



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Actividad transcripcional e interacción con el DNA del factor EhHSTF7 de *Entamoeba histolytica*”

TESIS

Que presenta

M. en C. FABIOLA BELLO SANTOS

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

EN LA ESPECIALIDAD DE

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directoras de la Tesis:

D. en C. María Esther Orozco Orozco (DIPM-CINVESTAV)

D. en C. María del Consuelo Gómez García (ENMyH-IPN)

Ciudad de México

Diciembre, 2021

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María Esther Orozco Orozco y de la Dra. María del Consuelo Gómez García, en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, y en el Laboratorio de Biomedicina Molecular I de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco por el apoyo para la realización de este proyecto de investigación, por el apoyo económico para la asistencia a congresos internacionales, y sobre todo por permitirme obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por el apoyo recibido para la realización y culminación de este proyecto de investigación, en especial a la D. en C. Ana Lorena Gutiérrez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la asignación de beca nacional de posgrado (CVU 561586).

A mis directoras de tesis, la D. en C. María del Consuelo Gómez García y la D. en C. Esther Orozco Orozco, por compartirme sus conocimientos y experiencia; por brindarme su confianza para la realización de este proyecto de investigación.

A mi comité tutorial:

La D. en C. Rosa María del Ángel, la D. en C. Esther López-Bayghen, el D. en C. Mario Alberto Rodríguez, y el D. en C. Guillermo Pérez, por sus comentarios al proyecto y tiempo de revisión de esta tesis.

Índice

Lista de tablas	7
Lista de figuras	7
Lista de abreviaturas	9
Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	13
1.2 Panorama epidemiológico de la amebiasis	15
1.3 Mecanismos de patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	17
1.4 Genoma del parásito <i>E. histolytica</i>	18
1.4.1 Inicio de la transcripción en eucariotas	20
1.4.2 Factores de transcripción en <i>E. histolytica</i>	21
1.5 Factores de transcripción de choque térmico (HSFs)	25
1.5.1 Factores de transcripción de choque térmico (HSFs) en <i>E. histolytica</i>	30
1.6 Fenotipo de resistencia a múltiples fármacos	31
1.6.1 Resistencia a fármacos y fenotipo MDR en <i>E. histolytica</i>	32
1.6.2 Importancia de los HSFs en el fenotipo MDR	35
2. Antecedentes	37
3. Justificación	40
4. Hipótesis	41
5. Objetivo General	41
5.1 Objetivos específicos	41
6. Estrategia Experimental	42
7. Material y Métodos	43
7.1 Caracterización <i>in silico</i> de la interacción del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen <i>EhPgp5</i> .	43

7.1.1	Modelo 3D estructural del factor de transcripción EhHSTF7	43
7.1.2	Dinámica molecular del factor EhHSTF7	43
7.1.3	Acoplamiento molecular del factor EhHSTF7 y el elemento HSE del gen <i>EhPgp5</i>	44
7.2	Análisis de la proteína recombinante del factor EhHSTF7 y su oligomerización	45
7.2.1	Amplificación del gen <i>Ehhstf7</i>	45
7.2.2	Obtención, propagación y transformación del plásmido pET28a+ <i>Ehhstf7</i>	48
7.2.3	Inducción de la expresión de la proteína recombinante EhHSTF7	51
7.2.4	Obtención de la proteína recombinante EhHSTF7	52
7.2.5	Ensayos de fluorescencia de los residuos aromáticos	53
7.3	Interacción <i>in vitro</i> del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen <i>mdr EhPgp5</i>	54
7.3.1	Marcaje e hibridación de la sonda HSEwt	54
7.3.2	Ensayos de interacción rEhHSTF7-HSEwt	54
7.3.3	Superretardamiento	55
7.3.4	Ensayos de competencia del complejo rEhHSTF7-HSEwt	56
7.4	Participación del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen <i>EhPgp5</i> en trofozoítos cultivados con emetina	56
7.4.1	Silenciamiento del factor de transcripción EhHSTF7 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	56
7.4.2	Viabilidad de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cultivados con emetina y DsiRNAs	58
7.4.3	Expresión del mRNA del gen <i>Ehhstf7</i> y del gen <i>EhPgp5</i> en trofozoítos silenciados	58
7.4.4	Expresión de la proteína EhHSTF7 y EhPGP5 en trofozoítos silenciados	60
7.5	Realizar el interactoma <i>in silico</i> de EhHSTF7 y confirmar su asociación con alguna de las proteínas identificadas	61
7.5.1	Interactoma <i>in silico</i> del factor EhHSTF7 con la proteína EhHSP70	61
7.5.2	Co-localización del factor EhHSTF7 con la EhHSP70 en trofozoítos en respuesta a emetina	62
8.	Resultados	63
8.1	Interacción del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen <i>mdr EhPgp5 in silico</i>	63
8.1.1	Modelo estructural 3D del factor EhHSTF7	63

8.1.2 Simulación de la dinámica molecular del factor EhHSTF7	66
8.1.3 Acoplamiento molecular del modelo del factor EhHSTF7 y el elemento HSE del promotor del gen <i>EhPgp5</i>	69
8.2 Obtención de la proteína recombinante del factor EhHSTF7	72
8.2.1 Amplificación del gen <i>Ehhstf7</i>	72
8.2.2 Obtención del plásmido pET28a+ <i>Ehhstf7</i>	73
8.2.4 La proteína rEhHSTF7 cambia su estado de oligomerización en respuesta al aumento de temperatura y concentración	78
8.3 Interacción <i>in vitro</i> del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del promotor del gen <i>mdr EhPgp5</i>	81
8.3.1 El factor EhHSTF7 interacciona de manera específica con el HSE <i>in vitro</i>	81
8.3.2 Importancia de las bases 5'-GAA-3' en la interacción rEhHSTF7-HSEwt	85
8.4 Participación del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen <i>EhPgp5</i> en trofozoítos cultivados con emetina	87
8.4.1 Expresión del factor EhHSTF7 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cultivados con emetina	87
8.4.2 Efecto del silenciamiento del factor EhHSTF7 en la expresión del <i>EhPgp5</i>	89
8.5 Análisis del interactoma <i>in silico</i> de EhHSTF7 y confirmar su asociación con alguna de las proteínas identificadas	93
8.5.1 Interactoma de la proteína EhHSTF7	93
8.5.2 Interacción <i>in vivo</i> de las proteínas EhHSTF7-EhHSP70	94
9. Discusión	97
10. Conclusiones	107
11. Perspectivas	108
12. Referencias Bibliográficas	109

Lista de tablas

Tabla 1. Factores de transcripción caracterizados en <i>E. histolytica</i>	24
Tabla 2. HSE identificados en diferentes organismos	27
Tabla 3. Familia de <i>HSFs</i> de <i>E. histolytica</i>	32
Tabla 4. Condiciones para la síntesis del DNA complementario	47
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de <i>PCR</i>	48
Tabla 6. Condiciones de <i>PCR</i>	48
Tabla 7. Condiciones de la doble restricción enzimática del plásmido pET28a+ <i>Ehhstf7</i>	49
Tabla 8. DsiRNAs y siRNAs utilizados en el silenciamiento del gen <i>Ehhstf7</i>	58
Tabla 9. Oligonucleótidos usados en la qRT-PCR	59
Tabla 10. Condiciones usadas en la qRT-PCR	60
Tabla 11. Validación del modelo de EhHSTF7 obtenido en I-TASSER	64
Tabla 12. Posibles interacciones proteína-proteína de EhHSTF7	94

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida del parásito <i>E. histolytica</i> (tomado de Centers for Disease Control and Prevention, 2015).	14
Figura 2. Casos y tasa de incidencia de amebiasis intestinal en el periodo 2000-2011 en México (Tomado de SUIVE, 2011).	17
Figura 3. Esquema de la estructura del promotor de <i>E. histolytica</i> (Tomado de Vanacova et al., 2003).	22
Figura 4. Representación de los dominios de los <i>HSFs</i> (Tomado de Macías-Argüelles et al., 2012).	27
Figura 5. Esquema de activación de los <i>HSFs</i> (Modificado de Kansanen et al., 2009).	28

Figura 6. Modelo del transporte de moléculas por la Pgp (Tomado de Bansal et al., 2006).	32
Figura 7. Sobreexpresión de EhHSTF7 en trofozoítos cultivados con emetina (Tomado de Macías-Argüelles et al., datos no publicados).	39
Figura 8. Construcción pET28a+ <i>Ehhstf7</i> .	50
Figura 9. Representación de los modelos <i>in silico</i> del factor EhHSTF7.	64
Figura 10. Representación estructural del modelo 2 del factor EhHSTF7.	65
Figura 11. Dominios y motivos del modelo 2 del factor EhHSTF7.	66
Figura 12. Análisis de la MDS del factor EhHSTF7.	68
Figura 13. Clusterización de la MDS del factor EhHSTF7.	69
Figura 14. Acoplamiento molecular <i>in silico</i> EhHSTF7-HSE.	71
Figura 15. Secuencia nucleotídica del gen <i>Ehhstf7</i> .	72
Figura 16. Amplificación del gen <i>Ehhstf7</i> .	73
Figura 17. Obtención del plásmido pET28a+ <i>Ehhstf7</i> .	74
Figura 18. Sobreexpresión de la proteína rEhHSTF7.	76
Figura 19. Purificación de la proteína recombinante EhHSTF7 por cromatografía de afinidad a Níquel y exclusión por tamaño.	78
Figura 20. Posición de residuos de Tirosina y Triptófano en la proteína EhHSTF7.	79
Figura 21. Disminución de la fluorescencia intrínseca de rEhHSTF7 en respuesta al aumento de temperatura y concentración.	80
Figura 22. Interacción rEhHSTF7-HSEwt <i>in vitro</i> .	82
Figura 23. Especificidad de la interacción rEhHSTF7-HSEwt.	84
Figura 24. Importancia de las bases 5'-GAA-3' en el complejo rEhHSTF7-HSEwt.	86

Figura 25. El factor EhHSTF7 se sobreexpresa en trofozoítos con emetina.	88
Figura 26. Efecto del silenciamiento con siRNAS en la expresión del mRNA del factor EhHSTF7.	90
Figura 27. Expresión del gen <i>EhPgp5</i> en trofozoítos con el factor EhHSTF7 silenciado.	92
Figura 28. Posibles interacciones proteicas de la proteína EhHSTF7.	93
Figura 29. Localización <i>in vivo</i> por inmunofluorescencia del factor EhHSTF7 y la proteína EhHSP70.	96

Lista de abreviaturas

ABC: cassette de unión a ATP

CME: centro de masas espectral

CTA: dominio de transactivación C-terminal

DEPC: dietilpirocarbonato

DBD: dominio de unión al DNA

DO: dominio de oligomerización

EhPgp: P-glicoproteína de *E. histolytica*

EMSA: ensayo de cambio en la corrida electroforética

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HB: puentes de hidrógeno

HSE: elemento de respuesta a choque térmico

HSEwt: elemento de respuesta a choque térmico *wild type*

HSF: factor de transcripción de choque térmico

HSP: proteína de choque térmico

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

mdr: resistencia a múltiples fármacos

MDS: simulación de dinámica molecular

NLS: señal de localización nuclear

NR: dominio reguladora

OMS: organización mundial de la salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDB: protein data bank

PTMs: modificaciones post-traduccionales

qPCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

RG: radio de giro

RMSD: desviación cuadrática de la raíz media

RMSF: fluctuación cuadrática de la raíz media

RNA pol II: polimerasa tipo II de ácido ribonucleico

SASA: área de exposición al solvente

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

siRNA: RNA de interferencia pequeño

siRNA_r: RNA de interferencia pequeño no relacionado

UTR: región no traducida

Resumen

Entamoeba histolytica contiene una de las familias más numerosas de factores de transcripción de choque térmico (EhHSTFs), conformada por siete genes. Resultados anteriores a este trabajo, sugieren que el factor de transcripción EhHSTF7 podría estar involucrado en la activación transcripcional del gen de resistencia a múltiples fármacos *EhPgp5* en respuesta a emetina. El objetivo de este trabajo fue analizar el papel regulador del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en el parásito *E. histolytica*. La interacción por acoplamiento molecular *in silico* del factor EhHSTF7 y el elemento HSE, mostró que los residuos Ser69 y Arg72 de la α hélice 3 del dominio de unión al DNA de EhHSTF7, están involucrados en la interacción con las bases complementarias de la secuencia 5'-GAA-3' del elemento HSE. Por otra parte, se encontró que la proteína rEhHSTF7 cambia el estado de oligomerización en respuesta a la concentración y al estrés térmico; además, mediante ensayos de retardamiento se demostró que la proteína recombinante interacciona con el HSE de manera específica y se comprobó que las bases complementarias a la secuencia 5'-GAA-3' son relevantes en esta unión. El silenciamiento de EhHSTF7 con siRNAs, demostró que en trofozoítos cultivados con emetina la viabilidad celular disminuyó, así como la expresión de *EhPgp5* a nivel de mRNA y proteína. Finalmente, el factor EhHSTF7 no co-localizó con la proteína EhHSP70 en el núcleo de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con emetina. Los resultados de este proyecto indican que el factor EhHSTF7 reconoce al elemento HSE del gen de resistencia a múltiples fármacos *EhPgp5*, lo que sugiere que está involucrado en la regulación del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en el parásito *E. histolytica*.

Abstract

Entamoeba histolytica has one of the most numerous families of heat shock transcription factors (EhHSTFs), consisting of seven genes. Previous results suggest that the EhHSTF7 transcription factor may be involved in the transcriptional activation of the multidrug resistance gene *EhPgp5* in response to emetine. The aim of this work was to analyze the regulatory role of the EhHSTF7 factor in the transcriptional activation of the *EhPgp5* gene in the *E. histolytica* parasite. The interaction by *in silico* molecular docking of the EhHSTF7 factor and the HSE element of the *EhPgp5* gene showed that residues Ser69 and Arg72 of α helix 3 of the DNA-binding domain of EhHSTF7 are involved in the interaction with the complementary bases of the 5'-GAA-3' sequence of the HSE element. Moreover, the rEhHSTF7 protein was found to change the oligomerization state in response to concentration and heat stress; furthermore, by retardation assays it was shown that the recombinant protein interacts with HSE in a specific manner and the bases complementary to the 5'-GAA-3' sequence were found to be relevant in this binding. Silencing of EhHSTF7 with siRNAs showed that in trophozoites cultured with emetine cell viability decreased, as well as EhPgp5 expression at the mRNA and protein level. Finally, EhHSTF7 factor did not co-localize with EhHSP70 protein into the nucleus of the *E. histolytica* trophozoites cultured with emetine. The results of this project indicate that the EhHSTF7 factor recognizes the HSE element of the multidrug resistance gene *EhPgp5*, suggesting that it is involved in the regulation of the multidrug resistance phenotype in the *E. histolytica* parasite.

1. Introducción

1.1 *Entamoeba histolytica*

El parásito *Entamoeba histolytica* representa un problema importante de salud pública en todo el mundo, este organismo es el agente etiológico de la amebiasis, la cual es una enfermedad común en regiones tropicales donde la higiene y sanidad son inadecuadas. Las características clínicas de esta enfermedad van desde la colonización asintomática hasta la colitis amebiana (disentería o diarrea) y la amebiasis invasiva extra-intestinal, siendo el absceso hepático la forma clínica más común (Samie et al., 2012). La clasificación taxonómica de este parásito indica que pertenece al Reino Protista, Phylum Amebozoa, Clase Archamoebae, Orden Entamoebida, Familia Entamoebidae, Género *Entamoeba*, Especie *Entamoeba histolytica*, según Schaudinn en 1904 (Ximénez et al., 2007).

El ciclo de vida de *E. histolytica* es oral-fecal, y consiste en una etapa infectiva, el quiste, y otra etapa de multiplicación, el trofozoito (Figura 1). El quiste es una forma infectiva y de latencia, con estructura esférica u ovoide. Según su grado de madurez, presenta de uno a cuatro núcleos y una capa gruesa de quitina que le permite resistir a las condiciones adversas del ambiente y al pH ácido del estómago (Saavedra & Olivos-García, 2017). Los quistes maduros en el intestino grueso abandonan el huésped en grandes números y permanecen viables en ambientes fríos y húmedos por al menos 12 días, mientras que en el agua los quistes pueden sobrevivir hasta por 30 días. Cuando son ingeridos los quistes pasan a través del estómago y en el intestino delgado, donde las condiciones son alcalinas y permiten la división nuclear, ocho trofozoítos móviles son producidos (Samie et al., 2012).

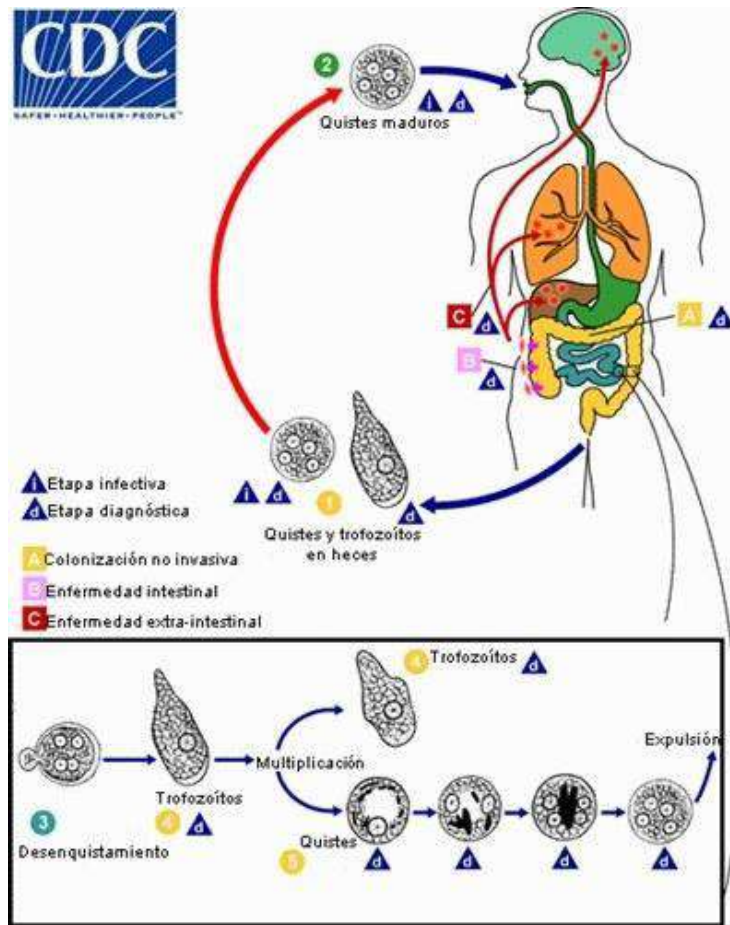


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *E. histolytica*. (1) Quistes presentes en heces humanas, (2) ingestión de quistes maduros en comida, agua, o contacto humano, (3) desenquistamiento en el intestino, (4) liberación de trofozoítos y migración al intestino grueso u otros órganos (principalmente hígado), (5) enquistamiento y liberación en heces humanas (Tomado de Centro para el control y prevención de enfermedades, 2015).

Los trofozoítos son móviles, proliferativos e invasivos, con forma irregular. En su citoplasma se distinguen el exoplasma, que le sirve para desplazarse a la vez que emite pseudópodos y el endoplasma, que rodea al núcleo y se caracteriza por tener numerosas vacuolas (Saavedra & Olivos-García, 2017). Los trofozoítos se establecen en el lumen del intestino grueso, donde se dividen por fisión binaria y se alimentan de células del huésped, bacterias, y otras partículas; se multiplican indefinidamente en la mucosa del intestino grueso. Los trofozoítos inician la invasión del tejido cuando hidrolizan las células de la mucosa y absorben los productos pre-

digeridos. En algunas ocasiones el parásito invade la pared intestinal, alcanzan la submucosa y con esto los vasos sanguíneos, los trofozoítos viajan a través de la sangre hasta alcanzar tejidos importantes del huésped tales como el hígado, los pulmones, la piel e incluso el cerebro, en este caso los trofozoítos entran en un ciclo sin salida en el cual no pueden abandonar el huésped, ni causar infección a otros individuo (Samie et al., 2012).

El enquistamiento ocurre en el lumen intestinal y el quiste se forma completamente cuando presenta cuatro núcleos, por último el quiste llega al ambiente a través de las heces humanas y éstos son resistentes a una variedad de condiciones ambientales. En algunas ocasiones los trofozoítos pueden salir en las heces, pero no pueden sobrevivir fuera del huésped. Las señales que dan lugar al enquistamiento y desenquistamiento actualmente son desconocidas o muy poco entendidas en este parásito (Samie et al., 2012).

1.2 Panorama epidemiológico de la amebiasis

La epidemiología de la amebiasis es estudiada en todo el mundo, sin embargo los datos epidemiológicos en muchos países tropicales endémicos son sobreestimados debido a una identificación inadecuada del parásito *E. histolytica*. (Samie et al., 2012). En países desarrollados la amebiasis tiende a ser más común en pacientes mayores y ocurre de manera más frecuente en hombres homosexuales o en ciertas instituciones (Hung et al., 2008). Mientras que en regiones tropicales, la epidemiología de la amebiasis es completamente diferente y es más común en la población en general, siendo los más afectados los menores de 18 años (Ximénez et al., 2009). La infección es más frecuente en países y regiones en vías de desarrollo como América Latina, Asia y África (Ghosh et al., 2000). Por otro lado, la reclasificación de *E. histolytica* en dos especies diferentes, incluye la especie patógena *E. histolytica* y las especies no patógenas *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*, estas tres especies no pueden ser diferenciadas por simple microscopía, que es el método de diagnóstico más usado en países tropicales donde la amebiasis es endémica (Samie et al., 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la amebiasis, como la infección provocada por el parásito *E. histolytica* en humanos con presencia o ausencia de manifestaciones clínicas. Se conoce que aproximadamente el 90% de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas, sin embargo, existe un estimado de 50 millones de casos de infecciones al año y de acuerdo con la OMS se encuentra clasificada como la cuarta causa de muerte por enfermedades parasitarias, sólo después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Ramírez et al., 2012). Cerca del 10% de la población mundial (aproximadamente 480 millones) está infectada con el parásito *E. histolytica*, este parásito ocasiona de 70 a 100 mil muertes al año en todo el mundo debido a complicaciones de la enfermedad invasiva y se estima una prevalencia mundial promedio de 12%. Sin embargo, la prevalencia de la infección puede llegar a alcanzar de un 50 a 80% en países poco desarrollados y en zonas tropicales. Del total de infectados con síntomas clínicos aproximadamente del 80 al 98% presenta síntomas relacionados con alteraciones de la mucosa intestinal (disentería) (Saavedra & Olivos García, 2017).

En México la amebiasis se encuentra entre las veinte principales causas de enfermedad, se reportaron más de 300,000 casos en 2013 y la infección ocupa el décimo lugar dentro de las patologías con mayor prevalencia en el país (Saavedra & Olivos García, 2017). La incidencia de amebiasis intestinal del año 1995 al 2006 se encontraba entre 1000 y 5000 casos por cada 100,000 habitantes por año, siendo los individuos menores de 15 años los más frecuentemente afectados, principalmente los niños menores de 5 años (Ximénez et al., 2007). Así mismo, se reportó que en el año 2003 ocupaba el quinto lugar dentro de las principales causas de morbilidad con una incidencia nacional de 972 por cada 100,000 habitantes, mientras que en el año 2011 ya ocupaba el sexto lugar dentro de esta categoría, donde alcanzó una incidencia de 384 casos por cada 100,000 habitantes (Figura 2) (SUIVE, 2011).



Figura 2. Casos y tasa de incidencia de amebiasis intestinal en el periodo 2000-2011 en México. *tasa de incidencia por 100,000 habitantes; **tasa de incidencia por 100 habitantes (Tomado de SUIVE, 2011).

1.3 Mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*

Solamente una minoría de las infecciones por *E. histolytica* progresan al desarrollo de síntomas clínicos (uno por cada cuatro pacientes es asintomático), la explicación precisa de este evento permanece desconocida. Esto se puede deber en parte a las diferencias en el potencial de patogenicidad de las cepas infecciosas, al genotipo del parásito y a la variabilidad en la respuesta del sistema inmune del huésped contra la invasión amebiana (Mortimer & Chadee, 2010). La colonización asintomática se caracteriza por la sobrevivencia del parásito en perfecta armonía con el huésped. Se ha demostrado que una deficiencia en IL-10 del huésped lo predispone a no desarrollar síntomas clínicos de amebiasis (Samie et al., 2012).

En la amebiasis intestinal, el parásito invade la mucosa del colon en un periodo de una a cuatro semanas, produciendo úlceras características de la infección y cuadros agudos de diarrea sanguinolenta (disentería amebiana), la invasión amebiana a través de la mucosa y en la submucosa es una marca de la colitis amebiana (Stanley, 2003). El contacto de los trofozoítos vía la lectina de unión a galactosa y N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) activa cascadas de señalización que inician la muerte de las células del huésped a través de diferentes mecanismos, como la

fagocitosis, la citotoxicidad y activación de caspasas, iniciando la etapa invasiva de la enfermedad (intestinal o extraintestinal) (Samie et al., 2012).

Otras moléculas involucradas en el proceso de la enfermedad son: la proteína rica en serina (SREHP), la cual promueve la adhesión de los trofozoítos a las células del huésped (Stanley et al., 1995), los amebaporos, que junto con la lectina Gal/GalNAc interviene en la adhesión del trofozoíto a las células del huésped (Zhai & Saier, 2000) y las cisteín-proteasas, que están involucradas en la destrucción de las células del huésped, fagocitosis, reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, la inactivación de la vía clásica del complemento, así como la inducción de la inflamación intestinal (Bruchhaus et al., 2003; Moncada et al., 2003; Lidell et al., 2006; Furukawa et al., 2013). La activación de la respuesta inflamatoria y no inflamatoria después del contacto de los trofozoítos con el intestino induce una infiltración masiva de neutrófilos a través del epitelio, resultando en el debilitamiento de las células epiteliales y de la mucosa permitiendo a los trofozoítos invadir el epitelio intestinal y diseminarse a otros órganos a través del torrente sanguíneo (Samie et al., 2012).

Cerca del 5% de individuos con amebiasis intestinal, en uno o tres meses después de la desaparición de la disentería, desarrollan amebiasis extra-intestinal (Stanley, 2003). Una vez en la sangre, el parásito usa diferentes estrategias para evitar la eliminación por parte del huésped y alcanzar otros órganos, como el hígado, pulmones, cerebro, etc. El sitio extra-intestinal más comúnmente afectado por el parásito es el hígado, generando el absceso hepático amebiano. Los trofozoítos alcanzan el hígado creando un único absceso y mediante la lisis de neutrófilos en el sitio de daño se liberan mediadores que producen la muerte de las células del hígado, extendiendo el daño a otros hepatocitos que no se encuentran en contacto directo con el parásito (Samie et al., 2012).

1.4 Genoma del parásito *E. histolytica*

El genoma de *E. histolytica* se ha secuenciado completamente (Loftus et al., 2005); sin embargo, un análisis posterior reveló nuevas características del genoma de este

parásito (Lorenzi et al., 2010). El genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño de aproximadamente 20.84 Mpb y con 8163 genes codificantes de proteínas anotados, los cuales presentan un tamaño promedio de 1.17 kpb, hasta el momento a sólo la mitad de esos genes se les ha asignado una función; además la composición de nucleótidos GC en el genoma es de solamente 24% (Shabardina et al., 2018). El 25% de los genes contienen intrones y sólo el 6% de estos presentan intrones múltiples, las secuencias intrónicas son relativamente cortas con un tamaño de 46-115 pb y contienen los dinucleótidos conservados GU y AG en los sitios donadores y aceptores de *splicing*, respectivamente (Gómez et al., 2010).

Los cromosomas de *E. histolytica* no se condensan, lo que ha dificultado la determinación de su número, aunque se han reportado al menos 15 grupos de ligamiento cuyo tamaño varía de 0.3 a 2.2 Mpb (Chávez-Munguía et al., 2006). También se han reportado diferencias en el tamaño de los cromosomas homólogos de diferentes cepas aisladas (Ximénez et al., 2007; Gómez et al, 2010), la variación en el tamaño de los cromosomas puede ser debido a la contracción y expansión de los repetidos subteloméricos, como se ha reportado en otros protistas (Loftus et al., 2005). El genoma de *E. histolytica* consiste en cromosomas lineales y un número de moléculas de DNA circulares de diferentes tamaños (Bhattacharya et al., 2000). Las regiones intergénicas son de aproximadamente 400 pb a 2.3 kpb lo que sugiere un alta compactación de los genes (Gómez et al, 2010).

Aproximadamente el 10% del genoma de *E. histolytica* consiste en genes de tRNA organizados en tándem que varían en longitud de 490 a 1775 pb y contienen de 1 a 5 genes de tRNA (Clark et al., 2006). Los genes de rRNA están localizados exclusivamente en las moléculas de DNA circular extra-cromosomal con un tamaño aproximado de 26 kb (Gómez et al, 2010), que contienen dos unidades de transcripción arregladas como invertidos repetidos con muchas familias de repetidos cortos en tándem río arriba y río abajo de las unidades de transcripción (Bhattacharya et al., 2000). El análisis del genoma revela una redundancia en los genes que codifican para los factores de virulencia tales como la lectina Gal/GalNAc,

las cisteína-proteasas y el amebaporo (Loftus et al., 2005). Las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' de genes estructurales usualmente son cortas, comprendiendo de 5 a 21 pb y de 14 a 44 pb, respectivamente (Bhattacharya et al., 2000).

1.4.1 Inicio de la transcripción en eucariotas

En la mayoría de los organismos, el inicio de la transcripción es el punto de control más importante de la expresión de genes, y es regulada por dos clases de proteínas: (1) factores no específicos, como la RNA Polimerasa II (RNA Pol II), factores de transcripción generales, y enzimas involucradas en la modificación de histonas y metilación de DNA; y (2) factores específicos, comúnmente nombrados factores de transcripción. Los factores de transcripción eucariotas han desarrollado un arsenal de mecanismos moleculares para enfrentarse con el complejo ambiente bioquímico de la cromatina eucariota; esto es llevado a cabo a través de su unión a secuencias específicas del DNA y a sus dominios específicos que permiten el reclutamiento de reguladores no específicos que impactan en la transcripción a diferentes niveles, como el acceso al DNA o el reclutamiento de la maquinaria de la RNA Pol II (Suter, 2020).

El primer intermediario para la expresión de genes codificantes, es la formación del complejo de preiniciación (CPI), que contiene la RNA Pol II, los factores generales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF, y TFIIH y un mediador de 20 subunidades; en el CPI, una red de interacciones del DNA con los factores generales ancla la RNA Pol II al promotor de doble cadena. (Boeger et al., 2005; Grünberg & Hahn, 2013). La proteína de unión a TATA (TBP) es parte del complejo TFIID; la cual se une a la caja TATA localizada río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS), posteriormente TBP dobla el DNA y éste es estabilizado por TFIIA, TFIIB, y TFIIIF, este último complejo permite que la RNA Pol II localice el TSS, además de estabilizar la interacción de la RNA Pol II y el mediador; TFIIIE interacciona con TFIIIF y estabiliza el CPI, por último TFIIH separa la doble hélice de DNA en el promotor y

permite que la RNA Pol II entre en el sitio de inicio de la transcripción, y finalmente pasa a un modo de alargamiento procesivo (Schier & Taatjes, 2020).

Los factores de transcripción específicos de secuencia, dirigen todos los procesos biológicos y se unen a secuencias promotoras o potenciadoras y subsecuentemente reclutan al CPI a *loci* genómicos específicos. La unión de los factores de transcripción a promotores o potenciadores está correlacionado con la activación de la transcripción por la RNA Pol II. Sin embargo, los factores de transcripción no se unen directamente a la enzima RNA Pol II, éstos comunican sus señales de activación a la RNA Pol II a través del complejo mediador que interacciona con la RNA Pol II (Schier & Taatjes, 2020).

1.4.2 Factores de transcripción en *E. histolytica*

Actualmente, muy pocas proteínas del complejo CPI han sido identificadas y caracterizadas en *E. histolytica*. El genoma de este parásito contiene un gen que codifica para la subunidad mayor de la RNA Pol II denominado *rpb1*; esta enzima exhibe un nivel alto de resistencia a la α -amanitina y hasta ahora solamente 10 de las 12 subunidades de esta enzima han sido identificadas por lo que esto no ha permitido dilucidar completamente la función de la RNA Pol II en este parásito (Das y Bellofatto, 2009; Pearson and Singh; 2010; López-Camarillo et al., 2014). *E. histolytica* es el único organismo unicelular que contiene dos proteínas funcionales de unión a la caja TATA (TBP) denominadas EhTBP y el factor relacionado a EhTBP-1 (EhTRF1) (Luna-Arias et al., 1999; De Dios-Bravo et al., 2005; Castañón-Sánchez et al., 2010), además ambas proteínas también se unen a la caja GAAC del promotor y muestran expresión diferencial bajo distintas condiciones de estrés (Narayanasamy et al., 2018).

El factor de TFIID es una pieza clave del inicio de la transcripción en eucariotas, está compuesto por la proteína TBP y por aproximadamente 14 subunidades denominados factores asociados a TBP (TAFs); el factor asociado a TBP-1 (EhTAF1) fue identificado en *E. histolytica* y se demostró que se localiza en el núcleo y citoplasma, además se sobreexpresa en respuesta al estrés térmico (Avendaño-

Borromeo et al., 2019). En los promotores de *E. histolytica* se han identificado tres elementos reguladores conservados (Figura 3) que incluyen una caja TATA no típica (5'-TATTTAAA-3'), el elemento iniciador Inr (5'-AAAAATTCAA-3') que se traslapa con el sitio de inicio de la transcripción, así como el elemento GAAC (5'-GAACT-3') único de la ameba, con una posición variable entre la caja TATA y la secuencia Inr y con la habilidad de determinar el sitio de inicio de la transcripción, independientemente de estos dos elementos (Purdy et al., 1996; Vanacova et al., 2003; López-Camarillo et al., 2014).

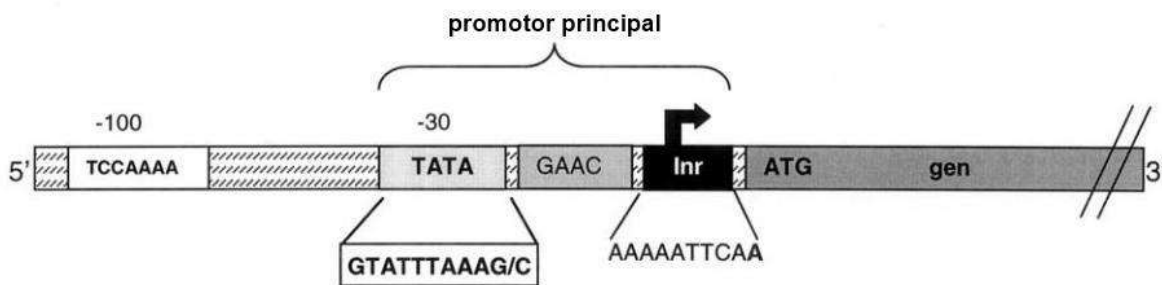


Figura 3. Esquema de la estructura consenso del promotor en *E. histolytica*. La flecha indica el sitio de inicio de transcripción; los números arriba de los motivos representan su posición. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (Modificado de Vanacova et al., 2003).

Pocos factores de transcripción específicos de secuencia han sido caracterizados en *E. histolytica*, como lo podemos ver en la Tabla 1, por lo que la regulación transcripcional de este parásito es en gran parte desconocida. Sin embargo, se ha demostrado que existen factores de transcripción que se activan y responden a diferentes condiciones de estrés, de esta manera estos factores de transcripción tienen un papel principal en la regulación del ciclo de vida y adaptación de los seres vivos (Pietrocola et al., 2013). Por ejemplo en *E. histolytica*, el factor EhURE3-BP es regulado por cambios en los niveles de calcio (Gilchrist et al., 2001). Sólo dos miembros de la familia de factores de transcripción EhMyb, han sido caracterizados, EhMyb10 y EhMyb-dr; EhMyb10 se sobreexpresa en trofozoítos aislados de un modelo murino de colitis amebiana y se une al elemento de reconocimiento de Myb (MRE) (Gilchrist et al., 2006; Meneses et al., 2010); mientras que EhMyb-dr controla la expresión de genes específicos del ciclo de vida (Ehrenkauf et al., 2009).

La proteína de unión al motivo de respuesta a H₂O₂ (EhHRM-BP) es un factor de transcripción de respuesta al estrés en *E. histolytica*, activa la expresión de diferentes genes, principalmente aquellos involucrados en la protección al estrés nitrosativo y oxidativo, a través de la unión al motivo HRM (Pearson et al., 2013). Los factores similares a STAT1 y STAT3, se expresan y activan en trofozoítos de *E. histolytica* en respuesta al contacto con el colágeno tipo I y calcio; además mediante ensayos de retardamiento se ha sugerido que reconocen al elemento inducible *sis* (SIE) (Cruz-Vera et al., 2003). La familia de factores de transcripción de choque térmico (HSFs), ha sido identificada en *E. histolytica*, y el factor EhHSTF7 es el motivo de estudio de este trabajo, por lo que son descritos con detalle más adelante.

Tabla 1. Factores de transcripción caracterizados en *E. histolytica*

Factor de transcripción	AmoebaDB ID	DNA blanco / genes regulados	PM (kDa)	Referencia
EhTBP1	EHI_020610	caja TATA, caja GAAC	26	(Luna-Arias et al., 1999; De Dios-Bravo et al., 2005; Narayanasamy et al., 2018)
EhTRF1	EHI_077240	caja TATA, caja GAAC	24	(Castañón-Sánchez et al., 2010; Narayanasamy et al., 2018)
EhTAF1	EHI_093770	secuencia Inr, elementos río abajo del promotor	25	(Avendaño-Borromeo et al., 2019)
EhURE3BP	EHI_060740	<i>Ehhgl5</i> TATTCTATT <i>Ehfdx1</i>	25	(Gilchrist et al., 2001)

EhURE1BP	EHI_101240	URE1 TTTTTCAGATAACAT	96	(Calixto-Gálvez et al., 2011; Cázares-Apátiga et al., 2017)
EhEBP1	EHI_121780	URE4 AAAAATGAATGGAAA AATGAA <i>Ehagl5</i>	28	(Schaenman et al., 2001)
EhEBP2	EHI_182670 EHI_056380	URE4 AAAAATGAATGGAAA AATGAA <i>Ehagl5</i>	18	(Schaenman et al., 2001)
EhC/EBP1	EHI_054140	TGTTTGGTAGTTGAA TTGGAAAGAA	25	(Marchat et al., 2003)
EhC/EBP2	EHI_132370	TGGAAAGAA	65	(Marchat et al., 2003)
EhAP-1	NI	secuencia AP1 TGAGTCAT	-	(Pérez et al., 1998)
Ehp53	KM1_315480	GGACATGCCCGGGC ATGTCC <i>Ehadh112</i>	53	(Mendoza et al., 2003)
EhCudA	EHI_127960	AGAATTTTCT	31.2	(Yamada et al., 2008)
EhMyb10	EHI_129790	MRE (TAACGG) <i>Ehhsp70</i>	17.9	(Meneses et al., 2010)

EhMyb-dr	EHI_038640	CCCCCC	17	(Ehrenkaufner et al., 2009)
EhSTAT1	NI	SIE GTCGACATTTCCCGT AAATCGTC	-	(Cruz-Vera et al., 2003)
EhSTAT3	NI	SIE GTCGACATTTCCCGT AAATCGTC	-	(Cruz-Vera et al., 2003)
EhPC4	EHI_192520	<i>Ehadh112</i> , <i>Ehabp16</i> .	16.6	(Hernández de la Cruz et al., 2014; Hernández de la Cruz et al., 2016)
EhHRM-BP	EHI_108720	motivo HRM AAACCTCAATGAAGA	50	(Pearson et al., 2013)
EhHSTFs	EHI_008230 EHI_049510 EHI_087630 EHI_142120 EHI_137000 EHI_008660 EHI_200020	nnGAAnn, ATAGAAATTTTTCATA, <i>EhPgp5</i>	-	(Gómez-García et al., 2007, Macías-Argüelles et al., 2012)
EhHMGB	EHI_093800	unión a DNA no secuencia-específica	13.4	(Abhyankar et al., 2008)
EhGATA	EHI7A_037890	secuencia GATA <i>Ehadh</i> , <i>Ehvps32</i>	19 kDa	(Huerta et al., 2020)

PM, peso molecular; kDa, kiloDaltones. NI, no identificado.

1.5 Factores de transcripción de choque térmico (HSFs)

La respuesta al choque térmico es un proceso altamente conservado de cambios en la expresión génica que da lugar a la inducción de genes citoprotectores

(Lindquist, 1986). En los eucariotas, la respuesta al choque térmico está regulada principalmente a nivel de transcripción por los factores de transcripción de choque térmico (HSFs) (Wu, 1995). Los HSFs son una familia de factores de transcripción que participan en la diferenciación, el desarrollo, la reproducción y la adaptación inducida por el estrés mediante la regulación de los genes del estrés (Akerfelt et al 2010). Todos los HSFs se unen a secuencias de DNA, que se denominan elementos de choque térmico (HSE) y están compuestos por un conjunto de repeticiones invertidas del pentámero 5'-nGAAn-3', en esta secuencia el nucleótido G es altamente conservado (Sakurai & Enoki, 2010). Los HSE han sido identificados y estudiados en diferentes organismos (Tabla 2), lo que sugiere que son elementos relevantes y conservados en el control transcripcional de la respuesta al estrés (Macías-Argüelles et al., 2012).

Tabla 2. HSE identificados en diferentes organismos

Especie	Secuencia HSE / Gen	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	aGAACgTTCt / <i>apx1</i>	(Storozhenko et al., 1998)
<i>Nicotiana tabacum</i>	aGAAAtaTTTcaGAAC / <i>Ha hsp17.6 G1</i>	(Carranco et al., 1999)
<i>Triticum aestivum</i>	nGAAAnnTTCnnGAAn / <i>hsp26</i>	(Chauhan et al., 2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nTTCn-(11 bp)-nGAAn-(5 bp)-nGAAn / <i>MDJ1</i>	(Tachibana et al., 2002)
<i>Homo sapiens</i>	tgTTCtaGAACA / <i>NAT1</i>	(Butcher & Minchin, 2010)

Anteriormente, se pensaba que los HSE estaban presentes en múltiples copias únicamente en las regiones río arriba de los genes de proteínas de choque térmico (*hsp*), pero actualmente se sabe que se pueden encontrar en la región reguladora

de una gran variedad de genes, como genes de resistencia a múltiples fármacos (*mdr*), algunas interleucinas y proteasas, entre otros (Akerfelt et al., 2010). La primera evidencia de un regulador transcripcional específico que pudiera unirse al elemento HSE e inducir la expresión de las HSP, fue reportado en células de *D. melanogaster*, el elemento regulador se nombró factor de transcripción de choque térmico (HSF) (Akerfelt et al., 2010). Los HSFs al igual que otros factores de transcripción están compuestos por diferentes dominios funcionales (Figura 4).



Figura 4. Representación de los dominios de los HSFs. Dominio de unión al DNA, Dominio de oligomerización, Dominio regulador, y Dominio de transactivación C-terminal (Tomado de Macías-Argüelles et al., 2012).

El dominio de unión al DNA (DBD), es el dominio más conservado en la evolución y pertenece a los dominios hélice-giro-hélice, este dominio forma una estructura compacta globular, excepto en un bucle flexible que está localizado entre las hojas- β 3 y 4, que permite potenciar la unión de alta afinidad al elemento HSE por parte del trímero de HSF (Björk & Sistonen, 2010). El DBD también puede mediar las interacciones con otros factores de transcripción para modular la capacidad de transactivación de los HSFs, por lo cual este dominio está considerado como el dominio maestro para el reconocimiento del elemento HSE (Bulman et al., 2001).

Otro dominio fundamental de los HSFs es un motivo *coiled-coil* formado por arreglos de siete repetidos hidrofóbicos (HR-A y HR-B) que es característica de los dominios de cierre de leucina, el cual conforma el dominio de oligomerización (DO) de los HSFs (Sorger & Nelson, 1989). El ensamblaje trimérico de estos factores es inusual para los dominios de cierre de leucina, ya que normalmente este dominio facilita la formación de homodímeros o heterodímeros. La supresión espontánea de la

trimerización de los *HSFs* es llevada a cabo por otro repetido hidrofóbico, el HR-C (Chen et al., 1993; Rabindran et al., 1993). En el extremo carboxilo terminal de los *HSFs* se encuentra el dominio de transactivación, el cual es compartido por todos los *HSFs*, excepto en el *HSF* de levadura, que tiene dos dominios de transactivación en ambos extremos (amino y carboxilo terminal) y el *HSF4A* de humano que carece de éste; el dominio de transactivación está compuesto por residuos hidrofóbicos y ácidos, que juntos aseguran una rápida y prolongada respuesta al estrés (Wu, 1995; Tanabe et al., 1999; Nieto-Sotelo et al., 1990).

Por último, el dominio regulador, el cual se localiza entre los repetidos HR-A, HR-B y el dominio de transactivación, es esencial para la respuesta a los estímulos de estrés, debido a que diversos aminoácidos que son blanco de modificaciones post-traduccionales (PTMs) residen en el dominio regulador, sin embargo la estructura y la función de este dominio aún se encuentra bajo investigación (Green et al., 1995; Newton et al., 1996). La conversión de la forma inactiva de los *HSFs* a una forma de unión de alta afinidad al DNA, conlleva un proceso de activación de varios pasos, lo cual es una característica común de todos los *HSFs* y se lleva a cabo en respuesta a algún estímulo interno o externo (Figura 5).

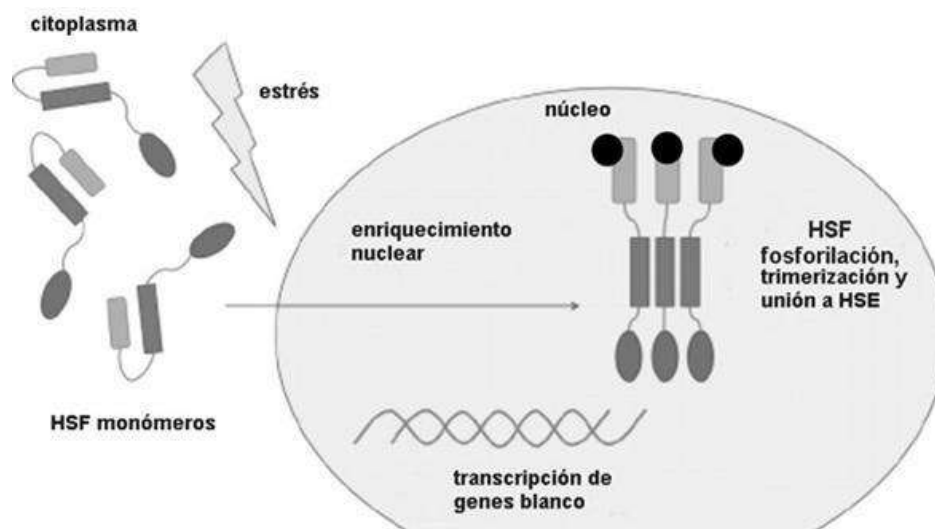


Figura 5. Esquema de activación de los *HSFs*. Los *HSFs* se localizan en el citoplasma como monómeros inactivos, en respuesta a diversas condiciones de estrés se activan,

mediante un proceso de múltiples modificaciones; que involucra modificaciones post-traduccionales, relocalización nuclear, trimerización y unión a los HSE, este proceso resulta en la transcripción de genes de estrés (Modificado de Kansanen et al., 2009).

La activación de los HSFs es regulada por un complejo de chaperonas compuesto por las HSP40, HSP70, y HSP90, así como otras proteínas que participan en la represión de los HSFs en condiciones sin estrés (Morimoto, 1998). Se ha descrito que HSP90 inhibe la oligomerización y la unión al DNA de los HSFs al unirse en el extremo N-terminal de estos factores, mientras que HSP70 se ha propuesto que inhibe la capacidad de transactivación de los HSFs (Abravaya et al., 1992; Zou et al., 1998). El uso de inhibidores de HSP90 resulta en la activación del HSF1, por otro lado, la sobreexpresión de HSP70 induce la inactivación de HSF1 durante estrés térmico (Gómez-Pastor et al., 2018). Por lo que la interacción con las HSPs, es relevante para analizar el estado de activación de los HSFs en respuesta al estrés.

Asimismo, los HSFs presentan diferentes PTMs, que permiten la activación de estos factores de transcripción, entre las cuales la más estudiada es la fosforilación, que ocurre de manera rápida en respuesta a ciertas condiciones de estrés, y se presenta principalmente en los residuos de serina (Ser) del dominio CTA (Cotto et al., 1996; Holmberg et al., 2001; Guettouche et al., 2005); la trimerización, por medio del DO que estabiliza la interacción HSF-HSE (Sarge et al., 1993); la relocalización de los HSFs del citoplasma al núcleo a través del complejo de poro nuclear, que reconoce la señal de localización nuclear presente en la mayoría de los HSFs, que se localiza en el extremo Carboxilo-terminal de los HSFs (Mittal et al., 2009). Una vez activados estos factores adquieren su capacidad de transactivación. La inactivación o atenuación de los HSFs es llevada a cabo por un mecanismo, que depende de los niveles de las proteínas HSPs (Akerfelt et al., 2010).

Diversos estudios han demostrado que en contraste con los invertebrados que presentan un solo HSF (*D. melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, y *Xenopus spp.*) y las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluymeromyces lactis*); los

vertebrados y las plantas presentan varios HSFs (Akerfelt et al., 2010). En otros organismos como las algas verdes unicelulares (*Chlamydomonas reinhardtii*) se han identificado dos genes *hsf* que codifican para los factores HSF1 y HSF2 (Scharf et al., 2012). La familia HSF del humano presenta seis miembros: HSF1, HSF2, HSF4, HSF5, HSFX y HSFY; estos factores poseen funciones específicas, así como funciones compartidas; estos factores exhiben patrones de expresión específicos de tejido y son susceptibles de diferentes PTMs, además de poder realizar diferentes interacciones proteína-proteína, lo que les permite participar en diversos mecanismos y condiciones (Akerfelt et al., 2010). Por otro lado, la familia de HSFs de las plantas superiores se ha clasificado en clase A y clase B, que al igual que los vertebrados son altamente conservados, y en la actualidad ascienden a más de 250 HSFs en total (Scharf et al., 2012); no obstante, cada organismo de este reino puede contener un número variable de genes *hsf* como en *A. thaliana* con 21 genes (Nover et al., 2001), *Oryza sativa* con 25 genes (Guo et al., 2008), *Daucus carota* con 35 genes (Huang et al., 2015), por mencionar algunas especies.

1.5.1 Factores de transcripción de choque térmico (HSFs) en *E. histolytica*

Al igual que otros organismos eucariotas este parásito presenta una respuesta ante diferentes tipos de estrés a los que se expone durante su ciclo de vida, tales como cambios de pH, contacto con diferentes tipos celulares, cambios de temperatura, exposición a jugos gástricos, diferentes fármacos anti-amebianos, entre otros (Gómez et al., 2007). Una vez que se completó la secuenciación del genoma de este parásito y después de varias revisiones, se encontraron siete genes los cuales pertenecen a la familia *HSF* (Tabla 3), estos genes codifican para los factores, EhHSTF1 a EhHSTF7 (Macías-Argüelles et al., 2012). Los *EhHSTFs* presentan una identidad y similitud con el HSF1 de humano desde un 19% a 22.5% y de un 10.66% a 15.16%, respectivamente. Entre los *EhHSTFs*, la mayor identidad y similitud la presentan EhHSTF1 y EhHSTF7 con un 70.75% y 75.75%, respectivamente (Macías-Argüelles et al., 2012).

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

Gen	AmoebaDB ID	pares de bases	número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	señal de localización nuclear
<i>Ehhstf1</i>	EHI_008230	513	170	20.44	si
<i>Ehhstf2</i>	EHI_049510	840	279	32.01	si
<i>Ehhstf3</i>	EHI_087630	860	268	32.12	si
<i>Ehhstf4</i>	EHI_142120	1020	339	39.38	si
<i>Ehhstf5</i>	EHI_137000	1318	329	37.38	si
<i>Ehhstf6</i>	EHI_008660	1058	269	31.04	si
<i>Ehhstf7</i>	EHI_200020	662	197	23.35	no

kDa, kiloDaltones.

1.6 Fenotipo de resistencia a múltiples fármacos

El fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (*MDR*, por sus siglas en inglés *multidrug resistance phenotype*), es actualmente el mecanismo de resistencia predominante en diferentes organismos y tipos celulares; este se caracteriza por la resistencia a un fármaco al que habitualmente un organismo era susceptible y al desarrollo de la resistencia cruzada a diferentes fármacos (Bansal et al., 2006). Esta resistencia se debe a un aumento en el flujo del fármaco al exterior de las células a través de la P-glicoproteína de 170 kDa (Figura 6), la cual es dependiente de energía y puede ser inhibida por bloqueadores de canales de calcio (Fojo et al., 1985). La Pgp presenta dos mitades homólogas (dominios transmembrana) que contienen seis α hélices transmembrana y dos sitios citoplásmicos de unión al ATP, que activan el eflujo del fármaco, la promiscuidad por el sustrato es una marca de la actividad de esta proteína perteneciente a la familia de transportadores ABC

(*ATP-binding cassette*); el gen *mdr* codifica para la Pgp y presenta un control transcripcional muy preciso en los diferentes organismos en los que ha sido identificado (Bansal et al., 2006).

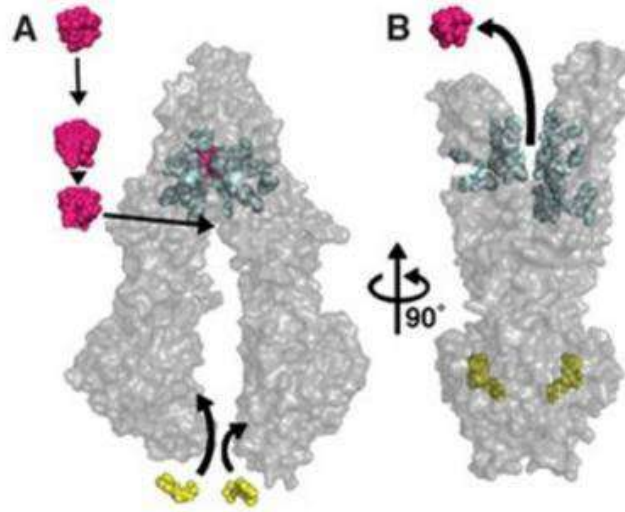


Figura 6. Modelo del transporte de moléculas por la Pgp. La unión de moléculas de ATP (amarillo) estimulada por la unión de moléculas (violeta) a la cavidad catalítica de la Pgp, causa la dimerización de los dominios de unión a nucleótido, lo cual produce cambios estructurales que resultan en una conformación “mirando hacia afuera”. La hidrólisis del ATP libera la molécula al exterior y rompe la dimerización de los dominios de unión a nucleótido, reiniciando el sistema en una conformación “mirando hacia dentro” (Tomado de Bansal et al., 2006).

1.6.1 Resistencia a fármacos y fenotipo *MDR* en *E. histolytica*

El tratamiento de individuos asintomáticos infectados con *E. histolytica*, podría resultar en un serio problema de resistencia a fármacos anti-amebianos; aunque actualmente este no es un problema por el cual preocuparse, se han presentado reportes de tratamientos fallidos con metronidazol y diferencias en la susceptibilidad a ciertos fármacos, lo cual sugiere que este podría ser el principio del desarrollo de una resistencia clínica a fármacos anti-amebianos (Orozco et al., 2002). Los fármacos anti-amebianos se clasifican en tres grupos principales: luminales, tisulares y mixtos. El metronidazol es el principal fármaco de elección y otros

compuestos derivados del nitroimidazol como el tinidazol, secnidazol y el ornidazol, son igual de efectivos (Knight, 1980). El furoato de diloxanida, la di-yodohydroxiquinoleína, la paromicina, la emetina y la cloroquina, son usadas también como fármacos alternativos. El furoato de diloxanida se ocupa para tratar portadores de quistes asintomáticos, mientras que la cloroquina es usada en combinación con el metronidazol o la emetina en casos de amebiasis hepática, sin embargo, la emetina es raramente usada por sí sola debido a su alta toxicidad (Bansal et al., 2006).

El metronidazol, tinidazol y otros nitroimidazoles, inhiben la síntesis de DNA a través de la oxidación, pero no son efectivos en el tratamiento contra quistes de *E. histolytica* (Penuliar et al., 2015). La cloroquina actúa sobre la forma vegetativa del parásito, matándolo mediante la inhibición de la síntesis de DNA, la emetina mata al trofozoíto principalmente inhibiendo la síntesis de proteínas (Bansal et al., 2004). La resistencia a fármacos anti-amebianos en aislados clínicos no ha sido profundamente estudiada debido a que las poblaciones de este parásito generalmente son heterogéneas. Hasta el momento, los mecanismos de resistencia a fármacos identificados en parásitos protozoarios son: la disminución de la entrada del fármaco por la pérdida de los transportadores necesarios para la entrada al parásito, el eflujo de los fármacos del parásito, ya sea por P-glicoproteínas o por ATPasas, la alteración de la estructura del fármaco y la pérdida de la activación del fármaco (Bansal et al., 2006).

La resistencia a metronidazol en cepas de *E. histolytica* inducida en el laboratorio ha sido reportada y cepas resistentes a metronidazol han sido mantenidas indefinidamente en cultivo *in vitro* (Wassman et al., 1999). La resistencia al metronidazol en *E. histolytica* así como en otros protozoarios como *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, es mediada por la inactivación enzimática de este fármaco (Pal et al., 2009). Los modelos disponibles para estudiar los mecanismos de resistencia a fármacos en *E. histolytica*, incluyen cepas resistentes a metronidazol inducidas *in vitro* (Samarawickrema et al., 1997) y clonas resistentes a emetina

derivadas de la cepa virulenta HM1:IMSS, seleccionadas después de la mutagénesis con el agente alquilante etil-metano-sulfonato (Orozco et al., 1985).

El fenotipo MDR en *E. histolytica* se caracteriza por la resistencia cruzada a fármacos no relacionados, un incremento en el eflujo y la disminución de la acumulación de fármacos, la reversión de la resistencia por bloqueadores de canales de calcio como el verapamil y la sobre-expresión de la proteína Pgp, como ha sido reportado en células tumorales de mamífero (Pastan & Gottesman, 1987; Orozco et al., 2002). La sobre-expresión en la membrana de la proteína Pgp también produce el fenotipo MDR en otros parásitos protozoos como *Plasmodium sp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, y *Leishmania sp.* (Cowman & Karcz, 1993; Dunne et al., 2003; Boreham et al., 1988; Ouellette & Borst, 1991). En el genoma de *Plasmodium falciparum*, se han identificado dos genes que codifican para proteínas de la familia de transportadores ABC; *Pfmrp1*, el cual se ha asociado a la disminución en la susceptibilidad a diferentes fármacos contra la malaria en este parásito y el gen *Pfmrp2*, del cual aún no se conoce su función en la resistencia a fármacos contra la malaria (Veiga et al., 2014).

La familia de proteínas MDR en *Leishmania* está conformada por dos miembros, MDR1 y MDR2. La sobreexpresión de las proteínas MDR1 y MDR2, confiere resistencia a fármacos como la vinblastina y otros compuestos no relacionados estructuralmente como la puromicina, adriamicina, doxorubicina, daunomicina y pentamidina (Légaré et al., 1994). Este parásito también contiene proteínas Pgp, PgpA y PgpE, las cuales están asociadas con la resistencia a arseniato y antimonio, mientras que la proteína PRP1 está involucrada en la resistencia a compuestos de arsénico y antimonio (Pradines, 2013). En el parásito amitocondriado *Trichomonas vaginalis*, se ha demostrado la presencia de Pgps (Dunne et al., 2003), sin embargo su papel en la resistencia de este parásito aún no ha sido investigado. Dos copias del gen *Tvpgp1* están presentes en el genoma de este parásito y se ha reportado un aumento en la expresión del RNA mensajero (mRNA) de los genes Pgps en cepas resistentes a diversos fármacos (Dunne et al., 2003). Sin embargo, hasta el

momento el fenotipo MDR en estos parásitos no se ha analizado a nivel transcripcional.

La presencia en *E. histolytica* de un fenotipo MDR típico, mediado por la sobreexpresión de la Pgp, fue confirmada por la clonación de cuatro genes *mdr* (*EhPgp1*, *EhPgp2*, *EhPgp5* y *EhPgp6*), esta familia de genes *mdr* es la más grande encontrada en un organismo. Los productos de los genes *EhPgp* presentan una identidad de 38 a 41% con las Pgps de mamíferos, mientras que la identidad con las Pgps de otros protozoarios es mucho menor (Descoteaux et al., 1992; Descoteaux et al., 1995). Análisis *in silico* demostraron que la secuencia aminoacídica de las *EhPgps* se superpone casi en su totalidad con la Pgp de humano, sugiriendo que las *EhPgps* también están conformadas por dos mitades idénticas, cada una con seis dominios transmembranales, seguidos de la peculiar firma altamente conservada de la familia de transportadores ABC, que son los sitios de unión de ATP (Orozco et al., 2002).

En cepas mutantes resistentes a emetina, los genes *EhPgp1* y *EhPgp6* se encuentran constitutivamente expresados, mientras que el gen *EhPgp5* se induce en presencia de emetina y por último el gen *EhPgp2* hasta el momento no se ha detectado su transcrito (Descoteaux et al., 1995; Orozco et al., 1995). La caracterización molecular de los genes *EhPgp* y sus productos en trofozoítos sensibles y resistentes a la emetina, sugiere que la expresión del fenotipo MDR podría estar regulado por: (1) la presencia de ciertos factores y secuencias que promueven la expresión diferencial de los genes *EhPgps*, (2) eventos post-transcripcionales involucrados en la estabilización del mRNA del *EhPgp*, (3) la amplificación de los genes *EhPgp*, y (4) la fisiología en particular que cada uno de los genes *EhPgps* pudiera presentar en diferentes condiciones ambientales (Orozco et al., 2002).

1.6.2 Importancia de los HSFs en el fenotipo MDR

Hasta el momento no se ha descrito el mecanismo de regulación del fenotipo MDR en parásitos. Sin embargo, el control transcripcional de este fenotipo en células de

mamíferos ha sido ampliamente estudiado. Los HSFs identificados en mamíferos han demostrado tener funciones diferentes, cooperativas o en ciertos casos son traslapadas (Akerfelt et al., 2007). Los factores HSF1 y HSF2 están estrechamente relacionados con la respuesta al estrés térmico, siendo el principal regulador el factor HSF1 (Akerfelt et al., 2010). Sin embargo, como se mencionó anteriormente los HSFs también regulan la respuesta a diferentes condiciones de estrés, tales como la presencia de fármacos; diferentes trabajos han demostrado la relación que existe entre la sobre-expresión de los HSFs en células cancerosas y la resistencia a diversos tratamientos farmacológicos (Kim et al., 1998; Tchénio et al., 2006; Yallowitz et al., 2018).

La caracterización funcional del promotor del gen *mdr1* de humano, permitió identificar un HSE en la posición -178 a -152 pb y se demostró que éste elemento es capaz de controlar la expresión de la proteína Pgp en células cancerosas, confiriéndoles el fenotipo MDR (Miyazaky, 1992). En células de melanoma, la sobre-expresión de HSF1 facilita la sobrevivencia de esta línea celular en el tratamiento con doxorubicina o paclitaxel, además se demostró que la quimioresistencia mediada por el HSF1 no es dependiente de la acumulación de HSPs, pero si está relacionada con el aumento en el potencial del eflujo de los fármacos por parte de transportadores ABC (Vydra et al., 2013). La sobreexpresión del factor HSF1 en células cancerosas de pulmón, se encuentra significativamente relacionada con niveles altos de angiogénesis en este tipo celular (Cui et al. 2015). Como podemos ver, en estudios recientes de células cancerosas, en las cuales el fenotipo MDR está mediado por una sobre-expresión de la P-glicoproteína, se ha demostrado que este mecanismo está regulado a nivel transcripcional por los HSFs; por lo que un mecanismo similar pudiera estar sucediendo en la regulación del fenotipo MDR en el parásito *E. histolytica*.

2. Antecedentes

El fenotipo MDR en diferentes parásitos está mediado por proteínas de la familia de transportadores ABC (MDR y Pgp). En *Schistosoma mansoni*, la inhibición de la expresión de las proteínas MDR muestran un incremento en la susceptibilidad al Praziquantel y un aumento en la retención de éste al interior del parásito (Kasinathan et al., 2014). Interesantemente, *S. mansoni* es el único parásito en el que se ha identificado a los HSFs, y más recientemente en *E. histolytica* (Gómez et al., 2007). *S. mansoni*, presenta un gen que codifica para el SmHSF1, que responde al estrés térmico y está involucrado en la regulación de diferentes etapas del ciclo de vida del parásito (Levy-Holtzman & Schechter, 1994; 1996; Lantner et al., 1998; Ram et al., 2004).

En cuanto a *E. histolytica*, se sabe que posee la familia de genes *mdr* más grande reportada hasta el momento para un organismo, conformada por cuatro genes (*EhPgp1*, *EhPgp2*, *EhPgp5* y *EhPgp6*) y dos pseudogenes (*EhPgp3* y *EhPgp4*), que codifican para la P-glicoproteína. Los genes *EhPgp1* y *EhPgp6* se expresan de manera constitutiva en cepas resistentes, mientras que para el gen *EhPgp2* hasta el momento no se ha identificado su transcrito, el gen *EhPgp5* se expresa de manera inducible en presencia de emetina (Descoteaux et al., 1995). El análisis transcripcional del promotor del gen *EhPgp5* demostró que la actividad mínima del promotor era mantenida por una región de 235 pb localizada río arriba del sitio de inicio de la transcripción, además se demostró que esta actividad era mayor en presencia de una concentración más alta de emetina, lo que sugería que en esta región se localizan elementos de respuesta a este fármaco anti-amebiano (Pérez et al., 1998).

El análisis funcional más detallado del promotor del gen *EhPgp5*, permitió identificar a un elemento HSE, en la posición de -151 a -135 pb, el cual es indispensable para la expresión del gen en trofozoítos de la clona A cultivados en presencia de 8 μ M de emetina. Además también se demostró que este elemento es reconocido por proteínas nucleares de trofozoítos expuestos a emetina (Nieto et al., 2005; Nieto et

al., 2017). Posteriormente, se realizó el análisis *in silico* del genoma de *E. histolytica*, y se identificó que la amiba posee una familia de siete genes *hsf*, la cual es la familia más grande de HSFs encontrada en un organismo hasta el momento, exceptuando a las plantas (Macías-Argüelles, 2005).

Posteriormente, se realizó el análisis de expresión del mRNA de los HSFs de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en presencia de 8 μ M de emetina. Los siete HSFs se sobre-expresaron en respuesta al estrés térmico con diferentes niveles de expresión. Particularmente, el gen *Ehhstf7*, presentó la mayor expresión en presencia de 8 μ M de emetina (122 veces), comparado con trofozoítos que se cultivaron sin emetina (Figura 7A) (Macías-Argüelles, 2005), sugiriendo que este factor está involucrado en la regulación de la respuesta a emetina. De manera interesante, al realizar el mismo análisis y cuantificar la expresión del mRNA del gen *EhPgp5* de trofozoítos de *E. histolytica* en las mismas condiciones, se encontró un patrón de expresión similar al mostrado por el gen *Ehhstf7* (Figura 7B), en el cual se observa un aumento de 94 veces más en presencia de 8 μ M de emetina comparado con los trofozoítos que se cultivaron sin emetina (Macías-Argüelles, 2005).

Los resultados anteriores, sugieren que en el parásito *E. histolytica* el factor EhHSTF7 podría estar regulando a nivel transcripcional la expresión del gen *EhPgp5* involucrado en el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en presencia de emetina. Recientemente, se demostró que el factor EhHSTF7, aumenta su expresión, presenta un estado oligomerizado, se relocaliza al núcleo y se fosforila en trofozoítos de *E. histolytica* en respuesta a 8 μ M de emetina, lo cual sugiere la activación del factor EhHSTF7 bajo esta condición de estrés, lo anterior apoya fuertemente la idea de que el factor EhHSTF7 podría estar regulando a nivel transcripcional el fenotipo MDR en trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con emetina (Bello, 2016).

Mediante el uso de siRNAs, se silenció el factor *Ehhstf7* en trofozoítos cultivados con 8 μ M de emetina, el cual provocó una disminución en la expresión del mRNA

del factor *Ehhstf7* de 9 y 27 veces a las 16 y 24 h de cultivo, respectivamente comparado con trofozoítos no silenciados (Rojas, 2017). Al analizar la expresión del gen *EhPgp5* en trofozoítos bajo las mismas condiciones de cultivo, se observó una disminución de 40 veces la expresión del mRNA de este gen comparado con los trofozoítos que no tenían silenciado el factor *Ehhstf7* (Rojas, 2017). Estos datos sugieren que el factor EhHSTF7, podría estar involucrado en la regulación del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina.

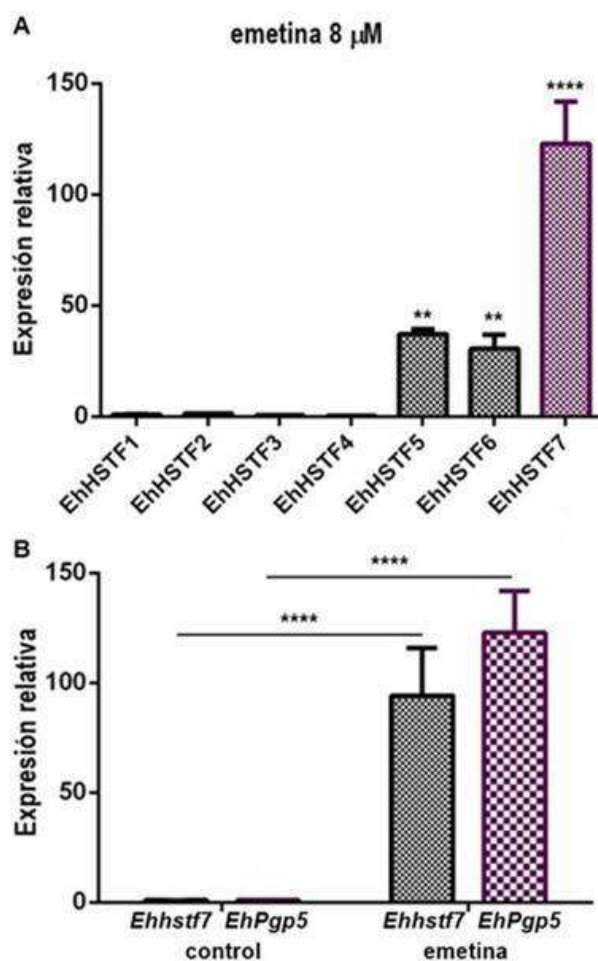


Figura 7. Sobreexpresión del gen *Ehhstf7* en trofozoítos cultivados con emetina. (A) Expresión relativa del mRNA de los *Ehhstfs* de trofozoítos cultivados con 8 μM de emetina. *** $p < 0.001$. (B) Expresión relativa del mRNA de *EhPgp5* y *Ehhstf7* en trofozoítos control (sin emetina) y con 8 μM de emetina. **** $p < 0.0001$. (Tomado de Macías-Argüelles, 2005).

3. Justificación

La infección por el parásito *E. histolytica*, es un problema de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo, en donde los servicios de higiene y salud son ineficientes. La amebiasis es controlada principalmente con el tratamiento de derivados del metronidazol y emetina. Décadas atrás la resistencia a fármacos en la amebiasis no era común, sin embargo, en la actualidad se han producido cepas resistentes en el laboratorio, además del reporte de casos aislados de tratamientos fallidos con los fármacos de elección. El fenotipo MDR es el mecanismo de resistencia predominante en la naturaleza, en *E. histolytica* se ha caracterizado la sobre-expresión de la P-glicoproteína por parte de los genes *EhPgps*, en respuesta a la emetina.

La caracterización funcional del promotor del gen *EhPgp5*, permitió identificar el posible mecanismo de regulación del fenotipo MDR en respuesta a emetina, ya que el HSE identificado en la región promotora es necesario para la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivado con emetina. Hasta el momento, se sabe que el factor de transcripción EhHSTF7 se sobre-expresa en trofozoítos cultivados con emetina, además de hiperfosforilarse y relocalizarse al núcleo bajo estas condiciones, lo que indica que el factor EhHSTF7 se activa en respuesta a la emetina. Recientemente, se demostró que el factor EhHSTF7 puede estar involucrado en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina. Estos antecedentes sugieren que el factor de transcripción EhHSTF7 podría estar involucrado y tener un papel importante en la regulación transcripcional del fenotipo MDR en el parásito *E. histolytica*. Conocer el papel del factor EhHSTF7 en la regulación transcripcional de *E. histolytica* en respuesta a la emetina es importante para comprender una parte de la biología de este parásito, así como conocer el mecanismo de regulación detrás del fenotipo MDR en *E. histolytica*.

4. Hipótesis

El factor de transcripción EhHSTF7 se une y reconoce al elemento HSE del gen *EhPgp5*, además se encuentra en diferentes estados de oligomerización y no co-localiza con la EhHSP70 en respuesta a la emetina.

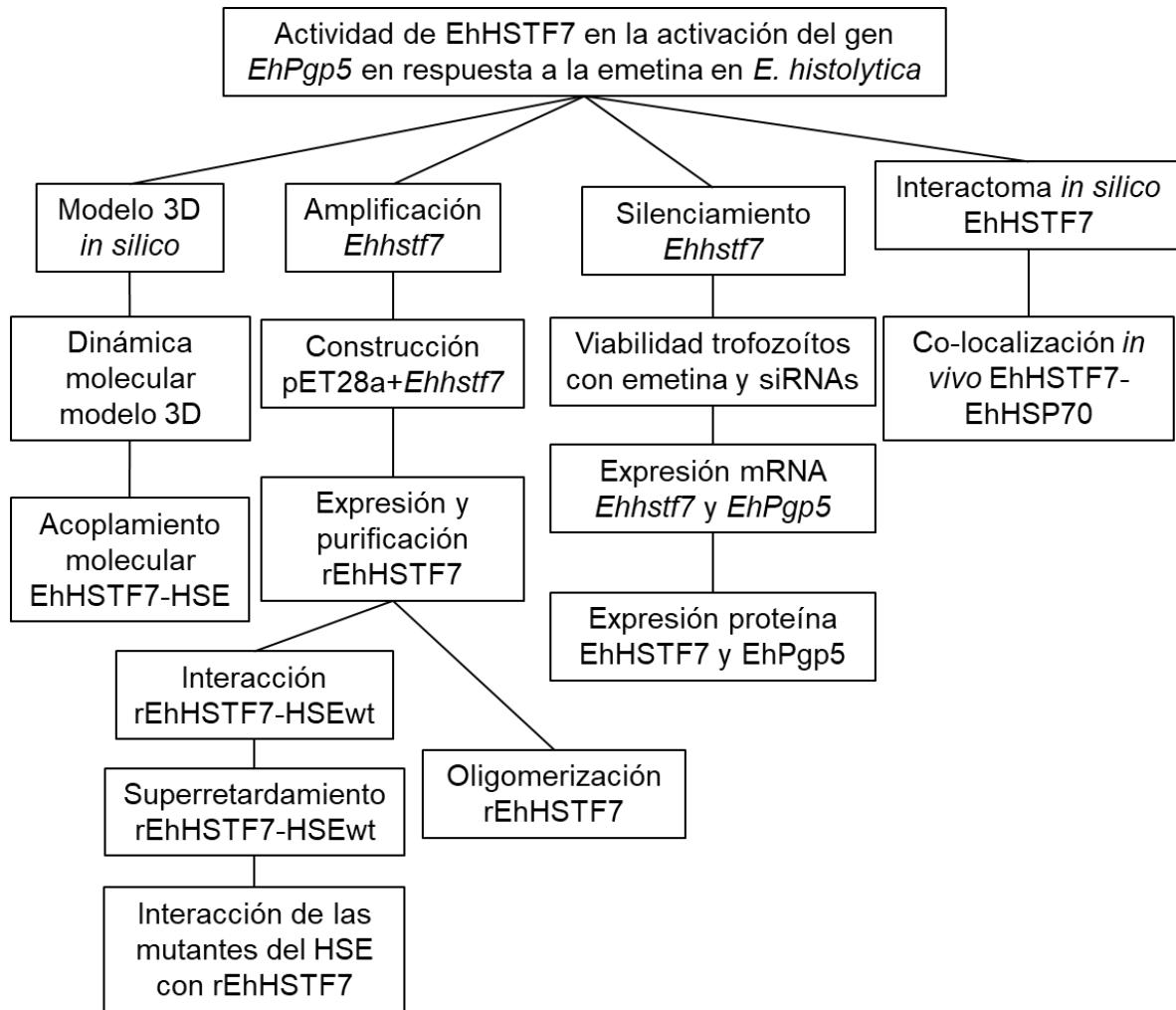
5. Objetivo General

Analizar el papel regulador del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en el parásito *Entamoeba histolytica*.

5.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar la interacción del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen *mdr EhPgp5 in silico*.
2. Analizar el estado de oligomerización de la proteína recombinante del factor EhHSTF7.
3. Evaluar la interacción *in vitro* del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen *EhPgp5*.
4. Demostrar la participación del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina.
5. Realizar el interactoma *in silico* de EhHSTF7 y confirmar su asociación con alguna de las proteínas identificadas

6. Estrategia Experimental



7. Material y Métodos

7.1 Caracterización *in silico* de la interacción del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen *EhPgp5*.

7.1.1 Modelo 3D estructural del factor de transcripción EhHSTF7

Para la obtención del modelo 3D del factor EhHSTF7, se utilizó la secuencia primaria de 197 aminoácidos (EHI_200020) obtenida de la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/>), la cual se introdujo en el programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), para obtener el modelo 3D de la proteína EhHSTF7 por modelamiento *ab initio*; se analizaron los primeros cinco modelos posibles de acuerdo a sus características estereoquímicas. Los cinco modelos se validaron mediante los programas Errat (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>), método que arroja el nivel de confianza en la estructura final basado en las interacciones atómicas características (Colovos y Yeates, 1993) y RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), método de validación que determina el porcentaje de aminoácidos con una estructura permitida (Lovell et al., 2002), se eligió el modelo con la mejor validación y con el *C-score* más positivo. El modelo elegido se sometió a la minimización de energía de la proteína para corregir errores en la estructura con el campo de fuerza del servidor Yet Another Scientific Artificial Reality Application (YASARA) (<http://yasara.org/servers.htm>). El análisis de los dominios y motivos del modelo 2 del factor EhHSTF7, se realizó con los servidores InterPro, para los dominios (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Jpred 4, para los motivos (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/>).

7.1.2 Dinámica molecular del factor EhHSTF7

Con el objetivo de obtener la principal estructura del factor EhHSTF7, se realizó la simulación de la dinámica molecular (MDS) del factor EhHSTF7 con el programa GROMACS versión 4.6.5 (<http://www.gromacs.org/>). Para la simulación, se solvató el modelo 3D con 9296 moléculas de agua, se construyó una caja rectangular para contener la proteína con un volumen de 316.72 nm³, la dinámica molecular fue

simulada durante 100 ns a 310 K, empleando el campo de fuerzas OPLS-AA, el termostato Nosé-Hoover y el baróstato Parrinello-Rahman; las simulaciones fueron realizadas en condiciones NVT con condiciones periódicas de frontera; se empleó el algoritmo “salto de rana” (leap-frog) para llevar a cabo la integración de las ecuaciones de Newton, el integrador seleccionado fue md y todos los enlaces fueron limitados con LINCS; la minimización de energía del modelo se realizó con el minimizador *steepest descent*, incluido en el programa GROMACS (Berendsen et al., 1995). Al finalizar la simulación, se realizó el *cluster* de la conformación 3D con un *cut-off* de 0.17 nm, para obtener la estructura en equilibrio del factor EhHSTF7 bajo esas condiciones. Por último, se calcularon diferentes parámetros de la simulación, usando herramientas del programa GROMACS. Estos parámetros incluyen; desviación cuadrática de la raíz media (*RMSD*), fluctuación cuadrática de la raíz media (*RMSF*), Radio de giro (*RG*), Área de exposición al solvente (*SASA*) y Número de puentes de hidrógeno (*HB*).

7.1.3 Acoplamiento molecular del factor EhHSTF7 y el elemento HSE del gen *EhPgp5*

Con el cluster del factor EhHSTF7 obtenido por simulación, se realizó el acoplamiento molecular usando la conformación de 95 ns y como ligando el elemento HSE del gen *EhPgp5*. Mediante el servidor 3D-DART (<http://haddock.chem.uu.nl/dna/dna.php>), se construyó un archivo del banco de datos de proteínas (PDB) del elemento HSE, usando la secuencia 5'-ata**GAA**attt**TTC**ata-3' como molde y con los parámetros por *default* del programa. El acoplamiento molecular proteína-DNA, se llevó a cabo con el servidor PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), los parámetros usados para este ensayo fueron; un valor de RMSD de interacción de 1.5 Armstrong (Å) y tipo de complejo proteína-ligando pequeño. El complejo con el *score* más alto y con la energía libre de Gibbs más negativa fue seleccionado (Schneidman-Duhovny et al., 2005), y se analizaron las interacciones por puentes de hidrógeno, entre el factor EhHSTF7 y el elemento HSE. La visualización de la estructura 3D del factor EhHSTF7 y la

interacción con el elemento HSE, fueron obtenidas con el programa UCSF Chimera versión 1.13.1 (<http://plato.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

7.2 Análisis de la proteína recombinante del factor EhHSTF7 y su oligomerización

7.2.1 Amplificación del gen *Ehhstf7*

Se cultivaron 3×10^5 trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS clona A, en medio TYI-S-33 durante 72 h, transcurrido este tiempo el cultivo se colocó en hielo por 20 minutos para despegar la monocapa. Posteriormente, se extrajo el DNA genómico (gDNA) por el método de fenol /cloroformo /alcohol isoamílico. Se cosecharon y centrifugaron los trofozoítos 1100 g durante 10 min, la pastilla celular se colocó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min; transcurrido este tiempo se agregó a la pastilla 5 ml de la solución de extracción, (EDTA 25 mM pH 8.0, 200 mM NaCl, SDS 0.5%, Tris-HCl 1 mM pH 8.5) más Proteinasa K 4 $\mu\text{g/ml}$. Se mezcló la solución con la pastilla celular y se incubó por 1 h a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó a 16000 g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante, se le añadió un volumen igual de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) (Invitrogen™). Se agitó, centrifugó a 16000 g durante 12 min y recuperó la fase acuosa; se agregó RNasa libre de DNasa (2.43 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific™) y se incubó por 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se agregó un volumen igual de cloroformo:fenol 1:1, se centrifugó a 16000 g durante 12 min y recuperó la fase acuosa, se precipitó el DNA con etanol absoluto (1:2) por 48 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó a 16000 g durante 12 min y se lavó el DNA con etanol al 70%, se secó la pastilla por 20 min a temperatura ambiente, se resuspendió con 40 μl de agua libre de nucleasas y se cuantificó el DNA en un espectrómetro de microplacas EPOCH (BioTek®).

La extracción del RNA de trofozoítos de *E. histolytica*, se realizó con el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) (Chomczynski, 1993), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colectaron 3×10^5 trofozoítos como se mencionó anteriormente y se centrifugaron a 1100 g durante 5 min, se desechó el medio de cultivo y se resuspendió la pastilla celular con 800 μl de TRIzol™, se mezcló hasta homogenizar la solución con los trofozoítos. Se colocó la solución en microtubos de 1.5 ml y se

incubó por 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de Cloroformo se mezcló y nuevamente se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 16000 g durante 10 min y se transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 ml. Se añadió isopropanol en una proporción 1:1 a la fase acuosa, se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16000 g durante 10 min y se desechó el sobrenadante, se resuspendió con 800 µl de etanol al 75% y se mezcló completamente. Se centrifugó a 16000 g durante 10 min y se desechó el sobrenadante; se dejó secar la pastilla por 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se disolvió la pastilla en 40 µl de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), el RNA se cuantificó y se guardó a -20 °C, hasta su uso. Finalmente, se comprobó la integridad del RNA mediante su corrimiento electroforético, en geles de agarosa al 1%.

La síntesis del DNA complementario (cDNA), se realizó con el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), las condiciones se muestran en la Tabla 4, la correcta síntesis del cDNA se corroboró mediante la amplificación del gen de *actina* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*, PCR) de punto final. Se diseñaron los oligonucleótidos en sentido y antisentido para amplificar el gen completo *Ehhstf7* (Tabla 5), los cuales contienen los sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *XhoI*, respectivamente. La amplificación del gen *Ehhstf7* se llevó a cabo por PCR de punto final, usando los oligonucleótidos diseñados y usando como molde tanto el gDNA, como el cDNA. Como control positivo de la reacción de PCR y control de integridad del RNA, se realizó la amplificación del gen de *actina* (Tabla 5). Las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación se muestran en la Tabla 6. El corrimiento electroforético de los amplicones se observó en un gel de agarosa al 2% (UltraPure™, Invitrogen) y amortiguador TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM).

Tabla 4. Condiciones para la síntesis del DNA complementario

Reactivos	Concentración	Condiciones
Oligo-dT 500 µg/mL dNTP mix 10 mM 3 µg RNA Agua libre de nucleasas	1 µL 1 µL - cbp 12 µL	65 °C/ 5 min 4 °C/ 1 min
5X first-strand buffer 0.1 M DTT RNaseOUT™ (40 U/µL)	4 µL 2 µL 1 µL	42 °C/ 2 min
SuperScript™ II RT	1 µL	42 °C/ 50 min 70 °C/ 15 min 4 °C

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de *PCR*

Gen	Secuencia oligonucleótidos	Tamaño del amplicón
<i>Ehstf7</i>	Sentido- <i>BamHI</i> 5'-GATC <u>GGATCC</u> ATGAATGTGATACGACAAAA-3' Antisentido- <i>XhoI</i> 5'-TCGACTC <u>GAGT</u> TAATTCCATGTTATACCAG-3'	682 pb
<i>Actina</i>	Sentido 5'-TTCTCTTTCAGCAGTAGTGGT-3' Antisentido 5'-AGCTGTTCTTTCATTATATGC-3'	210 pb

Tabla 6. Condiciones de *PCR*

Reactivos	Concentración final	Condiciones de PCR	
10X PCR amortiguador	1X	<i>Ehhstf7</i>	<i>Actina</i>
5X solución Q		Desnaturalización	Desnaturalización
MgCl ₂ 25 mM	1X	94 °C 5 min	94 °C 5 min
dNTP mix (10 mM)	3 mM	35 ciclos	35 ciclos
oligonucleótido sentido 10 µM	200 µM	94 °C 30 s	94 °C 30 s
oligonucleótido antisentido 10 µM	1.5 µM	42 °C 45 s	52 °C 1 min
Taq DNA polimerasa Qiagen (Qiagen®)	1.5 µM	72 °C 1 min	72 °C 1 min
DNA molde	2.5 U/reacción	Extensión	Extensión
	100 ng	72 °C 7 min	72 °C 7 min

7.2.2 Obtención, propagación y transformación del plásmido pET28a+*Ehhstf7*

La síntesis del plásmido pET28a+*Ehhstf7* (Figura 8), se realizó en la empresa *GenScript*, la correcta clonación del gen completo *Ehhstf7* sin intrones en el plásmido pET28a+, se corroboró mediante *PCR* de punto final usando las condiciones anteriormente descritas, además de la doble restricción del plásmido pET28a+*Ehhstf7* con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, sitios en los cuales se encuentra clonado el gen *Ehhstf7* (Tabla 7), la liberación del gen *Ehhstf7* se observó mediante el corrimiento electroforético del resultado de la doble restricción enzimática en geles de agarosa al 0.8%.

Posteriormente, se prepararon células químicamente competentes *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) y C41 (Sigma-Aldrich), mediante la inoculación de un tubo con 10 ml de medio SOC (Tryptona 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0.5 g, MgCl₂ 2.5

mM, MgSO₄ 10 mM, y glucosa 20 mM) el cual se incubó por 16 h a 37 °C y agitación constante (225 rpm).

Tabla 7. Condiciones de la doble restricción enzimática del plásmido pET28a+*Ehhstf7*

Reactivos	Concentración	Condiciones
10X NEBuffer 3.1	5 µL (1X)	37 °C/ 18 min
pET28a+ <i>Ehhstf7</i>	1 µg	
<i>BamHI</i>	1 µL (20 U)	
<i>XhoI</i>	1 µL (20 U)	
Agua libre de nucleasas	cbp 20 µL	

Transcurrido este tiempo, se inoculó 1 ml de cultivo en un matraz con 100 ml de medio SOC y se incubó por 2.5 h a 37 °C, hasta alcanzar la densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.4. El cultivo se colocó en hielo por 20 min y se centrifugó por 5 min a 4 °C y 1800 g. El medio se decantó, se resuspendieron las células en 10 ml de MgCl₂ 100 mM y nuevamente se centrifugaron por 5 min a 1800 g, se decantó la solución y el paquete celular se resuspendió en 20 ml de CaCl₂ 100 mM y se incubó por 20 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 1800 g y se decantó la solución, y el paquete celular se resuspendió en 5 ml de una solución de CaCl₂ 85 mM y glicerol al 15%. Por último, se centrifugó por 10 min a 1800 g, se decantó y resuspendió el paquete celular en 1 ml de una solución de CaCl₂ 85 mM y glicerol al 15%; las células competentes guardaron en alícuotas de 50 µl y guardaron a -80 °C, todo esto bajo condiciones de esterilidad.

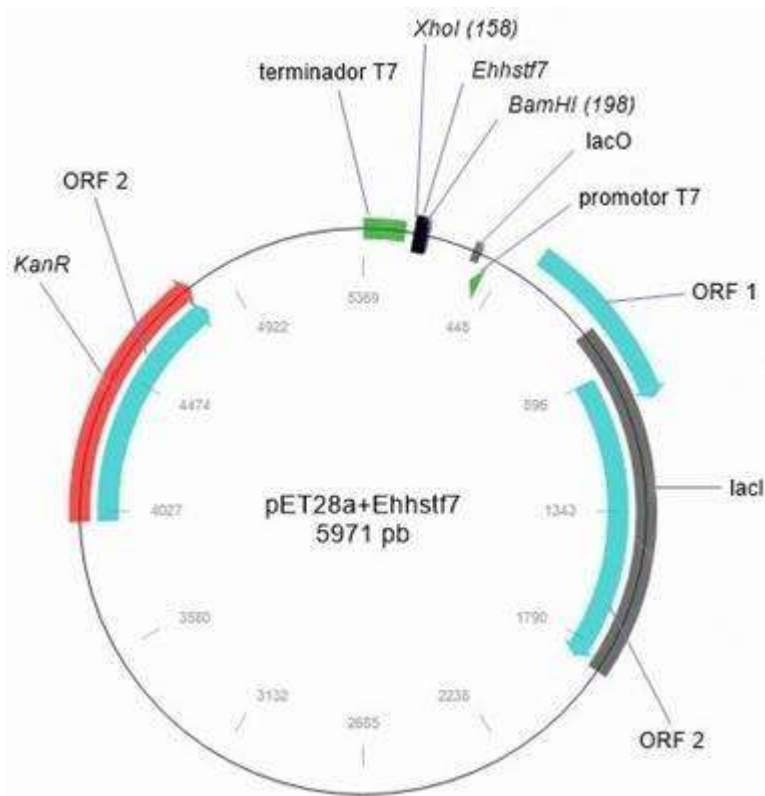


Figura 8. Construcción pET28a+Ehhstf7. Las flechas muestran la dirección de la transcripción; se muestra el sitio de clonación del gen *Ehhstf7*, entre los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*. ORF, marco de lectura abierto. *KanR*, gen de resistencia a Kanamicina.

Las células competentes TOP10 y C41 fueron transformadas con el plásmido pET28a+Ehhstf7 (Figura 8). Para la transformación, se descongelaron células químicamente competentes por 10 min en hielo. Se añadió 1 µl del plásmido pET28a+Ehhstf7 (50 ng), se mezcló suavemente con las células competentes e incubaron 20 min en hielo. Posteriormente, se colocaron en un termoblok, multi-blok®heater (Lab-Line), a 42 °C por dos min y se regresaron a hielo por otros dos min, se añadió al microtubo 250 µl de medio SOC y se incubó por 1 h a 37 °C y agitación constante (225 rpm). Transcurrido este tiempo, se sembraron las células transformadas en placas de agar LB con kanamicina (25 µg/ml, GIBCO®), y se incubaron por 16 h a 37 °C. La propagación del plásmido pET28a+Ehhstf7 se llevó a cabo mediante el kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen®) en células competentes *E. coli* TOP10 usando el protocolo del fabricante, mientras que la inducción de la

expresión de la proteína recombinante EhHSTF7 se llevó a cabo en células competentes *E. coli* C41.

7.2.3 Inducción de la expresión de la proteína recombinante EhHSTF7

La expresión de la proteína rEhHSTF7 se llevó a cabo en células competentes *E. coli* C41, las células competentes se transformaron con el plásmido pET28a+*Ehbstf7*. Las células transformadas fueron cultivadas en placas de agar LB con kanamicina (25 µg/ml), después se picó una colonia y se incubó en 10 ml de medio SOC suplementado con kanamicina (25 µg/ml) por 16 h a 37 °C con agitación constante (225 rpm); se tomó un inóculo de 10 ml de cultivo y se incubaron en 300 ml de medio SOC suplementado con kanamicina (25 µg/ml) a 37 °C y agitación constante (225 rpm), durante el tiempo necesario hasta que el cultivo alcanzó la densidad óptica de 0.6, la cual se midió en un espectrómetro de microplacas EPOCH (BioTek®) a la longitud de onda de 600 nm.

La sobre-expresión de la proteína rEhHSTF7 se indujo mediante la adición de 1mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Thermo Scientific™), el cultivo se dejó incubando por 6 h a 37 °C y agitación constante (225 rpm). La sobre-expresión de la proteína rEhHSTF7 se comprobó mediante electroforesis vertical con condiciones desnaturalizantes y reductoras, en geles de acrilamida al 12% y la cuantificación de proteína recombinante se llevó a cabo con el método de Bradford (Bradford, 1976). La inmunodetección de la proteína rEhHSTF7 se llevó a cabo por Western blot, se cargaron 20 µg de proteínas en un gel de poli(acrilamida)-SDS al 12%, se realizó el corrimiento electroforético vertical por 100 min a 130 V en solución Tris-Glicina-SDS, una vez terminado el corrimiento se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad) por medio de transferencia húmeda por 100 min a 360 mA en solución Tris-Glicina-SDS. Al finalizar la transferencia de proteínas, se bloqueó la membrana con leche en polvo libre de grasa al 5%. La inmunodetección de la proteína rEhHSTF7, se realizó con el anticuerpo policlonal αEhHSTF7 de ratón (Bello, 2016) en una dilución 1:500 y el anticuerpo monoclonal α6xhis de ratón (Roche) en una dilución 1:200, ambos

anticuerpos se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG, IgM de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Fisher Scientific). El anticuerpo policlonal α GAPDH de cabra (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:200, se usó como control. Las reacciones de quimioluminiscencia se revelaron con el substrato Immobilon® western chemiluminescent HRP (Millipore).

7.2.4 Obtención de la proteína recombinante EhHSTF7

Después de la inducción, se cosecharon las células de *E. coli* y centrifugaron por 30 min a 1800 g; el botón celular se resuspendió en 10 ml de solución de lisis, (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, Lisozima 10 mg/ml, pH 7.8); las células se dejaron incubando 30 min a temperatura ambiente. Las células se lisaron mediante sonicación, con un procesador ultrasónico (GE), a una frecuencia de 60% durante 20 ciclos de 15 s con intervalos de reposo de 15 s. Los lisados se centrifugaron 15 min a 16000 g y el sobrenadante se filtró con una unidad de filtración de 0.22 μ m Millex® GV (Millipore), para quitar impurezas y evitar que la columna de Níquel se tape. La purificación de la proteína se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad a Níquel, ya que la proteína recombinante EhHSTF7 contiene una cola de Histidinas N-terminal; para ello, se utilizó una columna HisTrap™ FF Crude (GE Healthcare) de 5 ml, que fue equilibrada con 25 ml de solución de unión, (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 7.8). La solución de proteínas fue inyectada en la columna, y se lavó nuevamente con 50 ml de solución de unión, para eliminar proteínas sin afinidad por el Níquel; la elución de la proteína recombinante EhHSTF7, se realizó añadiendo a la columna 25 ml de solución de elución, (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM, pH 7.8). La visualización de las fracciones que contenían la proteína rEhHSTF7 se observaron por medio de electroforesis vertical en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% y tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que contenían la proteína recombinante EhHSTF7 fueron dializadas en la solución de muestra (Tris-HCl 10 mM y NaCl 50 mM, pH 7.5), durante 24 h con tres cambios de la solución a 4 °C, para retirar los solutos que pudieran interferir en los experimentos posteriores; a la

proteína dializada se le añadió un cóctel de inhibidores de proteasas al 10% (cOmplete™, Roche), se realizaron alícuotas y se guardaron a -20 °C, hasta su uso.

Las fracciones que contenían la proteína rEhHSTF7 eluida de la cromatografía de afinidad con Níquel se analizaron posteriormente mediante cromatografía de exclusión por tamaño, la cual se realizó con un sistema HPLC 1200 Infinity LC (Agilent Technologies). En primer lugar, se equilibró una columna Biosec SEC-5 (i.d. 7,8 X 150 mm, tamaño de partícula de 5 µm; Agilent Technologies) con la solución de muestra. La columna se calibró con el kit de marcadores de filtración en gel para pesos moleculares de proteínas (Merck-Sigma). Cada proteína estándar se diluyó en la solución de muestra (concentración final de 0.5 mg/ml) y 50 µl se sometieron a cromatografía en la columna. A continuación, la proteína rEhHSTF7 dializada se fraccionó en la columna (0,8 ml/min) y se registró la absorbancia a 214 nm. La visualización de la proteína recombinante EhHSTF7 dializada, se llevó a cabo mediante electroforesis vertical SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12% y la inmunodetección por medio de Western blot, con las condiciones anteriormente descritas. La cuantificación de la concentración de proteína recombinante se realizó con el método de Bradford.

7.2.5 Ensayos de fluorescencia de los residuos aromáticos

La evaluación de la oligomerización de la proteína rEhHSTF7 se realizó mediante la obtención del espectro de emisión de fluorescencia, mediante el uso de un espectrómetro de luminiscencia LS 55 (Perkin Elmer) y una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm y la emisión intrínseca fue medida de 300 a 400 nm. Las soluciones de la proteína rEhHSTF7 fueron preparadas a diferentes concentraciones (0.4, 2.0, 4.0, 8.0, y 12.0 µM), en una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 7.8. El espectro fue obtenido tanto a 37 como a 42 °C, la temperatura de las muestras fue controlada usando una celda encamisada cubierta por agua y un baño de agua circulador con control de temperatura (Perkin Elmer). Las muestras fueron incubadas por 30 min y posteriormente, se obtuvo el espectro de emisión. Los experimentos se realizaron

por triplicado. El análisis de datos se realizó calculando el centro de masas espectral de cada medición, graficando este valor por la concentración de proteína, usando el software GraphPad Prism versión 6.04 para Windows.

7.3 Interacción *in vitro* del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen *mdr EhPgp5*

7.3.1 Marcaje e hibridación de la sonda HSEwt

Para la interacción proteína-DNA *in vitro*, se utilizó la sonda HSE tipo silvestre (HSEwt) de doble cadena marcada con biotina, la cual contiene la secuencia del elemento HSE del gen *EhPgp5* (5'-ata**GAAatttTTC**ata-3'), para el marcaje se utilizó el kit Biotin 3' End DNA Labeling (Thermo Scientific™), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez marcadas las sondas de cadena sencilla por separado, se hibridaron de la siguiente manera; se colocó una relación equimolar de ambos oligonucleótidos, mezclando suavemente y colocándolos en un termociclador Maxygene™ (Axygen®), empezando con la temperatura de 95 °C durante 5 min, y bajando 10 grados °C cada minuto hasta llegar a 25 °C y por último a 4 °C; una vez hibridados los oligonucleótidos se obtuvo una sonda del HSE wild type (HSEwt) de doble cadena, la cual se cuantificó en un espectrómetro de microplacas EPOCH (BioTek®) y se observó la adecuada hibridación mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%.

7.3.2 Ensayos de interacción rEhHSTF7-HSEwt

La interacción de la proteína rEhHSTF7 y el elemento HSE del gen *EhPgp5*, se analizó por medio de la técnica de ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA). La estandarización de la interacción se llevó a cabo usando diferentes concentraciones de proteína rEhHSTF7, desde 0.1 a 8.5 µM, además, de 3 µM de la sonda HSEwt marcada con biotina. Se utilizó el kit LightShift™ Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific™), las reacciones de interacción se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente, se añadió amortiguador de carga de DNA a las reacciones de interacción y fueron analizadas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

(PAGE) al 6 %. El corrimiento electroforético se realizó por una 1 h a 100 V en solución TBE 0.5X, las interacciones se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ de 0.45 μm (GE healthcare), la transferencia de las reacciones se realizó en una cámara húmeda en TBE 0.5X por 1 h a 380 mA.

La detección de los complejos proteína-DNA, se realizó con el kit Chemiluminescent nucleic acid detection module (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante. La afinidad de una interacción se cuantificó por la constante de disociación de equilibrio (K_D); la cual se entiende como la concentración de rEhHSTF7 a la que el 50% del DNA está en complejo con la proteína (Heffler et al., 2012). La cuantificación de la fracción de HSEwt unida a la proteína rEhHSTF7 se obtuvo mediante el análisis de densitometría óptica con el programa ImageJ versión 1.2.4; la señal de fondo de las regiones en blanco del gel se restó a la señal obtenida de las bandas. La fracción de HSEwt unido se determinó a partir de la señal sustraída del fondo utilizando la expresión: $\text{unido}/(\text{unido} + \text{no unido})$.

La fracción de HSEwt unido en cada reacción se representó gráficamente frente a la concentración de proteína rEhHSTF7 (μM). El error del intervalo de confianza del 95%, obtenido del ajuste de la curva; fue R^2 : 0,87. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 6.04 para Windows. Los experimentos se realizaron por triplicado. Además, se analizó la especificidad de la interacción rEhHSTF7-HSEwt, para lo cual se utilizaron 0.7 μM de proteína recombinante y 3 μM de HSEwt; como competidor específico se utilizó la sonda HSEwt no marcada con una concentración 200 veces mayor a la sonda HSEwt marcada con biotina, y como competidor inespecífico Poly(dI-dC) no marcado con una concentración 350 veces mayor a la sonda HSEwt marcada con biotina. Las reacciones se realizaron con las condiciones mencionadas anteriormente para los ensayos de EMSA.

7.3.3 Superretardamiento

La interacción específica de la proteína rEhHSTF7 con el elemento HSEwt, se corroboró mediante ensayos de superretardamiento, en los cuales se utilizaron los anticuerpos específicos $\alpha\text{EhHSTF7}$ (LBM1) de ratón en una dilución 1:500 y $\alpha 6\text{xHis}$

(Roche, 11922416001) de ratón en una dilución 1:200; como control se utilizó un anticuerpo no específico α GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-20357) de cabra en una dilución 1:500. Los anticuerpos se añadieron a las reacciones de interacción sin sonda HSEwt marcada con biotina y se incubaron por 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda HSEwt marcada con biotina a las reacciones de interacción y se realizó el procedimiento como en los ensayos EMSA, con las condiciones anteriormente descritas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.3.4 Ensayos de competencia del complejo rEhHSTF7-HSEwt

Para analizar la importancia de las bases que conforman el elemento HSE del gen *EhPgp5*, se realizaron ensayos de competencia con oligonucleótidos que presentan diferentes mutaciones del elemento HSEwt. Los oligonucleótidos mutados no marcados usados como competidores con una concentración 200 veces mayor a la sonda HSEwt marcada con biotina, fueron; HSEmgaa (5'-atatcgattt**TT**Cata-3'), HSEmttc (5'-ata**GAA**atttgatata-3'), HSEmc (5'-ata**GAA**attt**TT**aata-3'), HSEmt (5'-ata**GAA**attt**Tg**Cata-3'), HSEmt* (5'-ata**GAA**atttgTCata-3'); además, como control de inespecificidad se utilizó Poly (dl-dC) con una concentración 350 veces mayor, y un oligonucleótido no relacionado, HSEnr (5'-atatcgatttgatata-3'). La densidad óptica de la señal de los complejos proteína-DNA se obtuvo mediante el software ImageJ (Schneider et al., 2012); el análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía y el análisis *post-hoc* de Dunnett en el software GraphPad Prism versión 6.04 para Windows. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.4 Participación del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina

7.4.1 Silenciamiento del factor de transcripción EhHSTF7 en trofozoítos de *E. histolytica*

El silenciamiento con RNA de interferencia (RNAi) es una vía conservada, donde el RNA de doble cadena suprime la expresión de genes con secuencias complementarias (Meister & Tuschl, 2004). La secuencia del gen *Ehhstf7* sin intrones (EHI_200020), se obtuvo de la base de datos AmoebaDB

(<http://amoebadb.org/amoeba/>), y se utilizó para el diseño de pequeños RNAi. El diseño se realizó en con la herramienta Custom Dicer-Substrate siRNA (por sus siglas en inglés, DsiRNA) del servidor Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/>), siguiendo las recomendaciones para el diseño de siRNAs tradicionales; éstas secuencias deben encontrarse dentro del marco de lectura, tener un contenido bajo de GC (35-50%), evitar secuencias con más de 4 nucleótidos repetidos contiguos y una homología del 100% con el gen de interés (Hannon & Rossi, 2004).

Los DsiRNAs, son RNA de doble cadena de 27 nucleótidos que han demostrado un aumento en la potencia de silenciar mRNA comparado con los siRNAs tradicionales de 21 nucleótidos, debido a su optimización para ser procesados por la proteína Dicer (Kim et al., 2005). La especificidad de cada DsiRNA se corroboró mediante la búsqueda de similitud de secuencias en la herramienta BLAST de la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/>), analizando que los DsiRNAs no se encontraran en una secuencia diferente al gen *Ehhstf7*. Se diseñaron dos DsiRNAs, además se utilizó el siRNA566 (Rojas, 2017) específico del gen *Ehhstf7* (Tabla 8), previamente diseñado en el laboratorio y como control de silenciamiento un siRNA específico del mRNA de la proteína GFP (siRNA_{nr}), el cual no reconoce ningún mRNA de *E. histolytica* (Solis & Guillén, 2008).

Tabla 8. DsiRNAs y siRNAs utilizados en el silenciamiento del gen *Ehhstf7*

Nombre	Secuencia	Posición
siRNA566	5'-CACCUUCAACUGGUUAUACAUGGAA-3' 3'-GUGGAAGUUGACCAUAUUGUACCUU-5'	566-591
DsiRNA67	5'-GAACUUGUCAAUUGAUGAAAAAUdCdTdA-3' 3'-AACUUGAACAGUUACUACUUUUUAGAU-5'	67-92

DsiRNA467	5'-GAAUUGAUGAGAUGGAAGAACAAdAdAdT-3' 5'-UUCUUAACUACUCUACCUUCUUGUUUA-5'	467-492
siRNA _{nr}	5'-CAAGCUGACCCUGAAGUUCdTdT-3' 3'-dTdTGUUCGACUGGGACUUCAAG-5'	-

7.4.2 Viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con emetina y DsiRNAs

La viabilidad de los trofozoítos se determinó mediante el ensayo de exclusión del azul de tripano; se sembraron 1×10^5 trofozoítos en 10 ml de medio TYI-S-33, se dejaron adherirse durante 1 h a 37 °C y se colocó emetina en una concentración final de 8 μ M, además de colocar el siRNA566, el DsiRNA67, el DsiRNA467 y el siRNA_{nr}, respectivamente en una concentración final de 55 nM y se dejaron incubando por 24 h. Los trofozoítos que no contenían emetina o DsiRNAs, fueron tomados como el 100% de porcentaje de viabilidad (control). Transcurrido el tiempo de incubación, los trofozoítos se despegaron, centrifugaron y se realizaron dos lavados con PBS pH 6.8. La pastilla celular se resuspendió en 5 ml de medio TYI-S-33, se tomó 10 μ l de esta solución y se realizó una dilución 1:2 con azul de tripano (Gibco) al 0.4%. El conteo de trofozoítos viables, se realizó en una cámara de Neubauer, tomando como viables a los trofozoítos que excluyeron al colorante, es decir que no muestran un color azul. Este experimento se realizó por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con un análisis *post-hoc* de Dunnett, usando el software GraphPad Prism versión 6.04 para Windows.

7.4.3 Expresión del mRNA del gen *Ehhstf7* y del gen *EhPgp5* en trofozoítos silenciados

Para evaluar la expresión del factor *Ehhstf7* durante el estrés con emetina, se cultivaron 3×10^5 trofozoítos durante 8, 16, 24, y 48 h con emetina 8 μ M. Además, para el silenciamiento del factor *Ehhstf7* se cultivaron trofozoítos con emetina 8 μ M durante 24 h, trofozoítos con emetina y 55 nM de siRNA566, DsiRNA67,

DsiRNA467, o siRNA_r, respectivamente. Como control, se cultivaron trofozoítos sin emetina y sin siRNAs. El silenciamiento del factor EhHSTF7, se llevó a cabo por la internalización de los siRNAs por la técnica de *soaking*, la cual toma ventaja de las cualidades fagocíticas intrínsecas de este parásito (Ocádiz-Ruiz et al., 2013). La extracción del RNA de trofozoítos de *E. histolytica*, se realizó con el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) (Chomczynski, 1993), anteriormente descrito. La síntesis del cDNA se realizó con el kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) anteriormente descrita. La síntesis de cDNA se evaluó mediante la amplificación del gen de *actina* por *PCR* de punto final. El producto de amplificación se analizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, se corrió durante 40 min a 100 V, y se tiñó con bromuro de etidio. La expresión del mRNA se analizó mediante *PCR* cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), usando los oligonucleótidos de la Tabla 9.

Tabla 9. Oligonucleótidos usados en la qRT-PCR

Gen	Secuencia	Concentración final
<i>Ehhstf7</i>	5'-TAGATTTTTTCATCATTGACAAGTTCAAA-3'	3 µM
	3'-ATCCGCTACGGCTATCTTCG-5'	0.5 µM
<i>EhPgp5</i>	5'-CGGGATCCGTAGGAGGTGCAGTATTTCC-3'	3 µM
	3'-GGGGTACCCATCCTATTTCTTGTTTGAC-5'	9 µM
<i>gapdh</i>	5'-CCGTCCACAGACAATTCTGA-3'	3 µM
	3'-TTCGACTTTCTCTAGGTCGAGTT-5'	3 µM

La reacción de qPCR-RT se realizó en un equipo Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) usando el software MxPro QPCR; utilizando SYBR™ Green como sistema de detección y el Kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). Las condiciones de amplificación de los genes *Ehhstf7*, *EhPgp5*, y *gapdh* se muestran en la Tabla 10, las reacciones se realizaron por triplicado en microtubos de 0.6 µl. El número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia cruce el nivel basal se conoce como “*cycle threshold*”. Los niveles de ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácidos nucleicos en la reacción. El control endógeno de expresión del mRNA fue el gen *gapdh*. La expresión relativa del mRNA se obtuvo por el método de cuantificación de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con un análisis *post-hoc* de Dunnett, usando el software GraphPad Prism versión 6.04 para Windows.

Tabla 10. Condiciones usadas en la qRT-PCR

Componentes	Cantidad final	Condiciones
2X SYBR Green PCR Master Mix	6.25 µl	95 °C/ 10 min/ 1 ciclo 95 °C/ 15 s 60 °C/ 1 min } 40 ciclos
Oligonucleótido sentido	1.25 µl	
Oligonucleótido antisentido	1.25 µl	
cDNA	50 ng	
Agua libre de nucleasas	cbp 12.5 µl	
Total	12.5 µl	

7.4.4 Expresión de la proteína EhHSTF7 y EhPGP5 en trofozoítos silenciados

Para evaluar la expresión del factor EhHSTF7 durante el estrés con emetina, se cultivaron 3×10^5 trofozoítos durante 8, 16, 24, y 48 h con emetina 8 µM. Además, para el silenciamiento del factor *Ehhstf7* se cultivaron trofozoítos con emetina 8 µM

durante 24 h, trofozoítos con emetina y con 55 nM de siRNA566, DsiRNA67, DsiRNA467, o siRNA_{nr}, respectivamente. Como control, se cultivaron trofozoítos sin emetina y sin siRNAs. La obtención de proteínas totales de los trofozoítos se realizó mediante lisis por calor. Se cosecharon los trofozoítos y lavaron con PBS 1X pH 6.8; la pastilla celular se resuspendió en 300 µl de solución de lisis, Tris-HCl 100 mM pH 7.4, SDS 10%, IP-P2X (Tris-HCl 100 mM pH 7.4, PMSF 100 mM), adicionado con un cóctel de inhibidores de proteasas al 10% (cOmplete™, Roche). Se colocó la solución con los trofozoítos 6 min en agua a 100 °C y en hielo por 1 min y se guardó a -20 °C, hasta su uso. Posteriormente, 20 µg de proteínas totales de los trofozoítos cultivados bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se analizaron en un SDS-PAGE al 12%, se transfirieron e inmunodetectaron con los anticuerpos específicos α EhHSTF7 y α EhPGP5 (Medel-Flores, 2019), como control se utilizó el anticuerpo α GAPDH. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con un análisis *post-hoc* de Dunnett, usando el software GraphPad Prism versión 6.04 para Windows.

7.5 Realizar el interactoma *in silico* de EhHSTF7 y confirmar su asociación con alguna de las proteínas identificadas

7.5.1 Interactoma *in silico* del factor EhHSTF7 con la proteína EhHSP70

El análisis de las posibles interacciones proteína-proteína del factor EhHSTF7 con la proteína EhHSP70, se realizó con el servidor STRING versión 11.0 (<http://string-db.org/>). Estas interacciones pueden ser directas (físicas) o asociaciones indirectas (funcionales), que derivan de la predicción *in silico* de conocimiento transferido entre organismos o de interacciones agregadas de otras bases de datos (Szklarczyk et al., 2019). Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína EhHSTF7 (EHI_200020) obtenida del servidor AmoebaDB. Se usaron los parámetros *default* del programa STRING, con el *Score* más alto (>0.700).

7.5.2 Co-localización del factor EhHSTF7 con la EhHSP70 en trofozoítos en respuesta a emetina

Una de las proteínas identificadas en el interactoma, fue la proteína de choque térmico 70 (EhHSP70), por lo que analizar la localización del factor EhHSTF7 y la proteína EhHSP70 en el parásito *E. histolytica* en respuesta a emetina 8 μ M, es importante para analizar la posible activación del factor EhHSTF7 en respuesta a este fármaco. La co-localización de estas proteínas *in vivo*, se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Trofozoítos incubados con emetina 8 μ M, con el DsiRNA467 y emetina, y con el siRNA_{nr} y emetina fueron cultivados por 24 h a 37 °C. Trofozoítos sin emetina y sin siRNAs fueron cultivados por 24 h a 37 °C y fueron tomados como control de co-localización de las proteínas EhHSTF7 y EhHSP70. Los trofozoítos (2×10^5) se dejaron adherir por 2 h a 37°C a cubreobjetos de 22 x 22 mm que se colocaron en una caja Petri de vidrio; transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se lavaron tres veces con PBS 1X pH 6.8. Los trofozoítos se fijaron por 1 h a 37 °C, con paraformaldehído al 4% (SIGMA) y se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.5% (SIGMA) durante 25 min a 37 °C. Entonces, se realizó el bloqueo con una solución de albúmina sérica de bovino al 5% (BSA), durante 30 min a temperatura ambiente, se retiró la solución y se lavó con PBS. Se colocaron 2 ml de anticuerpos primarios, α EhHSTF7 de ratón obtenido en el laboratorio y α EhHSP70 de conejo obsequiado por el Dr. Alfonso Olivos García, en una dilución 1:500 en PBS-tween 20 (BIO-RAD®), se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó e incubó las preparaciones con los anticuerpos secundarios α lgG (H+L) de ratón conjugado a FITC (Zymed ®) y α lgG (H+L) de conejo conjugado a Alexa Fluor 568 (Invitrogen), en una dilución 1:2000 durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se agregaron 50 μ l del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nm (SIGMA®) a las preparaciones, y se incubó por 8 min a temperatura ambiente. Se colocaron las preparaciones en un portaobjetos con 7 μ l de la solución de montaje Vectashield® y se sellaron con esmalte de uñas transparente para evitar que se secan. Las imágenes se obtuvieron a través de un Microscopio Confocal de Barrido Láser-

Multifotónico LSM 710 NLO (Carl Zeiss), ubicado en el Instituto del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, del Instituto Politécnico Nacional.

8. Resultados

8.1 Interacción del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen *mdr EhPgp5 in silico*

8.1.1 Modelo estructural 3D del factor EhHSTF7

Primeramente, se obtuvo el modelo de la estructura terciaria del factor EhHSTF7, mediante el servidor I-TASSER. El modelador generó cinco modelos, los cuales se analizaron para seleccionar la estructura terciaria con el mayor valor de *C-score* y parámetros de validación (Figura 9). El *C-score* es un valor de confianza que permite estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER, se basa en la significancia de los alineamientos de los moldes enhebrados y los parámetros de convergencia de las simulaciones del ensamble de estructuras, posee valores comúnmente entre -5 y 2, donde un puntaje alto, cercano a 2, es indicativo de un modelo con un alto grado de confianza (Yang et al., 2015).

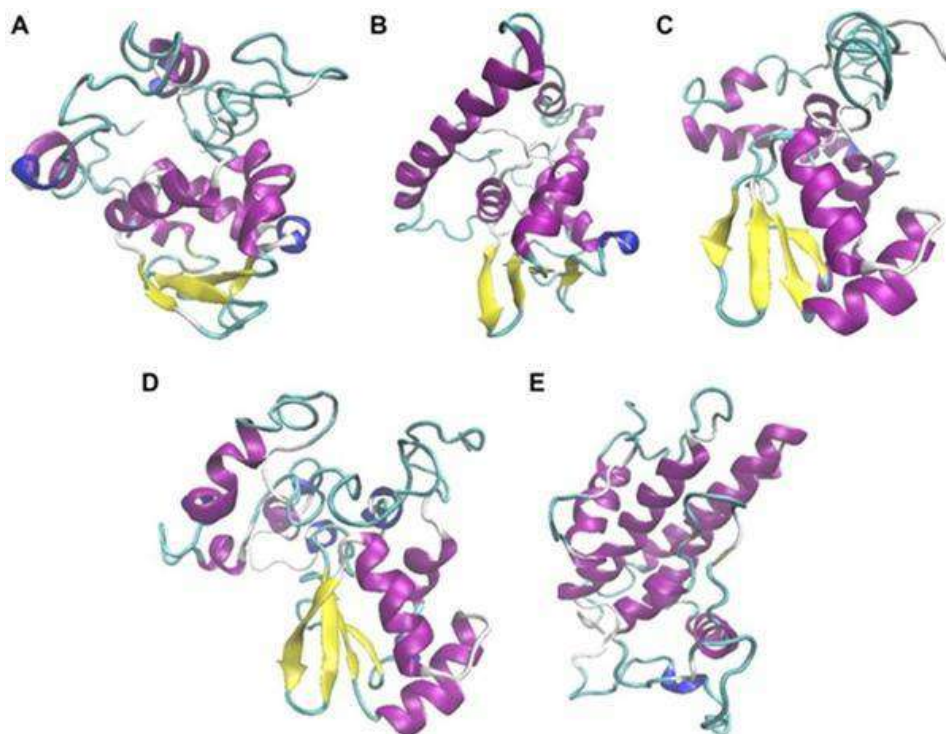


Figura 9. Representación de los modelos del factor EhHSTF7. (A) Modelo 1. (B) Modelo 2. (C) Modelo 3. (D) Modelo 4. (5) Modelo 5. Los colores representan la estructura secundaria de cada modelo. α hélice, morado; 3_{10} hélice, azul rey; hoja β , amarillo; bucle, azul celeste.

Los valores obtenidos de *C-score*, para cada modelo se muestran en la Tabla 11, siendo el modelo 2 el que presentó el mejor valor de *C-score* el cual fue de -2.6. Sin embargo, para poder garantizar una selección aún más confiable, los cinco modelos del EhHSTF7 fueron analizados con los programas de validación Errat y el gráfico de Ramachandran, los resultados mostraron nuevamente que el modelo 2 fue el que tuvo el mayor porcentaje de Errat de 95.77% y 98.9% de aminoácidos en regiones permitidas, mientras que los demás modelos sus valores fueron más bajos (Tabla 11).

Tabla 11. Validación del modelo de EhHSTF7 obtenido en I-TASSER

Modelo I-TASSER	C-Score	Errat (%)	Gráfico de Ramachandran (%)
1	-3.3	76.19	93.3
2	-2.6	95.77	98.9
3	-3.5	83.6	96.1
4	-3.54	77.25	93.9
5	-3.45	85.19	95.5

El modelo 2 se seleccionó al tener *C-score* y parámetros de validación más altos, por lo que se sometió a minimización de energía con el servidor YASARA, para corregir errores en la estructura usando el campo de fuerza de YASARA. Una vez minimizado, el modelo 2 presentó un porcentaje de Errat de 98.92% y aminoácidos en regiones permitidas de 98.3% (Figura 10), por lo que este modelo fue usado para realizar el análisis de simulación de dinámica molecular.

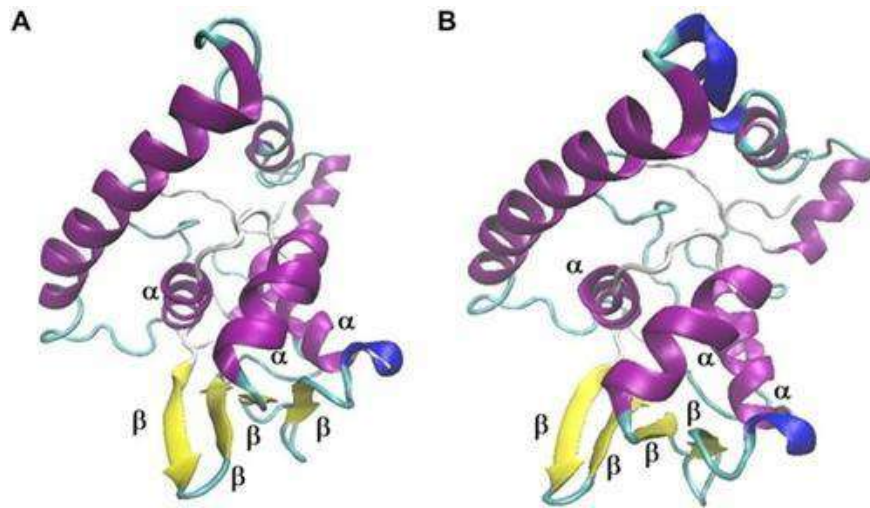


Figura 10. Representación estructural del modelo 2 del factor EhHSTF7. (A) Modelo 2 de EhHSTF7 obtenido del servidor I-TASSER. (B) Modelo 2 del factor EhHSTF7 minimizado. Los colores representan la estructura secundaria de cada modelo. α hélice, morado; β hélice, azul rey; hojas β , amarillo; bucle, azul celeste.

La estructura del modelo 2 minimizado, contiene los dominios reportados para esta familia de factores de transcripción según el análisis realizado en el servidor InterPro, así como el motivo reportado para el dominio de unión al DNA (DBD) de los HSFs, de acuerdo al servidor Jpred 4. Un DBD altamente conservado del residuo 13 al 109, con un motivo hélice-vuelta-hélice, conformado por 4 hojas β antiparalelas y 3 α hélices. Además, el dominio de oligomerización (DO) se localiza del residuo 122 al 163 con motivo coiled-coil (Figura 11).

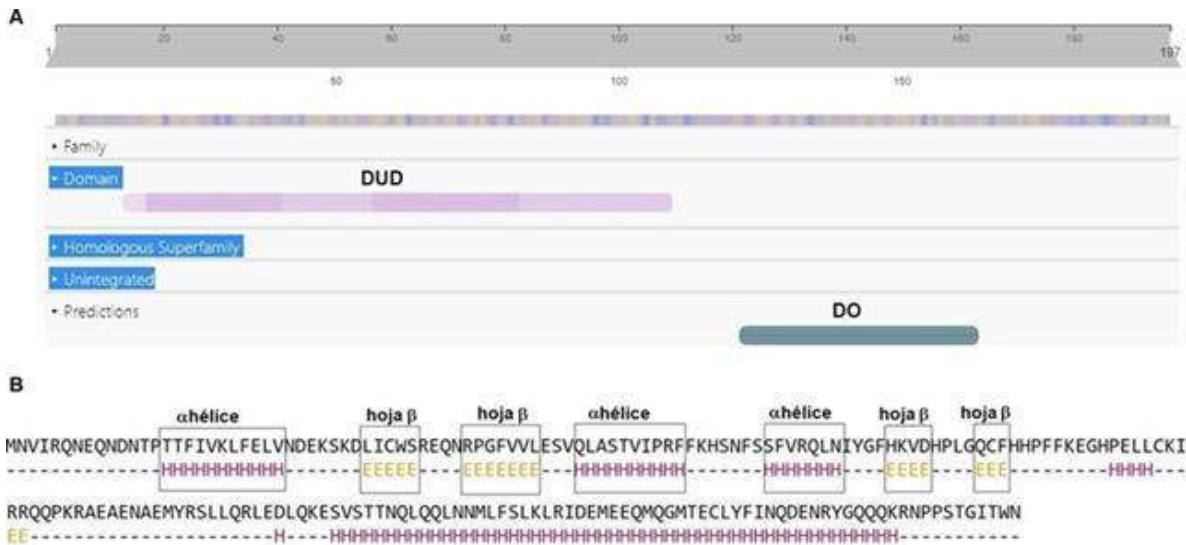


Figura 11. Dominios y motivos del modelo 2 del factor EhHSTF7. (A) Dominios del factor EhHSTF7; dominio de unión al DNA (DBD) y dominio de oligomerización (DO). (B) Motivo hélice-vuelta-hélice del DBD del factor EhHSTF7; contiene 4 hojas β antiparalelas y 3 α hélices. Los residuos que conforman el motivo hélice-vuelta-hélice, se encuentran encerrados en cuadros.

8.1.2 Simulación de la dinámica molecular del factor EhHSTF7

Con la finalidad de obtener la estructura de mayor estabilidad del EhHSTF7, se realizó la simulación de la dinámica molecular de esta proteína, evaluando diferentes parámetros estructurales. La trayectoria de la MDS del factor EhHSTF7 bajo condiciones fisiológicas en solvente agua y 310 K arrojó los siguientes datos; el RMSD de los carbonos α en la etapa inicial de 0 a 10 ns de MDS, alcanzó un valor de 0.7 nm. Posteriormente, se observa una etapa de equilibrio de 10 a 100 ns, donde la simulación fluctúa entre 0.7 y 0.8 nm (Figura 12A). Estos resultados indican una estabilidad estructural para este modelo *in silico*. En los gráficos de RMSF se observan las fluctuaciones de los carbonos α de cada uno de los 197 residuos (Figura 12B), los valores con menor RMSF se encuentran en las zonas de estructura secundaria regular correspondientes a las α hélices y hojas β del DBD, del residuo 13 al 109 (Figura 11B), lo que le confiere una menor fluctuación estructural. Mientras que las zonas correspondientes a los bucles y las α hélices del DO, del residuo 122 al 163 (Figura 11B), presentaron los valores más altos de RMSF, lo que permite al

DO interaccionar con otras proteínas al tener esta región una mayor fluctuación estructural.

En cuanto al RG del modelo de la proteína EhHSTF7, se observa que de 0 a 5 ns el valor de RG es cercano a 1.95 nm, lo que denota una conformación desplegada. A partir de 20 ns de MDS se observa una disminución cercana a 1.75 nm, lo que demuestra un plegamiento compacto de la proteína EhHSTF7 desde 20 a 100 ns de la MDS, observándose un pico de 1.8 nm entre 60 y 70 ns de MDS, pero sin cambios importantes en la compactación (Figura 12C). El parámetro de SASA obtenido muestra que el área expuesta alcanza 145 nm² de 0 a 5 ns de MDS, presentando una conformación desplegada al tener mayor área de contacto antes del equilibrio (10 ns). Posteriormente, se observa la disminución del valor de SASA a 20 ns de la MDS de la proteína EhHSTF7, de 120 a 125 nm². El valor de SASA se mantiene en promedio de 20 a 100 ns de MDS, observándose un pico cercano a 135 nm² entre 60 y 70 ns de MDS (Figura 12D).

Corroborando un plegamiento compacto de la proteína cuando alcanza el equilibrio estructural. El número de puentes de hidrógeno (HB) intramoleculares entre los residuos de la proteína EhHSTF7, presentó un promedio de 120 HB de 0 a 10 ns de MDS. Una vez que alcanza el equilibrio estructural el modelo de EhHSTF7, el promedio aumentó a 140 HB y se mantuvo constante de 10 a 100 ns de MDS (Figura 12E). Este resultado demuestra que la proteína equilibrada tiene un mayor número de enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que indica una conformación compacta.

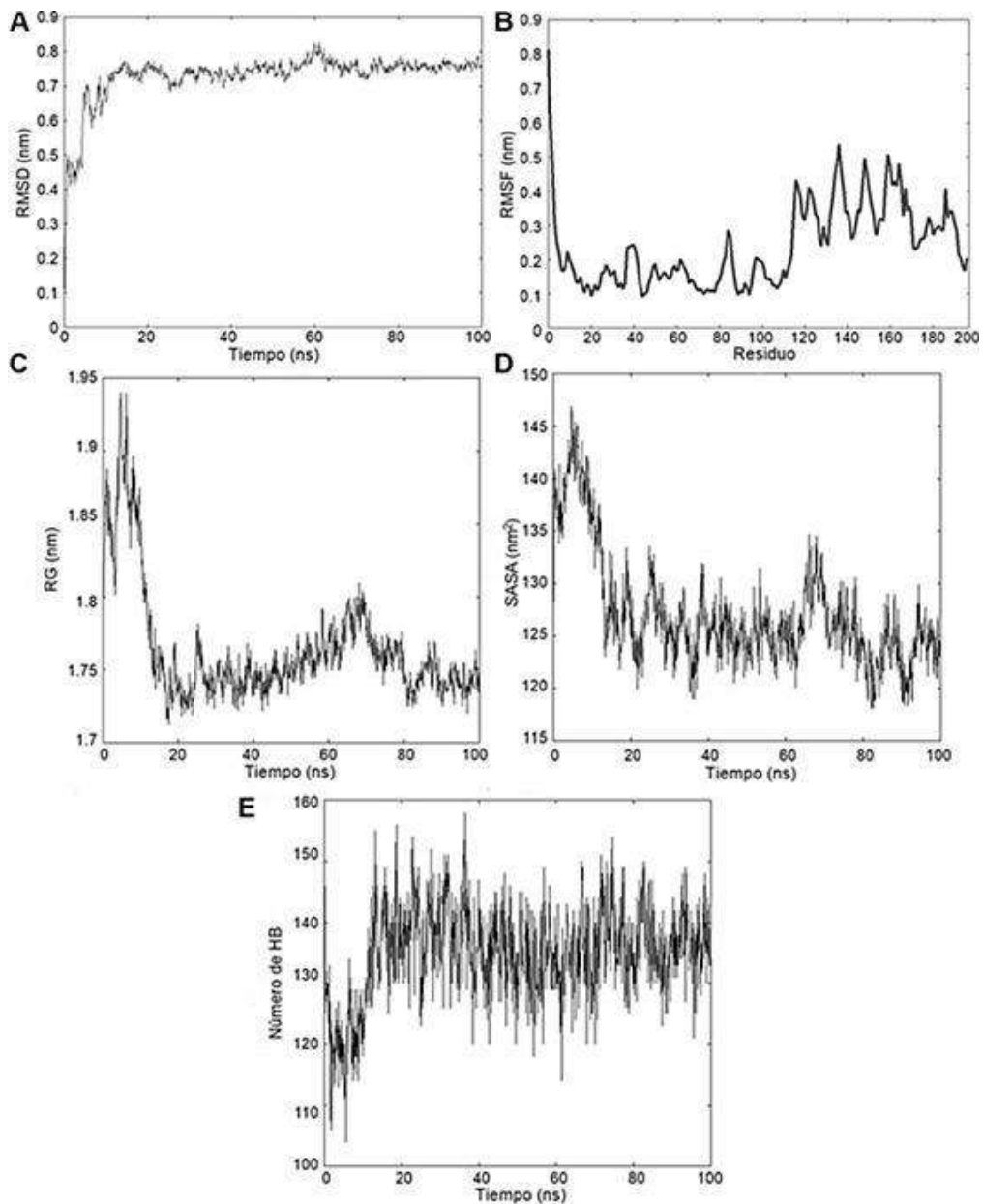


Figura 12. Análisis de la MDS del factor EhHSTF7 durante 100 ns. (A) Evolución en el tiempo (ns) del RMSD (nm) de los carbonos α de la proteína EhHSTF7. (B) fluctuación (RMSF) de los carbonos α de los 197 residuos de la proteína EhHSTF7. (C) Radio de giro (RG) de la proteína EhHSTF7. (D) Área de exposición al solvente del EhHSTF7 determinado por el valor de SASA (nm^2). (E) número de puentes de Hidrógeno (HB) intramoleculares de la proteína EhHSTF7.

La MDS de la proteína EhHSTF7 se corrió por 100 ns, sin embargo, para poder realizar el acoplamiento molecular con el elemento HSE del promotor del gen

EhPgp5, se obtuvo el *cluster* de la MDS de la proteína EhHSTF7, esto es la conformación representativa, con un *cut-off* de 0.17 nm. Bajo estas condiciones, la clusterización de la MDS produjo 15 conformaciones representativas, las cuales 14 de éstas caen dentro de 0 a 10 ns de la MDS (Figura 13A), tiempo en el que el modelo de la proteína EhHSTF7 no alcanzó el equilibrio estructural (Figura 12A), por lo que fueron descartadas. Por lo tanto, la conformación número 15, la cual corresponde a 95 ns, representa la conformación de la proteína en equilibrio, es decir de 10 a 100 ns (Figura 13B).

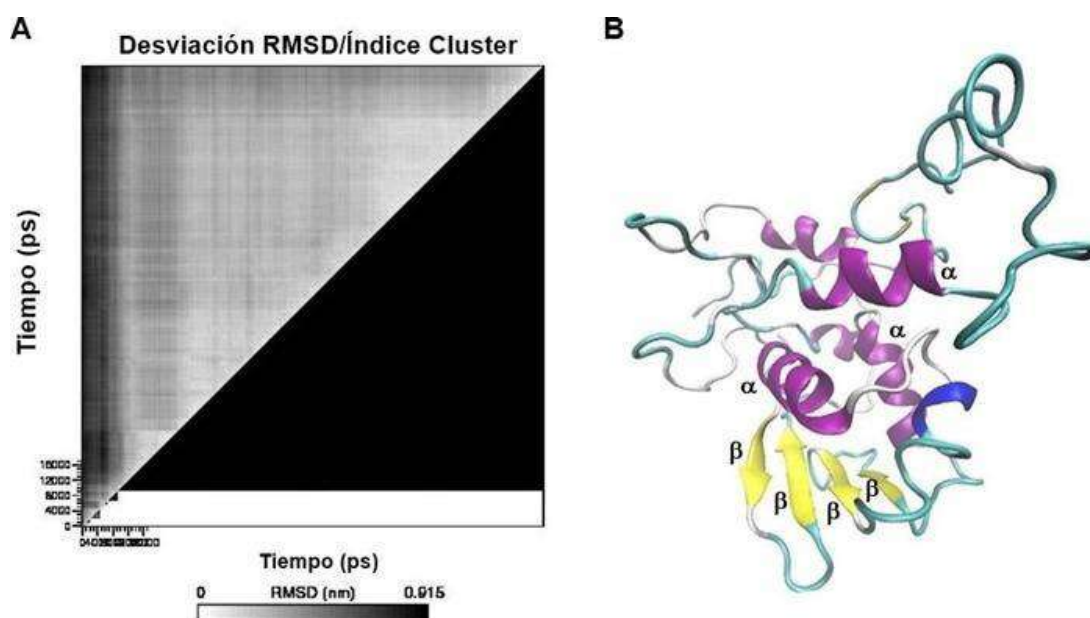


Figura 13. Clusterización de la MDS del factor EhHSTF7. (A) Estructuras representativas de la MDS del factor EhHSTF7. (B) Estructura de 95 ns representativa de la estructura equilibrada del factor EhHSTF7. α hélice, morado; 3_{10} hélice, azul rey; hoja β , amarillo; bucle, azul celeste.

8.1.3 Acoplamiento molecular del modelo del factor EhHSTF7 y el elemento HSE del promotor del gen *EhPgp5*

Una vez obtenida la conformación de 95 ns del EhHSTF7, ésta se utilizó para realizar el acoplamiento molecular con la secuencia HSE del promotor del gen *EhPgp5*, cuya secuencia es 5'-ata**GAA**attt**TTC**ata-3'. El programa PatchDock generó 20 modelos del complejo EhHSTF7-HSE. Se analizaron las interacciones

por enlaces de hidrógeno del DBD del factor EhhSTF7 y el elemento HSE de los diferentes modelos del complejo proteína-DNA mediante el software UCSF Chimera versión 1.13.1. Se seleccionó el modelo que presentó el mayor *Score* de interacción y la energía libre (ΔG) de interacción más negativa, además de un RMSD de interacción más cercano. El complejo 9 fue el que presentó el mejor *Score*, de 13698 y un ΔG de -258.66 kcal/mol, por lo que este representa el complejo *in silico* EhhSTF7-HSE con la mayor probabilidad de interactuar (Figura 14A).

La interacción entre el EhhSTF7 y el HSE se presentó con las bases complementarias del segundo motivo conservado del elemento HSE (5'-GAA-3'), mediante los residuos Ser69 y Arg72 localizados en la α hélice 3 del DBD, por medio de enlaces de hidrógeno (Figura 14A). El residuo Ser69 interactúa con la base G mediante dos enlaces de hidrógeno con una distancia de interacción de 3.70 y 4.22 Å y además interactúa con la siguiente A mediante un enlace de hidrógeno con una distancia de interacción de 2.19 Å (Figura 14B). Mientras que el residuo Arg72 interactúa con la primera A mediante dos enlaces de hidrógeno con una distancia de interacción 4.93 y 3.04 Å; así como con la segunda A, a través de un enlace de hidrógeno con una distancia de interacción de 4.40 Å (Figura 14C).

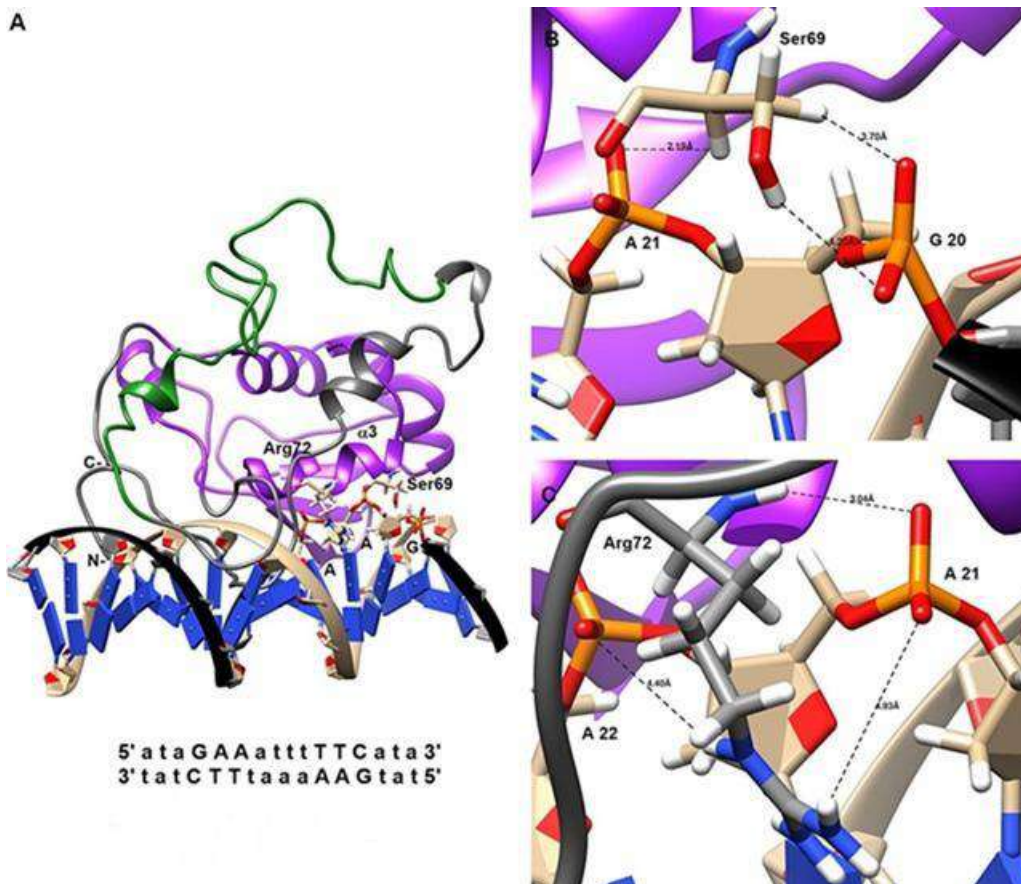


Figura 14. Acoplamiento molecular *in silico* EhHSTF7-HSE. (A) Complejo EhHSTF7-HSE obtenido en el servidor PatchDock, se observa la interacción con las bases 5'-GAA-3' complementarias del elemento HSE. En la parte inferior se muestra la secuencia del HSE con los motivos GAA y TTC en mayúsculas. (B) Interacciones por enlace de hidrógeno del residuo Ser69 con las bases 5'-GA-3' complementarias del elemento HSE. (C) Interacciones por enlace de hidrógeno del residuo Arg72 con las bases 5'-AA-3' complementarias del elemento HSE. Residuos y nucleótidos interaccionando están representados en *sticks*, los residuos representados en *cartoon* son residuos en la hélice 3 del DBD que no tienen contacto con las bases 5'-GAA-3' por enlaces de hidrógeno. Residuos y nucleótidos interaccionando se muestran con sus letras y números. α , α -hélice; β , hojas β . Región verde, DO. Región morada, DBD. N-, N-terminal; C-, C-terminal.

8.2 Obtención de la proteína recombinante del factor EhHSTF7

8.2.1 Amplificación del gen *Ehhstf7*

El gen *Ehhstf7* de *E. histolytica* contiene un intrón de 68 pb (Figura 15), por lo cual la amplificación del gen completo que codifica para la proteína funcional EhHSTF7 se obtuvo del cDNA que se generó a partir del RNA de trofozoítos de *E. histolytica*. Con la finalidad de corroborar la presencia del intrón en el gen *Ehhstf7* se realizó la amplificación del gen *Ehhstf7* a partir del gDNA y cDNA.

```
ATGAATGTGATACGACAAAATGAACAAAATGATAATACACCTACTACATTTATAGT
TAAATTATTTGAACTTGTCAATGATGAAAAATCTAAAGACTTAgtttgtcgtttttctttatta
ataaaagacaacaacaataagaaataatttaattaattcatcagATTGTTGGAGTAGAGAACAA
AATAGACCTGGATTTGTTGTCTTAGAGTCAGTTCAATTAGCATCAACTGTTATTC
CCAGTTTTTTTAAACATTGCAATTTTAGTAGTTTTGTACGACAATTAATATTTTAC
GGATTTTCATAAAGTAGACCATCCTCTTGGACAATGTTTTCATCATCCATTTTTTA
AAGAAGGACATCCTGAATTATTATGTAAAATTCGTCGTCAACAACCTAAACGTG
CAGAAGCAGAAAATGCAGAAATGTATCGTAGTTTATTACAAAGATTAGAAGATT
ACAAAAAGAGAGTGTATCAACAACAAATCAATTACAACAACCTAATAATATGTTA
TTTTCATTAATAAAGAAATTGATGAGATGGAAGAACAATGCAAGGAATGACA
GAATGTCTTTATTTTATTAACCAAGATGAAAATAGGTATGGACAACAACAAAAA
GAAATCCACCTTCAACTGGTATAACATGGAATTAA
```

Figura 15. Secuencia nucleotídica del gen *Ehhstf7*. Secuencia de 662 pb del gen completo *Ehhstf7*. Se observa la presencia de un intrón de 68 pb, en color rojo y minúsculas; los nucleótidos 5'-GU (gt) y AG-3' del intrón reconocidas por el espliceosoma se encuentran subrayadas y en negrillas.

Los resultados mostraron un amplicón de 682 pb a partir del gDNA de trofozoítos lo cual corrobora con el tamaño del gen con intrones más las bases agregadas a los oligonucleótidos para los sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *XhoI*; mientras que en la amplificación a partir del cDNA se obtuvo un amplicón de 614 pb que igualmente corrobora con el tamaño de 594 pb del gen *Ehhstf7* completo sin intrones más las bases agregadas a los oligonucleótidos para los sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *XhoI* (Figura 16). Como control de amplificación e integridad tanto del gDNA, como del cDNA se amplificó un fragmento del gen de *actina* de 210 pb

con ambos moldes; además, como control de integridad y contaminación con DNA en la síntesis del cDNA, se amplificó un fragmento del gen de *actina* usando como molde el RNA utilizado para la síntesis de cDNA y esta amplificación resultó negativa (Figura 16).

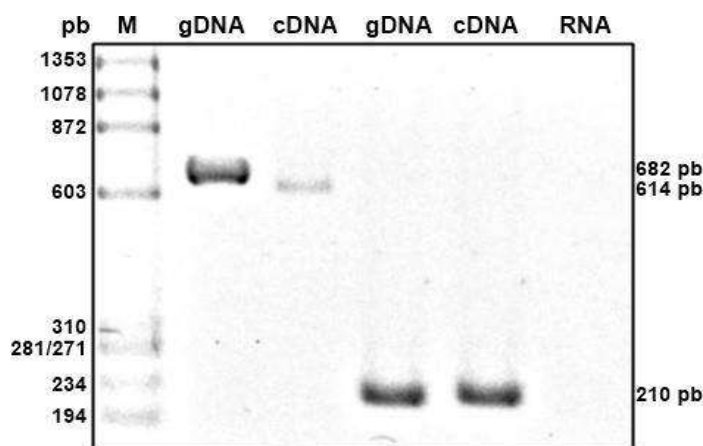


Figura 16. Amplificación del gen *Ehhstf7*. Amplificación por PCR de punto final del gen *Ehhstf7*. gDNA: reacción usando como molde DNA genómico de trofozoítos de *E. histolytica*; cDNA: reacción usando como molde DNA complementario de trofozoítos de *E. histolytica*; RNA: reacción con RNA de trofozoítos de *E. histolytica* como molde; M: marcador de tamaño molecular; pb: pares de bases.

8.2.2 Obtención del plásmido pET28a+*Ehhstf7*

El plásmido pET28a+*Ehhstf7* se obtuvo mediante clonación sintética por parte de la empresa GenScript, se corroboró la correcta clonación del gen completo *Ehhstf7* sin intrones, mediante la doble restricción del plásmido con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, con lo cual se observó la liberación de un fragmento de 602 pb que corresponde al gen *Ehhstf7* completo sin intrones y sin los sitios de restricción enzimática, además de la linearización del plásmido pET28a+*Ehhstf7* de 5971 pb, el cual se digirió solamente con la enzima *BamHI* (Figura 17A). Por otro lado, se realizó una reacción de PCR de punto final del gen completo *Ehhstf7* usando como molde 25 ng del plásmido pET28a+*Ehhstf7*, de la cual se obtuvo un amplicón de 614 pb (Figura 17B), cuyo tamaño se correlaciona con el tamaño del amplicón obtenido en la PCR de punto final usando como molde el cDNA de trofozoítos de *E. histolytica*, estos

resultados muestran que el gen *Ehhstf7* se encuentra clonado en la construcción pET28a+*Ehhstf7*.

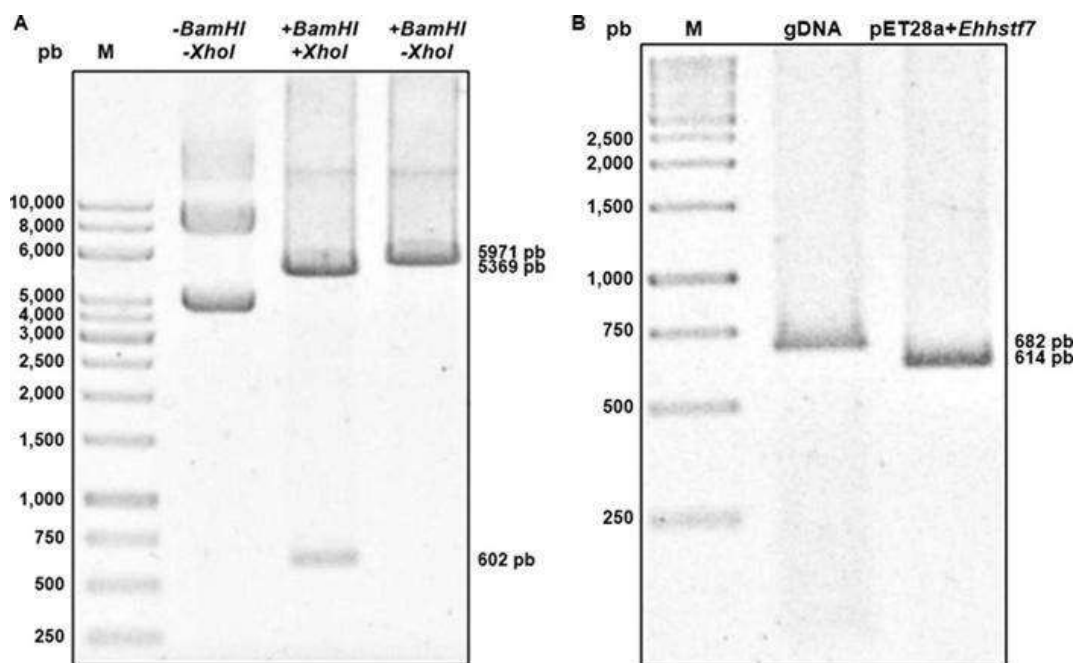


Figura 17. Análisis del plásmido pET28a+*Ehhstf7*. (A) Restricción enzimática del plásmido pET28a+*Ehhstf7*. *BamHI*- *XhoI*-, plásmido sin digerir en su conformación relajada, superenrollada y circular; *BamHI*+ *XhoI*+, doble restricción del plásmido, *BamHI*+ *XhoI*-, restricción enzimática solamente con *BamHI*. (B) Amplificación por PCR de punto final del gen *Ehhstf7*. gDNA, reacción usando como molde DNA genómico de trofozoítos de *E. histolytica*; reacción usando como molde el plásmido pET28a+*Ehhstf7*; M, marcador de tamaño molecular; pb, pares de bases.

8.2.3 Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante EhHSTF7

La sobreexpresión de la proteína recombinante (rEhHSTF7) se llevó a cabo en células competentes *E. coli* C41 transformadas con el plásmido pET28a+*Ehhstf7*, las cuales se indujeron con IPTG 1 mM por 3, 6, y 24 h, para determinar el tiempo necesario para inducir la mayor expresión de la proteína rEhHSTF7. El análisis de la expresión de rEhHSTF7 en extractos de *E. coli* C41, se realizó en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie, donde se observó que en ausencia del inductor IPTG existe una expresión basal de una proteína de 24 kDa, que

corresponde al peso molecular teórico para la proteína EhHSTF7; mientras que en los extractos de bacterias transformadas cultivadas por 3, 6, y 24 h con el inductor IPTG se observó un aumento en la expresión de la proteína de 24 kDa. Por otra parte, en los extractos de bacterias sin plásmido y sin el inductor IPTG no se observa la sobre-expresión de la banda de 24 kDa (Figura 18A). Asimismo, pudimos observar la sobre-expresión de una proteína de un peso molecular de 72 kDa, principalmente en extractos de bacterias con el inductor IPTG a las 6 y 24 h (Figura 18A), este peso molecular correlaciona con el peso molecular teórico del trímero del EhHSTF7. Ahora bien, la sobreexpresión de la proteína rEhHSTF7, se corroboró mediante ensayos de Western blot utilizando los anticuerpos específicos α EhHSTF7 (Figura 18B, 18C), así como como α 6xHis (Figura 18D, 18E), ya que la proteína rEhHSTF7 contiene una cola de seis residuos de histidina (6xHis) en el extremo N-terminal. Interesantemente, se detectó la sobreexpresión de las proteínas de 24, 72, y 80 kDa en extractos de bacterias transformadas cultivadas por 3, 6, y 24 h con el inductor IPTG. Mientras que en extractos de bacterias transformadas y sin el inductor IPTG, se observó la expresión basal de las proteínas de 24 y 72 kDa y en extractos de bacterias sin plásmido y sin el inductor IPTG, no se detectó ninguna proteína con alguno de los anticuerpos (Figura 18B, 18D). El peso molecular de 24 y 72 kDa detectados con los anticuerpos α EhHSTF7 y α 6xHis corresponde a los pesos moleculares teóricos de la proteína rEhHSTF7 como monómero y trímero. Además, de correlacionar con los pesos moleculares de las proteínas de 24 y 72 kDa que se observan sobre-expresadas en el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (Figura 18A), en la inducción con IPTG por 3, 6, y 24 h. La mayor expresión de la proteína rEhHSTF7 inducida con 1 mM de IPTG en células de *E. coli* C41 transformadas, se obtuvo en un tiempo de 6 h (Figura 18C, 18E).

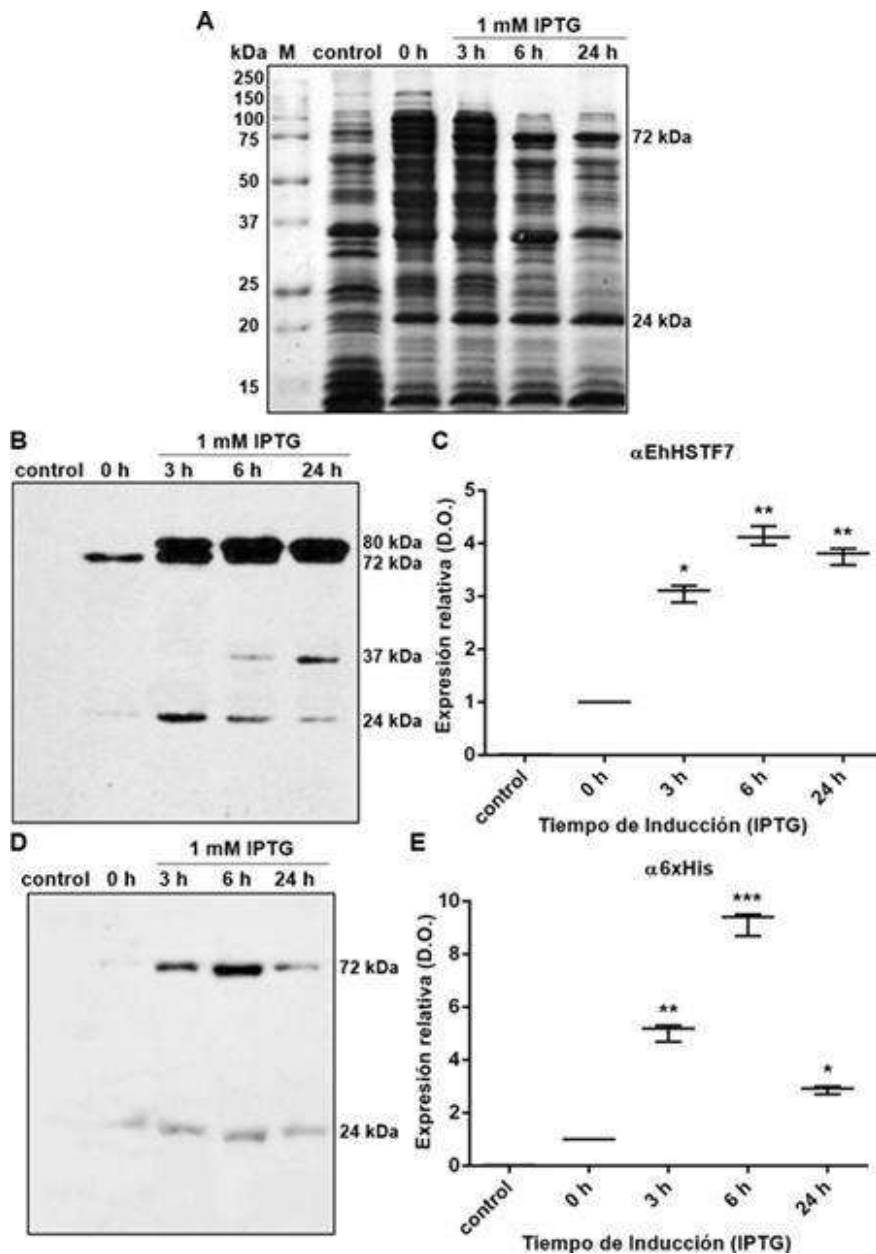


Figura 18. Sobreexpresión de la proteína rEhHSTF7. (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. (B) Western blot de extractos de *E. coli* C41 usando el anticuerpo α EhHSTF7 específico. (C) Densidad óptica de extractos de *E. coli* C41 usando el anticuerpo α EhHSTF7 específico (D) Western blot de extractos de *E. coli* C41, usando el anticuerpo α 6xHis. (E) Densidad óptica de extractos de *E. coli* C41 usando el anticuerpo α 6xHis. Control, extractos de bacterias *E. coli* C41 sin plásmido y sin IPTG. 0 h, extractos de bacterias con plásmido pET28a+Ehhstf7 sin inducir. 3, 6, y 24 h, extractos de bacterias *E. coli* C41 transformadas

con el plásmido pET28a+*Ehhstf7* y con 1mM de IPTG. M, marcador de peso molecular; kDa, kiloDaltones. *** $p < 0.001$.

Posteriormente, se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel. Se obtuvieron 15 fracciones y en las fracciones 3, 4, 5, y 6 (F3, F4, F5, y F6), se eluyeron tres proteínas de 24, 72, y 80 kDa (Figura 19A). El peso molecular de las proteínas eluidas es similar al observado anteriormente en la estandarización de la inducción de la rEhHSTF7. Se colectaron las fracciones que contenían la rEhHSTF7, y se dializaron contra una solución de Tris-HCl 20 mM pH 7.8. Las fracciones colectadas, se analizaron posteriormente para determinar el estado oligomérico de la proteína rEhHSTF7 mediante cromatografía de exclusión por tamaño, la cual dió lugar a múltiples picos (Figura 19B). El perfil de elución de la proteína rEhHSTF7 revela cinco picos principales con tiempos de retención de 3,5, 4,2, 5,0, 5,9 y 6,6 minutos.

El peso molecular aparente de cada pico, según el perfil de elución obtenido para proteínas de peso molecular conocido aplicadas a la misma columna en las mismas condiciones, indica un agregado (184.1 kDa), un pentámero de (118,8 kDa), un trímero de (71,2 kDa), un dímero de (46,7 kDa) y un monómero de rEhHSTF7 (24,2 kDa) (Figura 20B). Los resultados obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño, demuestran que la proteína rEhHSTF7 bajo las condiciones evaluadas tiene diferentes estados oligoméricos. La identidad de las proteínas eluidas en el *pool* de fracciones se determinó mediante ensayos de Western blot con los anticuerpos α EhHSTF7 y α 6xHis. Los anticuerpos α EhHSTF7 y α 6xHis detectaron a las proteínas de 24 y 72 kDa, mientras que el anticuerpo α EhHSTF7, detectó otra banda de 80 kDa (Figura 19C). Por último, las fracciones dializadas también se analizaron con el anticuerpo no relacionado α GAPDH, con el cual no se obtuvo señal de detección (Figura 19C)

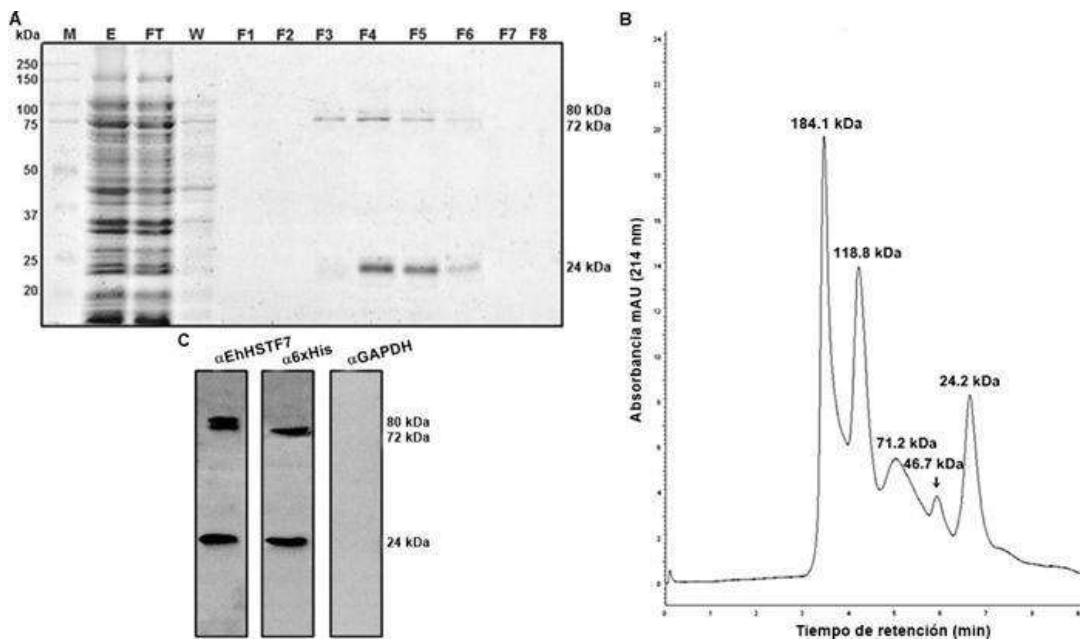


Figura 19. Purificación de la proteína recombinante EhHSTF7 por cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía por exclusión de tamaño. (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad a níquel. E, extractos totales de *E. coli* C41 transformadas y con el inductor IPTG. FT, extractos totales de *E. coli* C41, que no se unieron a la columna de níquel. W, proteínas eluidas en los lavados. F1-F8, fracciones eluidas con 500 mM de Imidazol. (B) Perfil de elución de la proteína rEhHSTF7 por cromatografía de exclusión por tamaño. El peso molecular de los estados oligoméricos de rEhHSTF7 se indica sobre cada pico del perfil de elución. (C) Western blot del *pool* de fracciones que contienen la proteína rEhHSTF7, usando los anticuerpos α EhHSTF7, α 6xHis, y α GAPDH. M, marcador de peso molecular; kDa, kiloDaltones.

8.2.4 La proteína rEhHSTF7 cambia su estado de oligomerización en respuesta al aumento de temperatura y concentración

La oligomerización es un proceso clave en la activación de las proteínas HSF, además las conformaciones de alto peso molecular presentan mayor afinidad a interactuar con el DNA (Ota et al., 2013; Gómez-Pastor et al., 2018). Los resultados obtenidos hasta el momento en este trabajo, sugieren que la proteína rEhHSTF7 puede adoptar conformaciones, con un peso molecular correspondiente a diferentes estados oligoméricos. El modelo tridimensional de EhHSTF7 muestra

que dentro de la región de oligomerización putativa hay tres residuos de tirosina en las posiciones 122, 172, y 181, además de residuos de triptófano en las posiciones 36 y 196, que contribuyen a la fluorescencia de esta proteína (Figura 20). Por lo que, tomando en consideración estas características, la interacción intramolecular fue cuantificada analizando la espectrofluorometría de los residuos aromáticos (tirosina y triptófano), además la concentración de proteína y el estrés térmico se analizaron como inductores para mover el equilibrio entre los monómeros y los oligómeros de la proteína rEhHSTF7.

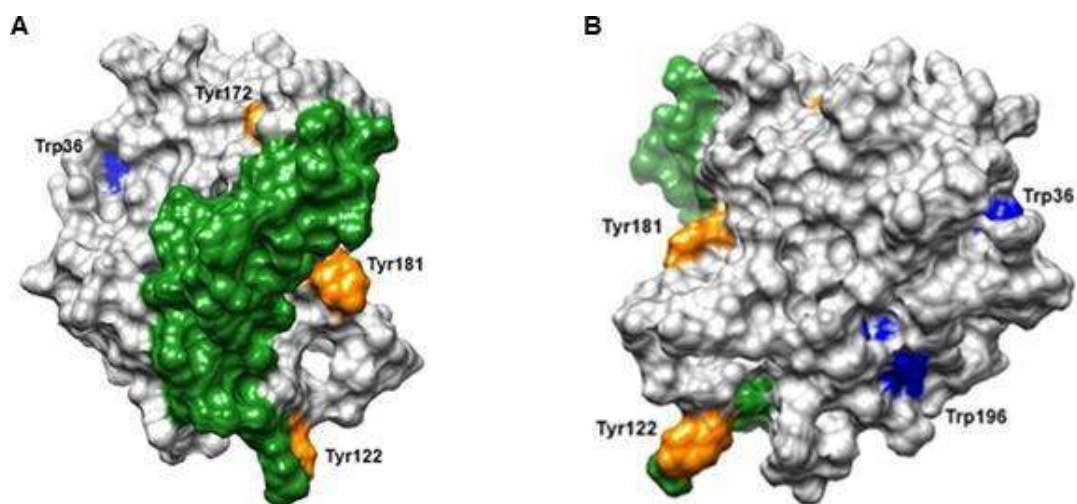


Figura 20. Posición de residuos de tirosina y triptófano en la proteína EhHSTF7. El dominio de oligomerización, se encuentra marcado en verde. Los residuos de tirosina 122,172, y 181, se encuentran marcados en naranja con su etiqueta. Los residuos de triptófano 36 y 196, se encuentran marcados en azul con su etiqueta.

Los resultados mostraron que a concentraciones bajas de rEhHSTF7 ($0.4 \mu\text{M}$) y 37°C por 30 min, condiciones experimentales que favorecen la formación de monómeros, el centro de masa espectral (CME) es de 345.5 nm. Sin embargo, cuando se colocó $0.4 \mu\text{M}$ de la proteína rEhHSTF7 a 42°C por 30 min, el CME disminuyó a 344 nm (Figura 21A). Curiosamente, cuando se incubó $4.0 \mu\text{M}$ de rEhHSTF7 a 37°C y 42°C , los valores del CME disminuyen a 345 y 343.8 nm, respectivamente (Figura 21A); lo que indica el ocultamiento de los residuos aromáticos (menor fluorescencia), por lo que esta conformación se debe más

plausiblemente a la oligomerización inducida por la concentración de proteínas y el estrés térmico. Para evaluar el efecto de la concentración de proteína en la formación de oligómeros de rEhHSTF7, se realizó una cinética de concentración con 0.4, 2.0, 4.0, 8.0, y 12 μM de rEhHSTF7 a 42 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 21B).

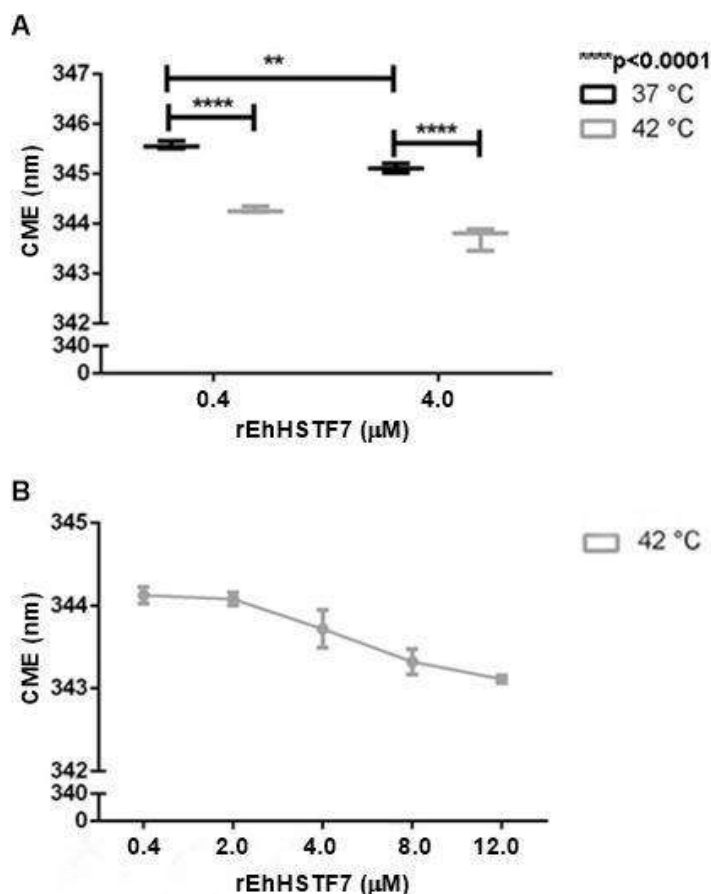


Figura 21. Disminución de la fluorescencia intrínseca de rEhHSTF7 en respuesta al aumento de temperatura y concentración. La espectrofluorimetría de los residuos aromáticos evidenció cambios en el estado oligomerizado de la proteína rEhHSTF7. (A) valores del CME de 0.4 y 4.0 μM de rEhHSTF7 a 37 y 42 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. (B) valores de CME de 0.4, 2.0, 4.0, 8.0, y 12.0 μM de rEhHSTF7 a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min. CME, centro de masa espectral. *** $p < 0.0001$.

El CME disminuyó de forma inversamente proporcional a la concentración de proteínas. A bajas concentraciones de proteína, 0.4 y 2.0 μM , el valor de CME no mostró algún cambio a los 30 min de incubación; cuando la concentración de

proteína aumentó a 4.0, 8.0, y 12.0 μM , se observó una disminución en el valor de CME a los 30 min de incubación (Figura 21B). Asimismo, se observó que la reducción en los valores de CME es mayor cuando se aumentó la concentración de rEhHSTF7. Estos resultados indican que los residuos tirosina podrían estarse ocultando en respuesta a un cambio conformacional de la proteína rEhHSTF7, el cual probablemente está directamente relacionado con la oligomerización de este factor, y a su vez con el aumento de la temperatura y concentración de proteína. Estos datos revelan la importancia de la concentración de proteína en la oligomerización de la proteína rEhHSTF7.

8.3 Interacción *in vitro* del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del promotor del gen *mdr EhPgp5*

8.3.1 El factor EhHSTF7 interacciona de manera específica con el HSE *in vitro*

La interacción rEhHSTF7-HSEwt se evaluó por ensayos de retardamiento. Se observó que el factor rEhHSTF7 reconoce e interacciona con el elemento HSEwt y que la unión es dependiente de la concentración de proteína (Figura 22). La interacción se realizó con diferentes concentraciones de rEhHSTF7, desde 0.1 hasta 8.5 μM y se detectó un complejo (complejo a) rEhHSTF7-HSEwt (Figura 22A) en concentraciones iniciales, esto es de 0.1 hasta 1.0 μM de rEhHSTF7. Sin embargo, a mayor concentración de rEhHSTF7, de 2.0 a 8.5 μM , se observó la formación de otros complejos de mayor retardamiento, aunque con menor intensidad (Figura 22A, complejos b, c, y d).

La formación de complejos de mayor retardamiento entre rEhHSTF7 y el elemento HSEwt, sugiere que en concentraciones altas de proteína rEhHSTF7, ésta se podría oligomerizar y unirse al HSEwt con esta conformación oligomerizada. En cuanto a la afinidad de unión, la fracción de HSEwt unido en cada reacción se graficó frente al incremento en la concentración de rEhHSTF7 (μM); los datos se ajustaron con una ecuación de unión para obtener valores para la K_D y la fracción máxima unida (B_{max}), que fue de 0.735 ± 0.17 y 0.618 ± 0.045 , respectivamente (Figura 22B). La

K_D de unión nos indica que la proteína rEhHSTF7 tiene una alta afinidad por el ligando que en este caso fue la secuencia HSE del promotor del gen *EhPgp5*.

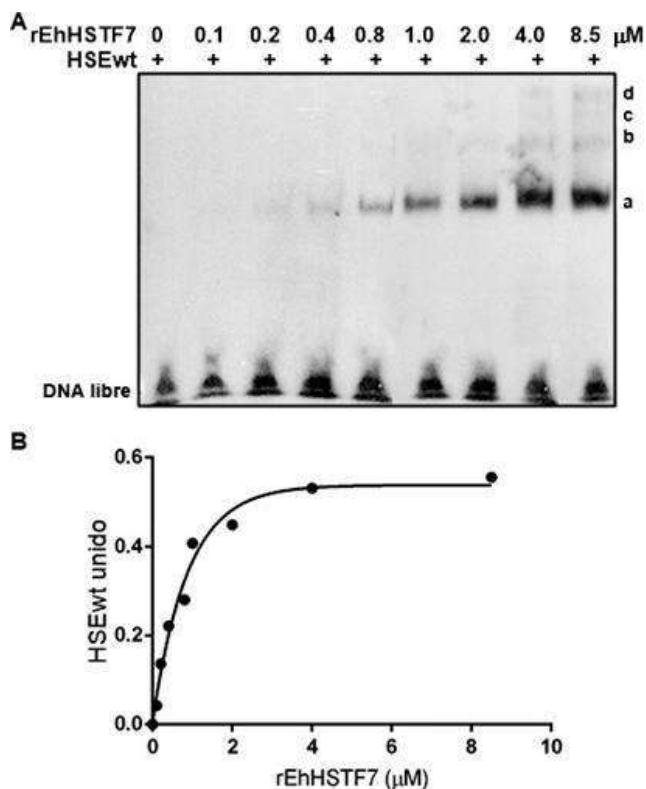


Figura 22. Interacción rEhHSTF7-HSEwt *in vitro*. (A) Ensayo de interacción rEhHSTF7-HSEwt. La reacción sin rEhHSTF7 se observa en el primer carril, concentraciones de 0.1 a 8.5 μM de rEhHSTF7 se utilizaron para evaluar la afinidad de interacción. HSEwt, 3 μM del elemento HSE del gen *EhPgp5* marcado con biotina. a, b, c, y d; complejos rEhHSTF7-HSEwt detectados. El DNA libre se encuentra señalado. (B) Representación gráfica de la fracción HSEwt unida en función del aumento de la concentración de la proteína rEhHSTF7 (μM).

La especificidad del complejo rEhHSTF7-HSEwt se evaluó usando diferentes competidores mediante la técnica de EMSA. Cuando en la reacción de interacción proteína-DNA se usó el competidor específico (sonda HSEwt no marcada) en una concentración 200 veces mayor, se observó que compite completamente con el HSEwt marcado con biotina por la interacción con la proteína rEhHSTF7 (Figura 23A, carril 3). Mientras que el competidor inespecífico poly (dl-dC) en una

concentración 350 veces mayor, no es capaz de competir por la interacción con la proteína rEhHSTF7 (Figura 23A, carril 4). Estos resultados muestran que la interacción entre la proteína rEhHSTF7 y el HSEwt es específica. Ahora bien, para demostrar que el complejo proteína-DNA detectado es debido al reconocimiento e interacción exclusiva entre el rEhHSTF7 y el HSEwt y no a proteínas de las bacterias *E. coli* C41, se realizó un ensayo EMSA utilizando extractos de *E. coli* C41 sin plásmido y sin inducir (Figura 23B, carril 4). Como se puede observar, al incubar los extractos de las bacterias con el HSEwt no se logró observar la formación de algún complejo.

Por último, para evaluar que la proteína que está interaccionando en el complejo detectado con la técnica de EMSA corresponde al factor rEhHSTF7, se realizaron ensayos de superretardamiento. Interesantemente, se observó que el anticuerpo específico α EhHSTF7 es capaz de retardar el complejo rEhHSTF7-HSEwt (Figura 23C, carril 3), al igual que el anticuerpo específico α 6xHis (Figura 23C, carril 4); mientras que un anticuerpo no relacionado como el α GAPDH no superretardó al complejo rEhHSTF7-HSEwt (Figura 23C, carril 5). Estos resultados nos muestran que el rEhHSTF7 está interaccionando con el HSEwt y de forma específica.

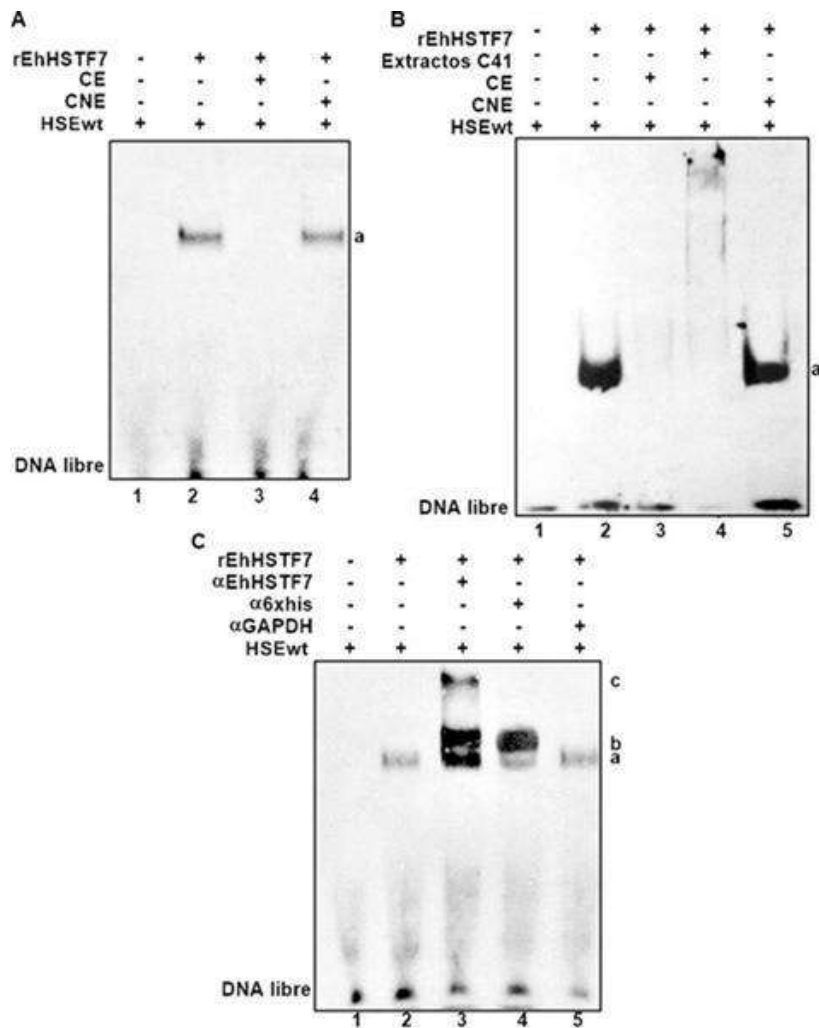


Figura 23. Especificidad de la interacción rEhHSTF7-HSEwt. (A) Ensayo de retardamiento del complejo rEhHSTF7-HSEwt; carril 1, DNA libre; carril 2, complejo proteína rEhHSTF7 y HSEwt; carril 3, CE competidor específico (HSEwt no marcado, 200 veces más); carril 4, CNE competidor no específico (Poly dl-dC, 350 veces más). (B) Ensayo de retardamiento del complejo rEhHSTF7-HSEwt; carril 1, DNA libre; carril 2, complejo rEhHSTF7-HSEwt (complejo a); carril 3, CE competidor específico (HSEwt no marcado, 200 veces más), carril 4, retardamiento con extractos de *E. coli* C41; carril 5, CNE competidor no específico (Poly dl-dC, 350 veces más). (C) Superretardamiento del complejo rEhHSTF7-HSEwt; carril 1, DNA libre; carril 2, complejo rEhHSTF7-HSEwt (complejo a); carril 3, superretardamiento con el anticuerpo específico α EhHSTF7 (complejo b y c); carril 4, superretardamiento con el anticuerpo específico α 6xHis (complejo b); carril 5, superretardamiento con el anticuerpo no relacionado α GAPDH. El DNA libre se encuentra señalado.

8.3.2 Importancia de las bases 5'-GAA-3' en la interacción rEhHSTF7-HSEwt

Una vez que se analizó la afinidad de unión del factor rEhHSTF7 con el HSE del promotor del gen *EhPgp5*, se caracterizaron los nucleótidos del HSE que tienen mayor relevancia en la interacción rEhHSTF7-HSEwt. Esto se realizó mediante ensayos de retardamiento usando mutantes del HSE no marcados con biotina como competidores (Figura 24A). Los resultados muestran la formación de un complejo específico rEhHSTF7-HSEwt (Figura 24A, carril 2), el cual no se llevó a cabo cuando el competidor específico es añadido a la reacción (Figura 24A, carril 3). De manera interesante al añadir a la reacción el competidor HSEmgaa, que no contiene las bases 5'-GAA-3' del primer motivo del elemento HSE; se observó que el complejo rEhHSTF7-HSEwt no se formó de igual manera (Figura 24A, carril 4), lo que muestra que el factor rEhHSTF7 es capaz de reconocer al elemento HSE sin las bases 5'-GAA-3' sentido.

Un resultado opuesto es observado cuando el mutante HSEmttc, que tiene mutadas las bases 5'-TTC-3' fue añadido a la reacción, este competidor no fue capaz de impedir la formación del complejo rEhHSTF7-HSEwt (Figura 24A, carril 5), tal como podemos observar en la gráfica de densidad óptica relativa de los complejos obtenidos, dónde la señal del complejo rEhHSTF7-HSEwt incrementa en presencia de la mutante HSEmttc (Figura 24B). Estos resultados mostraron que las bases 5'-TTC-3' de la cadena molde son relevantes en la interacción rEhHSTF7-HSEwt, corroborando los resultados del acoplamiento molecular *in silico* entre el elemento HSE y EhHSTF7. Por lo anterior, se analizó el papel de cada una de estas tres bases bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

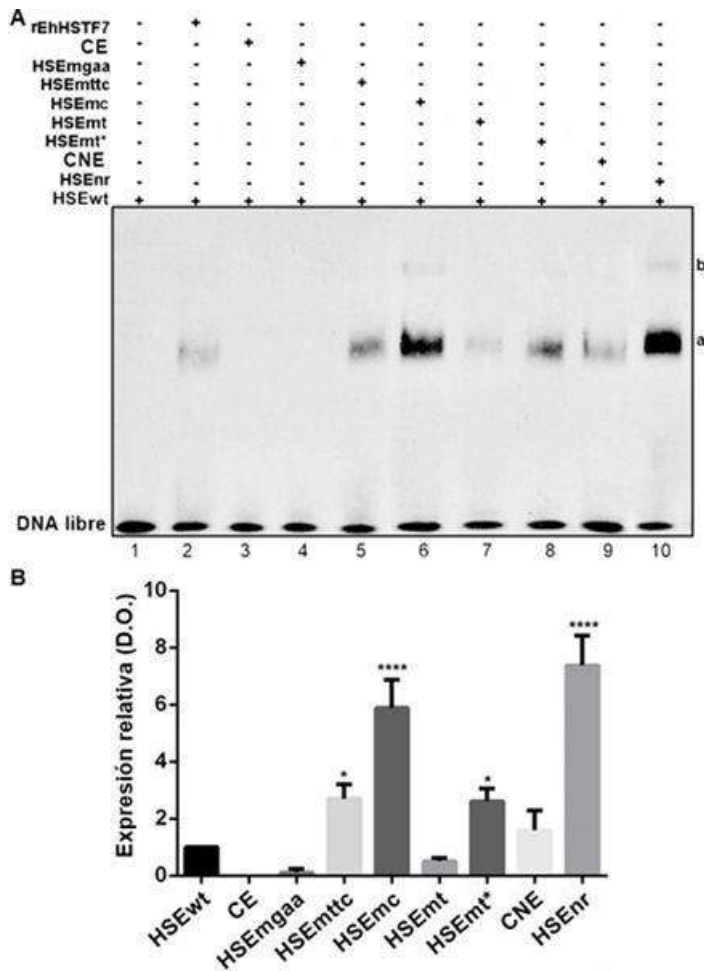


Figura 24. Importancia de las bases 5'-GAA-3' en el complejo rEhHSTF7-HSEwt. (A) Ensayos de retardamiento de rEhHSTF7 con mutantes no marcados con biotina del elemento HSE. Carril 2, interacción rEhHSTF7-HSEwt; carril 3, en presencia del competidor específico (HSEwt no marcado); o en presencia de mutantes del HSE: carril 4, HSEmgaa; carril 5, HSEmttc; carril 6, HSEmc; carril 7, HSEmt; carril 8, HSEmt*; carril 9, CNE competidor no específico (Poly dl-dC); carril 10, HSEnr. (B) Análisis semi-cuantitativo del complejo rEhHSTF7-HSEwt en presencia de mutantes del HSE, expresado como la densidad óptica relativa del complejo a. **** $p < 0.0001$.

El competidor HSEmc, que tiene solamente mutado el nucleótido C del motivo 5'-TTC-3' no fue capaz de impedir la formación del complejo rEhHSTF7-HSEwt (Figura 24A, carril 6). Cuando el competidor HSEmt, que tiene mutado el primer nucleótido T fue añadido en la reacción, la señal del complejo rEhHSTF7-HSEwt disminuyó 0.3

veces (Figura 24A, carril 7). Sin embargo, cuando el competidor HSEmt* fue usado en una concentración 200 veces mayor al HSEwt marcado con biotina, se observó que este competidor tampoco fue capaz de impedir la formación del complejo rEhHSTF7-HSEwt (Figura 24A, carril 8). Con estos resultados podemos determinar que las bases 5'-TTC-3', tienen diferente relevancia para la interacción rEhHSTF7-HSEwt. El competidor no relacionado y el competidor no específico, no fueron capaces de impedir la formación del complejo rEhHSTF7-HSEwt e incluso favorecieron la formación de complejos de mayor retardamiento (Figura 24A, carril 9 y 10).

8.4 Participación del factor EhHSTF7 en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina

8.4.1 Expresión del factor EhHSTF7 en trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con emetina

Con la finalidad de conocer el patrón de expresión del factor EhHSTF7 en trofozoítos cultivados con 8 μ M de emetina durante 8, 16, 24, y 48 h; primeramente, se evaluó la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica* bajo estas condiciones de cultivo. Los resultados mostraron la disminución de la viabilidad, la cual fue mayor conforme avanzó el tiempo de cultivo con emetina (Figura 25A). Así, los trofozoítos cultivados por 8, 16, 24, y 48 h con emetina mostraron un 90%, 76%, 64%, y 55% de viabilidad, respectivamente (Figura 25A). El porcentaje de viabilidad se calculó tomando como el 100% trofozoítos control que no fueron cultivados con emetina. Estos resultados mostraron que los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con emetina presentan hasta 50% de viabilidad a las 48 h de cultivo.

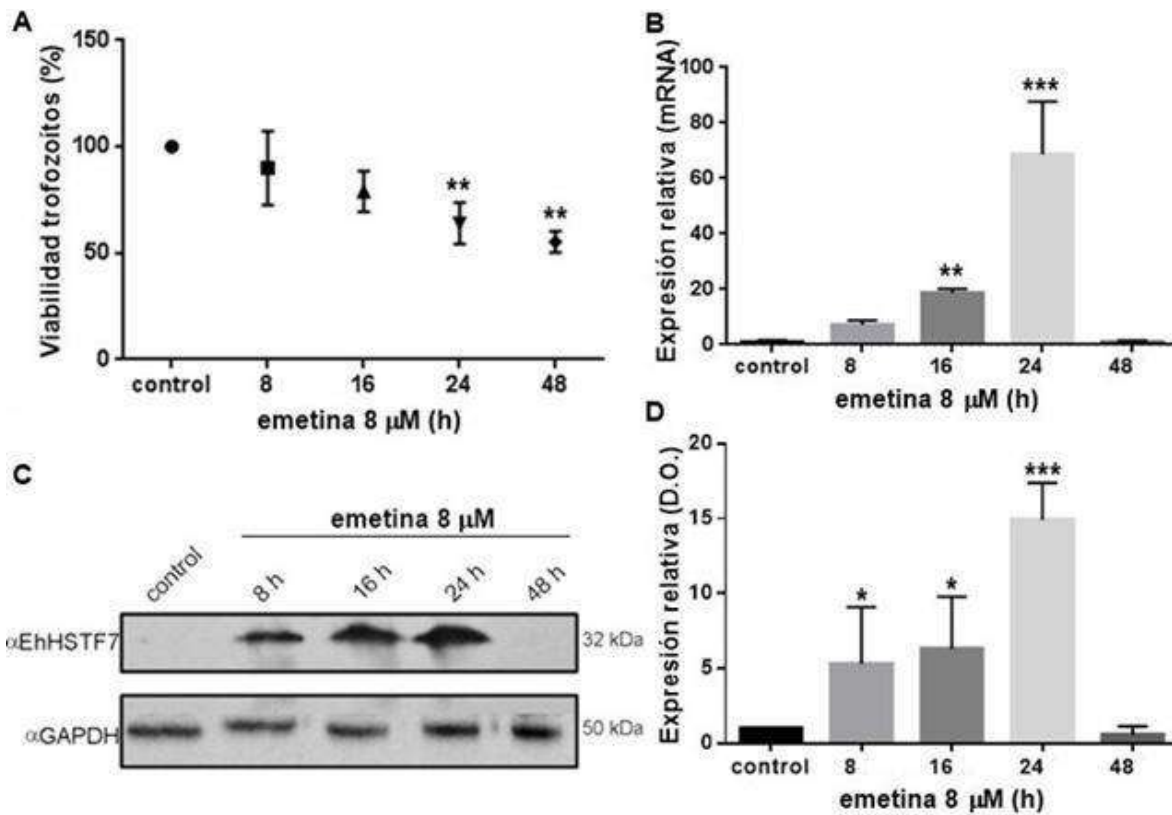


Figura 25. El factor EhHSTF7 se sobreexpresa en trofozoítos en respuesta a la emetina. (A) Viabilidad de trofozoítos cultivados con emetina durante 8, 16, 24, y 48 h. (B) Expresión relativa del mRNA de trofozoítos cultivados con 8 μ M de emetina durante 8, 16, 24, y 48 h. (C) Western blot usando el anticuerpo específico α EhHSTF7 en extractos totales de trofozoítos cultivados con emetina durante 8, 16, 24, y 48 h. (D) Análisis semi-cuantitativo de la expresión de la proteína EhHSTF7 en extractos totales de trofozoítos cultivados con emetina durante 8, 16, 24, y 48 h. *** $p < 0.001$.

La expresión del mRNA en trofozoítos cultivados con emetina mostró que el fármaco antiamebiano, induce la expresión del transcrito del gen *Ehhstf7* de forma tiempo dependiente, ya que a las 8, 16, y 24 h, mostró un incremento de siete, 18, y 68 veces más que en trofozoítos sin emetina. Sin embargo, en trofozoítos cultivados con emetina por 48 h se observó una importante disminución en la expresión del mRNA de este gen, la cual fue similar a la obtenida en trofozoítos sin emetina (Figura 25B).

La expresión de EhHSTF7 también se evaluó a nivel de proteína mediante ensayos de Western blot. Los resultados demostraron que hay una correlación en la expresión del factor EhHSTF7 a nivel de mRNA y proteína en trofozoítos cultivados con emetina, ya que en extractos totales de trofozoítos cultivados con emetina por 8 h se obtuvo una expresión de la proteína EhHSTF7 cinco veces mayor en relación a la expresión obtenida en trofozoítos control sin emetina; mientras que a las 16 h de cultivo se observó una expresión seis veces mayor comparada con los trofozoítos control. Interesantemente, la mayor expresión de la proteína EhHSTF7 se detectó al igual que con el mRNA a las 24 h de cultivo con emetina, presentando una expresión 15 veces mayor que en los trofozoítos control. No obstante, a las 48 h mostró una expresión similar a la obtenida en trofozoítos sin emetina (Figura 25C, 25D). Con estos resultados pudimos determinar que el factor EhHSTF7 en trofozoítos cultivados con emetina, presenta los mayores niveles de expresión de mRNA y proteína, a las 24 h de cultivo, por lo que este tiempo se estandarizó para realizar los ensayos de silenciamiento.

8.4.2 Efecto del silenciamiento del factor EhHSTF7 en la expresión del *EhPgp5*

La estandarización del silenciamiento del gen *Ehhstf7* con los siRNAs siRNA566, DsiRNA67 y DsiRNA467, se realizó en trofozoítos cultivados con emetina por 24 h. La expresión del mRNA en trofozoítos cultivados con emetina mostró que el cultivo con el siRNA566, con el DsiRNA67 y con el DsiRNA467 por 24 h, disminuye 35, 42, y 46 veces, respectivamente, la expresión del gen *Ehhstf7* comparada con la expresión en trofozoítos solamente con emetina (Figura 26). En el control de silenciamiento, el siRNAnr mostró una expresión del mRNA del factor *Ehhstf7* similar a la de trofozoítos solamente con emetina, demostrando que la disminución en la expresión del mRNA de *Ehhstf7* se debe al efecto de los siRNAs y no a la técnica en general. Así, se determinó que el DsiRNA467 es el que presentó un mayor silenciamiento del gen *Ehhstf7* bajo estas condiciones.

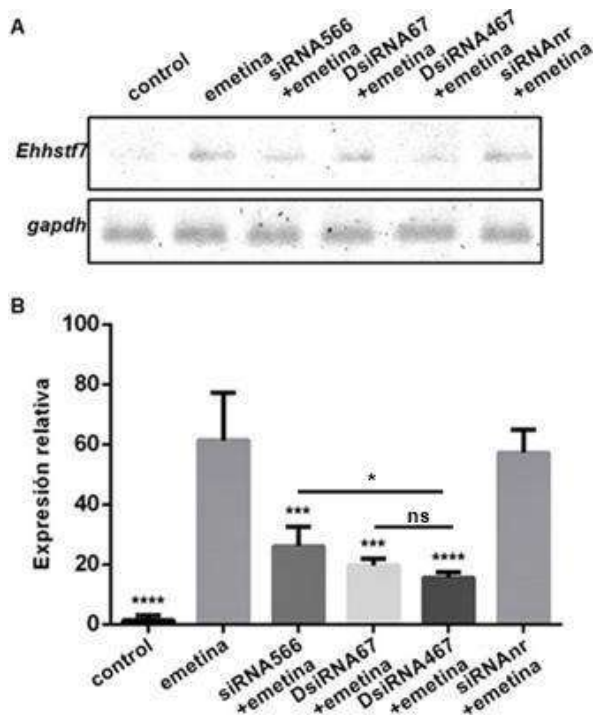


Figura 26. Efecto del silenciamiento con siRNAs en la expresión del mRNA del factor EhHSTF7. (A) Corrimiento electroforético de la qRT-PCR del mRNA del factor *Ehhstf7* en trofozoítos cultivados durante 24 h con emetina, con emetina y siRNA566, con emetina y DsiRNA67, con emetina y DsiRNA467, y con emetina y siRNAnr. (B) Análisis cuantitativo de la expresión del mRNA del factor *Ehhstf7* en trofozoítos cultivados durante con emetina y siRNAs. **** $p < 0.0001$.

Ahora bien, para evaluar la posible participación del factor EhHSTF7 en la regulación transcripcional del gen *EhPgp5*, se determinó la expresión de este gen en trofozoítos cultivados durante 24 h con emetina y con el DsiRNA467. Para lo cual primero se evaluó la viabilidad de los trofozoítos cultivados bajo las condiciones antes mencionadas. Los resultados mostraron una disminución de la viabilidad celular del 16 % en los trofozoítos incubados con el DsiRNA467 y emetina, comparada con la viabilidad de los trofozoítos cultivados únicamente con emetina (Figura 27A). Mientras que, la viabilidad de los trofozoítos cultivados durante 24 h con emetina y el siRNAnr, no mostró diferencia significativa con la viabilidad de los trofozoítos cultivados solo con emetina. Lo que muestra que la disminución de la

viabilidad observada en trofozoítos cultivados con el DsiRNA467, se debe al silenciamiento del gen *Ehhstf7*.

Al evaluar la expresión del mRNA del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados durante 24 h con emetina y con el DsiRNA467 se encontró que la expresión del mRNA disminuyó 36 veces comparado con la expresión en trofozoítos cultivados solamente con emetina por 24 h. Por el contrario, la expresión del mRNA en trofozoítos cultivados durante 24 h con emetina y con el siRNA_{nr} no mostró diferencia significativa en la expresión del gen *EhPgp5* comparado con la de trofozoítos cultivados solamente con emetina por 24 h (Figura 27B, 27C). La disminución en la expresión del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina y el DsiRNA467, se corroboró por medio de Western blot. Se observó que la expresión de la proteína EhPGP5 en trofozoítos con el factor EhHSTF7 silenciado, muestra una disminución de 3 veces comparada con la expresión en trofozoítos cultivados con emetina y sin silenciar, mientras que la expresión de la proteína EhPGP5 en trofozoítos cultivados con emetina y el siRNA_{nr} fue similar a la obtenida en los en trofozoítos cultivados con emetina y sin silenciar el factor EhHSTF7 (Figura 27D, 27E). Estos resultados demuestran que el factor EhHSTF7 está involucrado en la regulación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina, ya que su silenciamiento inhibe la expresión del gen *EhPgp5*.

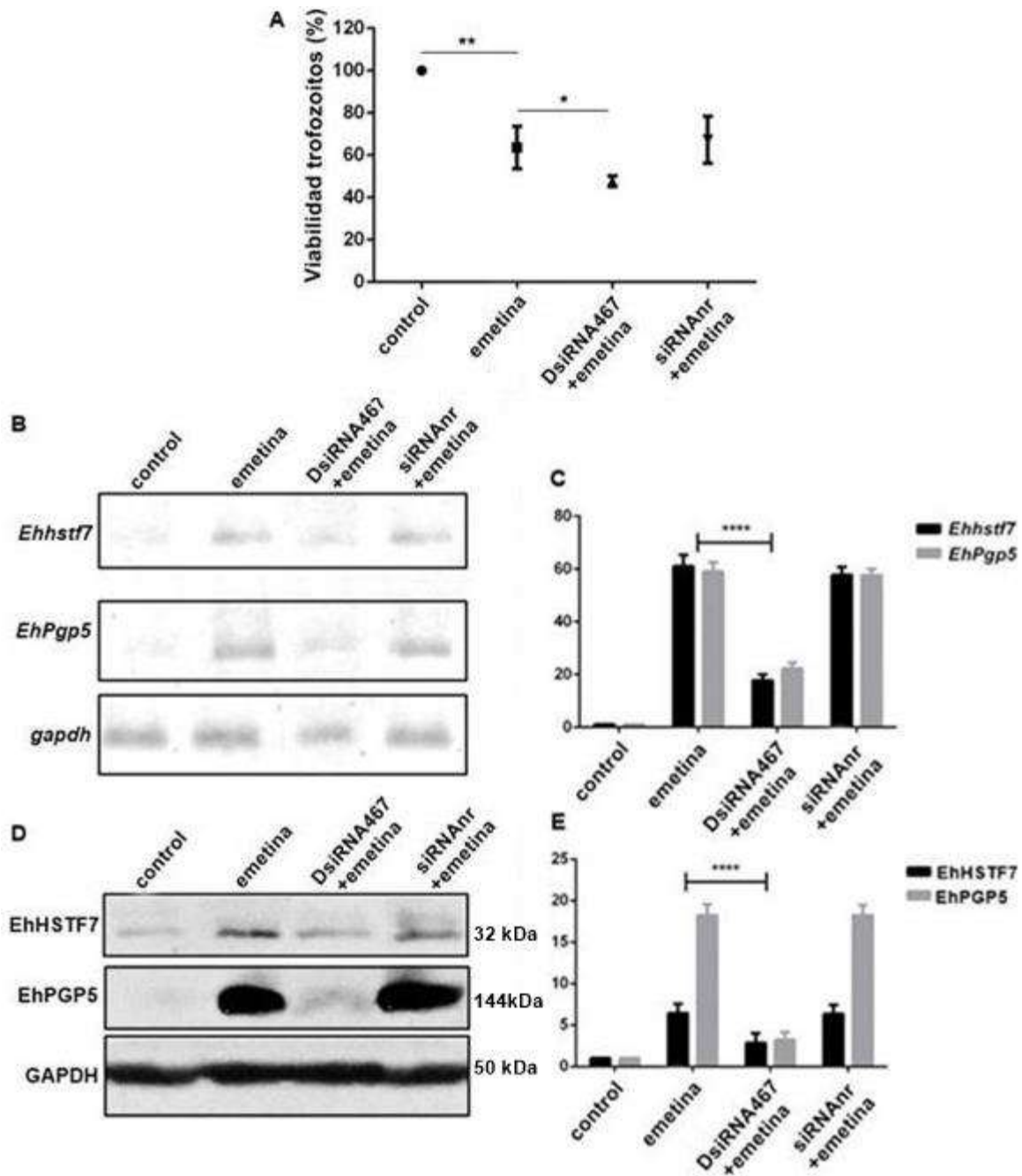


Figura 27. Expresión de *EhPgp5* en trofozoitos con el factor EhHSTF7 silenciado. (A) Viabilidad de trofozoitos cultivados con emetina, con emetina y DsiRNA467, y con emetina y siRNAnr durante 24 h. (B) Corrimiento electroforético de la qRT-PCR del mRNA de los genes *Ehhstf7* y *EhPgp5* en trofozoitos cultivados con emetina, con emetina y DsiRNA467, y con emetina y siRNAnr durante 24 h. (C) Análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de los genes *Ehhstf7* y *EhPgp5* en trofozoitos cultivados con emetina, con emetina y

DsiRNA467, y con emetina y siRNA_{nr} durante 24 h. (D) Western blot usando los anticuerpos específicos α EhHSTF7, α EhPGP5 y α GAPDH en extractos totales de trofozoítos cultivados con emetina durante 24 h. (E) Análisis semi-cuantitativo de la expresión de la proteína EhHSTF7 y EhPGP5 en extractos totales de trofozoítos cultivados con emetina durante 24 h. **** $p < 0.0001$.

8.5 Análisis del interactoma *in silico* de EhHSTF7 y confirmar su asociación con alguna de las proteínas identificadas

8.5.1 Interactoma de la proteína EhHSTF7

El interactoma *in silico* de la proteína EhHSTF7, se obtuvo en el programa STRING 11.0 (Figura 28). Las posibles interacciones con proteínas de *E. histolytica* con un *Score* mayor a 0.700, fueron proteínas reguladoras de la transcripción (Sir2), HSPs, cinasas y proteínas similares a ubiquitina (Tabla 12). La posible interacción de EhHSTF7 y las HSPs, es de particular interés para nuestro grupo de trabajo, ya que están involucradas en la regulación del estado activo de los HSFs en la respuesta al estrés (Morimoto, 1998).

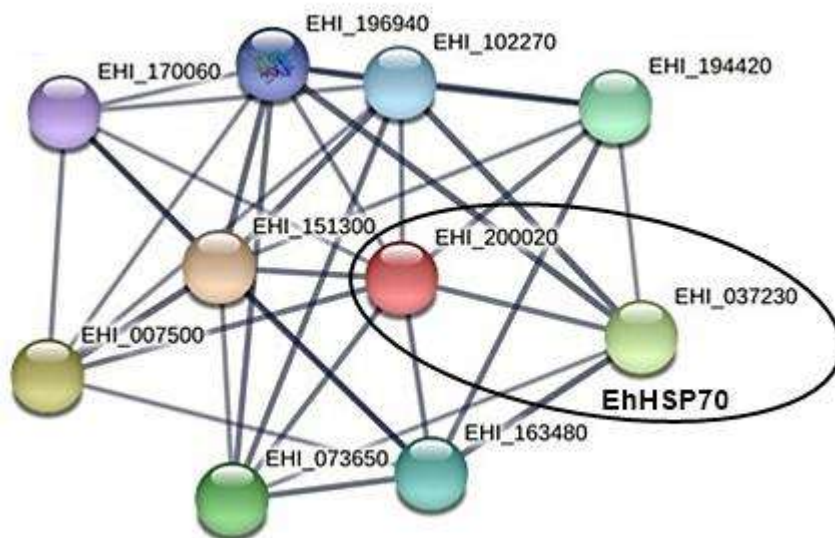


Figura 28. Posibles interacciones proteicas de EhHSTF7. La proteína EhHSTF7 se representa con un círculo rojo. Las proteínas son representadas con círculos de colores, los círculos con una imagen dentro, representan proteínas con estructura cristalizada

reportada. El grueso de las líneas indica el nivel de confianza de la interacción (*Score*). Se indica el número de acceso (ID) en AmoebDB de las proteínas.

Tabla 12. Posibles interacciones proteína-proteína de EhHSTF7

AmoebaDB ID	Proteína	Score
EHI_151300	regulador transcripcional Sir2	0.876
EHI_007500	regulador transcripcional Sir2	0.873
EHI_037230	proteína chaperona; proteína de choque térmico 70 (HSP70)	0.851
EHI_073650	Ser/Thr cinasa; subfamilia MAP cinasa	0.850
EHI_194420	proteína con dominio de cinasa	0.850
EHI_163480	proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90), putative	0.816
EHI_102270	proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90), putative	0.765
EHI_196940	proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90), putative	0.765
EHI_170060	proteína similar a ubiquitina	0.704

8.5.2 Interacción *in vivo* de las proteínas EhHSTF7-EhHSP70

Se ha demostrado que la unión al DNA y la capacidad transcripcional de los HSFs son inhibidas a nivel intermolecular por chaperonas como la HSP90 y HSP70, entre otras (Naidu & Dinkova-Kostova, 2017). Por tal motivo, se evaluó si existe interacción *in vivo* EhHSTF7-EhHSP70 por Inmunofluorescencia indirecta. Los resultados mostraron, que ambas proteínas se expresan tanto en el núcleo, como en el citoplasma de manera basal en trofozoítos sin emetina (Figura 29A), de

manera interesante en el núcleo se observa la co-localización EhHSTF7-EhHSP70, mientras que en el citoplasma esta co-localización no se observa, la cual se puede deber a la baja expresión del factor EhHSTF7 en condiciones sin estrés.

En trofozoítos cultivados con emetina se observa un aumento de la señal de ambas proteínas, la proteína EhHSTF7 en núcleo y citoplasma, mientras que la proteína EhHSP70 se observa principalmente en el citoplasma (Figura 29B); por lo que no se observa la co-localización de ambas proteínas, esto puede deberse a la actividad de ambas proteínas en condiciones de estrés, el factor EhHSTF7 lleva a cabo su actividad transcripcional en el núcleo y la proteína EhHSP70 como chaperona en el citoplasma. Para corroborar los resultados obtenidos, se utilizaron trofozoítos cultivados con emetina y con el DsiRNA467, se observó una expresión similar a la observada con emetina solamente, sin embargo, ambas proteínas se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma, y se observa co-localización en el núcleo (Figura 29C); el silenciamiento del factor EhHSTF7 con el DsiRNA467 podría inducir la inhibición de este factor. En trofozoítos cultivados con emetina y con el siRNA_{nr}, las proteínas EhHSTF7 y EhHSP70 muestran una expresión y localización similar a la de trofozoítos cultivados con emetina solamente.

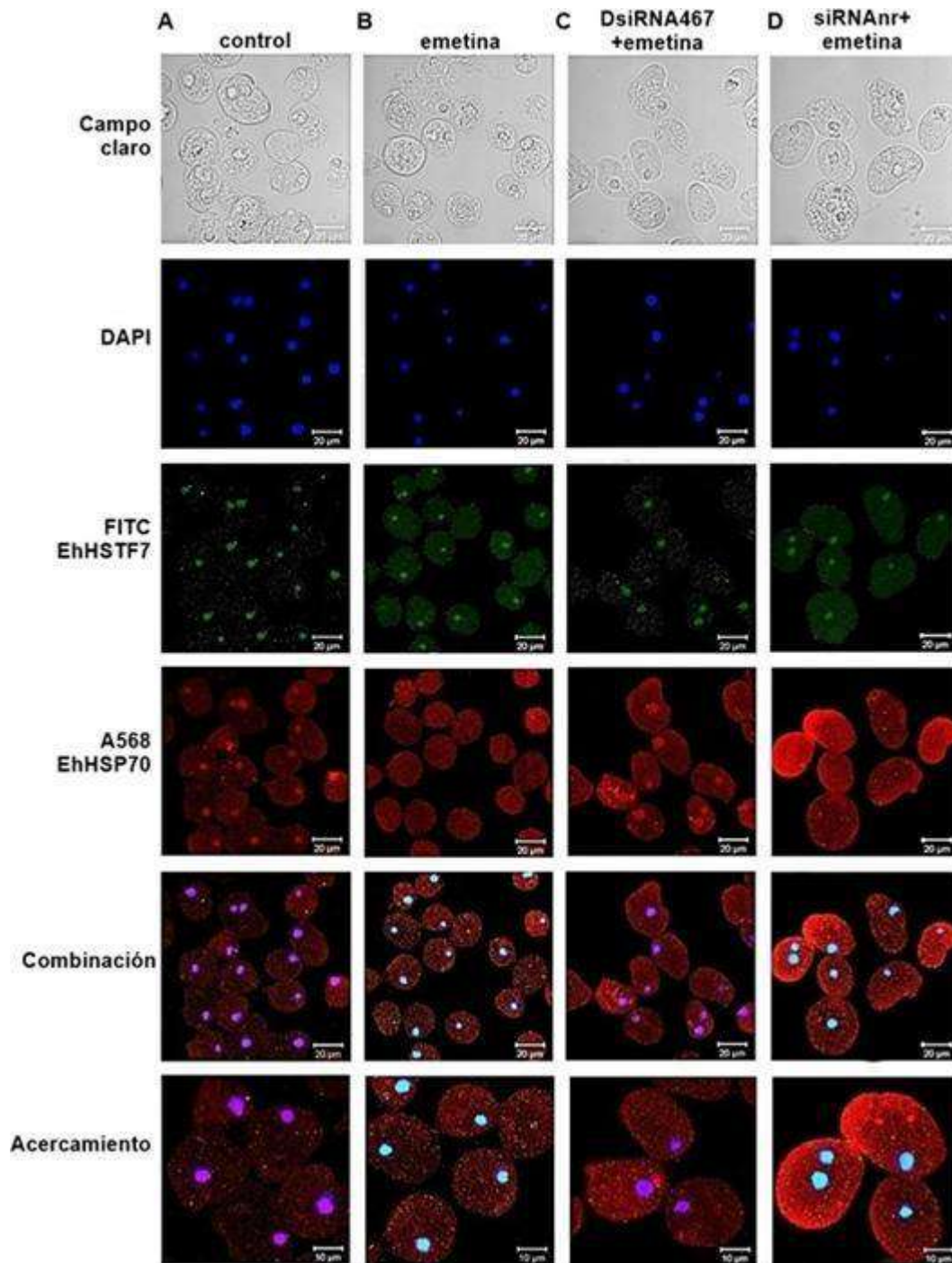


Figura 29. Localización *in vivo* por inmunofluorescencia del factor EhHSTF7 y la proteína EhHSP70. (A) Trofozoítos sin emetina y sin siRNA. (B) Trofozoítos con emetina por 24 h. (C) Trofozoítos con emetina y DsiRNA467. (D) Trofozoítos con emetina y siRNA^{nr}. DAPI, tinción de núcleos. Escala 20 µm; acercamiento 10 µm.

9. Discusión

En este trabajo se determinó que el factor EhHSTF7 interacciona con las bases complementarias 5'-GAA-3' del elemento HSE del promotor del gen *EhPgp5*. Asimismo, se demostró que el silenciamiento de EhHSTF7 disminuye la expresión del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina, y se observó que la proteína EhHSP70 no co-localiza con el factor EhHSTF7 en trofozoítos cultivados con emetina. El modelo 3D de la estructura del factor EhHSTF7 mostró que el DBD es altamente conservado, formado por el motivo hélice-giro-hélice característico de la familia HSF; el DBD del factor EhHSTF7 así como el de diferentes HSFs forman una estructura compacta globular formada por 4 hojas β antiparalelas, 3 α hélices y un bucle flexible localizado entre las hojas β 3 y 4 (Harrison et al., 1994; Vuister et al., 1994).

El DBD es considerado el dominio característico de los HSFs, por lo que el factor EhHSTF7 pertenece a esta familia de proteínas, de acuerdo a los resultados El acoplamiento molecular del factor EhHSTF7 con el elemento HSE del gen *EhPgp5*, demostró que este factor interacciona con las bases complementarias 5'-GAA-3' del HSE a través de los residuos Ser69 y Arg72, localizados en la α hélice 3 del DBD. El análisis de la interacción proteína-DNA de los HSFs mediante ensayos *in silico* no se ha reportado hasta el momento. Sin embargo, aunque existe muy poca información acerca de la estructura de los HSFs, la estructura cristalográfica del DBD en complejo con un HSE de tres HSFs ha sido reportada. La estructura del DBD del HSF de *Kluyveromyces lactis* (KIHSF) en complejo con la secuencia canónica 5'- ggTTCTaGAAcc-3', reveló que la α hélice 3 del DBD interacciona con el surco mayor del DNA, el residuo conservado Arg interacciona mediante dos HB con la G, mientras que el residuo conservado Ser interacciona con la T complementaria de la segunda A del motivo 5'-GAA-3' (Littlefield & Nelson, 1999).

La estructura cristalizada del DBD del HSF2 de *Homo sapiens* (HsHSF2) unido a la secuencia HSE, 5'-ggTTCTaGAAcc-3', mostró un dímero HSF2 unido al HSE, a

través de HB entre el residuo altamente conservado Arg63 y la G del motivo 5'-nGAAn-3'. El residuo Arg63 se localiza en la α hélice 3 y éste se inserta en el surco mayor del DNA (Jaeger et al., 2016). El DBD cristalizado del HSF1 de *Homo sapiens* (HsHSF1) con el HSE 5'-ggTTCtaGAAcc-3', demostró que el DBD interacciona con el motivo 5'-GAA-3' mediante la altamente conservada α hélice 3, el cual se inserta en el surco mayor del DNA; el residuo Arg71 interacciona por dos HB con la base G, además el residuo Ser68 estabiliza la interacción del residuo Arg71 mediante la interacción con las bases complementarias TT de las bases AA del motivo 5'-GAA-3' (Neudegger et al., 2016).

Los residuos en la α hélice 3 del DBD de los HSFs que interaccionan con el DNA son altamente conservados, los residuos Ser y Arg localizados en la α hélice 3 han sido identificados en diferentes HSFs (Sakurai & Enoki, 2010). Interesantemente, el factor EhHSTF7 contiene los residuos Ser y Arg en la α hélice 3 del DBD, y a través de análisis *in silico* en este trabajo se encontró que estos residuos pueden estar interaccionando con las bases conservadas del motivo 5'-GAA-3' del elemento HSE del gen *EhPgp5*. Estos resultados demuestran que el factor EhHSTF7 presenta una α hélice 3 del DBD altamente conservada y que es capaz de reconocer al motivo conservado 5'-GAA-3', lo que sugiere que es un factor de transcripción con la habilidad de unirse al DNA.

El análisis de la secuencia genómica del factor *Ehhstf7*, demostró la presencia de una secuencia intrónica de 68 pb localizado en el extremo 5'; mediante PCR de punto final se comprobó la presencia de este intrón. El parásito *E. histolytica* presenta un porcentaje bajo de intrones, solamente el 25 % de los genes identificados hasta el momento presenta al menos un intrón (Loftus et al., 2005). La presencia de intrones en los genes *Ehhstfs* es una característica altamente conservada en la familia de genes *hsfs*, ya que en los genes caracterizados se ha observado la presencia de estas secuencias (Zafar et al. 2016). La relevancia de las secuencias intrónicas en el papel de los HSFs, se ha estudiado en diversos organismos; se ha encontrado que el gen *hsf2* de mamíferos, se expresa como 2

proteínas distintas y que estas isoformas son reguladas de forma tejido-dependiente (Goodson et al., 1995; Gómez-Pastor et al., 2018). En el parásito *S. mansoni* el HSF se puede expresar con 4 isoformas, esta diversidad estructural podría ayudar en este parásito a modular procesos específicos de la etapa larvaria o de lombriz adulta (Ram et al., 2004). Resulta interesante estudiar más a detalle la regulación del mRNA del factor EhHSTF7.

Por otro lado, el factor EhHSTF7 recombinante fue purificado por cromatografía de afinidad y por exclusión de tamaño, en estado monomérico y oligomérico. La activación de los HSFs ocurre vía la homotrimerización y esta modificación puede ocurrir en solución sin otros factores o DNA (Larson et al., 1995). La proteína HSF1 de *Arabidopsis thaliana* (AtHSF1) fue clonada y purificada, en geles SDS-PAGE se pudo observar la proteína en su forma monomérica; sin embargo, al analizar la proteína AtHSF1 en geles nativos es posible observar a la proteína recombinante en su conformación oligomerizada, lo que corrobora la capacidad de esta familia de factores de transcripción de oligomerizar *in vitro* (Höbel & Schöffl, 1994). Se ha reportado que la proteína recombinante HsHSF1 fue purificada por cromatografía de afinidad principalmente como monómero, mientras que el dímero y el trímero fueron obtenidos en menor concentración (Zuo et al., 1994; Hentze et al., 2016). El HSF1 de ratón (MmHSF1) también ha sido purificado sin condiciones de estrés, obtenido principalmente en su conformación monomérica, mientras que la conformación oligomerizada fue observada en una concentración muy baja (Ahn & Thiele, 2003).

Anteriormente, se realizó la inmunodetección del factor EhHSTF7 en trofozoítos sin estrés, bajo estas condiciones se inmunodetectó una proteína de 102 kDa, tanto en la fracción citoplásmica como en el núcleo (Bello, 2016). En este trabajo se purificaron e inmunodetectaron usando el mismo anticuerpo dos proteínas de 24 y 72 kDa, esta diferencia en el peso molecular se puede deber principalmente a la ausencia de fosforilación del factor EhHSTF7 en las bacterias *E. coli* C41 y a las diferentes condiciones de obtención de las proteínas que pueden favorecer una u

otra conformación como el pH de las soluciones y las diferentes interacciones que pueden llevarse a cabo en dos organismos diferentes como *E. histolytica* y *E. coli*. Debido a la importancia que tiene la oligomerización en la activación de los HSFs, se evaluó el estado de oligomerización *in vitro* de la proteína rEhHSTF7, y se identificó por medio de espectrofluorometría de residuos aromáticos, que esta proteína cambió su estado de oligomerización en respuesta al estrés térmico y al aumento en la concentración de proteína.

Diferentes autores han observado estos cambios conformacionales en respuesta al estrés y a la concentración de proteínas. La proteína AtHsfA1a es inducida *in vitro* de monómero a trímero en respuesta a diversas condiciones de estrés; como estrés térmico, cambios en pH, peróxido de hidrógeno, y altas concentraciones de proteína; estos datos revelaron que la proteína AtHsfA1a es capaz de reconocer directamente el estrés y este proceso es dependiente de la concentración de proteína (Liu et al., 2013). La capacidad de reconocer el estrés directamente *in vitro* se ha demostrado en diferentes HSFs; el estrés térmico, peróxido de hidrógeno, y la alta concentración de proteína inducen la trimerización reversible del factor DmHSF *in vitro*, mientras que otras condiciones estrés no afectan el estado conformacional del factor DmHSF, lo que indica que existen diferentes mecanismos de reconocimiento del estrés (Zhong et al., 1998).

El factor HSF de levadura se trimeriza *in vitro* en respuesta al estrés térmico y al anión superóxido; asimismo se demostró que un bucle flexible que se localiza entre el DBD mínimo y la región adyacente al DO, es el responsable de este cambio conformacional (Lee et al., 2000). Dentro de esta región se localiza el residuo Cys, que se ha demostrado en diferentes HSFs como el responsable de reconocer diferentes condiciones de estrés; como el estrés térmico y el peróxido de hidrógeno; en el DBD del HSF1 de mamífero se localizan dos residuos Cys que forman un puente disulfuro sensible al estado redox del ambiente, HSF1 de mamífero que carecen de uno o ambos residuos Cys son incapaces de trimerizarse en respuesta al estrés (Ahn & Thiele, 2003). La interacción proteína-DNA entre el factor EhHSTF7

y el elemento HSE del promotor del gen *EhPgp5* fue obtenida *in vitro*, en donde ensayos de retardamiento corroboraron que la interacción era específica y que el motivo 5'-GAA-3' es necesario para el reconocimiento proteína-DNA. Además, se determinó que el factor rEhHSTF7 se une al elemento HSE en función de la concentración de proteína.

La unión al HSE se ha descrito para diferentes HSFs; el factor ScHSF se une específicamente al elemento HSE del promotor del gen *Hsp82*, la señal del complejo ScHSF-HSE es mayor en relación al incremento de concentración del factor ScHSF (Erkine et al., 1999). La unión del factor KIHSF a un HSE con tres repetidos 5'-GAA-3' fue obtenida mediante ensayos de retardamiento proteína-DNA, complejos de mayor retardamiento se observaron cuando se incrementó la concentración del factor KIHSF, en este trabajo los autores explicaron que esto sugería que la proteína oligomerizada estaba uniéndose al HSE y que la oligomerización estaba relacionada con el aumento en la concentración de KIHSF (Cicero et al., 2001). Otro análisis realizado con el factor HsHSF1 en el que se unía al HSE del gen *Hsp70*, demostró que la interacción era dependiente de la concentración del factor HsHSF1, además se obtuvieron complejos de mayor retardamiento cuando la concentración de HsHSF1 incrementó (Westerheide et al., 2009).

En organismos eucariotas, los HSFs están involucrados en la regulación de la respuesta al estrés a través de la activación transcripcional de genes de estrés. En este trabajo determinamos que el factor rEhHSTF7 se une al elemento HSE del gen *mdr EhPgp5 in vitro*, además las bases complementarias 5'-GAA-3' son necesarias para la interacción proteína-DNA. Diferentes estudios han determinado la importancia de las bases 5'-GAA-3' para la interacción HSF-HSE, mediante ensayos de retardamiento, además de la cristalización HSF-HSE. La afinidad de unión del ScHSF con el HSE del gen *Hsp82* fue significativamente reducida por la mutación del nucleótido G del motivo 5'-GAA-3' del HSE (Erkine et al., 1999). Otro estudio realizado también con el ScHSF, demostró que el factor se une a la secuencia HSE consenso 5'-nGAAnnTTCn-3', sin embargo no fue capaz de unirse al elemento HSE

mutante 5'-nGAAnnGGCn-3', revelando la importancia de las bases 5'-GAA-3' complementarias del HSE en la interacción proteína-DNA (Chen & Parker, 2001).

El análisis de la interacción de los HSFs de *Saccharomyces* y *Drosophila* con las bases 5'-AGAAT-3', se realizó mediante ensayos de retardamiento y mutantes de cada uno de los cinco nucleótidos, el oligonucleótido con la base G mutada mostró la menor afinidad por la unión con ambos HSFs, mientras que los oligonucleótidos con la A3 y la A4 mutada también mostraron una menor afinidad por ambos HSFs comparada con la afinidad del oligonucleótido wild type. La mutación de los nucleótidos 5'-GAA-3' reduce significativamente la afinidad de unión con los HSFs de *Saccharomyces* y *Drosophila* (Xiao et al., 1991; Fernandes et al., 1994). Mediante ensayos de retardamiento se demostró la importancia de la base G en la interacción HSF-HSE, usando el HsHSF1 expresado en *E. coli* se observó que el HsHSF1 muestra diferente afinidad de unión por mutantes del HSE del gen *Ha hsp17.7 G4*, siendo las mutantes que no contienen el nucleótido G las que muestran una unión reducida con el HsHSF1 e incluso no se forma el complejo HSF-HSE (Almoguera et al., 1998). Las bases 5'-GAA-3' en la interacción HSF-HSE son relevantes, sin embargo, cada una de estas bases tiene un impacto o función diferente dentro de la interacción proteína-DNA.

El silenciamiento de la expresión de genes mediante RNAs de interferencia pequeños (siRNAs) sintetizados químicamente ha demostrado ser una herramienta específica y eficiente para inhibir la expresión de genes cuándo son introducidos en el parásito *E. histolytica* (Vayssié et al., 2004). En trofozoítos de *E. histolytica*, se demostró que un siRNA dúplex de 22 nt específico del mRNA del gen γ -*tubulina* en una concentración final de 10 μ g/ml e introducido por *soaking* en los trofozoítos, fue capaz de silenciar la expresión de γ -*tubulina*, el 70% de trofozoítos cultivados con el siRNA, mostraron desorganización en la estructura de microtúbulos, además los niveles de mRNA y proteína de γ -*tubulina* en trofozoítos cultivados con 5 μ g/ml de siRNA disminuyeron 51 y 90% en comparación con trofozoítos control; como control

del experimento usaron el siRNA no relacionado del mRNA del gen *gfp*, el cual no mostró cambios en los niveles de expresión de γ -tubulina (Vayssié et al., 2004).

En este trabajo se demostró que los siRNAs; siRNA566, DsiRNA67, y DsiRNA467 disminuyen 35, 42, y 46 veces la expresión del mRNA el gen *Ehhstf7*, respectivamente en comparación con trofozoítos control (cultivo con emetina). Por otro lado, se observó la disminución de la viabilidad de trofozoítos cultivados con emetina cuándo se colocaron los siRNAs en el cultivo comparada con trofozoítos control. Anteriormente, se había silenciado el gen *Ehhstf7* usando el siRNA566 de 25 nt y se observó una disminución de 27 veces la expresión del mRNA en trofozoítos cultivados con emetina (Rojas, 2017). En el presente trabajo además del siRNA566 se usaron el DsiRNA67 y el DsiRNA467 de 27 nt, los cuales mostraron un silenciamiento mayor del factor EhHSTF7 tanto a nivel de mRNA como de proteína; en el parásito *E. histolytica* los RNAs pequeños endógenos tienen un tamaño de 27 nt, por lo que el aumento en la eficiencia del silenciamiento del DsiRNA67 y DsiRNA467, puede deberse a la similitud en tamaño de estas secuencias con los siRNAs endógenos de este parásito (Zhang et al., 2011).

El gen *EhPgp5* está involucrado en el fenotipo *MDR* en *E. histolytica* en respuesta a la emetina (López-Camarillo et al., 2003; Bañuelos et al., 2004; Nieto et al., 2005). Sin embargo, la regulación transcripcional detrás de este proceso es desconocida hasta el momento; la presencia de un elemento HSE funcional en la región promotora del gen *EhPgp5*, sugiere la regulación por parte de factores de transcripción HSF (Orozco et al., 2002; Nieto et al., 2005; Nieto et al., 2017). En este trabajo se observó que el factor de transcripción EhHSTF7, está involucrado en la regulación de la expresión de *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina; al silenciar el gen *Ehhstf7* la expresión de *EhPgp5* disminuye en comparación con la expresión en trofozoítos que no tienen silenciado el gen *Ehhstf7*. La activación transcripcional de genes de estrés por parte de los HSFs en respuesta a condiciones específicas de estrés, se ha demostrado mediante diferentes enfoques.

El factor HsHSF1 participa en la sobre-expresión del gen *selenof*, durante el tratamiento con selenato y tunicamicina en células de riñón y neuroblastoma de ratón; la sobreexpresión del factor HsHSF1 en estas células incrementó la actividad del promotor, además de los niveles de mRNA y proteína de Selenof. Así como la sobre-expresión y/o el silenciamiento del factor HsHSF1 mostraron un incremento o disminución significativa en la transcripción de *selenof* durante el tratamiento con selenato o tunicamicina (Ren et al., 2019). En otro estudio realizado en hojas de *A. thaliana*, se observó que el gen *pdf* incrementa su expresión en hojas con los factores AtHsfB1 y AtHsfB2b mutados, esto se observó tanto en las hojas que tenían mutado cada uno de estos factores como en las hojas que contenían ambos factores mutados, en presencia del hongo *A. brassicicola* y/o ácido jasmónico comparados con las hojas con los factores *wild type*; este es un ejemplo de regulación negativa dependiente de un HSF en plantas en respuesta a un estímulo biótico o abiótico (Kumar et al., 2009).

En ratones ICR se silenció el factor HSF1 con siRNAs, posteriormente, mediante análisis de microarreglos se observó que el silenciamiento del HSF1 inhibió la transcripción de diferentes miembros de la familia HSP, además, el silenciamiento de HSF1 disminuyó la termo-tolerancia al estrés térmico en ratones, ya que la mortalidad aumentó después del tratamiento de hipertermia (Yin et al., 2005). En la línea celular RKO de carcinoma de colon se silenció el factor HSF1 con siRNAs, se observó que este factor es necesario para la inducción transcripcional de las HSPs, HSP40 y HSP70 en respuesta al 4-hidroxinonenal, además, la inhibición de la expresión de estas proteínas correlacionó con un incremento en la apoptosis de las células en respuesta al 4-hidroxinonenal (Jacobs & Marnett, 2007). En este trabajo se observó que en trofozoítos con el factor EhHSTF7 silenciado y con una baja expresión de la EhPGP5, la viabilidad celular en respuesta a la emetina disminuyó de manera significativa con el DsiRNA467, el cuál mostró la mayor capacidad de silenciar el factor EhHSTF7.

La proteína HSP70 lleva a cabo el plegamiento de proteínas desnaturalizadas para minimizar la degradación proteolítica como parte de la respuesta de estrés térmico (Shamovsky & Nudler, 2008). En este trabajo mediante análisis *in silico* del interactoma del factor EhHSTF7, se predijo la interacción con las HSPs que forman el complejo regulador de las HSFs; HSP40, HSP70, y HSP90 (Gómez-Pastor et al., 2018). Sin embargo, sólo se pudo obtener la co-localización del factor EhHSTF7 con la proteína EhHSP70 en trofozoítos cultivados con emetina; en estos resultados se observó que estas proteínas no co-localizan en el núcleo de trofozoítos cultivados con emetina, mientras que estas proteínas co-localizan en el núcleo de trofozoítos control (sin estrés) y trofozoítos con el EhHSTF7 silenciado.

En diferentes organismos, la proteína HSP70 regula la actividad de los HSFs como parte de un multicomplejo, secuestrando a los monómeros y trímeros de estos factores de transcripción (Baler et al., 1996; Guo et al., 2001). La sobreexpresión de HSP70 en la línea celular PEER de humano redujo la activación de HsHSF1 después del estrés térmico. La activación de HsHSF1 en respuesta al tratamiento con arseniato de sodio o azetidina fue reprimida en células que expresan HSP70 en comparación con células control no transfectadas. Estos resultados sugieren que HSP70 tiene un papel activo en mantener a HSF1 en una conformación inactiva (Mosser et al., 1993).

En *A. thaliana* se realizó el silenciamiento mediante un plásmido anti-sentido específico del gen *hsp70*. En las plantas transfectadas, el gen *hsp70* no fue inducido por el estrés térmico y el nivel de proteína HSP70 fue significativamente reducido; la termo-tolerancia en las plantas anti-sentido se redujo 2 °C en comparación con las plantas *wild type*, además el tiempo para inactivar el hetero-trímero de AtHSF1 fue significativamente mayor en las plantas anti-sentido indicando que HSP70 participa en la rápida inactivación de HSF1 después del estrés térmico (Lee & Schöffl, 1996). Durante la atenuación de la respuesta de estrés térmico, la transcripción de genes de estrés térmico regresa a niveles basales y el HSF1 a su conformación monomérica; estos eventos coinciden con los altos niveles de HSP70

y otras HSPs. La sobre-expresión de HSP70 en la línea celular HeLa reprime la actividad transcripcional de HSF1 endógeno y transfectado, HSP70 interacciona directamente con el dominio de transactivación de HSF1 y reprime la transcripción de genes de estrés térmico (Shi *et al.*, 1998).

Se ha observado que el factor HSF1 de *S. cerevisiae* interacciona basalmente con la proteína chaperona HSP70 y mediante co-inmunoprecipitación se observó que estas proteínas se disocian durante el estrés térmico y que HSP70 es capaz de inhibir el crecimiento celular causado por la sobre-expresión de HSF1; lo que representó la primera evidencia de una chaperona represora que regula directamente la actividad de ScHSF1 (Zheng *et al.*, 2016). Posteriormente, se predijo que ScHSF1 no es capaz de inactivarse en ausencia del transcrito de *hsp70*; ensayos *in vitro* mostraron que HSP70 se une al dominio CE2 de ScHSF1 localizado en el extremo C-terminal, y que al deletar el dominio CE2 se incrementa la actividad basal de ScHSF1 y se obtuvo un retraso en la inactivación de ScHSF1 durante el estrés térmico (Krakowiak *et al.*, 2018). En nuestro trabajo se demostró la co-localización en el núcleo de EhHSTF7 y EhHSP70 en trofozoítos cultivados en condiciones basales, mientras que se observa la pérdida de co-localización de estas proteínas en respuesta a la emetina, lo que podría indicar que EhHSP70 no es requerido en el núcleo en esta condición de estrés.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el factor EhHSTF7 se une al elemento HSE funcional de la región promotora del gen *EhPgp5*, además se determinó la importancia del motivo 5'-GAA-3' complementario en la interacción EhHSTF7-HSE. También se observó que el factor EhHSTF7 se oligomeriza en respuesta al estrés térmico y a la concentración de proteína tal como se ha visto para otros HSFs; el silenciamiento de EhHSTF7 en trofozoítos cultivados con el antiamebiano emetina induce una disminución significativa del gen *EhPgp5*. Por último, se observó que EhHSP70 no co-localiza en el núcleo con EhHSTF7 en respuesta a la emetina. Los resultados de este proyecto indican que EhHSTF7 participa en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos de *E.*

histolytica en respuesta a emetina. La regulación transcripcional de la respuesta a la emetina y el fenotipo MDR en *E. histolytica* presenta un mecanismo complejo que involucra a diferentes factores de transcripción, proteínas remodeladoras de la cromatina, regulación de genes *mdr*, HSPs, entre otros, por lo que es necesario realizar más estudios y análisis detallados para descifrar la compleja red de regulación detrás del fenotipo MDR en el parásito *E. histolytica*.

10. Conclusiones

1. El factor EhHSTF7 interacciona *in silico* con el elemento HSE localizado en la región promotora del gen *EhPgp5* mediante los residuos Ser69 y Arg72 localizados en la α hélice 3 del DBD con las bases complementarias 5'-GAA-3' del HSE.
2. La proteína rEhHSTF7 cambia su estado de oligomerización en respuesta a altas concentraciones y al estrés térmico.
3. El factor rEhHSTF7 reconoce y se une específicamente a la secuencia 5'-ata**GAA**attt**TTC**ata-3' del elemento HSE del gen *EhPgp5*; las bases 5'-GAA-3' del elemento HSE son relevantes para la interacción rEhHSTF7-HSEwt, corroborando la información obtenida en la interacción *in silico*.
4. El silenciamiento del gen *Ehhstf7* con el DsiRNA467 disminuyó la viabilidad de los trofozoítos y la expresión del gen *EhPgp5* en trofozoítos cultivados con emetina, esto sugiere que EhHSTF7 está involucrado en la activación transcripcional del gen *EhPgp5* en trofozoítos de *E. histolytica* en respuesta a emetina.
5. El factor EhHSTF7 no co-localiza con la proteína EhHSP70 en el núcleo de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con emetina.

11. Perspectivas

- Realizar la mutación dirigida de Ser69 y Arg72, para evaluar la participación de los residuos en la interacción EhHSTF7-HSE.
- Evaluar a nivel celular (movilidad, eritrofagocitosis, funcionalidad, etc) las alteraciones del silenciamiento de EhHSTF7 en trofozoítos cultivados con emetina.
- Analizar la interacción de EhHSTFs y EhHSP70 en trofozoítos cultivados sin y con emetina.
- Eliminar el dominio CTA de EhHSTF7 y analizar la interacción con EhHSP70 y su actividad transcripcional en trofozoítos cultivados con emetina.
- Evaluar la regulación e interacción de EhHSTF7 con otras HSPs en trofozoítos cultivados con emetina.
- Analizar la interacción de los EhHSTFs con las chaperonas EhHSP70 y EhHSP90 en trofozoítos cultivados con emetina.
- Evaluar el efecto del silenciamiento de los EhHSTFs en el fenotipo MDR en trofozoítos cultivados con emetina.
- Búsqueda de otros genes blanco de la regulación por EhHSTF7 en el transcriptoma de trofozoítos cultivados con emetina.

12. Referencias Bibliográficas

- Abhyankar, M.M., Hochreiter, A.E., Hershey, J., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O., Sobral, B.W.S., Mann, B.J., Petri Jr, W.A., Gilchrist, C.A. (2008). Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryotic Cell* 7, 1565-1572.
- Abravaya, K., Myers, M.P., Murphy, S.P., Morimoto, R.I. (1992). The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes & Development* 6, 1153–1164.
- Ahn, S.G., & Thiele, D.J. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for *Hsp* gene activation and protection from stress. *Genes & Development* 17, 516-528.
- Åkerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V., Sistonen, L. (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113, 15–27.
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Molecular Cell Biology* 11, 545-555.
- Almoguera, C., Prieto-Dapena, P., Jordano, J. (1998). Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *The Plant Journal* 13, 437-446.
- Avendaño-Borromeo, B., Narayanasamy, R.K., García-Rivera, G., Labra-Barrios, M.L., Lagunes-Guillén, A.E., Munguía-Chávez, B., Castañón-Sánchez, C.A., Orozco, E., Luna-Arias, J.P. (2019). Identification of the gene encoding the TATA box-binding protein-associated factor 1 (TAF1) and its putative role in the heat shock response in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research* 118, 517–538.

- Baler, R., Zou, J., Voellmy, R. (1996). Evidence for a role of Hsp70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* 1, 33–39.
- Bansal, D., Sehgal, R., Chawla, Y., Mahajan, R.C., Malla, N. (2004). In vitro activity of antiamebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 3, 27.
- Bansal, D., Malla, N., Mahajan, R.C. (2006). Drug resistance in amoebiasis. *Indian Journal of Medical Research* 123, 115-118.
- Bañuelos, C., Orozco, E., Gómez, C., González, A., Medel, O., Mendoza, L., Pérez, D.G. (2004). Cellular Location and Function of the P-Glycoproteins (EhPgps) in *Entamoeba histolytica* Multidrug-Resistant Trophozoites. *Microbial Drug Resistance* 8.
- Bello, F. 2016. Inmunolocalización del factor EhHSTF7 en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* expuestos a estrés. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.
- Berendsen, H.J.C., Van der Spoel, D., Van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 91, 43-56
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., Bhattacharya, S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology* 30, 401-410.
- Björk, J.K., Sistonen, L. (2010). Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family. *The FEBS Journal* 277, 4126-4139.
- Boeger, H., Bushnell, D.A., Davis, R., Griesenbeck, J., Lorch, Y., Strattan, J.S., Westover, K.D., Kornberg, R.D. (2005). Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Letters* 579, 899–903.

- Boreham, P.F.L., Phillips, R.E., Shepherd, R.W. (1988). Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, Pages 104–106,
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J, Hall, N., Tannich, E. (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* 2, 501-509.
- Bulman, A. L., Hubl, S. T., Nelson, H. C. M. (2001). The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N- and C-terminal activation domains. *Journal of Biological Chemistry* 276, 40254–40262.
- Butcher, N.J., & Minchin, R.F. (2010). Arylamine N-acetyltransferase 1 gene regulation by androgens requires a conserved heat shock element for heat shock factor-1. *Carcinogenesis* 31(5), 820–826.
- Calixto-Gálvez, M., Romero-Díaz, M., García-Muñoz, A., Salas-Casas, A., Pais-Morales, J., Galván, I.J., Orozco, E., Rodríguez, M.A. (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* 41, 775-782.
- Campos-Peralta, J.M., Sánchez-Monroy, V., Villalba-Magdaleno, J.D.A. (2011). *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 31, 63-70.

- Carranco, R., Almoguera, C., Jordano, J. (1999). An Imperfect Heat Shock Element and Different Upstream Sequences Are Required for the Seed-Specific Expression of a Small Heat Shock Protein Gene. *Plant Physiology* 121, 723–730.
- Castañón-Sánchez, C.A., Luna-Arias, J.P., De Dios-Bravo, M.G., Herrera-Aguirre, M.E., Olivares-Trejo, J.J., Orozco, E., Hernández, J.M. (2010). *Entamoeba histolytica*: A unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein Expression and Purification* 70, 48-59.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015). Pathogen & Environment. Atlanta, GA, E.U.A. Parasites, Amebiasis, *Entamoeba histolytica* Infection, Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/pathogen.html>.
- Chauhan, H., Khurana, N., Nijhavan, A., Khurana, J.P., Khurana, P. (2012). The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination and imparts tolerance to heat stress. *Plant, Cell and Environment* 35, 1912–1931.
- Chávez-Munguía, B., Tsutsumi, V., Martínez-Palomo, A. (2006). *Entamoeba histolytica*: Ultrastructure of the chromosomes and the mitotic spindle. *Experimental Parasitology* 114, 235-239.
- Chen, Y., Barlev, N. A., Westergaard, O., Jakobsen, B. K. (1993). Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity. *The EMBO Journal* 12, 5007–5018.
- Chen, T., & Parker, C.S. (2002). Dynamic association of transcriptional activation domains and regulatory regions in *Saccharomyces cerevisiae* heat shock factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 1200–1205.

- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-537.
- Cicero, M.P., Hubl, S.T., Harrison, C.J., Littlefield, O., Hardy, J.A., Nelson, H.C.M. (2001). The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic Acids Research* 29, 1715–1723.
- Clark, C.G., Ali, I.K.M., Zaki, M., Loftus, B.J., Hall, N. (2006). Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 146, 24-29.
- Cruz-Vera, J., Clara, L., Hernández-Kelly, R., Méndez, J.A., Pérez-Salzar, E., Ortega, A. (2003). Collagen-induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *FEMS Microbiology Letters* 229, 203-209.
- Cui, J., Tian, H., Chen, G. (2015). Upregulation of nuclear heat shock factor 1 contributes to tumor angiogenesis and poor survival in patients with non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* 100, 465-472.
- Colovos, C., & Yeates, T.O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* 2, 1511-1519.
- Cotto, J. J., Kline, M., Morimoto, R. I. (1996) Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 3355–3358.
- Cowman, A.F., Karcz, S. (1993). Drug resistance and the P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*. *Seminars in Cell Biology* 4, 29-35.
- Das, A., & Bellofatto, V. (2009). The Non-canonical CTD of RNAP-II is essential for productive RNA synthesis in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* 4, e6959.

- De Dios-Bravo, G., Luna-Arias, J.P., Riverón, A.M., Olivares-Trejo, J.J., López-Camarillo, C., Orozco, E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants *in vitro*. *The FEBS Journal* 272, 1354-1366.
- Descoteaux, S., Shen, P.S., Ayala, P., Orozco, E., Samuelson, J. (1992). P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 23, 23-25.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Samuelson, J., Orozco, E. (1995). Increase in mRNA of multiple Ehpgp genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites. *Gene* 164, 179-184.
- Dunne, R.L., Dunn, L.A., Upcroft, P., O'Donoghue, P.J., Upcroft, J.A. (2003). Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* 13, 239-249.
- Ehrenkauer, G.M., Hackney, J.A., Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology* 11, 898-910.
- Erkine, A.M., Magrogan, S.F., Sekinger, E.A., Gross, D.S. (1999). Cooperative Binding of Heat Shock Factor to the Yeast HSP82 Promoter *in Vivo* and *in Vitro*. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1627–1639.
- Fernandes, M., Xiao, H., Lis, J.T. (1994). Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Research* 22, 167-173.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T. (2013). Cysteine Protease-Binding Protein Family 6 Mediates the Trafficking of Amylases to Phagosomes in the Enteric Protozoan *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 81, 1820-1829.

- Fojo, A., Akiyama, S., Gottesman, M.M., Pastan, I. (1985). Reduced Drug Accumulation in Multiply Drug-resistant Human KB Carcinoma Cell Lines. *Cancer Research* 45, 3002-3007.
- Ghosh, S., Frisardi, M., Rminez-Avila, L., Descoteaux, Sturm-Ramirez, K., Newton-Sanchez, O.C., Santos-Precado, J.I., Ganguly, C., Lohia, A., Reed, S., Samuelson, J. (2000). Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: Evidence of a bottleneck (Demographic Sweep) and Transcontinental Spread of Diploid Parasites. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3815-3821.
- Gilchrist, C.A., Holm, C.F., Hughes, M.A., Schaenman, J.M., Mann, B.J., Petri Jr, W.A. (2001). Identification and characterization of *Entamoeba histolytica* Upstream Regulatory Element 3 sequence-specific DNA-binding Protein containing EF-hand Motifs. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 11838-11843.
- Gilchrist, C.A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D.J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauf, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B.J., Petri Jr, W.A. (2006). Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147, 163-176
- Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D. (1995). Tissue-Dependent Expression of Heat Shock Factor 2 Isoforms with Distinct Transcriptional Activities. *Molecular and Cellular Biology* 15, 5288-5293.
- Gómez-García, C., Macías-Argüelles, M.L., Pérez-Ishiwara, D.G., Suárez-Tecla, M., Nieto-Martínez, A., Medel-Flores, O., Orozco-Solís, R., Náder-García, E. (2007). A Novel Heat Shock Transcription Factor Family in *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Infectious Diseases* 3, 115-122.

- Gómez-García, C., Ramírez, M.E., Calixto-Galvez, M., Medel, O., Rodríguez, M.A. (2010). Regulation of Gene Expression in Protozoa Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 726045.
- Gómez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., Thiele, D.J. (2018). Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 4–19.
- Green, M., Schuetz, T.J., Sullivan, E.K., Kingston, R.E. (1995). A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Molecular and Cellular Biology* 15, 3354–3362.
- Grünberg, S., Hahn, S. (2013). Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences* 38(12), 603-611.
- Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W. S., Voellmy, R. (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochemistry* 6, 4.
- Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F., Voellmy, R. (2001). Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 45791–45799.
- Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Wang, Y., Wang, J. (2008) Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. *Journal of Genetics and Genomics* 35, 105–118.
- Hannon, G.J., Rossi, J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371–378.
- Harrison, C.J., Bohm, A.A., Nelson, H.C.M. (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 263, 224–227.

- Heffler, M.A., Walters, R.D., Kugel, J.F. (2012) Using Electrophoretic Mobility shift Assays to Measure Equilibrium Dissociation Constants: GAL4-p53 Binding DNA as a Model System. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 40, 383-387.
- Hentze, N., Le Breton, L., Wiesner, J., Kempf, G., Mayer, M.P. (2016). Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *eLife* 5, e11576.
- Hernández de la Cruz, O., Muñoz-Lino, M., Guillén, N., Weber, C., Marchat, L.A., López-Rosas, I., Ruíz-García, E., Astudillo-de la Vega, H., Fuentes-Mera, L., Álvarez-Sánchez, E., Mendoza-Hernández, G., López-Camarillo, C. (2014) Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Proteome* 111, 46-58.
- Hernández de la Cruz, O., Marchat, L.A., Guillén, N., Weber, C., López-Rosas, I., Díaz-Chávez, J., Herrera, L., Rojo-Domínguez, A., Orozco, E., López-Camarillo, C. (2016) Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*. *Scientific Reports* 6, 19611.
- Höbel, A., & Schöffl, F. (1994). *Arabidopsis* heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. *Plant Molecular Biology* 26, 353-362.
- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J.O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R.I., Eriksson, J.E., Sistonen, L. (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *The EMBO Journal* 20, 3800-3810.

- Huang, Y., Li, M.Y., Wang, F., Xu, Z.S., Huang, W., Wang, G.L., Ma, J., Xiong, A.S. (2015). Heat shock factors in carrot: genome-wide identification, classification, and expression profiles response to abiotic stress. *Molecular Biology Reports* 42, 893–905.
- Huerta, M., Reyes, L., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Betanzos, A., Díaz-Hernández, M., Galindo, A., Bolaños, J., Cárdenas, H., Azuara-Liceaga, E., Chávez-Munguía, B., Orozco, E. (2020). A noncanonical GATA transcription factor of *Entamoeba histolytica* modulates genes involved in phagocytosis. *Molecular Microbiology* 114(6), 1019-1037.
- Hung, C.C., Ji, D.D., Sun, H.Y., Lee, Y.T., Hsu, S.Y., Chang, S.Y., Wu, C.H., Chan, Y.H., Hsiao, C.F., Liu, W.C., Colebunders, R. (2008). Increased risk for *Entamoeba histolytica* infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2, e175.
- Jacobs, A.T., & Marnett, L.J. (2007). Heat Shock Factor 1 Attenuates 4-Hydroxynonenal-mediated Apoptosis: CRITICAL ROLE FOR HEAT SHOCK PROTEIN 70 INDUCTION AND STABILIZATION OF Bcl-XL. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 33412-33420.
- Jaeger, A.M., Pemble IV, C.W., Sistonen, L., Thiele, D.J. (2016). Structures of HSF2 Reveal Mechanisms for Differential Regulation of Human Heat Shock Factors. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 147-154.
- Kansanen, E., Jyrkkanen, H.K., Volger, O.L., Leinonen, H., Kivela, A.M., Hakkinen, S.K., Woodcock, S.R., Schopfer, F.J., Horrevoets, A.J., Yla-Herttuala, S., Freeman, B.A., Levonen, A.I. (2009). Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 33233-33241.

- Kasinathan, R.S., Sharma, L.K., Cunningham, C., Webb, T.R., Greenberg, R.M. (2014). Inhibition or Knockdown of ABC transporters enhances susceptibility of adult and juvenile Schistosomes to praziquantel. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e3265.
- Kim, S.H., Yeo, G.S., Lim, Y.S., Kang, C.D., Kim, C.M., Chung, B.S. (1998). Suppression of Multidrug resistance via Inhibition of Heat Shock Factor by Quercetin in MDR Cells. *Experimental and Molecular Medicine* 30(2), 87-92.
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S., Rossi, J.J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology* 23, 222–226.
- Knight, R. (1980). The chemotherapy of amoebiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 6, 577-593.
- Krakowiak, J., Zheng, X., Patel, N., Feder, Z.A., Anandhakumar, J., Valerius, K., Gross, D.S., Khalil, A.S., Pincus, D. (2018). Hsf1 and Hsp70 constitute a two-component feedback loop that regulates the yeast heat shock response. *eLife* 7, e31668.
- Kumar, M., Busch, W., Birke, H., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Schöffl, F. (2009). Heat Shock Factors HsfB1 and HsfB2b Are Involved in the Regulation of *Pdf1.2* Expression and Pathogen Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 2, 152-165.
- Lantner, F., Ziv, E., Ram, D., Schechter, I. (1998). Different forms of the mRNA encoding the heat-shock transcription factor are expressed during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Biochemistry* 253, 390-398.
- Larson, J.S., Schuetz, T.J., Kingston, R.E. (1995). *In vitro* activation of purified human heat shock factor by heat. *Biochemistry* 34, 1902-1911.

- Lee, J.H., & Schöffl, F. (1996). An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 252, 11-19.
- Lee, S., Carlson, T., Christian, N., Lea, K., Kedzie, J., Reilly, J.P., Bonner, J.J. (2000). The Yeast Heat Shock Transcription Factor Changes Conformation in Response to Superoxide and Temperature. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1753–1764.
- Légaré, D., Hettema, E., Ouellette, M. (1994). The P-glycoprotein-related gene family in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 68, 81-91.
- Levy-Holtzman, R., & Schechter, I. (1994). *Schistosoma* extracts with heat shock factor activity revealed by the gel shift assay. *Parasitology* 108, 35-42.
- Levy-Holtzman, R., & Schechter, I. (1996). Expression of different forms of the heat-shock factor during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1317, 1-4.
- Lewin, B. (2008). Transcripción. En B. Lewin (Ed.), *Genes IX* (pp. 256-299). Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.
- Lidell, M.E., Moncada, D.M., Chadee, K., Hansson, G.C. (2006). *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9298-9303.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55, 1151-1191.

- Littlefield, O., & Nelson, H.C.M. (1999). A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocrystal. *Nature Structural & Molecular Biology* 6, 464-470.
- Liu, Y., Zhang, C., Chen, J., Guo, L., Li, X., Li, W., Yu, Z., Deng, J., Zhang, P., Zhang, K., Zhang, L. (2013). *Arabidopsis* heat shock factor HsfA1a directly senses heat stress, pH changes, and hydrogen peroxide via the engagement of redox state. *Plant Physiology and Biochemistry* 6, 92-98.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CCT}}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillén, N., Gilchrist, C., Stroup, S.E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N.M., Petri Jr, W.A., Clark, C.G., Embley, T.M., Barrell, B., Fraser, C.M., Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865-868.
- López-Camarillo, C., Luna-Arias, J.P., Marchat, L.A., Orozco, E. (2003). *EhPgp5* mRNA Stability Is a Regulatory Event in the *Entamoeba histolytica* Multidrug Resistance Phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 278, P11273-11280.
- López-Camarillo, C., López-Rosas, I., Ospina-Villa, J.D., Marchat, L.A. (2014). Deciphering molecular mechanisms of mRNA metabolism in the deep-branching eukaryote *Entamoeba histolytica*. *WIREs RNA* 5, 247-262.

- Lorenzi, H.A., Puiu, D., Miller, J.R., Brinkac, L.M., Amedeo, P., Hall, N., Caler, E.V. (2010). New Assembly, Reannotation and Analysis of the *Entamoeba histolytica* Genome Reveal New Genomic Features and Protein Content Information. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(6), e716.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, III W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2002) Structure validation by C-alpha geometry: phi, psi and C-beta deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics* 50, 437-450.
- Luna-Arias, J.P., Hernández-Rivas, R., De Dios-Bravo, G., García, J., Mendoza, L., Orozco, E. (1999). The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. *Microbiology* 145, 33-40.
- Macías-Argüelles, M.L. (2005). El factor de transcripción de choque térmico (HSTF) en *Entamoeba histolytica*. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.
- Macías-Argüelles, M.L., Sánchez-Vargas, L.O., Gómez-Hernández, A.L., Náder-García, E., Estanislao-Gómez, C.C., Gómez-García, M.C. (2012). Los factores de transcripción de choque térmico (HSTFs) en *Entamoeba histolytica*. En R.C. Rocha-Gracia, P. Lozano-Zarain & Y. Martínez-Laguna (Eds.), Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II (pp. 221-237). Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Marchat, L.A., Gómez, C., Pérez, D.G., Paz, F., Mendoza, L., Orozco, E. (2002). Two CCAAT/enhancer binding protein sites are *cis*-activator elements of the *Entamoeba histolytica* *EhPgp1* (*mdr*-like) gene expression. *Cellular Microbiology* 4, 725-737.

- Marchat, L.A., Pezet-Valdez, M., López-Camarillo, C., Orozco, E. (2003) *Entamoeba histolytica*: expression and DNA binding of CCAAT/enhancer-binding proteins are regulated through the cell cycle. *Experimental Parasitology* 103, 82-87.
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349.
- Mendoza, L., Orozco, E., Rodríguez, M.A., García-Rivera, G., Sánchez, T., García, E., Gariglio, P. (2003). Ehpf53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology* 149, 885-893.
- Meneses, E., Cárdenas, H., Zárate, S., Brieba, L.G., Orozco, E., López-Camarillo, C., Azuara-Liceaga, E. (2010). The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* 455, 32-42.
- Mittal, D., Chakrabarti, S., Sarkar, A., Singh, A., Grover, A. (2009). Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 785–795.
- Miyazaki, M., Kohno, K., Uchiumi, T., Tanimura, H., Matsuo, K., Nasu, M., Kuwano, M. (1992). Activation of human *multidrug resistance-1* gene promoter in response to heat shock stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187, 677-684.
- Moncada, D., Keller, K., Chadee, K., (2003). *Entamoeba histolytica* Cysteine Proteinases Disrupt the Polymeric Structure of Colonic Mucin and Alter Its Protective Function. *Infection and Immunity* 71, 838-844.
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* 12, 3788–3796.

- Mortimer, L., Chadee, K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 126, 336-80.
- Mosser, D.D., Duchaine, J., Massie, B. (1993). The DNA-Binding Activity of the Human Heat Shock Transcription Factor Is Regulated *In Vivo* by hsp70. *Molecular and Cellular Biology* 13, 5427-5438.
- Naidu, S.D., & Dinkova-Kostova, A.T. (2017). Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *The FEBS Journal* 284, 1606–1627.
- Narayanasamy, R.K., Castañón-Sánchez, C.A., Luna-Arias, J.P. García-Rivera, G., Avendaño-Borromeo, B., Labra-Barrios, M.L., Valdés, J., Herrera-Aguirre, M.E., Orozco, E. (2018). The *Entamoeba histolytica* TBP and TRF1 transcription factors are GAAC-box binding proteins, which display differential gene expression under different stress stimuli and during the interaction with mammalian cells. *Parasites & Vectors* 11, 153.
- Neudegger, T., Verghese, J., Hayer-Hartl, M., Ulrich Hartl, F., Bracher, A. (2016). Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. *Nature Structural & Molecular Biology* 23, 140-148.
- Newton, E.M., Knauf, U., Green, M., Kingston, R.E. (1996). The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Molecular and Cellular Biology* 16, 839–846.
- Nieto, A., Pérez, D.G., Orozco, E., Paz, F., Gómez, C. (2005). *Entamoeba histolytica* *EhPgp5* transcriptional activation depends on putative emetine response elements. *Experimental Parasitology* 110, 233-237.
- Nieto, A., Pérez-Ishiwara, D.G., Orozco, E., Sánchez-Monroy, V., Gómez-García, C. (2017). A Novel Heat Shock Element (HSE) in *Entamoeba histolytica* that Regulates the Transcriptional Activation of the *EhPgp5* Gene in the Presence of Emetine Drug. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 29, 492.

- Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A., Parker, C.S. (1990). The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* 62, 807–817.
- Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.D. (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress & Chaperones* 6, 177–189.
- Ocádiz-Ruiz, R., Fonseca, W., Martínez, M.B., Ocádiz-Quintanar, R., Orozco, E., Rodríguez, M.A. (2013). Effect of the silencing of the *Ehcp112* gene on the *in vitro* virulence of *Entamoeba histolytica*. *Parasites & Vectors*, 6, 248.
- Orozco, E., Suárez, M.A., Sánchez, T. (1985). Differences in adhesion, phagocytosis, and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *International Journal for Parasitology* 15, 655-660.
- Orozco, E., López, C., Gómez, C., Pérez, D.G., Marchat, L., Bañuelos, C., Delgadillo, D.M. (2002). Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International* 51, 353-359.
- Ortiz, D., Domínguez-Robles, M.C., Villegas-Sepúlveda, N., Meza, I. (2000). Actin induction during PMA and cAMP-dependent signal pathway activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology* 2, 391-400.
- Ota, A., Enoki, Y., Yamamoto, N., Sawai, M., Sakurai, H. (2013). Evolutionarily conserved domain of heat shock transcription factor negatively regulates oligomerization and DNA binding. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 930-936.
- Ouellette, M., Borst, P. (1991). Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Research in Microbiology* 142, 737-746.

- Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S.K., Samuelson, J. (2009). *Giardia*, *Entamoeba* and *Trichomonas* Enzymes Activate Metronidazole (Nitroreductases) and Inactivate Metronidazole (Nitroimidazole Reductases). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 458-464.
- Pastan, I., Gottesman, M. (1987). Multiple-drug resistance in human cancer. *New England Journal of Medicine* 316, 1388-1393.
- Pearson, R.J., & Singh, U. (2010). Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cellular Microbiology* 12, 1681-1690.
- Pearson, R.J., Morf, L., Singh, U. (2013). Regulation of H₂O₂ Stress-responsive Genes through a Novel Transcription Factor in the Protozoan Pathogen *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 4462-4474.
- Penuliar, G.M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., Nozaki, T. (2012). Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 375-386.
- Penuliar, G.M., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T. (2015). Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance. *Frontiers in Microbiology* 6, 354.
- Pérez, D.G., Gómez, C., López-Bayghen, E., Tannich, E., Orozco, E. (1998). Transcriptional Analysis of the *EhPgp5* Promoter of *Entamoeba histolytica* Multidrug-resistant Mutant. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 7285-7292.
- Pérez, E., Muñoz, M.L., Ortega, A. (1998) *Entamoeba histolytica*: collagen-induced AP-1 DNA binding activity. *FEMS Microbiology Letters* 159, 187-192.

- Pietrocola, F., Izzo, V., Niso-Santano, M., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Kroemer, G. (2013). Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Seminars in Cancer Biology* 23(5), 310-322.
- Pradines, B. (2013). P-glycoprotein-like transporters in *Leishmania*: A search of reversal agents. En A. Ponte-Sucre & M. Padrón-Nieves (Eds.), *Drug Resistance in Leishmania Parasites* (pp. 319-340). Springer, Cham.
- Prabhu, R., Sehgal, R., Chakraborti, A., Malla, N., Ganguly, N.K., Mahajan, R.C. (2000). Isolation of emetine resistant clones of *Entamoeba histolytica* by Petri dish agar method. *Indian Journal of Medical Research* 111, 11-13.
- Purdy, J.E., Pho, L.T., Mann, B.J., Petri Jr, W.A. (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 78, 91-103.
- Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 259, 230–234.
- Ram, D., Ziv, E., Lantner, F., Lardans, V., Schechter, I. (2004). Stage-specific alternative splicing of the heat-shock transcription factor during the life-cycle of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 129, 587-596.
- Ren, B., Huang, Y., Zou, C., Wu, Y., Huang, Y., Ni, J., Tian, J. (2019). Transcriptional Regulation of Selenoprotein F by Heat Shock Factor 1 during Selenium Supplementation and Stress Response. *Cells*, 8, 479.
- Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J. (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell* 40, 253-266.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.

- Ritossa, F. (1964). Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Experimental Cell Research* 35, 601-607.
- Rojas, M. (2017). Efecto del silenciamiento del gen *Ehhstf7* de *Entamoeba histolytica*. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.
- Romero-Díaz, M., Gómez, C., López-Reyes, I., Martínez, M.B., Orozco, E., Rodríguez, M.A. (2007). Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica EhrabB* gene promoter. *BMC Molecular Biology*, 8, 82.
- Saavedra, E., Olivos-García, A. (2017). Amibiasis. *Ciencia* 68, 14-17.
- Sakurai, H., Enoki, Y. (2010). Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression. *The FEBS Journal* 277, 4140-4149.
- Samarawickrema, N.A., Brown, D.M., Upcroft, J.A., Thammapalerd, N., Upcroft, P. (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40, 833-40.
- Samie, A., El Bakri, A., Abu Odeh, R. (2012). Amoebiasis in the tropics: Epidemiology and pathogenesis. En: A.J. Rodríguez-Morales (Ed.), *Current tropics in tropical medicine* (pp. 201-226). Croacia: InTech.
- Sarge, K.D., Murphy, S.P., Morimoto, R.I. (1993). Activation of Heat Shock Gene Transcription by Heat Shock Factor 1 Involves Oligomerization, Acquisition of DNA-Binding Activity, and Nuclear Localization and Can Occur in the Absence of Stress. *Molecular and Cellular Biology* 13(3), 1392-1407.
- Schaenman, J.M., Driscoll, P.C., Hockensmith, J.W., Mann, B.J., Petri Jr, W.A. (1998). An upstream regulatory element containing two nine base pair

repeats regulates expression of the *Entamoeba histolytica* *hgl5* lectin gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 94, 309-313.

Schaenman, J.M., Gilchrist, C.A., Mann, B.J., Petri Jr, W.A. (2001). Identification of Two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding proteins with homology to the RNA-binding Motif RRM. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 1602-1609.

Scharf, K.D., Berberich, T., Ebersberger, I., Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (HSF) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 104-119.

Schier, A.C., Taatjes, D.J. (2020). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes & Development* 34, 465-488.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675.

Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research* 33, W363-367.

Shabardina, V., Kischka, T., Kmita, H., Suzuki, Y., Makalowski, W. (2018). Environmental adaptation of *Acanthamoeba castellanii* and *Entamoeba histolytica* at genome level as seen by comparative genomic analysis. *International Journal of Biological Sciences* 14(3), 306–320.

Shamovsky, I., & Nudler, E. (2008). New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 855–861.

Shi, Y., Mosser, D.D., Morimoto, R.I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes & Development* 12, 654-666.

Solis, C.F., Guillen, N. (2008). Silencing genes by RNA interference in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Methods in Molecular Biology* 442, 113–128.

- Sorger, P.K., Nelson, H.C.M. (1989). Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59, 807–813.
- Stanley, S.L.Jr., Tian, K., Koester, J.P., Li, E. (1995). The Serine-rich *Entamoeba histolytica* Protein Is a Phosphorylated Membrane Protein Containing O-Linked Terminal N-Acetylglucosamine Residues. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 4121-4126.
- Stanley, S.L.Jr. (2003). Amoebiasis. *The Lancet* 361, 1025-1034.
- Storozhenko, S., De Pauw, P., Van Montagu, M., Inzé, D., Kushnir, S. (1998). The Heat-Shock Element Is a Functional Component of the *Arabidopsis* APX1 Gene Promoter. *Plant Physiology* 118, 1005–1014.
- SUIVE. (2011). Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos.
- Suter, D.M. (2020). Transcription Factors and DNA Play Hide and Seek. *Trends in Cell Biology* 30(6), 491-500.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Von Mering, C. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47, D607-613.
- Tachibana, T., Astumi, S., Shioda, R., Ueno, M., Uritani, M., Ushimaru, T. (2002). A Novel Non-conventional Heat Shock Element Regulates Expression of MDJ1 Encoding a DnaJ Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(25), 22140–22146.
- Tanabe, M., Sasai, N., Nagata, K., Liu, X.D., Liu, P.C.C., Thiele, D.J., Nakai, A. (1999). The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a

repressor of heat shock genes by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 27845–27856.

Tchénio, T., Havard, M., Martinez, L.A., Dautry, F. (2006). Heat Shock-Independent Induction of Multidrug Resistance by Heat Shock Factor 1. *Molecular and Cellular Biology* 26(2), 580-591.

Vanacova, S., Liston, D.R., Tachezy, J., Johnson, P.J. (2003). Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology* 33, 235-255.

Vayssié, L., Vargas, M., Weber, C., Guillén, N. (2004). Double-stranded RNA mediates homology-dependent gene silencing of γ -tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 138, 21-28.

Veiga, M.I., Osório, N.S., Ferreira, P.E., Franzén, O., Dahlstrom, S., Lum, J.K., Nosten, F., Gil, J.P. (2014). Complex polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 2 gene and its contribution to antimalarial response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 7390-7397.

Vuister, G.W., Kim, S.J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C., Bax, A. (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nature Structural Biology* 1, 605–614.

Vydra, N., Toma, A., Glowala-Kosinska, M., Gogler-Pigłowska, A., Widlak, W. (2013). Overexpression of heat shock transcription factor 1 enhances the resistance of melanoma cells to doxorubicin and paclitaxel. *BMC Cancer* 13, 504.

Wassman, C., Hellberg, A., Tannich, E., Bruchhaus, I. (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and

- peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 26051-26056.
- Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, Jr. S.M., Sistonen, L., Morimoto, R.I. (2009). Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT. *Science* 323, 1063-1066.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual Review of Cell Biology* 11, 441–469.
- Xiao, H., Perisic, O., Lis, J.T. (1991). Cooperative Binding of *Drosophila* Heat Shock Factor to Arrays of a Conserved 5 bp Unit. *Cell* 64, 585-593.
- Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., Ramiro, M. (2007). Amibiasis intestinal: Estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México* 23, 398-407.
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., Gómez, A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 1023-32.
- Yallowitz, A., Ghaleb, A., Garcia, L., Alexandrova, E.M., Marchenko, N. (2018). Heat shock factor 1 confers resistance to lapatinib in ERBB2-positive breast cancer cells. *Cell Death and Disease* 9, 621.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12, 7–8.
- Yamada, Y., Wang, H.Y., Fukuzawa, M., Barton, G., Williams, J.G. (2008). A new family of transcription factors. *Development* 135, 3093-3101.
- Yin, C., Xi, L., Wang, X., Eapen, M., Kukreja, R.C. (2005). Silencing heat shock factor 1 by small interfering RNA abrogates heat shock-induced cardioprotection against ischemia–reperfusion injury in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39, 681-689.

- Zafar, S.A., Hussain, M., Raza, M., Ahmed, H.G.M, Rana, I.A., Sadia B., Atif R.M. (2016). Genome wide analysis of heat shock transcription factor (HSF) family in chickpea and its comparison with *Arabidopsis*. *Plan Omics Journal* 9, 136-141.
- Zhang, H., Pompey, J.M., Singh, U. (2011). RNA interference in *Entamoeba histolytica*: implications for parasite biology and gene silencing. *Future Microbiology* 6, 103-117.
- Zheng, X., Krakowiak, J., Patel, N., Beyzavi, A., Ezike, J., Khalil, A.S., Pincus, D. (2016). Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *eLIFE* 5, e18638.
- Zhong, M., Orosz, A., Wu, C. (1998). Direct Sensing of Heat and Oxidation by *Drosophila* Heat Shock Transcription Factor. *Molecular Cell* 2, 101–108.
- Zuo, J., Baler, R., Dahl, G., Voellmy, R. (1994). Activation of the DNA-Binding Ability of Human Heat Shock Transcription Factor 1 May Involve the Transition from an Intramolecular to an Intermolecular Triple-Stranded Coiled-Coil Structure. *Molecular and Cellular Biology* 14, 7557-7568.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471–480.