRNA en 175,000 amibas. Después se realizó una curva de crecimiento por duplicado durante seis días para evaluar su efecto en la proliferación celular de *E. histolytica* y por último, para detectar la expresión de EhGATA se realizaron ensayos

de Western blot con proteínas totales de trofozoítos control (sin dsRNA) y los trofozoítos problema (con dsRNA).

Transformación de células competentes

Las construcciones de los plásmidos pNeo y pNeo*Ehgata* proporcionados por las doctoras Miriam Huerta y Guillermina García, se expandieron mediante la transformación de bacterias *E. coli DH5α* competentes. Se utilizaron 200 µl de bacterias competentes y se agregaron 20 ng del plásmido, se incubaron durante 30 min a 4°C. Después se dio un choque térmico durante 90 seg a 42°C, seguido por una incubación de 3 min a 4°C. Terminando la incubación se añadieron 450 µl de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación constante. Pasado el tiempo, las bacterias transformadas se sembraron en cajas petri con medio LB/agar y ampicilina (100 µg/ml). Por último, los cultivos se incubaron toda la noche a 37°C.

Extracción de plásmidos (método lisis-alkalina)

Se tomaron 1.5 ml de un cultivo saturado de bacterias *E. coli DH5α* transformadas con los plásmidos pNeo y pNeo*Ehgata*, y se centrifugaron a 2,500 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución 1 fría (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM), y se incubó durante 5 min a TA. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de la solución 2 (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) incubando 5 min en hielo; se centrifugo a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 0.8 ml de isopropanol al 100% y se dejó toda la noche a -20 °C. Al otro día, se dio un tratamiento con RNAsa (1U) y luego se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 75% y después se centrifugó bajo las mismas condiciones para finalmente dejar secar la pastilla. La pastilla se resuspendió en 300 µl de agua libre de nucleasas, se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop y se verificó la integridad de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Ya purificados los plásmidos se realizó un ensayo de restricción enzimática, donde se usaron las enzimas *Kpn1* y *BamH1* (Invitrogen)

para corroborar la presencia del inserto (*Ehgata*) en el tamaño esperado. La mezcla de la reacción se realizó de la siguiente manera: 1 µg de plásmido, 1 µl de cada una de las enzimas de restricción, 3 µl de buffer de reacción 4X y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. La reacción se incubó durante toda la noche a 37 °C y los productos se analizaron por electroforesis de agarosa al 1 %. Demostrando que las construcciones estaban integra y con los tamaños esperados se usaron para realizar la transfección en los trofozoítos de *E. histolytica*.

Sobreexpresión del factor de transcripción EhGATA

Con el objetivo de sobreexpresar el factor de transcripción EhGATA, se realizó una transfección y pNeo*Ehgata* (proporcionado por Huerta Miriam) en trofozoítos de *E. histolytica*. Como control se usó el plásmido pNeo vacío. Se colocaron 3×10^5 amibas en una placa de cultivo celular de seis pozos y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las amibas se lavaron con 5 ml de medio M199 (Sigma) precalentado y se cultivaron con 2 ml de medio M199 suplementado con 25 % de suero bovino (ECHITEC-BIO; GIBCO, Invitrogen). A los cultivos se les añadió lentamente la mezcla de transfección (20 µg de plásmido, 100 µg de medio M199 precalentado y 20 µg de Superfect [Quiagen]) se dejaron las amibas en una incubadora con 5% de CO₂ a 37 °C durante 4 horas. Después, las amibas transfectadas se incubaron 10 min en hielo para despegarlas y cambiarlas en tubos con medio TYI-S, para posteriormente ir subiendo las concentraciones de antibiótico de selección cada 18 horas hasta demostrar la sobreexpresión, en el caso de esta transfección se usó hasta 20 µg ml⁻¹ de G418 y se mantuvieron los cultivos estables (poblaciones transfectadas de *E. histolytica* Neo y NeoGATA). La sobreexpresión de EhGATA en los trofozoítos NeoGATA se confirmaron mediante ensayos de Western blot e Inmunofluorescencia.

Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Para la extracción de proteínas totales, los trofozoítos se cosecharon cuando alcanzaron la fase logarítmica como se describió anteriormente. Después se hicieron dos lavados con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 1,700 rpm durante 7 min a 4°C. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en p-hidroximercuribenzoato (PHMB); 1 ml por cada 15×10^6 de células y también 20.5 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasa (PMSF 100 mM; Benzamidina 100 mM; Aprotinina 10 mg/ml; Pepstatina 1 mg/ml; leupeptina 10 mg/ml y E-64 1 mg/ml) por cada 500 μ l de volumen final. La lisis celular se llevó a cabo congelando la muestra en Nitrógeno líquido por 10 min. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y los extractos se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Los extractos proteicos totales de amiba se analizaron en geles SDS-PAGE al 12% y la electroforesis se llevó a cabo a 120 V. Para determinar el peso molecular de las proteínas de interés, se usaron marcadores de peso molecular conocidos y preteñidos (Bio-Rad Dual Color). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 al 0.05%, metanol al 5% y ácido acético al 10%) durante 30 min. Posteriormente, se destiñeron los geles en una solución que contiene metanol al 5% y ácido acético al 7%, se hicieron varios cambios de esta solución hasta que fueran visibles y definidas las bandas de proteínas.

Ensayo de Western blot

Después de someter los extractos proteicos a un análisis en SDS-PAGE, los geles se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 9 M, Glicina 1 M y metanol 20%). Después se armó la unidad de transferencia tipo “sándwich” de la siguiente manera: base negra, fibra absorbente, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro, fibra absorbente y base blanca; se montó la unidad, de forma que la base negra estuviera colocada en el ánodo, dejando así la membrana de nitrocelulosa orientada hacia el cátodo. La unidad se colocó en una cámara de

electrotransferencia (Mini Trans-Blot®, Bio-Rad), luego se adicionó buffer de transferencia frío y se colocó en un baño de hielo y un agitador magnético para dispersar la temperatura en toda la cámara y evitar que se degraden las proteínas. La transferencia se realizó a 400 mA durante 75 min. Después de la transferencia se desmontó la cámara y el resto de los componentes para que la membrana de nitrocelulosa se tiñera con la solución rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% v/v y ácido acético 1% v/v) con la finalidad de verificar que se llevará a cabo correctamente la transferencia a la membrana. La membrana fue desteñida rápidamente con buffer de transferencia y se incubó en una solución de bloqueo (leche baja en grasas al 5%) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de rata anti-EhGATA proporcionado por Huerta y col., 2020 (en prensa) con una dilución 1: 150, el anticuerpo policlonal de ratón anti-actina proporcionado por el Dr. Manuel Hernández del departamento de biología celular con una dilución de 1: 3,500) suspendidos en solución bloqueadora durante toda la noche a 4 °C. Al otro día, la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween al 1% por 5 min cada lavado, posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti- IgG de rata o ratón 1: 10,000 acoplados a peroxidasa) incubado durante dos horas a TA, después se realizaron tres lavados de la misma forma que los anteriores; para visualizar la unión antígeno-anticuerpo se reveló con el sistema ECL (GE-Healthcare) utilizando el equipo MicroChemi (DNR Bio-Imaging Systems Ltd).

Ensayos de Inmunofluorescencia

Se cultivaron los trofozoítos NeoGATA (sobreeexpresa EhGATA) y Neo (control) en cubreobjetos en una concentración de 1.25×10^5 trofozoítos en 100 μ l, se incubaron a 37°C durante 20 min para permitir la adhesión de los trofozoítos al vidrio. Posteriormente se añadieron 2 ml de medio TYI incompleto y se incubaron 2 horas a 37°C. Posteriormente las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) a 37°C durante 1 hora, se lavó con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% durante 15 min. Se hizo otro lavado con PBS y se bloqueó con albumina de suero bovino al 1 % (BSA) 10 mg/ml durante 1 hora. Después se añadieron los

anticuerpos primarios policlona de rata anti-EhGATA 1:10 (Huerta et al., 2020 en prensa), policlona de ratón anti-EhADH 1:25 (Montaño y col., 2017) y policlona de ratón anti-EhVps32 1:100 (Avalos Padilla, 2015) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubaron una hora con los anticuerpos secundarios anti-rata acoplados a TRITC (rojo) y anti-ratón acoplados a FITC (verde) a una dilución 1:100 durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS y posteriormente para teñir los núcleos de las células se incubaron con DAPI (decolorhidrato de 4',6-diamido-2-fenilindo) durante 6 min a TA, seguidos de tres lavados con PBS para eliminar el exceso de DAPI. Las muestras se colocaron sobre porta objetos limpios y estériles, adicionando 10 µl de medio de montaje Vectashield®. Las preparaciones se guardaron a 4 °C hasta su uso. Para analizar las muestras se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 Imager y el análisis se hizo con el software proporcionado por el fabricante (ZEN 2009 Light Edition de Zeiss). Para evaluar la intensidad de fluorescencia se usó el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) de 60 amibas al azar, provenientes de diferentes campos obtenidos en tres ensayos independientes.

Curva de crecimiento

De las poblaciones de trofozoítos Neo y NeoGATA, se partió de 1.25×10^4 trofozoítos como inóculo inicial en 12 tubos por duplicado de tres ensayos independientes, con medio selectivo que contenía 20 µg/ml de G418 durante 120 horas a 37°C. Las células de cuantificaron cada 24 horas en una cámara de Neubauer al microscopio óptico y para discriminar a las amibas muertas de las vivas se uso azul de tripano (2%) con una relación 1:1.

Obtención de eritrocitos humanos

Eritrocitos humanos se aislaron a partir de 3 ml de sangre periférica obtenida por punción venosa, a los cuales se le agregaron 3 ml de solución Alsever (0.275 g de ácido cítrico, 4 g de citrato de sodio, 2.1 g de cloruro de sodio, 10.25 g de dextrosa pH 6.1) utilizado como anticoagulante. La sangre fue centrifugada a 2,000 rpm

durante 10 min y la pastilla se lavó tres veces con la solución Alsever. Los eritrocitos obtenidos fueron suspendidos en medio TYI sin suero quedando a una concentración final de 1×10^8 cel/ml. En caso de usarse inmediatamente se incubaron a 37°C o bien, fueron guardados a 4°C hasta por un mes.

Ensayos de eritrofagocitosis y adhesión

Para medir la capacidad de fagocitar y adherir eritrocitos, las poblaciones de trofozoítos Neo y NeoGATA, se incubaron con eritrocitos humanos (relación 1:25) durante 5 y 10 min a 37°C y en el caso de adhesión a 4°C. Posteriormente, se lisaron los eritrocitos no fagocitados o no adheridos dependiendo sea el caso con agua estéril fría y se mezcló suavemente, se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 1,700 rpm por 7 min a 4°C y en el caso del ensayo de adhesión a 1,000 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante con una bomba de vacío. Se pueden dejar almacenadas a 4°C en PBS durante un mes o bien agregar la solución que se requiera para el experimento posterior.

Tinción de Novikoff

Después de haber realizado los ensayos de eritrofagocitosis y adhesión, se fijaron las muestras con 1 ml de glutaraldehído al 2% incubadas por 1 hora a 37 °C en baño maría. Se lavaron dos veces con PBS y entre cada lavado se centrifugaron a 1,000 rpm por 10 min a 4 °C. Posteriormente, a la pastilla se agregaron 1 ml de solución de tinción Novikoff que contiene: 2 mg de diaminobenzidina/ml en la solución amortiguadora (2-amino-2-metilpropanodiol 0.05M (5.25 g/L) pH 7) y H₂O₂ al 30% por cada 10 ml de solución. Se incubaron a 37 °C en baño maría por 30 min, durante este tiempo cada 10 min se mezclaron las muestras suavemente. Se lavaron dos veces con PBS y entre cada lavado se centrifugaron a 1,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se montó la muestra en porta objetos, contando 100 o más trofozoítos al azar por triplicado de experimentos independientes en cada uno de los tiempos para finalmente sacar el promedio de los eritrocitos fagocitados o adheridos.

Extracción de RNA total de amiba

Los trofozoítos transfectados (Neo y NeoGATA) se cosecharon como se ha mencionado anteriormente, se lavaron con PBS frío y se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min en cada lavado. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó el reactivo Trizol[®] (200 μ l/1 x 10⁶), se homogenizo la mezcla con micropipeta (en este paso se pueden almacenar a -70 °C). Se incubaron 5 min a TA, seguido se agregaron 30 μ l de cloroformo, se homogenizo la mezcla en vortex a velocidad media. Se incubo 3 min a TA y se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se formaron dos fases, se separó la fase orgánica o superior a un tubo estéril de 1.5 ml y se adicionaron 80 μ l de isopropanol a TA mezclando suavemente por inversión; las muestras se incubaron por 10 min a TA, después se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se lavó la pastilla con 500 μ l de etanol al 75%, en agua con DEPC 0.1% v/v. Se mezcló por inversión, luego se centrifugó 5 min a 13,000 rpm y se repitió el lavado con etanol al 75%. Se retiró el exceso de etanol con la micropipeta, la pastilla se resuspendió en 30 μ l de agua DEPC, el RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop y la integridad se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

qRT-PCR

La qRT-PCR se realizó mediante el método de un solo paso con el kit (One-step NZY qRT-PCR Green ROX plus; NZYTech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se hicieron por duplicado y se montaron en el equipo Real-Time PCR (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclado fueron: la retrotranscripción a 42°C durante 5 min, un paso de desnaturalización a 95 C por 3 min, seguido de 40 ciclos (3 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C) y un paso de disociación (10 min a 72°C). Los oligonucleótidos empleados para los genes de interés (*Ehvps32* y *Ehadh*) se muestran en la tabla 2. El gen s2 de la subunidad ribosómica 40s se usó como control interno. Los valores de Ct se utilizaron para normalizar los genes de interés con el control interno. La expresión diferencial se

calculó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se realizaron tres ensayos independientes con su replica técnica para el análisis de qRT-PCR.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo en el software Prism8 (GraphPad), empleando la prueba estadística se hicieron *t-Student* para muestras pareadas. Los datos con * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, se consideraron significativas.

RESULTADOS

Caracterización *in silico* de las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* de *E. histolytica*

Recientemente, se identificó que *E. histolytica* posee un gen que codifica para un posible factor de transcripción de la familia de proteínas GATA (Huerta et al., 2020 en prensa). Los factores de transcripción GATA pertenecen a la familia con dominios de dedos de zinc (ZFDB) y reconocen a la secuencia consenso (A/T) GATA (A/G) (Huaqing, 2015). Algunas de las características que distinguen a esta familia, es que en un solo organismo puede contener más de un miembro. Por lo tanto, la familia GATA son factores de transcripción muy conservados, ya que se encuentran presentes desde eucariotas unicelulares hasta mamíferos. Además, se ha descrito que participan en la regulación génica de una variedad de procesos celulares, entre ellos la diferenciación celular, el metabolismo, la respuesta a cambios ambientales y la fagocitosis, que son funciones relevantes para la viabilidad celular (Balaji et al., 2015; Gupta et al., 2017; Hive et al., 2020; Valanne et al., 2018).

De acuerdo con los análisis *in silico* de regiones promotoras en el genoma de *E. histolytica*, realizados por Huerta y col. (2020, en prensa), se identificó que el 26% de los genes en este parásito contiene secuencias para la posible unión de EhGATA. Es de llamar la atención la presencia de estas secuencias en una familia diversa de genes relacionados con la virulencia del parásito. Particularmente, se identificaron algunos genes ampliamente asociados con el mecanismo de fagocitosis, como *Ehvps32* y *Ehadh*. Debido a las contribuciones de estas dos proteínas en dos eventos considerados críticos en la virulencia de *E. histolytica*, como lo es la fagocitosis y la adhesión, se analizó a nivel transcripcional la regulación de los genes que las codifican.

Primeramente, se analizó la estructura de los promotores de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*, utilizando las secuencias completas, obtenidas de la base de datos

AmoebaDB. Se tomaron en consideración 1,000 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, para analizar la región promotora mediante el uso del *software* ApePlasmid (Davis, 2019), el cual permitió editar y seleccionar las regiones promotoras y excluir la región codificante de cada uno de los genes de interés. Posteriormente, mediante el uso del *software* GENTle (Manske, 2019), se identificaron en los promotores *Ehvps32* y *Ehadh*, secuencias consenso para factores de transcripción reportados en *E. histolytica* (Tabla 1) y en otros eucariontes (Santa Cruz Biotechnology, 2019).

El análisis *in silico* de la estructura del promotor *Ehvps32* (Fig. 10A), reveló varias secuencias consenso de unión a diversos factores de transcripción, como TCF-1, GAAC, C/EBP, STAT, Hox, GATA, P53 y Myb, entre otras. Tomando en cuenta que usualmente los promotores de otros eucariontes poseen secuencias TATA, Inr y GAAG, para reclutar la maquinaria basal de la transcripción (Claros, 2020), cabe destacar que el promotor *Ehvps32* carece de cajas TATA y secuencias Inr, señalando que éste es un promotor atípico. A pesar de ello, se encontraron siete sitios para una posible interacción con EhGATA, ubicados en las posiciones -968 a -961; -505 a -201; -318 a -312; -294 a -288; -192 a -186; -123 a -117; y -112 a -105 pb (Fig. 10A).

Por otra parte, en la estructura del promotor del gen *Ehadh* (Fig. 10B) con un tamaño de 1,000 pb río arriba de la secuencia de inicio de la transcripción, se identificaron varias secuencias consenso para la posible unión a diversos factores de transcripción, entre ellas secuencias para STAT, GATA, Hox, C/EBP, P53, TCF1 y GAAC, entre otras. El promotor del gen *Ehadh* no exhibió cajas TATA ni secuencias Inr, por ello también consideramos que es un promotor atípico. Particularmente, se encontraron tres sitios de unión para EhGATA, localizados en -232 a -225; -93 a -87; y -14 a -6 pb (Fig. 10B).

Acorde con el análisis *in silico*, mostramos que los promotores de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* contienen secuencias consenso para una posible interacción con EhGATA.

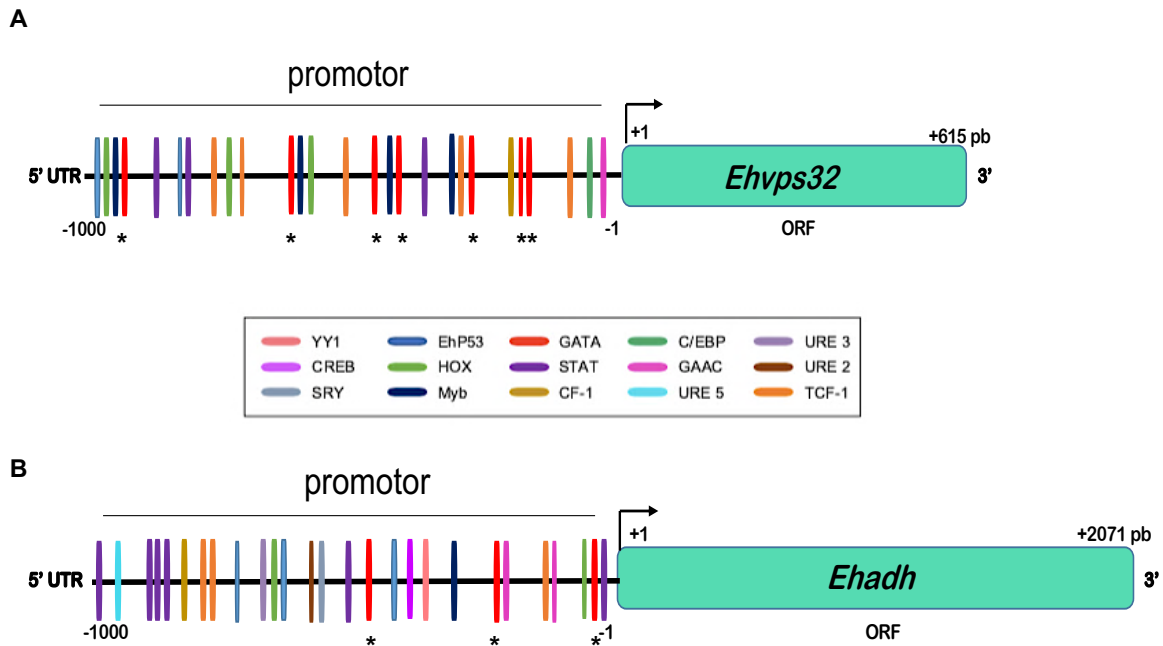


Figura 10. Estructura de la región promotora de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*. Estructuras de los promotores (A) *Ehvps32* y (B) *Ehadh*, representadas en un diagrama de tubo, donde las barras de colores representan cada una de las secuencias consenso putativas para la unión a factores de transcripción. Las barras de color rojo representan específicamente los sitios de unión para EhGATA y además, están señaladas con (*).

Unión de EhGATA a secuencias consenso presentes en los promotores *Ehvps32* y *Ehadh*

Los hallazgos anteriores sugieren que EhGATA puede unirse a los promotores *Ehvps32* y *Ehadh*, por lo que para demostrarlo experimentalmente llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) (Das et al., 2004), en combinación con experimentos de amplificación por PCR en tiempo real (Visa & Jordán, 2018). Esta metodología mixta, prevé la amplificación de las secuencias a las cuales se haya unido específicamente EhGATA, ya que ChIP es una herramienta útil para hacer estudios *in vivo* de las interacciones de la cromatina con otras proteínas y regiones de DNA. En este caso, esta metodología consiste en

aislar la cromatina, estabilizar las interacciones DNA-proteína y usar un anticuerpo que reconozca un antígeno presente en EhGATA, quien estará interaccionando con secuencias de DNA específicas, en los promotores *Ehvps32* y *Ehadh*.

Para este experimento, se utilizó cromatina de *E. histolytica*, fragmentada en segmentos de 300 a 1,000 pares de bases mediante el método de sonicación (Fig. 12A), un anticuerpo policlonal anti-EhGATA obtenido mediante la inmunización de ratas con la proteína recombinante rEhGATA y proporcionado por Huerta y col. (2020 en prensa), así como pares de oligonucleótidos específicos que amplifican las regiones consenso GATA, en cada uno de los promotores de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* (Fig. 11). En el caso del promotor del gen *Ehvps32*, se seleccionó la región promotora de -564 a 4 pb, pues contiene sitios de unión a EhGATA, y se diseñaron tres pares de oligonucleótidos para su amplificación. En tanto que para amplificar la región de -781 a 36 pb del promotor del gen *Ehadh*, que contiene tres sitios de unión a EhGATA, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos (Tabla 2). En este tipo de ensayos se suelen utilizar al menos dos controles, uno de ellos, fue el empleo del anticuerpo policlonal de conejo contra la histona 3 lisina 4 trimetilada (anti-H3K4 m3; Abcam). La pertinencia en el uso de este anticuerpo, radica en que la cromatina está compuesta por histonas y la marca trimetilada es característica de genes transcripcionalmente activos (Dillom et al., 2005); además, ya está estandarizado el uso de este tipo de control, para el protocolo ChIP (Visa & Jordán, 2018). En esta caso se espera que toda la cromatina sea inmunoprecipitada con anti-H3K4 m3, y se obtenga DNA de todas las regiones promotoras incluyendo la de los genes de interés. El otro control es el suero preinmune (SP) de ratas, obtenido antes de la inmunización con la proteína rEhGATA. Este control permite descartar las uniones DNA-proteína no específicas. El control de SP y el Input (cromatina sin inmunoprecipitar), se utilizaron para normalizar los resultados de amplificación de las regiones promotoras mediante PCR en tiempo real. Este ensayo de PCR cuantitativa, permite comparar las regiones promotoras de todo el genoma de la célula con las regiones promotoras de interés, y demostrar si hay una amplificación evidente de la región promotora problema, que no sea producida por contaminantes en las muestras.

El DNA obtenido a partir de los inmunoprecipitados, empleando los anticuerpos anti-EhGATA y anti-H3K4 m3, o el suero pre inmune, se sometió a amplificación mediante ensayos de PCR en tiempo real, utilizando los distintos juegos de oligonucleótidos específicos de las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* (Fig. 11 y Tabla 2).

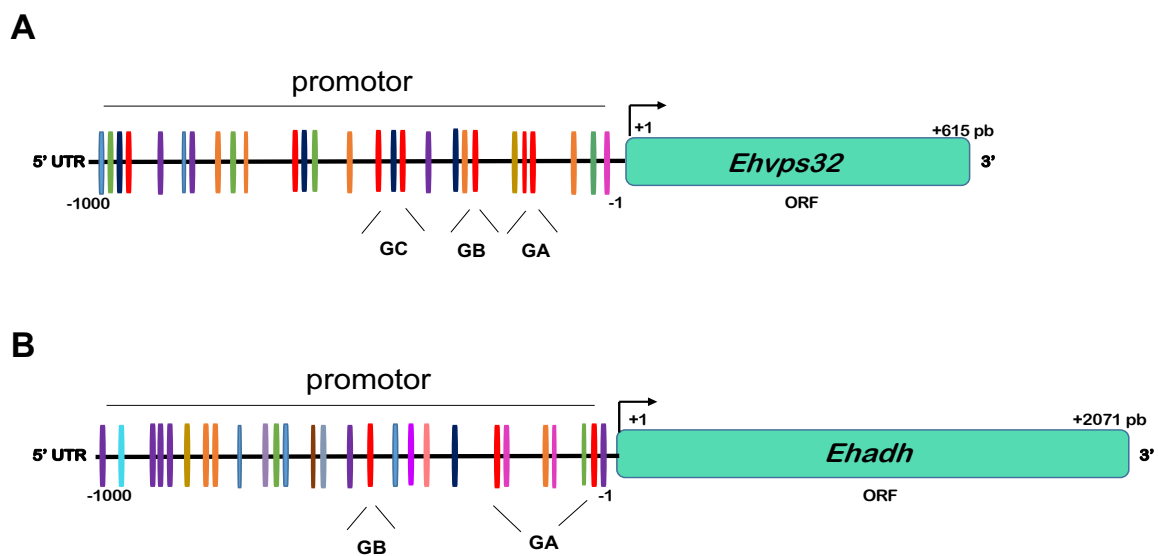


Figura 11. Esquema de los sitios de amplificación de las regiones promotoras de *Ehvps32* y *Ehadh*. A) Estructura de la región promotora del gen *Ehvps32*, donde se indica las regiones que se utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos, diferenciadas con la nomenclatura GA (que abarca dos sitios de unión a EhGATA), GB (que contiene un sitio de unión a EhGATA) y GC (con dos sitios de unión a EhGATA). B) Estructura de la región promotora del gen *Ehadh*, donde se indican las regiones que se utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos, diferenciadas con la nomenclatura GA (conteniendo dos sitios de unión a EhGATA) y GB (con un sitio de unión a EhGATA).

De acuerdo con los resultados de ChIP-qPCR, encontramos que en las muestras de cromatina fragmentada sin inmunoprecipitar (Input), se amplificaron todas las regiones de los promotores de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*, en los sitios donde se localizan secuencias de unión para EhGATA (Fig. 12B). Este control interno del experimento, permitió evidenciar amplificaciones eficientes y el funcionamiento adecuado de los oligonucleótidos diseñados. En las muestras de cromatina

fragmentada e inmunoprecipitada con anti-H3k4 m3 (Abcam), se amplificaron la mayoría de las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* (GA, GB y GC) y *Ehadh* (GA), excepto la región promotora GB del gen *Ehadh*. Esta región podría tener una estructura laxa, libre de histonas e inactiva transcripcionalmente, o posiblemente, la modificación postraduccional (metilación) no está presente en esta región específica. Por último, en las muestras correspondientes a la cromatina fragmentada e inmunoprecipitada con anti-EhGATA, se amplificó la mayoría de las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* (GA, GB y GC) y *Ehadh* (GB), excepto la región promotora GA del gen *Ehadh*.

En conjunto, estos resultados demuestran que el factor de transcripción EhGATA se une *in vivo* a las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* y por ello, podría regular la expresión de ambos genes, a nivel transcripcional.

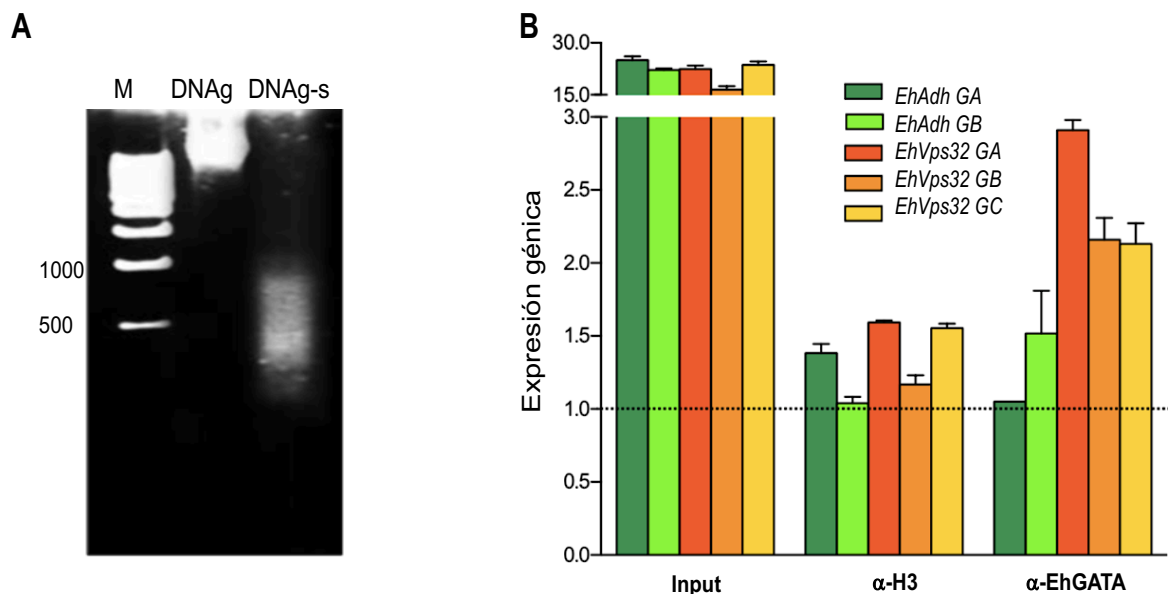


Figura 12. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, en combinación con experimentos de PCR en tiempo real (ChIP-qPCR).

A) Gel de agarosa al 1% que muestra la cromatina íntegra (DNAg) y la cromatina fragmentada por sonicación de 300 a 1,000 pb (DNAg-s). B) Ensayos de ChIP en combinación con amplificación por PCR en tiempo real, realizados a partir de la cromatina fragmentada sin inmunoprecipitar (Input) e inmunoprecipitada (con anticuerpos α -EhGATA y α -H3K4 m3). El DNA de las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* y *Ehadh* que se amplificó en cada caso, fue normalizado respecto del DNA obtenido de la inmunoprecipitación con el suero preinmune (representado con la línea discontinua). Los niveles relativos de amplificación se

calcularon mediante el método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes por duplicado y cada uno con su replica técnica.

Intento de silenciamiento del gen *Ehgata* en trofozoítos de *E. histolytica*

Para ampliar la caracterización funcional de EhGATA en *E. histolytica* iniciada por Huerta y col. (2020, en prensa), primero intentamos silenciar la expresión del gen *Ehgata* utilizando la estrategia de RNA de doble cadena (dsRNA) (Solis et al., 2009). Amplificamos por PCR un fragmento de 400 pb del gen *Ehgata* y lo clonamos en el plásmido pL4440 para producir dsRNA. Los dsRNA específicos fueron introducidos a los trofozoítos mediante “soaking” y posteriormente, evaluamos su efecto en la proliferación celular. Las curvas de crecimiento fueron similares entre los trofozoítos control y los trofozoítos con dsRNA para *Ehgata* (Fig. 13A). Adicionalmente, realizamos ensayos de Western blot con proteínas totales de cada uno de los trofozoítos (control y con dsRNA para *Ehgata*), para detectar los niveles de expresión de EhGATA, usando anticuerpos policlonales de rata anti-EhGATA. En estos ensayos tampoco encontramos diferencias significativas de la expresión de EhGATA en ambas poblaciones de trofozoítos (Fig. 13B). En estas condiciones y empleando esta metodología de silenciamiento, podemos concluir que fuimos incapaces de silenciar el gen *Ehgata*. En otros organismos, las proteínas GATA existen como familias y regulan la expresión de genes implicados en funciones vitales. Por tanto, es posible que siendo *Ehgata* el único gen presente en el genoma de *E. histolytica*, su silenciamiento resulte determinante para la viabilidad en los trofozoítos y por eso eviten a toda costa su eliminación.

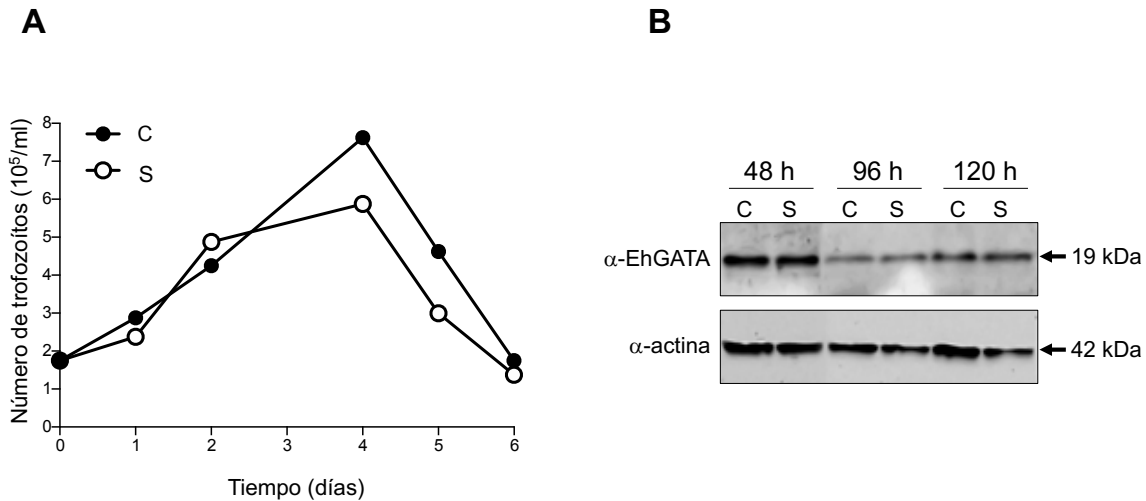


Figura 13. Intento de silenciamiento de *Ehgata* en trofozoítos de *E. histolytica*.
 A) Curvas de crecimiento de los trofozoítos control (C) y con dsRNA para silenciar el gen *Ehgata* (S). El número de trofozoítos vivos en los tubos de cultivo se contaron durante seis días consecutivos, por duplicado. B) Western blot de las proteínas totales de los trofozoítos control (C) e incubados durante 48, 96 y 120 h con dsRNA de *Ehgata* (S), utilizando anticuerpos anti-EhGATA (α -EhGATA) y anti-actina (α -actina). Las flechas del extremo derecho señalan el peso molecular en kDa de EhGATA y actina (como control de carga).

Sobreexpresión de la proteína EhGATA en trofozoítos de *E. histolytica*

De manera alternativa, se generó una población de trofozoítos que sobreexpresaran el factor de transcripción EhGATA, utilizando ensayos de transfección de trofozoítos con el plásmido conteniendo el gen de interés.

Los plásmidos pNeo (vacío) y pNeo*Ehgata* (con la secuencia completa del gen *Ehgata*, Fig. 14A) se expandieron para contar con suficiente concentración de DNA plasmídico, empleado en los ensayos de transfección. Para ello, los plásmidos se transformaron en células competentes (*E. coli DH5-alfa*) y las colonias bacterianas se analizaron mediante PCR-colonia. Se obtuvieron tres colonias positivas, donde se observó la amplificación del gen *Ehgata* de 492 pb (Fig. 14B). La integridad de ambos plásmidos también se verificó mediante restricción enzimática. En este caso, se observaron las diferentes conformaciones de los plásmidos pNeo (tamaño de 6.4 kb) y pNeo*Ehgata* (tamaño de 6.9 kb) sin digerir, así como la digestión de este último

plásmido con las enzimas de restricción *Kpn1* y *BamH1*, donde se puede ver la liberación del gen *Ehgata* (Fig. 14C).

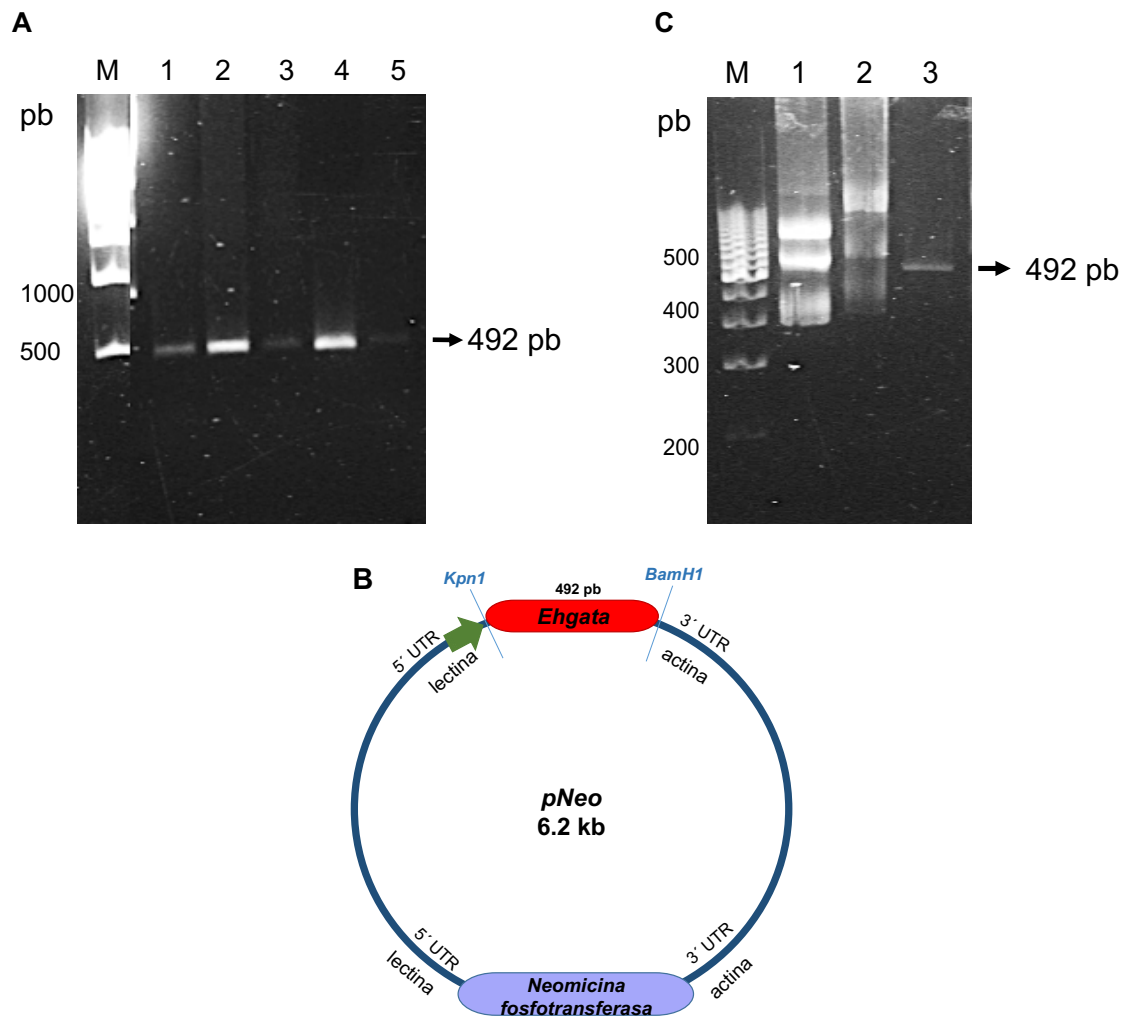


Figura 14. Análisis de la integridad de los plásmidos pNeo y pNeoEhgata. A) Esquema de la construcción del plásmido pNeo con el gen *Ehgata*. B) Gel de agarosa al 1% mostrando los resultados de los ensayos de PCR-colonia. Amplificación del gen *Ehgata* (492 pb) en las colonias positivas (carriles 1 a 3). Como control positivo se usó el plásmido purificado pNeoEhgata como DNA molde (carril 4) y para el control negativo se usó agua (carril 5). C) Gel de agarosa al 1% que muestra los resultados de los ensayos de restricción enzimática. Carril 1, plásmido pNeo. Carril 2, plásmido pNeoEhgata. Carril 3, plásmido pNeoEhgata digerido con las enzimas *Kpn1* y *BamH1*. M, marcadores de talla molecular.

Una vez verificada la identidad de los vectores, transfectamos las construcciones pNeo (control) y pNeoEhgata en los trofozoítos y la selección de los parásitos que incorporaron a los vectores se llevó a cabo con G418, a una concentración de 20 µg/ml. Se generaron dos poblaciones estables de trofozoítos, los cuales se

nombraron Neo (contienen el plásmido vacío) y NeoGATA (sobreexpresa el factor de transcripción EhGATA). Para determinar los niveles de expresión de EhGATA en las dos poblaciones de trofozoítos que resultaron de la transfección, se realizaron ensayos de Western blot, utilizando extractos proteicos totales de los trofozoítos Neo y NeoGATA. Las proteínas totales de ambas poblaciones se separaron mediante SDS-PAGE y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, teñida con rojo de Ponceau. En estas membranas se pudo comprobar la integridad de las proteínas totales de ambas poblaciones, así como la misma concentración proteica. Mediante el uso de anticuerpos anti-EhGATA de rata generados por nuestro grupo de investigación (Huerta et al., 2020 en prensa), detectamos a la proteína EhGATA con un peso de 19 kDa (Fig. 15B). Como control se detectó la proteína actina de 42 kDa, usando anticuerpos anti-actina de ratón. En la población de trofozoítos NeoGATA se vio más abundante la expresión de la proteína EhGATA, en comparación con los trofozoítos Neo. Para demostrar cuantitativamente la sobreexpresión de EhGATA en la población NeoGATA, se hizo un análisis de densitometría, usando el programa ImageJ y normalizando los datos con los niveles de expresión de actina. El análisis estadístico demostró que EhGATA se sobreexpresa, al menos dos veces más en los trofozoítos NeoGATA, en comparación con los trofozoítos Neo (Fig. 15C).

Con estos hallazgos, podemos afirmar que fuimos capaces de generar poblaciones de trofozoítos que sobreexpresan a la proteína EhGATA.

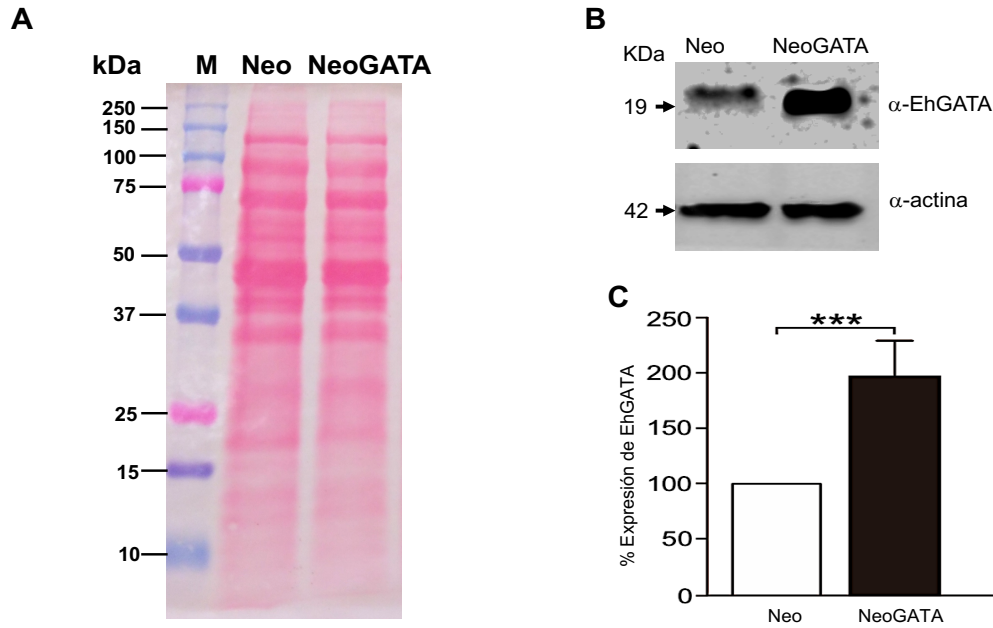


Figura 15. Determinación de los niveles de expresión de la proteína EhGATA en los trofozoítos Neo y NeoGATA. A) Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. M, marcador de peso molecular. Neo y NeoGATA: proteínas totales de los trofozoítos transfectados con los plásmidos pNeo y pNeoEhgata, respectivamente. B) Western blot de las proteínas totales de los trofozoítos Neo y NeoGATA, utilizando anticuerpos anti-EhGATA (α -EhGATA) y anticuerpos contra actina (α -actina). Las flechas del extremo izquierdo señalan el peso molecular en kDa de EhGATA y actina. C) Expresión de EhGATA determinada con base en análisis densitométricos de las bandas de EhGATA y actina entre las poblaciones Neo y NeoGATA. Los datos son provenientes de tres ensayos independientes por duplicado, se normalizaron respecto de los valores de Neo y se calculó la significancia con una prueba estadística tipo *t-Student* $p < 0.001$ ***. La gráfica y el análisis estadístico se llevó a cabo en el programa *GraphPad Prism 8*.

Localización de EhGATA en trofozoítos que sobreexpresan esta proteína

Una vez confirmada la sobreexpresión de EhGATA en los trofozoítos NeoGATA, iniciamos la caracterización de los trofozoítos transfectados, mediante ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización celular de EhGATA, utilizando anticuerpos anti-EhGATA. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que EhGATA se localizó en el citoplasma y núcleo de los trofozoítos Neo y NeoGATA (Fig. 16A). De acuerdo con las micrografías, no hubo diferencias en la localización celular de EhGATA entre las dos poblaciones; sin embargo, se detectaron diferencias cualitativas respecto de la intensidad de la fluorescencia. La observación

de distintos campos reveló que la población NeoGATA exhibía cualitativamente una mayor señal de fluorescencia correspondiente a la proteína EhGATA, en comparación con la población Neo. Por lo tanto, se cuantificó la intensidad de fluorescencia en 20 campos, mediante el programa ImageJ. Los resultados demostraron que los trofozoítos NeoGATA exhibieron en promedio hasta dos veces más intensidad de fluorescencia que los trofozoítos Neo (Fig. 16B); lo que confirma la sobreexpresión de la proteína EhGATA en los trofozoítos NeoGATA, previamente validada por los ensayos de Western blot.

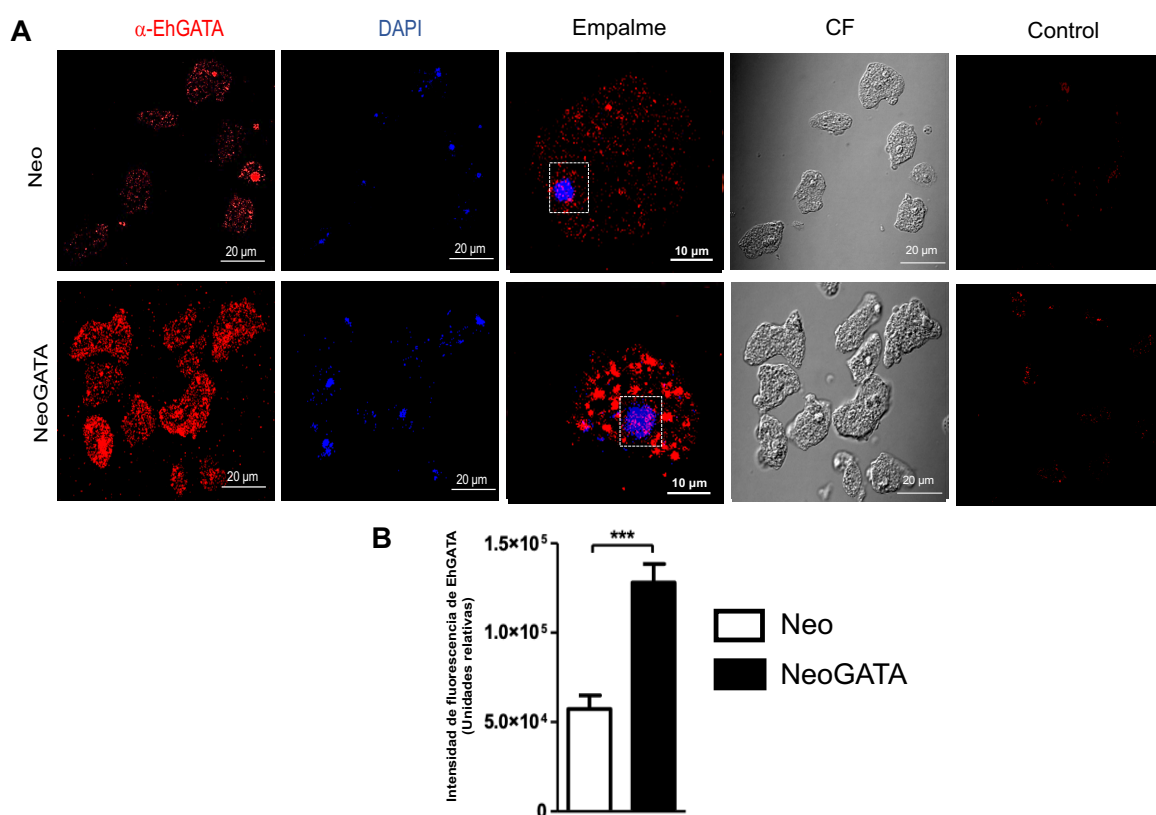


Figura 16. Localización subcelular de EhGATA en los trofozoítos Neo y NeoGATA.

A) Los trofozoítos Neo y NeoGATA fueron procesados para ensayos de inmunofluorescencia, usando anticuerpos α -EhGATA y anticuerpos anti-rata acoplados a TRITC (canal rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (canal azul). En el empalme de los canales, se muestra un acercamiento a los núcleos. CF, Imágenes en contraste de fases. Control negativo: trofozoítos Neo y NeoGATA procesados para inmunofluorescencia, usando solo el anticuerpo secundario acoplado a TRITC. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EhGATA en los trofozoítos transfectados, analizando 20 imágenes representativas de tres ensayos independientes por microscopía confocal y el *software ZEN 2009 Light Edition de Zeiss*. Los valores estadísticos se determinaron con la prueba estadística *t-Student*, en el programa *GraphPad Prism 8*, donde *** $p < 0.001$.

Efecto de la sobreexpresión de EhGATA en la proliferación de los trofozoítos

Con la finalidad de evaluar el efecto de la sobreexpresión de EhGATA sobre la proliferación celular, se llevaron a cabo curvas de crecimiento de las poblaciones Neo y NeoGATA. Las células se cuantificaron cada 24 h y la viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante azul de tripano. Dado que se partió de un mismo número de amibas para cada población, los datos se normalizaron con el tiempo 0. Los resultados indicaron que la población NeoGATA creció más rápido que la población Neo, llegando a la fase estacionaria de crecimiento al tercer día, con un promedio de 4.5×10^4 células/ml; mientras que la población Neo la alcanza al segundo día, con un promedio de 2.3×10^4 células/ml (Fig. 17). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EhGATA no afecta la viabilidad de los trofozoítos y que, por el contrario, podría tratarse de un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas involucradas en la proliferación celular, como ocurre en otros organismos (Balaji et al., 2015).

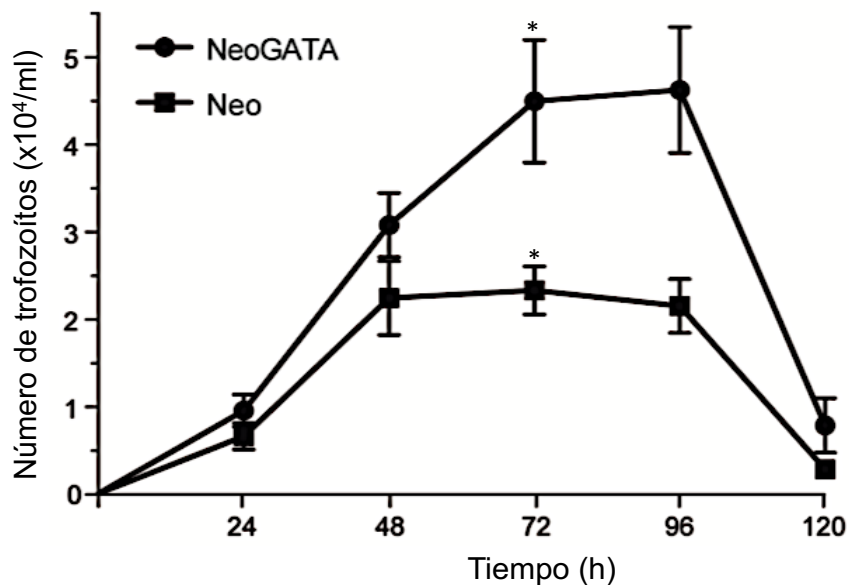


Figura 17. Curvas de crecimiento de los trofozoítos Neo y NeoGATA. El número de trofozoítos vivos en los tubos de cultivo se contó durante cinco días consecutivos, por triplicado y de manera independiente, con su replica técnica. Los valores estadísticos se obtuvieron mediante la prueba estadística *t-Student*, en el programa *GraphPad Prism 8*, donde * $p < 0.05$.

Propiedades de virulencia de los trofozoítos NeoGATA: Adhesión y fagocitosis

La regulación génica a nivel transcripcional es un evento crítico para la expresión de algunos factores de virulencia, que permiten la invasión de la amiba a su hospedero. Anudado a esto, estudios recientes sugieren que EhGATA regula la expresión de algunas moléculas relacionadas con mecanismos patogénicos (Huerta et al., 2020 en prensa). Además, previamente demostramos que EhGATA interacciona con las regiones promotoras de los genes *Ehvps32* y *Ehadh*, cuyos productos participan en la fagocitosis y la adhesión (Avalos et al., 2015; García et al., 1999).

Por todas estas razones, decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de EhGATA en la virulencia de *E. histolytica*, analizando las eficiencias de adhesión y eritrofagocitosis, que son dos eventos celulares críticos en la virulencia de este parásito. Los ensayos de adhesión y eritrofagocitosis consistieron en la incubación de los trofozoítos transfectados (Neo y NeoGATA) con eritrocitos humanos frescos, a 4 °C y 37 °C, respectivamente, para evaluar el desempeño de las amibas a distintos tiempos.

Después de 5 y 10 min de interacción, los eritrocitos adheridos a los trofozoítos Neo y NeoGATA fueron contrastados mediante la tinción de Novikoff (Novikoff et al., 1972) y cuantificados aleatoriamente bajo el microscopio óptico. La población Neo adhirió en promedio 1.6 eritrocitos/trofozoíto, mientras que la NeoGATA adhirió 2.5 eritrocitos/trofozoíto. Es decir, los trofozoítos NeoGATA exhibieron una mayor eficiencia de adhesión (20 y 82 % más que Neo, a los 5 y 10 min, respectivamente) (Fig. 18A).

En relación con los ensayos de eritrofagocitosis, los trofozoítos Neo ingirieron 2 y 2.9 eritrocitos a los 5 y 10 min de interacción; en tanto que las amibas NeoGATA fagocitaron 0.4 y 1.8 eritrocitos a esos mismos tiempos (Fig. 18B). Tomando como 100% el número de eritrocitos ingeridos por los trofozoítos Neo a los 5 y 10 min, se

determinó que la tasa de eritrofagocitosis en los trofozoítos NeoGATA había disminuido 23 % y 64 %, respecto del desempeño correspondiente de la población Neo.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EhGATA altera las propiedades de adhesión y eritrofagocitosis en las amibas. Paradójicamente, los trofozoítos NeoGATA son capaces de unir eritrocitos en su superficie de manera eficiente, sin embargo, se ven imposibilitados a ingerirlos con eficiencia; lo cual sugiere que la presencia de EhGATA en los trofozoítos, afecta estas propiedades de virulencia. En conjunto, con estos resultados se postula que el factor de transcripción EhGATA podría estar regulando genes relacionados con la fagocitosis de *E. histolytica*.

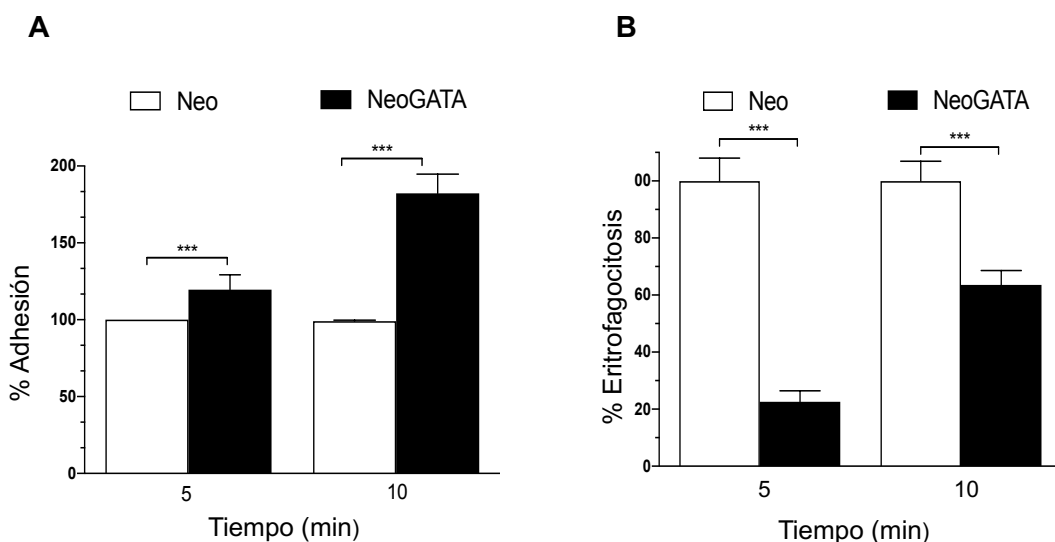


Figura 18. Eficiencias de adhesión y eritrofagocitosis en los trofozoítos Neo y NeoGATA. A) Gráfica de la tasa de eritrocitos adheridos por las poblaciones Neo y NeoGATA, a los 5 y 10 min de interacción a 4 °C. De tres ensayos independientes por duplicado, los datos se normalizaron respecto de los valores de Neo y el análisis estadístico se hizo mediante la prueba *t-Student* *** $p < 0.001$. B) Gráfica de la tasa de eritrocitos fagocitados por las poblaciones Neo y NeoGATA, a los 5 y 10 min de interacción a 37 °C. De tres ensayos independientes por duplicado, los datos se normalizaron respecto de los valores de Neo y el análisis estadístico se hizo mediante la prueba *t-Student* *** $p < 0.001$.

Niveles de expresión de EhADH y EhVps32 en los trofozoítos NeoGATA

Acorde a los resultados presentados anteriormente, relacionados con el efecto de la sobreexpresión de EhGATA en la virulencia de *E. histolytica*, nos preguntamos si EhGATA podría regular la expresión de genes relacionados con la adhesión y la fagocitosis. Para responder esta duda, seleccionamos a los genes *Ehadh* y *Ehvps32*, que codifican para proteínas relevantes en diversos procesos de la virulencia de *E. histolytica*, entre ellos la adhesión y fagocitosis. Pues EhADH además de funcionar en el proceso de adhesión en la amiba (García et al., 1999; Bañuelos et al., 2012), también es una proteína accesoria del complejo ESCRT, cuyos componentes son esenciales para la fagocitosis (Avalos et al., 2015). Por otro lado, EhVps32 es un componente crucial del ESCRT-III, que promueve la formación de los cuerpos multivesiculares, durante la fagocitosis y pinocitosis de *E. histolytica* (Avalos et al., 2015). Por lo tanto, EhADH y EhVps32 pueden tener un papel dinámico en la remodelación de la membrana, durante la generación de vesículas intraluminales en los fagosomas de *E. histolytica*. Además, se ha demostrado que EhADH y EhVps32 interactúan, funcionando como un tipo de receptor para eritrocitos (Avalos et al., 2018). A propósito, EhGATA se identifica como un posible factor de transcripción que pudiera estar regulando la expresión de estos dos genes, a nivel transcripcional. Al respecto, nuestros resultados anteriores mostraron que las regiones promotoras de ambos genes contienen más de un sitio de unión para EhGATA y además demostramos experimentalmente esta interacción.

Para estudiar la correlación entre la sobreexpresión de EhGATA con la regulación de la expresión de *Ehadh* y *Ehvps32*, se analizaron los niveles del RNAm de *Ehadh* y *Ehvps32*, así como la cantidad y localización de sus productos proteicos en los trofozoítos Neo y NeoGATA, mediante ensayos de qRT-PCR e inmunofluorescencia, respectivamente.

Utilizando los RNA totales de los trofozoítos transfectados y oligonucleótidos específicos para la amplificación de *Ehadh* y *Ehvps32*, se llevo a cabo la RT-qPCR

y la expresión relativa de los RNAm de cada uno de los genes se calculó mediante el modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los datos se normalizaron con el control interno S2, que codifica para la subunidad ribosomal 40S. Se evidenció que los niveles de RNAm de *Ehadh* resultaron dos veces mayores en los trofozoítos NeoGATA, en comparación con los trofozoítos Neo (Fig. 19A). Por su parte, los niveles de RNAm de *Ehvps32* disminuyeron ligeramente, aunque con un valor estadísticamente significativo, en los trofozoítos NeoGATA, en comparación con los trofozoítos Neo (Fig. 19B).

La localización celular de EhADH y EhVps32 en las poblaciones Neo y NeoGATA, se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia, empleando los anticuerpos policlonales de ratón anti-EhVps32 (Avalos et al., 2015) y anti-EhADH (Montaño et al., 2017). Las imágenes de microscopía mostraron que la proteína EhADH se localizó en la membrana plasmática y citoplasma de ambas poblaciones transfectadas, aunque en la población NeoGATA se concentra mayoritariamente en la membrana plasmática (Fig. 19C). La señal de fluorescencia se cuantificó en 60 amibas elegidas al azar, utilizando el programa ImageJ. De manera consistente con los niveles de RNAm detectados previamente por RT-qPCR, en la población NeoGATA la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EhADH fue dos veces mayor que la exhibida por los trofozoítos Neo (Fig. 19D). Esto a su vez correlaciona con el aumento en la eficiencia de adhesión de los trofozoítos NeoGATA, por lo que el exceso de proteína EhGATA pudiera estar siendo responsable de la función de adhesión, incrementada en esta población. En relación con la localización de EhVps32, las imágenes por microscopía confocal mostraron a EhVps32 en el citoplasma de las poblaciones Neo y NeoGATA; aunque de manera cualitativa, la señal de fluorescencia resultó menos intensa en los trofozoítos NeoGATA (Fig. 19E). La cuantificación de la fluorescencia validó la disminución del 60% en trofozoítos NeoGATA, en comparación con las amibas Neo (Fig. 19F). Este resultado también fue consistente respecto de los niveles de RNAm de *Ehvps32* expresados por las amibas NeoGATA.

En su conjunto, estos resultados demuestran que las proteínas EhADH y EhVps32 preservan la ubicación nativa reportada en *E. histolytica* (Bañuelos et al., 2012; Avalos et al., 2015), en los trofozoítos transfectados. Sin embargo, la alteración de sus niveles de RNAm y proteína en la población NeoGATA, sugiere que EhGATA podría estar participando en la regulación de la expresión de estos factores de virulencia. Tomando en cuenta, además, que las eficiencias de adhesión y eritrofagocitosis, en parte atribuidas a las proteínas EhADH y EhVps32 (Bañuelos et al., 2012; Avalos et al., 2018), están incrementadas y disminuidas, respectivamente, en los trofozoítos NeoGATA.

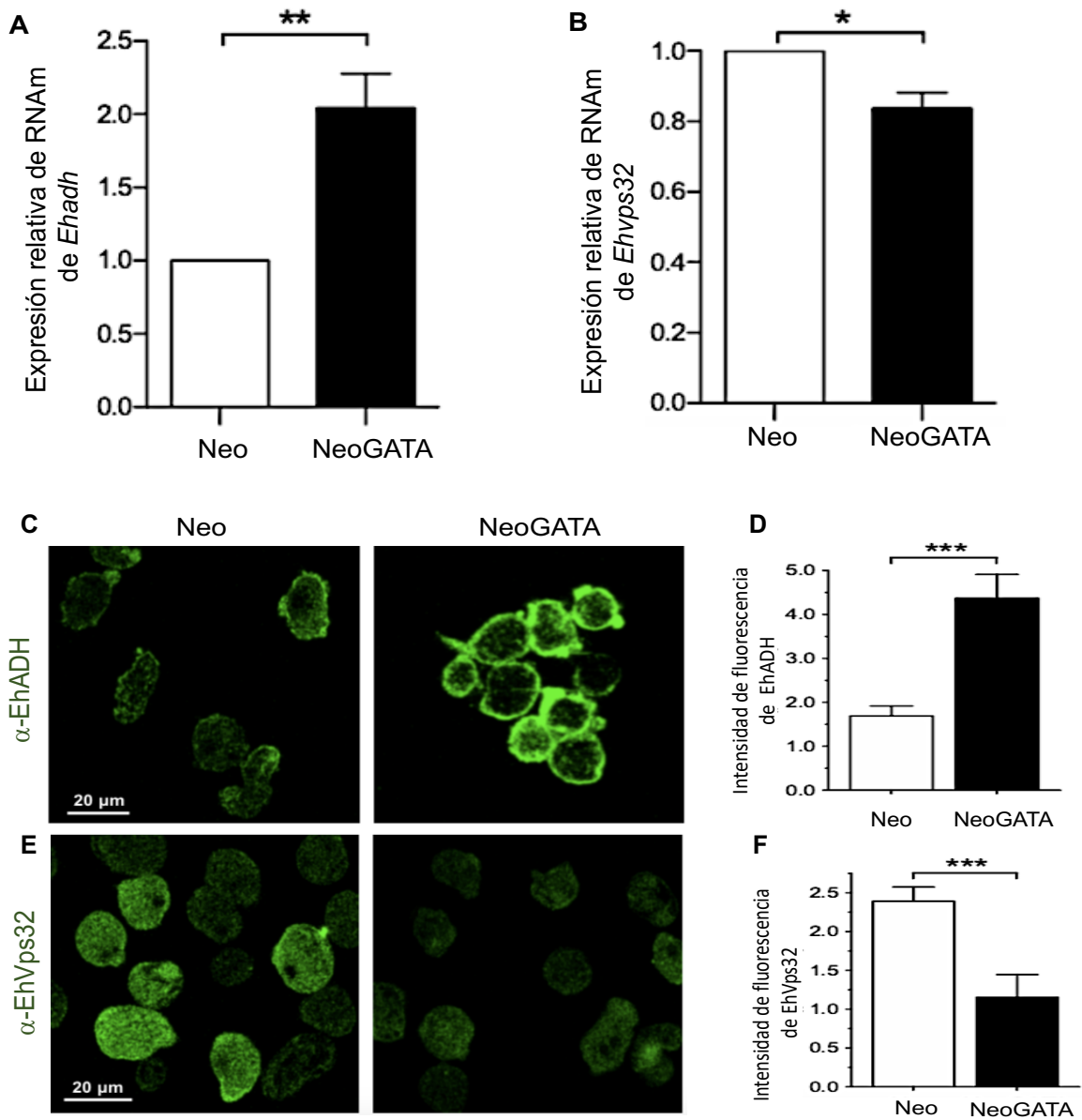


Figura 19. Expresión de EhADH y EhVps32 en los trofozoítos Neo y NeoGATA.

A y B) Gráficas de los niveles de RNAm de los genes *Ehadh* y *Ehvps32*, detectados en los trofozoítos Neo y NeoGATA, mediante qRT-PCR. Como control interno, se utilizó el gen S2 que codifica para la subunidad ribosomal 40S, el cual permitió normalizar los datos de los RNAm de ambas poblaciones transfectadas. Los ensayos se hicieron por triplicado de manera independiente con su replica técnica y con valor estadístico de ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$. C, E) Ensayos de inmunofluorescencia de los trofozoítos transfectados, usando anticuerpos α -EhADH (C) y α -EhVps32 (E). D, F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EhADH (D) y EhVps32 (F), a partir de 60 trofozoítos de las poblaciones Neo y NeoGATA, observados en distintos campos de hasta tres ensayos independientes, con un valor estadístico de *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

La familia de proteínas GATA está constituida por factores de transcripción muy conservados que controlan la expresión génica (Reya, 2001). Los factores de transcripción GATA pertenecen a la familia con dominios de dedos de zinc (ZFDB) y reconocen la secuencia consenso (A/T) GATA (A/G) (Huaqing, 2015). Algunas de las peculiaridades que destacan a estos factores de transcripción son, que en un solo organismo puede contener más de un miembro de proteínas GATA y entre ellos pueden regular distintas funciones; y que además el número de genes *gata* y sus productos varía entre especies, así como el número de genes que regulan las proteínas GATA (Omichinski et al., 1993). Por ejemplo, en plantas se han encontrado hasta 28 genes que codifican para proteínas GATA, algunas de las cuales regulan genes que participan en respuesta a estrés (Gupta et al., 2017). En el nematodo *Caenorhabditis elegans* existen 27 genes que codifican para factores de transcripción GATA, y algunos participan en la regulación de la longevidad (Kim et al., 2012) y expresión de colágeno (Hiva et al., 2020). En humanos existen seis miembros de esta familia, que están ampliamente involucrados en la hematopoyesis (Ferreira, 2005). Por consiguiente, la familia de proteínas GATA está muy conservada evolutivamente, puesto que sus miembros participan en distintos procesos celulares, como diferenciación, desarrollo, proliferación y supervivencia celular (Devilbiss, 2016).

En este trabajo, se amplió la caracterización funcional de un factor de transcripción de la familia GATA identificado en *E. histolytica* (EhGATA) por Huerta y col. (2020, en prensa). De acuerdo con los hallazgos previos, EhGATA es una proteína de 19 kDa que posee un dominio de dedo de zinc (ZFDB) y de manera inusual un motivo *AT-Hook* que podría estarle brindando estabilidad en la interacción DNA-proteína (Landsman, 1998). Esto explicaría porque EhGATA solo contiene un solo dominio ZFDB, en vez de dos como se encuentran en la mayoría de las proteínas GATA en otros organismos. Así, el motivo *AT-Hook* compensaría la ausencia del segundo

dominio ZFDB en EhGATA. Por estas razones estructurales, se señala a EhGATA como un factor de transcripción no canónico (Huerta et al., 2020, en prensa).

Mediante un análisis *in silico* realizado por Huerta y col. (2020, en prensa), utilizando el programa diseñado por Meneses (2010) para determinar posibles secuencias de unión a factores de transcripción de la familia GATA en el genoma de *E. histolytica*, se reveló la presencia de al menos 1,610 genes (casi el 26 % del genoma) que contienen en su región promotora secuencias putativas para unión a proteínas GATA (EhGATA). Estos genes se agruparon en 12 grandes familias, utilizando como base las funciones predichas para sus productos, en distintos eventos celulares de *E. histolytica* (Fig. 8).

Para iniciar el estudio de los genes que pudieran estar siendo regulados por EhGATA, en este trabajo se seleccionó al grupo de genes (y sus proteínas) relacionados con la fagocitosis, por ser este uno de los eventos de referencia respecto de la capacidad de *E. histolytica* para causar daño en su hospedero. Particularmente, los genes *Ehadh* y *Ehvps32* han sido ampliamente caracterizados en nuestro grupo de investigación. Al momento se sabe que, el gen *Ehadh* codifica para una proteína de superficie de 75 kDa, con propiedades de adhesión, y el gen *Ehvps32* codifica para una proteína de 32 kDa, que participa en la formación de las copas fagocíticas durante el proceso de eritrofagocitosis (García et al., 1999; Avalos et al., 2015, 2018). De manera interesante, ambas proteínas forman parte de la maquinaria de proteínas tipo ESCRT, la cual ha sido principalmente relacionada con los procesos del tráfico de membranas en la formación de fagosomas durante la fagocitosis de *E. histolytica* (Avalos et al., 2018,2015; López et al., 2010). Es predecible que, siendo estas proteínas críticas para la virulencia de *E. histolytica*, cuenten con una regulación finamente orquestada a distintos niveles, entre ellos, el transcripcional.

Para los fines de este trabajo, se exploró entonces la posible regulación de los genes *Ehadh* y *Ehvps32* por EhGATA. Lo primero que se realizó fue la

caracterización estructural de sus promotores, la cual reveló en el promotor de *Ehadh*, la existencia de 29 sitios de unión a los factores de transcripción STAT, URE-2,3 y 5, CF-1, proteína enhancer, TCF-1, EhP53, SRY, HOX, GATA, CREB, Myb, YY1 y GAAC; y en el promotor de *Ehvps32* se reportaron 26 sitios de unión a los factores de transcripción p53, HOX, GATA, Myb, STAT, TCF-1, C/EBP y GAAC. De estos sitios, los ubicados en las posiciones -232 a -225; -93 a -87; y -14 a -6 pb y -968 a -961; -505 a -201; -318 a -312; -294 a -288; -192 a -186; -123 a -117; y -112 a -105 pb fueron identificados por su posible unión con GATA, en los promotores de *Ehadh* y *Ehvps32*, respectivamente. Con base en estos hallazgos, se realizaron ensayos de ChIP, utilizando anticuerpos específicos contra EhGATA y los controles correspondientes. Con los resultados obtenidos, se evidenció que EhGATA interacciona con los promotores de los genes *Ehadh* y *Ehvps32* (Fig. 12), lo cual sugiere una posible regulación de la expresión de ambos genes a nivel transcripcional, a través de este factor.

De manera interesante, ya se ha caracterizado el promotor del gen *Ehadh* (Azua et al., 2005), encontrando que parte del promotor está contenido en la región codificante del gen *Ehcp112*, por lo tanto, los autores sugieren que podría estar ocurriendo una regulación coordinada entre ambos genes. De manera interesante, nosotros encontramos que esta región del promotor de *Ehadh* interacciona con EhGATA, por lo que a pesar de que no analizamos el promotor del gen *Ehcp112*, podría ser que EhGATA también regule la expresión de este gen, a nivel transcripcional. Adicionalmente, Azua y col. (2005) hicieron mutaciones en el promotor de *Ehadh*, y curiosamente en la región donde encontraron mayor actividad en el promotor, nosotros identificamos una secuencia consenso GATA, a la cual se une el factor de transcripción; por ello, sería interesante usar las construcciones del promotor *Ehadh* de Azua y col. (2005), para hacer mutaciones puntuales en donde se encuentra la secuencia de unión a EhGATA y de esta forma poder identificar cual de las tres secuencias identificadas regula positiva o negativamente la expresión de *Ehadh*.

Por su parte, con el propósito de ampliar la caracterización funcional de EhGATA iniciada por Huerta y col. (202, en prensa), se intentó silenciar el gen *Ehgata*. Utilizando la estrategia para el silenciamiento con ARN de doble cadena del gen *Ehgata*, se adicionaron RNAs de doble cadena a partir del plásmido pL4440 (Solis et al., 2009) conteniendo los primeros 400 pares de bases del gen *Ehgata* a los trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS. Sin embargo, no logramos silenciar este gen, al menos con la metodología estandarizada en nuestro grupo. De acuerdo con lo que se conoce de la familia GATA, se trata de proteínas que participan en una gama amplia de eventos críticos para la vitalidad y funcionalidad de las células (Gupta et al., 2017). Así, es muy probable que, siendo *Ehgata* el único gen de la amiba que codifica para proteínas de este tipo, su silenciamiento haya redundado en afectaciones sobre proteínas que pudieran estar participando en funciones celulares vitales para el parásito, llevando probablemente en última instancia, a la letalidad. Al respecto, en estudios previos se observó que la eliminación del gen *gata4* provoca letalidad en ratones embrionarios, debido a que las proteínas GATA son críticas para el desarrollo de diversos tejidos. En particular, GATA-4 es crucial en la formación del corazón en vertebrados (Crispino et al., 2001).

Para elucidar la función de EhGATA, se recurrió entonces a la sobreexpresión de esta proteína en los trofozoítos, mediante ensayos de transfección. La sobreexpresión de EhGATA fue validada a nivel de Western blot, demostrando un aumento de aproximadamente dos veces en la población NeoGATA, en comparación con los trofozoítos Neo. El incremento en la cantidad de esta proteína fue confirmado en los experimentos de inmunofluorescencia. De acuerdo con la cuantificación de los niveles de fluorescencia, se reveló una mayor cantidad de proteína en la población NeoGATA, en comparación con la población control, lo cual resulta consistente con los resultados obtenidos por Western blot, en los que se duplica la cantidad de EhGATA presente en los trofozoítos NeoGATA.

En relación con la ubicación de EhGATA, conforme a lo esperado, se le detectó en el núcleo, que es donde las proteínas que funcionan como factores de transcripción

efectúan su actividad. No obstante, también se le localizó en el citoplasma, donde ocasionalmente se pueden encontrar también a algunos factores de transcripción. Se ha reportado que por ser moléculas difusibles, mientras están inactivas, se encuentran en el citoplasma, pero al momento de ser activadas por un tipo de señal, se importan al núcleo, para así regular la transcripción de un gen o varios genes, dependiendo del contexto en el que se encuentre la célula (Tovy, 2010; Davidson, 2015).

Por otra parte, en relación con la caracterización fenotípica de los trofozoítos transfectados, se identificaron diferencias entre las tasas de crecimiento de los trofozoítos Neo y NeoGATA, siendo estos últimos los que alcanzan más rápido su fase de crecimiento exponencial. Dado su ritmo de proliferación incrementado, en comparación con los trofozoítos Neo, se presume que EhGATA pudiera estar regulando genes que participan en la proliferación celular, como ha sido reportado para proteínas GATA de otros organismos (Omichinski et al., 1993).

Por su parte, dos propiedades de virulencia críticas para *E. histolytica*, la adhesión y la fagocitosis, también se vieron afectadas por la sobreexpresión de EhGATA en los trofozoítos NeoGATA. Paradójicamente, esta población mostró una eficiencia de adhesión incrementada y una tasa de eritrofagocitosis reducida, respecto de la población Neo; lo cual sugirió afectaciones en aquellas proteínas que pudieran estar teniendo participación importante en uno u otro eventos, o en ambos, sobre todo considerando que la adhesión precede a la fagocitosis. Con base en estos hallazgos, nos remontamos a trabajos previos de nuestro grupo en donde se ha reportado que EhADH media la adhesión a las células del huésped (García et al., 1999), y junto con EhVps32 participan en la fagocitosis, como parte de una maquinaria proteica que direcciona moléculas hacia la degradación lisosomal, a través de la vía endocítica (Bañuelos et al., 2012; Avalos et al., 2015). Considerando, además, que en este trabajo se identificó que los genes *Ehadh* y *Ehvps32* exhiben en sus promotores tres y siete secuencias consenso de unión a EhGATA, respectivamente, y que esta proteína es capaz de unirse a estas

secuencias, fue que se analizó la correlación entre la sobreexpresión de EhGATA y la expresión de los genes *Ehadh* y *Ehvps32* y sus productos. Mediante ensayos de qRT-PCR y de inmunofluorescencia se mostró que la población NeoGATA presentó hasta dos veces mayores niveles del ARNm de *Ehadh* y hasta dos veces más proteína EhADH, respecto de Neo. Esto explicaría en parte, el incremento en la eficiencia de adhesión a eritrocitos de la población NeoGATA. En relación con el gen *Ehvps32*, se determinó que los trofozoítos NeoGATA tuvieron menos ARNm que los trofozoítos Neo, y que la proteína EhVps32 estaba disminuida un 60%, lo cual fue consistente con las tasas de eritrofagocitosis reducidas, que exhibió la población NeoGATA. De esta forma, los resultados sugieren fuertemente que EhGATA podría estar ejerciendo una regulación diferencial de los genes *Ehadh* y *Ehvps32*, dependiendo de las condiciones a las que está expuesto el parásito.

Hasta el momento se sabe que la regulación de genes a nivel transcripcional en *E. histolytica* depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre la amiba. Por ejemplo, en condiciones de estrés, el factor de transcripción p53 se sobreexpresa cuando los trofozoítos son expuestos a luz ultravioleta (Mendoza et al., 2003); también cuando los trofozoítos son expuestos a fármacos, estos expresan el gen *Ehpgp1*, cuyo producto tiene un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos (Ramírez M., 2005); además, cuando los trofozoítos se exponen a un estrés oxidativo, el factor de transcripción sensible a estrés oxidativo EhHRM aumenta la expresión en respuesta a la exposición de H₂O₂, posiblemente para evitar daño en el DNA (Pearson et al., 2012). También se ha estudiado la regulación génica, principalmente de aquellas moléculas que participan en la virulencia de *E. histolytica*. Por mencionar algunos ejemplos, se ha analizado *in silico* el promotor del gen *EhrabB*, que codifica para una GTPasa Rab implicada en la fagocitosis (Romero et al., 2007), y se han caracterizado los promotores de los genes *Ehpc112* y *Ehadh*, que son moléculas críticas en la patogénesis molecular de esta amiba (Azuara et al., 2005). Sin embargo, existen pocos trabajos sobre moléculas que regulan a nivel transcripcional; por lo que, es evidente extender y profundizar los estudios sobre regulación génica en *E. histolytica*. Esto contribuirá

al entendimiento de los mecanismos de patogénesis en este parásito, así como de la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero. En particular este trabajo tiene relevancia ya que esclarece una parte de la regulación génica de las moléculas EhADH y EhVps32, que participan en dos mecanismos patogénicos, la adhesión y la fagocitosis.

Además, estos hallazgos sobre la función de EhGATA en la regulación de fagocitosis, coinciden con otros estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, que describen la participación de GATA en la regulación de genes relacionados con la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos embrionarios de cuerpos apoptóticos (Valanne et al., 2018). Otra proteína GATA, también se relacionó con este evento, GATA-2 de rata desempeña un papel importante en la regulación de la fagocitosis en los macrófagos alveolares, durante la infección por *Pneumocystis carinii* (Lasbuy et al., 2003).

Con respecto a las curvas de crecimiento de los trofozoítos que sobreexpresan EhGATA, éstas nos sugieren que este factor de transcripción posiblemente también regule genes que participen en eventos de proliferación celular en *E. histolytica*. Existen estudios relacionados a este mismo evento celular donde participan proteínas GATA. Tal es el caso de *Dictyostelium discoideum*, donde Gtac regula la dinámica de la expresión génica en el desarrollo temprano y diferenciación terminal (Balaji et al., 2015). En *Arabidopsis thaliana*, GATA12 participa en la regulación de la latencia de las semillas, durante la fase de germinación (Ravindran et al., 2017). Un estudio sugestivo y reciente sobre la función de la familia de proteínas GATA, fue realizado en *Ustilaginoidea virens*, que es un hongo filamentoso patógeno (Yu et al., 2019), donde identificaron y caracterizaron funcionalmente siete proteínas GATA (UvGATA). Los resultados mostraron que la mayoría de los genes UvGATA se expresaban en diferentes etapas de infección y bajo estrés por H₂O₂, por lo que, los autores confirmaron la participación de UvGATA en la patogenicidad de este hongo y en la tolerancia al estrés por especies reactivas de oxígeno. Así, GATA

puede regular la expresión, ya sea de manera positiva o negativa, dependiendo del contexto del promotor y las condiciones ambientales, entre otras.

En particular, en este trabajo se demostró que EhGATA regula la expresión de genes relacionados con la fagocitosis, el cual es uno de los principales factores de virulencia durante la infección del ser humano por *E. histolytica*. Queda la necesidad de estudiar a detalle la función de EhGATA, en la regulación de otros genes como los sugeridos por el análisis *in silico*, donde se identificaron 1,610 genes; así como su participación en otros eventos celulares, como la migración celular, la evasión de la respuesta inmune y la invasión epitelial. Ahondar en este estudio, nos conducirá a la construcción de herramientas moleculares para controlar la virulencia de este patógeno, causante de la amibiasis humana.

CONCLUSIONES

- Mediante un análisis *in silico*, se encontró que los promotores de los genes *Ehadh* y *Ehvps32* contienen tres y siete secuencias consenso para la posible interacción con EhGATA, respectivamente.
- Por medio de ensayos de ChIP, se demostró que EhGATA interacciona con las regiones promotoras de los genes *Ehadh* y *Ehvps32*.
- La sobreexpresión de EhGATA aumentó la tasa de crecimiento en los trofozoítos NeoGATA, sugiriendo una posible participación en la regulación de genes relacionados con la proliferación celular.
- La sobreexpresión de EhGATA incrementó 20% y 82% la eficiencia de adhesión de los trofozoítos NeoGATA a los 5 y 10 min de interacción con eritrocitos, respectivamente. Sin embargo, disminuyó su tasa de eritrofagocitosis, en 23% y 64% a los 5 y 10 min, respectivamente. Estos hallazgos apuntan a la regulación mediada por EhGATA, de proteínas que participan en la adhesión y en la fagocitosis.
- Los niveles de las proteínas EhADH y EhVps32 están incrementados y disminuidos en los trofozoítos NeoGATA, respectivamente; señalando que EhGATA podría estar regulando positiva y negativamente su expresión, respectivamente.

En conclusión, demostramos que el factor de transcripción EhGATA regula la expresión de los genes *Ehadh* y *Ehvps32* que participan en la adhesión y fagocitosis de *E. histolytica*.

Algunos resultados de este trabajo forman parte de una publicación arbitrada (Huerta y col., 2020, en prensa), por lo que las contribuciones de esta tesis también pueden consultarse en la citada fuente.

PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de ChIP utilizando la cromatina de trofozoítos, durante el proceso de eritrofagocitosis; así como analizar las regiones promotoras de los genes *Ehadh* y *Ehvps32*.
- Realizar mutaciones puntuales en los promotores de los genes *Ehadh* y *Ehvps32* y determinar cuáles de las secuencias consenso GATA regulan la expresión positiva y negativamente.
- Dado los resultados del intento de silenciar *Ehgata* con dsRNA, una opción sería llevar a cabo mutagénesis dirigida, con la finalidad de silenciar EhGATA y determinar su efecto en la virulencia de *E. histolytica*.
- Identificar genes candidatos que participen en la proliferación de *E. histolytica* y analizar su regulación génica por EhGATA.
- Implementar técnicas como ChIPseq, que se utiliza para estudiar las interacciones DNA-proteína en todo el genoma de una célula, y encontrar otros genes que pudieran ser regulados por EhGATA en *E. histolytica*.

BIBLIOGRAFÍA

- Claros, M. G. (2020). *Los promotores de la RNA-polimerasa II*. Obtenido de https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/av_bma/apuntes/T11/RPii.htm
- L. Mendoza, E. O.-R. (2003). Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology*, 885–893.
- Chávez Munguía Bibiana, G. R. (2013). *Entamoeba histolytica*: la estructura interna de un destructor por naturaleza. *ciencia*, 42-29.
- Chacín-Bonilla, L. (2013). Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *méd. Chile*.
- Campos Peralta José Manuel, S. M. (2011). *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 63-70.
- Chang, A. C. (2002). GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9237-9242.
- Castañon-Sanchez Carlos Alberto, J. P.-A.-B.-A.-T. (2010). *Entamoeba histolytica*: A unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein Expression and Purification*, 48–59.
- Latchman. (1997). Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1305–1312.
- Lewis. (2008). *Genes IX*. McGrawHill.
- Livak, K. a. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods*, 402-408.
- Collavin, L. G. (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101,, 8870-8875.
- Loftus B, A. I. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*.
- Conlon, V. W. (2002). The T-box family. *Genome Biol*.
- Crespo JL, D. K. (2001). Los factores de transcripción GATA GLN3 y GAT1 vinculan TOR con el estrés salino en *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*.
- Crispino JD, H. M. (2017). GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood*.
- Crossley, M. a. (1994). Phosphorylation of the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem*, 16589-16596.
- Cruz-Vera Jorge, L. C.-K.-S. (2003). Collagen-induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *FEMS Microbiology*, 203^209.
- Cuellar P., E. H.-N.-R. (2017). *Entamoeba histolytica* EhCP112 Dislocates and Degrades Claudin-1 and Claudin-2 at Tight Junctions of the Intestinal Epithelium. *Front Cell Infect Microbiol*.
- López-Reyes I., G.-R. G.-C.-R.-R. (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *J Biomed Biotechnol*.
- Ángel, H. (2012). *BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA*. Elsevier Health Sciences.

- Ángel, H. (2020). *Biología Molecular E Ingeniería Genética - 2º Edición*. San Antonio Abad del Cusco: ELSEVIER.
- Academy, K. (2020). Obtenido de <https://es.khanacademy.org/about>
- Alberts Bruce, J. A. (2004). *Biología Molecular de la célula*. Barcelona: OMEGA.
- Abigail Betanzos, C. B. (2019). Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. *Genes*.
- AddGene. (2020). *Promoters*. Obtenido de <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/promoters/>
- Arguello-Astorga G., H.-E. L. (1998). Evolution of light-regulated plant promoters. *Rev. Plant Biol.* .
- Arroyo R, O. E. (1987). Location and Identification of Entamoeba histolytica adhesion. *Mol Biochem Parasitology*, 177-182.
- Avalos-Padilla Y., B. A.-R.-R.-M.-G.-R.-M. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of Entamoeba histolytica. *PLoS Pathog.*
- Avalos-Padilla Yunuen, R. L.-R.-R. (2018). The Conserved ESCRT-III Machinery Participates in the Phagocytosis of Entamoeba histolytica. *Front Cell Infect Microbiol.*
- Azuara-Liceaga E, F.-S. E.-C.-c. (2005). Entamoeba histolytica: structural and functional analysis of the E. histolytica ADH112 gene promoter. *Exp Parasitol.*
- Balaji Santhanam, H. C.-K. (2015). The GATA transcription factor GtaC regulates early developmental gene expression dynamics in Dictyostelium. *Nat Commun.*
- Babuta M., K. S. (2018). Calcium-binding protein EhCaBP3 is recruited to the phagocytic complex of Entamoeba histolytica by interacting with Arp2/3 complex subunit 2. *Cell. Microbiol.*
- Babuta M., M. M. (2015). The Entamoeba histolytica, Arp2/3 Complex Is Recruited to Phagocytic Cups through an Atypical Kinase EhAK1. . *PLoS Pathog.*
- Bañuelos Cecilia, G. G.-R.-R.-R. (2012). EhADH112 Is a Bro1 Domain-Containing Protein Involved in the Entamoeba histolytica Multivesicular Bodies Pathway. *J Biomed Biotechnol.*
- Baxt L.A., R. E. (2010). Downregulation of an Entamoeba histolytica rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryot. Cell.*, 283–1293.
- Baxt LA, R. E. (2010). Downregulation of an Entamoeba histolytica rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. . *Eukaryot. Cell.*, 1283–1293.
- Betanzos A., Z. D.-N. (2018). Epithelial Cells Expressing EhADH, An Entamoeba histolytica Adhesin, Exhibit Increased Tight Junction Proteins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* .
- Bharadwaj R., S. S. (2018). EhRho1 regulates phagocytosis by modulating actin dynamics through EhFormin1 and EhProfilin1 in Entamoeba histolytica. *Cell. Microbiol.*
- Bhattacharya A., P. N. (2006). Calcium-Binding Proteins of Entamoeba histolytica. *Arch. Med. Res.*, 221–225.

- Biotechnology, S. C. (2019). *Santa Cruz Biotechnolog*. Obtenido de <https://www.scbt.com/es/home>
- Boyes, J. B. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* , 594-598.
- Braga LL, N. H. (1992). Inhibition of complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* , 1131-1137.
- Bruchhaus I, L. B. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell*.
- Butler, J. E. (2002). «The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes*, 2583-2592.
- Davis. (septiembre de 2019). *ApE plasmid*. Obtenido de ApE plasmid Editor: rgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/
- Eric H. Davidson, I. S. (2015). The Genome in Development. *Genomic Control Process*.
- Felsenfeld, M. G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature reviews genetics*.
- Ferreira, R. O. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. . *Mol Cell Biol* 25, 1215-1227.
- García-Rivera G., R. M.-L.-R. (1999). *Entamoeba histolytica*: A novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.*, 556–568.
- Ghirlando, R. a. (2003). Determinants of GATA-1 binding to DNA: The role of non-finger residues. *J Biol Chem* . .
- Gilchrist C, M. E. (2010). Regulation of Virulence of *Entamoeba histolytica* by the URE3-BP Transcription Factor. *mBio*. .
- Guadalupe de Dios-Bravo, J. P.-A.-T.-C. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. *FEBS Journal*, 1354–1366.
- Gómez-Merino, F. C.-T. (s.f.). Factores de Transcripción. En Tiessen, *Fundamentos y metodologías innovadoras para el mejoramiento genético de maíz* (págs. 152-158). México: Conacyt.
- Gupta Priyanka, K. K.-P. (2017). Abiotic Stresses Cause Differential Regulation of Alternative Splice Forms of GATA Transcription Factor in Rice. *Front Plant Sci*.
- Hannon, R. E. (1991). Structure and promoter activity of the gene for the erythroid transcription factor GATA-1. . *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3004-3008.
- Hernández de la Cruz Olga, L. A.-C.-D.-C. (2015). Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*. *Scientific RepoRts*.
- Hernández-Nava E., C. P.-M. (2017). Adherens junctions and desmosomes are damaged by *Entamoeba histolytica*: Participation of EhCPADH complex and EhCP112 protease. *Cell. Microbiol.* .
- Hernandes A.M., C.-G. M.-R.-C.-Á. (2013). The small GTPase EhRabB of *Entamoeba histolytica* is differentially expressed during phagocytosis. . *Parasitol. Res*, 1631–1640.

- Hernandez-Hernandez, A. R. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. . *EMBO J* 25, 3264-3274.
- Hiva Mesbahi, K. B. (2020). Cuticle expression is regulated in response to environmental stimuli by the GATA transcription factor ELT-3 in *C. elegans*. *Genetics*.
- Huaqing Cai, M. K.-K. (2015). Nucleocytoplasmic shuttling of a GATA transcription factor functions as a development timer. *Science*.
- Huerta Miriam, L. R.-R.-H.-L.-M. (2020 en prensa). A non-canonical GATA transcription factor of *Entamoeba histolytica* modulates genes involved in phagocytosis.
- Huston CD, B. D.-S. (2003). Apop- totic killing and phagocytosis of host cells by the parasite Enta- moeba histolytica. . *Infect Immun*.
- JL, M. (1989). Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell*.
- J.L., L. M. (1989). Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell*, 405-408.
- J. Fleta Zaragozaanoa, O. B. (2000). Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. *ELSEVIER*, 96-101.
- Jarillo-Luna RA, C.-R. R. (2002). *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Experimental Parasitology*, 40-56.
- Jl, R. (1986). Pathogenesis of disease caused by Enta- moeba histolytica: Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Disease*, 247-260.
- Jl, R. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Dis* .
- Keene WE, H. M. (1990). En- tamoeba histolytica: correlation of the cytophatic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease. *Exp Parasitol* , 199-206.
- Kim, X. X. (2012). El factor de transcripción GATA egl-27 retrasa el envejecimiento al promover la resistencia al estrés en *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*.
- M., L. (1997). Amoebapores. *Parasitol Today*.
- M., L. (1997). Amoebapores. *Parasitol Today*.
- Manske. (2019). *Gentle*. Obtenido de GENTle: <http://gentle.magnusmanske.de/>
- Maria, S. M., Rodríguez, A. S., & Borunda, J. S. (2018). *Función y características de las regiones reguladoras funcionales*. Obtenido de StuDocu: <https://www.studocu.com/es-ar/document/universidad-nacional-de-san-luis/biologia-molecular/resumenes/funcion-y-caracteristicas-de-las-regiones-reguladoras-funcionales/3221674/view>
- Marion S., L. C. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: A proteomic approach. *Cell Microbiol*.
- Martin, D. a. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. . *Genes Dev* 4, 1886-1898.

- Martinez-Lopez C., O. E.-P.-H. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol.* .
- Martínez Corrales G, A. N. (2020). Evolutionary Conservation of Transcription Factors Affecting Longevity. *Trends Genet.*
- Martinez M.B., R. M.-R.-P. (2009). A pcDNA-Ehcpadh vaccine against *Entamoeba histolytica* elicits a protective Th1-like response in hamster liver. *Vaccine.*, 4176–4186.
- MARTINEZ-PALOMO, A. G.-R.-C. (1985). Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool*, 166-175.
- Medicine, N. L. (2020). *Leucine Zippers MeSH Descriptor Data 2020*. Obtenido de National Institutes of Health: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Leucine%20zippers>
- Meneses Eric, H. C.-C.-L. (2010). The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica* . *Gene*, 32–42.
- Mercedes Calixto-Gálvez, M. R.-D.-M.-C.-M. (2011). Identification of a polypeptide containing Tudor and staphylococcal nuclease-like domains as the sequence-specific binding protein to the upstream regulatory element 1 of *Entamoeba histolytica* . *International Journal for Parasitology*, 775-782.
- Meza I., C. F.-E.-R. (1987). Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. . *J. Infect. Dis.*, 798–805.
- Mina Yu 1 1, J. Y. (2019). Genome-wide identification and analysis of the GATA transcription factor gene family in *Ustilaginoidea virens*. *Genome*, 807-816.
- Montaño S., O. E.-B.-M. (2017). Heterodimerization of the *Entamoeba histolytica* EhCPADH virulence complex through molecular dynamics and protein–protein docking. *J. Biomol. Struct. Dyn.* .
- Naiyer S., K. D. (2019). Transcriptomic analysis reveals novel downstream regulatory motifs and highly transcribed virulence factor genes of *Entamoeba histolytica*. *BMC Genom.*
- Nakada-Tsukui K., S.-N. Y. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: Annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba*. *Exp. Parasitol.*
- Novikoff, A. N. (1972). Studies on microperoxisomes II. A cytochemical method for light and electron microscopy. *Histochem Cytochem*, 1006-1023.
- n-Pla, N. V. (2018). Chromatin Immunoprecipitation. *Methods and Protocols*.
- och J, S. H. (2019). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*.
- Ocádiz Ruiz R, F. W. (2016). The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence. *Parasitology*.
- Ocádiz Ruiz, F. W.-Q. (2013). Effect of the silencing of the Ehcp112 gene on the in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. . *Parasit. Vectors*.
- Olivos García Alfonso, S. E. (2011). amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 10-20.

- Okada, M. H. (2006). Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol* 145, 171–183.
- Omichinski J. G., C. G. (1993). NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 261, 438–446.
- P. Anthony Weil. (s.f.). Regulación de la expresión de gen. En P. A. Weil, *Harper. Bioquímica ilustrada*. McGraw-Hill.
- Pearson Richard J., L. M. (2012). Regulation of H₂O₂ Stress-responsive Genes through a Novel Transcription Factor in the Protozoan Pathogen *Entamoeba histolytica*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 4462–4474.
- Perdomo D., B. B.-D. (2013). The α -helical regions of KERP1 are important in *Entamoeba histolytica* adherence to human cells. *Sci. Rep.*
- Pertuz Belloso S., O. S.-Z. (2004). *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol.*, 237–241.
- Petri W.A., J. H. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiology*, 39–64.
- Petri WA, S. R. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediated the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest*, 1238-1244.
- Pineda E., E. R.-Z.-G.-S. (2010). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase are essential for energy metabolism under oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. *FEBS J*, 3382–3395.
- Pratibha Ravindran 1, V. V. (2017). A Novel RGL2-DOF6 Complex Contributes to Primary Seed Dormancy in *Arabidopsis thaliana* by Regulating a GATA Transcription Factor. *Molecular plant*, 1307-1320.
- Puig, R. P. (2020). *Dedos de zinc: estructura, clasificación, función e importancia*. Obtenido de lifeder: <https://www.lifeder.com/dedos-de-zinc/>
- Ramirez M. Esther, D. G. (2005). *Entamoeba histolytica*: Functional characterization of the \approx 234 to \approx 196bp promoter region of the multidrug resistance EhPgp1 gene. *Experimental Parasitology*, 238–243.
- Ramón Ocadiz 1, E. O.-L.-P.-J.-R. (2005). EhCP112 es una cisteína proteasa secretada por *Entamoeba histolytica* que puede estar involucrada en la virulencia del parásito. *Microbiol celular*.
- Ramón, C. (9 de junio de 2016). *Biología*. Obtenido de <https://biologia.laguia2000.com/genetica/factores-de-transcripcion>
- Ravdin JI, G. R. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest*, 1305-1313.
- RAVDIN, J. I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Dis.*, 247-260.
- Reya, T. M. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 105-111.
- Riveron, A. L.-C.-C.-P.-A. (2000). Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *European biophysics journal : EBJ* 29, 48-56.

- Rodríguez M.A., G.-P. R. (1998). The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba*. *Microb. Pathog.* .
- Rodríguez MA, H. F. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol Biochem Parasitology*, 87-100.
- Romero Díaz Mónica, C. G.-R. (2007). Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrabB gene promoter. *Molecular Biology*.
- Rosales-Encina JL, M. I.-d.-L.-R. (1987). Isolation of a 220 kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.*
- Rosales-Encina J.L., M. I.-D.-L.-R. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Dis.*, 790–797.
- Sahoo N, L. E. (2004). Calcium binding protein 1 of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* interacts with actin and is involved in cytoskeleton dynamics. *J Cell Sci.*
- Seigneur M., M. J. (2005). A lysine- and glutamic acid-rich protein, KERP1, from *Entamoeba histolytica* binds to human enterocytes. *Cell. Microbiol.*, 569–579.
- Serrano-Luna J., P.-V. C.-L.-E. (2013). Proteases from *Entamoeba* spp. and Pathogenic Free-Living Amoebae as Virulence Factors. *J. Trop. Med.*
- SF., G. (2000). Differential Gene Transcription. *Developmental Biology*.
- Singh D, N. S. (2004). Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. . *Parasitology*.
- Solis, C. S.-R. (2009). Use of bacterially expressed dsrna to downregulate *entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One*.
- Somlata, B. S. (2011). A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nat Commun*.
- Srivastava A, B. A. (2016). Identification of EhTIF-IA: The putative *E. histolytica* orthologue of the human ribosomal RNA transcription initiation factor-IA. *J. Biosci.*, 51–62.
- Teixeira J.E., S. A. (2012). Control of *Entamoeba histolytica* adherence involves metallosurface protease 1, an M8 family surface metalloprotease with homology to leishmanolysin. *Infect. Immun.* .
- Thibeaux R., A. P. (2014). The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nat. Commun*.
- Toral, E. M. (2018). ENFERMEDAD DIARRÉICA PARASITARIA FISIOPATOLOGÍA DE TIPO INFLAMATORIA . *Synaptic*.
- Tovy, A. S. (2010). A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: the metabolic regulation of cytosine-5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS pathogens* 6.
- Trejos Suárez Juanita, C. O. (2009). Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA | REVISTA INFECTIO*, 13:2.
- Uribe R., A.-B. M.-F.-H.-R.-R. (2012). A functional study of nucleocytoplasmic transport signals of the EhNCABP166 protein from *Entamoeba histolytica*. *Parasitology.*, 697–1710.

- Valanne Susanna, L. V. (2018). Commentary: Drosophila GATA Factor Serpent Establishes Phagocytic Ability of Embryonic Macrophages. *Front Immunol.*
- Valentina Guasconi, H. Y.-S.-A. (2003). *Factores de transcripción*. Obtenido de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/TFactorsSpID30020SS.html>
- Verma K., S. V. (2018). Rab GTPases take centre stage in understanding Entamoeba histolytica biology. *Small GTPases.*
- Verma K., S. V. (2018). Rab GTPases take centre stage in understanding Entamoeba histolytica biology. . *Small GTPases.*
- Vines R.R., R. G. (1998). Regulation of adherence and virulence by the Entamoeba histolytica lectin cytoplasmic domain, which contains a $\beta 2$ integrin motif. . *Mol. Biol. Cell.*, 2069–2079.
- Wärnmark A, T. E. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol.*
- Wayne, D. (september de 2019). *ApE A plasmid Editor*. Obtenido de ApE plasmid: <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>.
- Winkelmann J, L. M. (2006). A novel saposin-like protein of Entamoeba histolytica with membrane-fusogenic activity. *Mol Biochem Parasitol.*