



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Efecto del factor de transcripción EhMyb10 sobre genes de *Entamoeba histolytica*
involucrados en la interacción con células epiteliales”**

T E S I S

Que presenta

BIOL. MARIANA SALDIVAR ANAYA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directoras de tesis:

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Comité tutorial:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Ciudad de México

Diciembre 2022

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 1077167 en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) en colaboración con la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM).

Proyecto CF-2019-194163 denominado “Control cotranscripcional de genes relacionados a la virulencia y el enquistamiento de Entamoeba”.

Dedicatoria

A mi amado, Jhosue Arturo Andrade Pérez, quien me ha enseñado a valorar y apreciar el tiempo; me has dado durante muchos años un gran apoyo incondicional. Por todos tus consejos de sabiduría que me han ayudado a madurar y a crecer como persona y que, del mismo modo, me han dado la fuerza y motivación para continuar construyendo nuestro futuro juntos; por tu infinita paciencia durante esas largas pláticas en las que he aprendido a expresar mi sentir y de esta manera, a escuchar y a hacerme escuchar, me has mostrado que todavía hay muchas cosas por aprender y disfrutar. Muchas gracias por haber creído en mi a pesar de todo y por haber estado siempre conmigo en los mejores y más difíciles momentos de estos últimos maravillosos años.

Eres la luz que ha iluminado mi camino. Te amo.

“Love is always patient and kind; it is never jealous, love is never boastful or conceited; it is never rude or selfish; it does not take offense, and is not resentful. Love takes no pleasure in other people's sins but delights in the truth; it is always ready to excuse, to trust, to hope, and to endure whatever comes”.

A walk to remember, 2002.
(Original source: 1 Corinthians 13:4-7)

Agradecimientos

A mis padres. Fernando Saldivar Silva por ser una persona trabajadora, constante, que con todo su esfuerzo intenta administrar su tiempo de la mejor forma posible para nosotros, su familia, por darnos lo mejor, afrontando y aguantando todas las adversidades. A mi madre Ana María Anaya Villicaña por enseñarme a ser trabajadora, administrada y enseñarme a no rendirme a pesar de las circunstancias.

A mis hermanas. Diana Lorena Saldivar Anaya por ser tan dedicada con todo lo que lleva a cabo y por actuar de forma equilibrada. A Jennyfer Andrea Saldivar Anaya por ser tan constante, tan sociable, mostrarme y ayudarme a entender y apreciar un poco más la música. Gracias a ustedes he podido reír, llorar y divertirme mucho. Y es que ambas me han enseñado que hay que luchar por tus sueños. Ustedes han sido una gran compañía en mi vida y me han convertido en su hermana mayor. Si ustedes faltaran, mi vida no sería la misma. Las quiero “podys”.

A la familia Andrade-Pérez. A María Guadalupe Pérez Torres por las largas y amenas charlas en donde me ha dado consejos y me ha permitido expresarme y por ser como una segunda madre para mí. A Arturo Andrade Martínez por su fortaleza y por todo el apoyo que me ha dado. A Mariana Rosalia Andrade Pérez por compartir conmigo sus hobbies y brindarme momentos de risa y felicidad. Muchas gracias a todos por haberme dado la mano, por haberme acogido y por haber llenado mi corazón con el cariño, apoyo, consejos y todo el tiempo que hemos compartido juntos. Muchas gracias.

A mis amistades que me han brindado momentos de paz, tranquilidad, diversión y que me han dado esas ganas de seguir con este vínculo por el resto de nuestras vidas. Las quiero y las aprecio mucho.

Y agradezco a todas esas personas que estuvieron presentes a lo largo de mi vida y que han compartido conmigo momentos que han hecho que mi vida sea tan amena.

Agradecimientos

Al Cinvestav, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría

A la Dra. Abigail Betanzos Fernández y a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga por darme la oportunidad de pertenecer a sus grupos de trabajo, por haber permitido esta colaboración y por brindarme materiales para la realización del mismo. También por apoyarme, escucharme, por sus consejos y su paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores el Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y la Dra. Patricia Talamás Rohana por sus observaciones, críticas y comentarios para apoyar este trabajo.

A Dora Angélica Silva Olivares, por su apoyo en los experimentos, preparación de muestras, el mantenimiento de los diferentes tipos celulares utilizados, su compañía y por sus consejos.

A la Dra. Patricia Cuellar Silva por apoyarme durante esos meses de trabajo, por sus consejos, su apoyo, las pláticas y por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio.

A mis compañeras del Laboratorio en la UACM Claudia, Jacky, Dana, Marlene por todo el tiempo que pasamos juntas, por los consejos, y las buenas charlas durante periodos de estrés.

A mis compañeros del Laboratorio 4 del DIPM Dxine, Anais, Meli, Vicky, Edgar, Francisco y Gaby por todo el tiempo compartido en los Journal tanto en línea como presenciales, por su apoyo, sus consejos, observaciones y amistad durante mi estancia en este laboratorio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Amibiasis	3
1.2. Epidemiología de la amibiasis	3
1.3 <i>Entamoeba histolytica</i>	5
1.4. Ciclo de vida	7
1.5. Patogenia y virulencia.....	8
1.6. Genoma de <i>E. histolytica</i>	11
1.7. Transcripción en <i>E. histolytica</i>	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Factores de transcripción (FTs) en <i>E. histolytica</i>	13
2.2. Proteínas Myb	14
2.2.1. Proteínas Myb en eucariontes	16
2.2.2. Proteínas Myb en <i>E. histolytica</i>	20
2.2.3. EhMyb10.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos particulares	24
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 Análisis bioinformático.....	26
7.1.1. Búsqueda del Elemento de Reconocimiento a Myb (ERM) en los promotores de genes de <i>E. histolytica</i>	26
7.1.2. Clasificación de genes con ERM de acuerdo a su nivel de expresión basal	26
7.1.3. Selección de genes con ERM que modifican su expresión durante la colonización intestinal.....	27

7.1.4. Análisis ontológico de los genes	27
7.1.5. Identificación de motivos conservados en promotores de genes con ERM	27
7.2 Cultivo de <i>E. histolytica</i>	28
7.3 Sobreexpresión de EhMyb10 en trofozoítos.....	28
7.3.1. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	28
7.3.2. Extracción de DNA plasmídico.....	29
7.3.3. Transfección transitoria.....	30
7.3.4. Ensayos de inmunofluorescencia	30
7.4 Análisis de la expresión de genes blanco de EhMyb10 en <i>E. histolytica</i>	31
7.4.1. Extracción y cuantificación de DNA genómico.....	31
7.4.2. Extracción y cuantificación de RNA total.....	31
7.4.3. Tratamiento con DNasa.....	32
7.4.4. Síntesis de cDNA	32
7.4.5. Diseño de oligonucleótidos para PCR.....	32
7.4.6. Análisis de la expresión por RT-PCR	34
7.5 Ensayos de virulencia	35
7.5.1. Cultivo de las líneas celulares epiteliales	35
7.5.2. Medición de resistencia eléctrica transepitelial (RET)	35
7.5.3. Ensayo citopático	35
7.5.4. Análisis estadístico.....	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1. Identificación <i>in silico</i> del ERM en el promotor de genes de <i>E. histolytica</i>	37
8.2. Expresión diferencial de genes con ERM en condiciones basales de cultivo	37
8.3. Correlación de la expresión de genes que presentan el ERM, con la expresión de <i>ehmyb10</i>	38
8.4. Identificación de genes con ERM que modifican su expresión durante la colonización intestinal	39
8.5. Análisis de enriquecimiento de palabras en los posibles genes blanco de EhMyb10	39
8.6. Análisis ontológico de los posibles genes blanco de EhMyb10	41
8.7. Identificación de motivos en el promotor de los posibles genes blanco de EhMyb10	44
8.8. Análisis de la expresión de posibles genes blanco de EhMyb10 en los transcriptomas de colonización intestinal y explantes de colon.....	46

8.9. Análisis de la expresión de los genes seleccionados en condiciones basales de cultivo	48
8.10. Expresión y localización de EhMyb10 en trofozoítos mutantes.....	49
8.11. Expresión de los genes seleccionados en trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	52
8.13. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 sobre la permeabilidad epitelial.....	55
8.14 Efecto de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 sobre el daño citopático en células epiteliales	57
9. DISCUSIÓN.....	59
10. CONCLUSIONES	66
11. PERSPECTIVAS.....	66
12. REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos de amibiasis intestinal y absceso hepático en México en la semana 20 del Boletín Epidemiológico Nacional	5
Tabla 2. Morfología de <i>E. histolytica</i>	6
Tabla 3. Factores de virulencia presentes en <i>E. histolytica</i>	10
Tabla 4. Factores de transcripción identificados en <i>E. histolytica</i>	14
Tabla 5. Repetidos en proteínas Myb.....	15
Tabla 6. Presencia de las proteínas Myb en protozoarios	19
Tabla 7. Familias con DBD-Myb en <i>E. histolytica</i>	20
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes analizados.....	33
Tabla 10. Niveles de expresión de genes con expresión basal.....	37
Tabla 11. Análisis de enriquecimiento de palabras en los genes seleccionados	40
Tabla 12. Clasificación funcional de los posibles genes blanco de EhMyb10.....	44
Tabla 13. Motivos conservados en los genes seleccionados con ERM.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas de vida de <i>E. histolytica</i>	7
Figura 2. Factores y procesos de virulencia en <i>E. histolytica</i>	9
Figura 3. Factores de transcripción Myb.....	16
Figura 4. Estructura de c-Myb humana.....	17
Figura 5. Estructura de los repetidos R2 y R3 de EhMyb10	22
Figura 6. Estrategia experimental general	25
Figura 7. Vector de clonación pKT3M	28
Figura 8. Condiciones de amplificación para la RT-PCR.....	34
Figura 9. Clasificación de los genes que contienen el ERM, según su nivel de expresión en trofozoítos en condiciones basales	38
Figura 10. Análisis ontológico de los posibles genes blanco de EhMyb10	43
Figura 11. Cambios de expresión de los posibles genes blanco de EhMyb10 en diferentes condiciones	47
Figura 12. Amplificación de <i>ehmyb10</i> y posibles genes blanco de trofozoítos en condiciones basales de cultivo.....	48
Figura 13. Sobreexpresión del gen <i>ehmyb10</i>	49
Figura 14. Localización subcelular de la proteína EhMyb10 en trofozoítos transfectados	52
Figura 15. Expresión de los posibles genes blanco en trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10.....	55
Figura 16. RET de células epiteliales incubadas con trofozoítos transfectados.	56
Figura 17. Efecto citopático de trofozoítos transfectados sobre células epiteliales	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMV	Virus de mieloblastosis aviar, del inglés “avian myeloblastosis virus”
BSA	Albúmina de suero bovina
Caco-2	Células de adenocarcinoma de colon humano
°C	Grados centígrados
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrato
DBD	Dominio de unión a DNA, del inglés “DNA-binding domain”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
ERM	Elemento de reconocimiento a Myb
FT	Factor de transcripción
IL	Interleucina
Inr	Secuencia iniciadora de la transcripción independiente de la caja TATA
h	Hora
hpt	Horas post transfección
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
LPPG	Lipopolisacárido de lipopéptidosfoglicana
MDCK	Células epiteliales derivadas de riñón de perro
min	Mínutos
mM	Micromolar
Myb	Del inglés “ <i>Myeloblastosis</i> ”. Son un grupo de genes que se encuentran ampliamente distribuidos en eucariontes. Este grupo de genes lleva el nombre del oncogén viral v-Myb causante de mieloblastosis aviar
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PIC	Complejo de preiniciación de la transcripción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RET	Resistencia eléctrica transepitelial
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SOD	Superóxido dismutasa
SW480	Células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colon humano
TA	Temperatura ambiente
TATA	Secuencia de unión a TBP
TBP	Del inglés “TATA-box binding protein”
TLR	Del inglés “Tool like receptor”
TYI	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero bovino utilizado para cultivar <i>Entamoeba histolytica</i>

RESUMEN

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* tienen la capacidad de invadir y dañar la mucosa intestinal debido a diversos factores de virulencia, cuya expresión transcripcional se encuentra regulada por varios factores de transcripción (FTs). Los FTs más abundantes en este parásito son los tipo Myb, que poseen un dominio de unión al DNA MYB (DBD Myb) altamente conservado. Las proteínas EhMyb se clasifican en tres familias y en la familia I se encuentra EhMyb10, el cual posee dos repetidos (R1 y R2) en su DBD Myb. En trofozoítos que interactúan con células intestinales de ratón o que son incubados con explantes de colon humano, se ha reportado un incremento del transcrito *Ehmyb10*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la contribución de EhMyb10 sobre la expresión de genes que codifican para algunos factores de virulencia, así como su repercusión en la barrera epitelial. En primer lugar, se llevó a cabo un robusto análisis bioinformático, donde los genes de *E. histolytica* expresados en condiciones basales, se clasificaron de acuerdo a su nivel de expresión. Con este análisis se determinó que *Ehmyb10* presenta una expresión media, al igual que otros 162 genes que, además, contienen el elemento de reconocimiento a Myb (ERM) en su promotor y que cambian su expresión (al menos ± 1.5 veces) durante la colonización intestinal. De manera adicional, se llevó a cabo un análisis ontológico para identificar las funciones de estos genes y poder así seleccionar algunos de ellos con funciones relevantes durante la virulencia del parásito. Los genes seleccionados fueron: *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-1*, *hsp70* y el coactivador transcripcional *cotr*. Experimentalmente, para conocer el efecto de EhMyb10 sobre los genes seleccionados y sobre la barrera epitelial se sobreexpresó EhMy10 en trofozoítos. La sobreexpresión se confirmó mediante ensayos de RT-PCR e inmunofluorescencia. En estos trofozoítos, los genes *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2* y *cotr* incrementaron su transcrito y el gen *hsp70* disminuyó su expresión a nivel de mRNA. En cuanto a la homeostasis epitelial, se incrementó la permeabilidad de las células MDCK tratadas con trofozoítos que sobreexpresaron EhMyb10. Además, estos parásitos también produjeron un mayor efecto citopático sobre las células intestinales SW480, en comparación con los trofozoítos control. En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que *E. histolytica* posee genes con el ERM, susceptibles a regulación transcripcional por EhMyb10, dentro de los cuales se encuentran algunos relacionados con la invasión epitelial.

ABSTRACT

The *E. histolytica* trophozoites have the ability to invade and damage the intestinal mucosa by diverse virulence factors, whose transcriptional expression is regulated by several transcription factors (TFs). In this parasite, the most abundant TFs are Myb, which possess a highly conserved DNA MYB binding motif (DBD Myb). EhMyb proteins are classified into three families and EhMyb10 belongs to the family, having two repeats (R1 and R2) in its DBD Myb. In trophozoites interacting with intestinal cells derived from mice or incubated with human colon explants, an increase in the *Ehmyb10* transcript has been reported. Therefore, the aim of this work was to analyze the EhMyb10 contribution to the expression of encoding genes for some virulence factors and its repercussion in the epithelial barrier. First, by performing a robust bioinformatic analysis, the *E. histolytica* genes expressed in basal conditions were classified according to their expression level. It was determined that *Ehmyb10* has a medium expression level, as well as other 162 genes containing the Myb Recognition Element (MRE) in their promotor, and they also change their expression during the intestinal colonization, at least ± 1.5 -fold. In addition, an ontology analysis was carried out to identify the gene functions and thus, select some with relevant roles during parasite virulence. The selected genes were: *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2* and *hsp70*, and the transcriptional coactivator transcriptional *cotr*. Experimentally, to know the EhMyb10 effect upon the selected genes and epithelial barrier, EhMyb10 was overexpressed in trophozoites. The EhMyb10 overexpression was verified by RT-PCR and immunofluorescence assays. In these trophozoites, the *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2* and *cotr* genes increase their transcript and the *hsp70* gene decreases its mRNA level. Regarding epithelial homeostasis, an augment of the permeability of MDCK cells treated with *Ehmyb10*-overexpressing trophozoites was observed. Furthermore, these parasites also produced a greater cytopathic effect upon SW480 intestinal cells, compared to control trophozoites. In resume, our findings demonstrate that *E. histolytica* harbors genes with the MER, susceptible to transcriptional regulation by EhMyb10, and possibly some of them are related to the epithelial invasion.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

La amibiasis o disentería amebiana es una enfermedad infecciosa causada por el parásito *Entamoeba histolytica*. Los huéspedes naturales de *E. histolytica* son los seres humanos y posiblemente algunos primates (Stanley, 2003). Este parásito reside en el intestino grueso y puede persistir durante meses e incluso años, causando una infección asintomática (cuando se encuentra en la luz intestinal) o también puede derivar a una amibiasis invasiva en la cual puede penetrar la mucosa intestinal, provocando colitis amibiana, con síntomas clínicos como dolor abdominal, fatiga, fiebre, inflamación, diarrea, pérdida de peso, úlceras en el colon y disentería con sangre; asimismo puede diseminarse a otros órganos como el hígado, pulmones y cerebro, formando abscesos (Acuna-Soto *et al.*, 2000; Biller *et al.*, 2010; Shirley *et al.*, 2018; SSA, 2016; Weber *et al.*, 2016). A pesar de haberse descubierto hace más de 100 años, la cepa patógena HM1:IMSS fue axenizada en México en el Centro Médico Nacional IMSS en 1967 de un paciente varón adulto que padecía disentería amibiana y ha sido la más utilizada para reproducir las principales características de la amibiasis intestinal y hepática en modelos de esta enfermedad (Biller *et al.*, 2009).

1.2. Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis se ha catalogado como la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios a nivel mundial, ya que prevalece en regiones donde el manejo de residuos y la higiene no es adecuada, resultando en más de 50 millones de infecciones y hasta 100 mil muertes por año. Siendo, además de las primeras 15 causas de diarrea en los niños que viven en países en desarrollo (Adyankar *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2019; Shirley *et al.*, 2018). Aun así, alrededor del 90% de las infecciones por *E. histolytica* son asintomáticas (Kantor *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021).

La amibiasis puede afectar a hombres y mujeres de todas las edades por igual, sin embargo, se ha observado que el genotipo sexual, la interacción de las hormonas y predisposiciones cromosómicas permiten que exista una variación en el sistema inmunológico entre un sexo y otro, por lo que se ha visto que, en general, los hombres son

más susceptibles de presentar la amibiasis invasiva que las mujeres (Acuna-Soto *et al.*, 2000; Gay *et al.*, 2021; Hernández *et al.*, 2021). Los factores que determinan la patogenicidad de *E. histolytica* no están del todo determinados, pero se ha visto que, influyen en la susceptibilidad de los individuos, por ejemplo, las características del huésped, del parásito y el ambiente (Chacín, 2013). Otros factores como el embarazo, tratamiento con corticoesteroides, desnutrición y alcoholismo, aumentan el riesgo de complicaciones y mortalidad cuando se presenta una infección por *E. histolytica* (Shirley y Moonah, 2016; Stanley, 2003).

Los factores de riesgo que pueden derivar en infección, se presentan cuando se ingieren alimentos o agua contaminados con quistes de *E. histolytica*, de forma fecal-oral, a través de prácticas sexuales orales y anales, por la falta de higiene en las manos, o por tener un contacto cercano con animales infectados (Stanley, 2003; Wilson *et al.*, 2012). La alta incidencia de estos factores se presenta en países donde existen condiciones de hacinamiento y en donde la regulación sanitaria es limitada o no está bien establecida, ya que, en estos entornos la exposición al parásito es muy alta (Chou y Austin, 2021; Haque *et al.*, 2003). Los países que se han visto más afectados por la amibiasis incluyen a México, India, muchos de África, varios de América central y América del Sur. En cambio, en países donde las condiciones de salubridad están mejor reguladas, como Estados Unidos, las infecciones por amibiasis son raras (5 muertes por año), siendo la tercera causa más común de diarrea crónica en individuos que viajaron o migraron de zonas endémicas (Chou y Austin, 2021; Ross *et al.*, 2013; Shirley *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2016).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) se encarga de informar sobre nuevos casos de más de 100 enfermedades, además de proporcionar infografías de diversos temas relacionados con la salud y efemérides. En su Boletín Epidemiológico Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en el año 2021 y 2022 se han reportado casos de enfermedades intestinales, de los cuales se incluyen datos de amibiasis tanto intestinal como de absceso hepático (Tabla 1).

Tabla 1. Casos de amibiasis intestinal y absceso hepático en México en la semana 20 del Boletín Epidemiológico Nacional

Datos registrados	2021	2022
Enfermedades intestinales	1,069,941	1,220,300
Amibiasis intestinal	39,995	42,064
Absceso hepático	139	187

*SINAVE. Boletín epidemiológico (2 junio, 2022). Vol. 39, semana 20. Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica.

1.3 *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es una amiba parásito anaerobia y uno de los protozoarios más patógenos identificados (Ragland *et al.*, 1994). Este parásito presenta dos estadios diferentes durante su ciclo de vida que van a depender del sitio donde se encuentre: el quiste infeccioso y el trofozoíto ameboide (Figura 1). El quiste es la forma de vida resistente, que puede sobrevivir en el medio ambiente durante un periodo de tiempo prolongado, mientras que el trofozoíto es la forma activa, móvil e invasiva que puede penetrar en la mucosa intestinal y destruir células epiteliales e inflamatorias, pero que no puede vivir fuera del huésped (Chou y Austin, 2021) (Tabla 2).

Tabla 2. Morfología de *E. histolytica*

Estadio de vida	Trofozoíto	Quiste
Características	<p>De forma variable (pleomorfa) y tiene un tamaño que va de los 10-50 μm. Presenta un núcleo bien estructurado, con un tamaño que va de 4-7 μm. Carece de mitocondrias y de otros organelos típicos, pero obtiene su energía por conversión anaerobia de glucosa y piruvato. Su citoplasma contiene numerosas vacuolas delimitadas por una membrana y que son generadas por la alta tasa de fagocitosis y pinocitosis de este organismo. Tiene la capacidad de formar estructuras como pseudópodos, gracias a su citoesqueleto formado de actina y miosina. Estas estructuras contribuyen con su capacidad de alimentarse y moverse sobre cualquier superficie, dándole el poder de invadir y destruir el tejido del huésped. Se alimenta de bacterias y partículas de alimentos en el colon. Se divide por fisión binaria.</p>	<p>Tiene una forma redondeada-ovoide y un tamaño de 10-20 μm de diámetro. Dependiendo su madurez, presenta de uno a cuatro núcleos. Su forma se ve delimitada por una pared celular constituida principalmente de carbohidratos, proteínas de lectina de unión a quitina y quitinasa, que le permite sobrevivir al pH estomacal y llegar hasta el intestino. En la parte final del íleon o en el colon, se desenquista y se forma el trofozoíto. El enquistamiento del parásito es un proceso poco estudiado que se produce por factores como la escasez de nutrientes o el estrés; este proceso se da en el colon para así completar su ciclo de vida y excretarse al medio ambiente por las heces. Los quistes son los únicos responsables de la propagación de la enfermedad, porque los trofozoítos no tienen la capacidad de enfrentarse a ambientes externos.</p>
Referencias	<p>Stanley, 2003; Chávez y González, 2013; Saavedra y Olivos, 2017</p>	<p>Stanley, 2003; Saavedra y Olivos, 2017; Rawat <i>et al.</i>, 2020.</p>

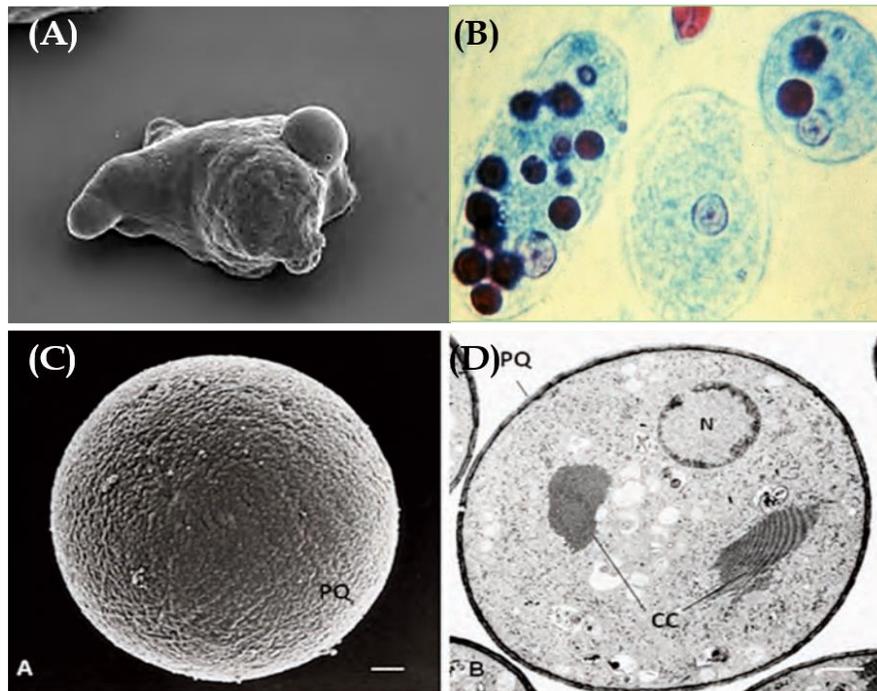


Figura 1. Formas de vida de *E. histolytica*. **A)** Trofozoíto observado en un microscopio electrónico de barrido. **B)** Trofozoítos después de ingerir eritrocitos, tinción hematoxilina-hierro. **C)** Quiste observado en un microscopio electrónico de barrido. **D)** Quiste tratado con rojo de rutenio y observado en un microscopio electrónico de transmisión, donde se distingue el núcleo (N), cuerpos corpusculares (CC) y la pared del quiste (PQ) (modificado de Chávez y González, 2013).

1.4. Ciclo de vida

La infección ocurre luego de que el huésped ingiere alimentos o agua contaminados con quistes maduros. Cuando alcanzan la región del íleon terminal del intestino delgado, los quistes pierden su pared quitinosa en un proceso poco estudiado llamado desenquistamiento, del cual emergen los trofozoítos (Rawat *et al.*, 2020). El colon humano se encuentra recubierto por una mucosidad que actúa como un lubricante que facilita el tránsito del bolo alimenticio, como capa protectora del epitelio subyacente y que la protege del estrés mecánico y contra patógenos (Thibeaux *et al.*, 2013). Los trofozoítos de *E. histolytica* interactúan con el epitelio intestinal y colonizan el sitio. Algunos pueden destruir la capa mucosa y la matriz extracelular, lo que les permite el acceso al torrente sanguíneo para dispersarse hacia el hígado, pulmones, cerebro y otras zonas del cuerpo, convirtiéndose en una enfermedad invasiva. Aún se desconocen los mecanismos que dirigen el enquistamiento de los

trofozoítos, sin embargo, los quistes se forman cuando el parásito llega al colon y después son expulsados en las heces hacia el ambiente, donde pueden infectar a otros humanos para así continuar con su ciclo de vida (Chávez y González, 2013; Haque *et al.*, 2003; Singh y Ehrenkauffer 2009).

1.5. Patogenia y virulencia

Luego del desenquistamiento, el trofozoíto puede colonizar como comensal o producir una amibiasis invasiva. Cuando es comensal, los trofozoítos llegan y se establecen en la luz intestinal y se alimentan de la microbiota residente (que vive en la mucosa) por fagocitosis (Weber *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2012). Cuando es una amibiasis invasiva, diferentes factores de virulencia en los trofozoítos, degradan la capa mucosa del colon, atraviesan las células epiteliales del huésped y viajan a través de la circulación sanguínea hasta el hígado, donde unos cuantos trofozoítos forman abscesos al rodear hepatocitos muertos y restos celulares (Stanley, 2003; Wilson *et al.*, 2012). Eventualmente, la infección entra a una fase aguda, en la cual se puede presentar disentería (dolor abdominal, fiebre, diarrea mucosa con sangre, inflamación y ulceración intestinal) (Weber *et al.*, 2016).

La capacidad que tiene *E. histolytica* para invadir el tejido del huésped depende de diferentes factores de virulencia. Los trofozoítos entran en contacto con la capa de moco intestinal por medio de lectinas que se unen a las mucinas colónicas (Singh y Ehrenkauffer 2009) y después de adherirse a ella, la degradan por procesos citolíticos para llegar a la superficie del epitelio como el aumento de Ca^{2+} intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pérdida de integridad de la membrana, fragmentación del DNA y apoptosis (Bansal *et al.*, 2009; Marie y Petri, 2014). Los trofozoítos también contienen enzimas protectoras que evitan la respuesta inmunitaria innata y adaptativa agresiva del huésped, entre otros (Chou y Austin, 2011; Guo *et al.*, 2007). Los diferentes procesos y proteínas de virulencia de *E. histolytica* se pueden visualizar en la figura 2 y se resumen en la Tabla 3.

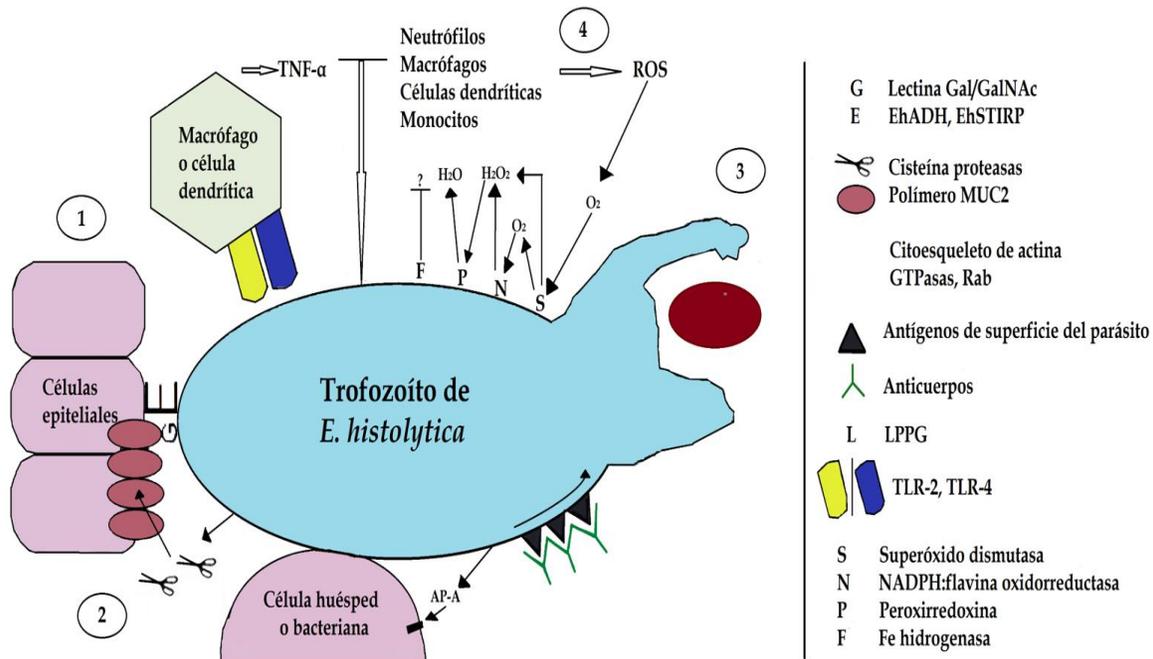


Figura 2. Factores y procesos de virulencia en *E. histolytica*. 1) Adhesión: los trofozoítos tienen contacto con la matriz extracelular epitelial mediante factores como la lectina Gal/GaNAc, EhADH y EhSTIRP. 2) Citólisis: después del contacto con la célula blanco, *E. histolytica* secreta enzimas proteolíticas que degradan la capa mucosa como EhCP-A5, colagenasas, fosfolipasas, proteinasas, catepsina B, etc. Los amebaporos como APA-A, APA-B, APA-C favorecen el proceso de lisis al provocar choque osmótico en la membrana plasmática de la célula blanco. 3) Fagocitosis: le permite a *E. histolytica* alimentarse de bacterias entéricas, de residuos del bolo alimenticio, etc. Este proceso es regulado por vías de señalización que controlan la estructura del citoesqueleto (actina y miosina) y el tráfico vesicular (GTPasas). 4) Resistencia al estrés oxidante: es ocasionado cuando el huésped libera neutrófilos, macrófagos, monocitos y células dendríticas que liberan ROS y NOS, las cuales amenazan a los trofozoítos. Los parásitos contrarrestan esta acción, gracias a la presencia de algunas moléculas de superficie, como la superóxido dismutasa (SOD), NADPH, peroxirredoxina y Fe-hidrogenasa, quienes reducen las ROS hasta convertirlos en agua (modificado de Wilson *et al.*, 2012).

Tabla 3. Factores de virulencia presentes en *E. histolytica*

Factor de virulencia	Ejemplos	Referencias
Adhesión	Unión de la amiba a las células de la mucosa a través de la lectina específica de galactosa y la N-acetil-D-galactosamina Gal/GalNAc, Glicosilasas, Adhesina como EhADH, proteínas ricas en serina (SREHP) de 52 kDa.	Chadee <i>et al.</i> , 1987 Haque <i>et al.</i> , 2003 Petri <i>et al.</i> , 2002
Citólisis	Después del contacto, los trofozoítos lisan las células del huésped debido a que aumenta la acción de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos como cisteína proteasas (p. ej. EhCP1, EhCP2, EhCP5 y EhCP112, CP-A5), Amebaporos: fosfolipasas amibianas, Glicosidasas, β -amilasa, Proteinasas, lo que disminuye la capa mucosa	Campos <i>et al.</i> , 2011 Chou y Austin, 2011 Leippe y Herbst, 2004 Martínez-López <i>et al.</i> , 2004 Stanley, 2003
Fagocitosis	Los trofozoítos ingieren líquidos, fragmentos celulares, partículas inertes, glóbulos rojos u otras células del huésped debido a la acción de Componentes del citoesqueleto (Actina, Histona H3), Moléculas de superficie (M17), Cisteína proteasas, GTPasas, EhRabs (EhRabA, EhRabB, EhRab5, EhRab7A, EhRab7B, EhRab8A, EhRab11B)	Cornick y Chadee, 2017 Naiyer <i>et al.</i> , 2019 Nakada-Tsukui <i>et al.</i> , 2010 Verma <i>et al.</i> , 2020
Respuesta inmune	Inflamación del tejido y formación de úlceras en el huésped. El Lipopéptidofosfoglicano (LPPG) en la superficie de membrana del parásito es reconocido por TLR2, TLR4 y TLR6 del huésped, resultando en la activación de NF- κ B y la producción de diferentes citocinas como IL-8, IL-10 y TNF α . La infección induce apoptosis de las células del huésped, lo que requiere la activación de caspasas, independiente de Fas y TNF α .	Lotter <i>et al.</i> , 2009 Stanley, 2003 Wong-Baeza <i>et al.</i> , 2010
Resistencia al estrés oxidante	Las NOS y ROS que son liberadas por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas son contrarrestadas por los trofozoítos con la acción de: Superóxido dismutasa (SOD), que genera H ₂ O ₂ en presencia de O ₂ , NADPH, que cataliza la reducción de O ₂ a H ₂ O ₂ , Peroxiredoxina, que reduce el H ₂ O ₂ en H ₂ O, Fe-hidrogenasa participa en la supervivencia al estrés oxidativo, lo que inhibe la respuesta inmune del huésped.	Guo <i>et al.</i> , 2007

1.6. Genoma de *E. histolytica*

Un mejor entendimiento de la biología de *E. histolytica*, se alcanzó con la primera secuencia de su genoma publicado en 2005 por Loftus *et al.* (2005). Esto permitió comprender cuales genes son funcionalmente importantes en este organismo y cuales son cruciales en su proceso de patogenicidad. Inicialmente se predijeron 9,938 genes codificantes y, posteriormente, se realizó un re-ensamblaje y re- anotación del genoma en el trabajo de Lorenzi *et al.*, 2010, en el cual propusieron 8,201 genes con un tamaño promedio de 1,280 pb; dándose una reducción de ~1,000 genes debido a la eliminación de parálogos aparentemente artificiales, modelos de genes muy cortos y genes truncados. El genoma de *E. histolytica* tiene un tamaño de ~20 Mb organizados en 1,496 andamios. Puede considerarse compacto, ya que las regiones intergénicas tienen un tamaño aproximado de 1,223 pb (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010, Wilson *et al.*, 2019). En el genoma se identificaron 897 familias de genes que codifican para 4,564 proteínas (56% del proteoma) y 3,637 proteínas “huérfanas”. De las familias de proteínas podemos encontrar: proteínas de unión a GTP, proteínas ricas en leucinas similares a BspA, proteínas con dominios cinasa, AIG1, de choque térmico, etc (Lorenzi *et al.*, 2010). Aproximadamente 20% del genoma consta de elementos transponibles que tienen tendencia a formar grupos que contribuyen a la inestabilidad cromosómica y, por lo tanto, a la variación genómica y evolución de *E. histolytica* (Lorenzi *et al.*, 2008, Lorenzi *et al.*, 2010).

1.7. Transcripción en *E. histolytica*

La transcripción es el proceso en el cual se forma una molécula de RNA a partir del DNA de la célula. Así, la célula puede expresar las “instrucciones” de sus genes, obteniendo muchas copias idénticas, además de que cada molécula de RNA puede sintetizar una gran cantidad de proteínas cuando sea necesario. Para transcribir de forma correcta un gen, la RNA polimerasa II transcribe la mayoría de los genes, pero necesita de proteínas llamadas “factores generales de transcripción” (FTs) para colocarse de forma correcta sobre la región promotora (Alberts *et al.*, 2015). El promotor mínimo (*core promoter* según su nombre en inglés) de *E. histolytica* tiene una estructura donde se han identificado tres elementos: una caja TATA (GTATTTAAAG/C), aproximadamente 30 nt río arriba del sitio de inicio de la transcripción; la secuencia iniciadora (Inr) (AAAAATTCA); y una secuencia única en este

parásito, la caja GAAC (AATGAACT), que se ubica de forma variable entre la caja TATA y la secuencia Inr y que controla el inicio de la transcripción independientemente de la caja TATA e Inr (Purdy *et al.*, 1996; Singh y Rogers, 1998).

Los primeros análisis del genoma de *E. histolytica*, mostraron la presencia de una RNA polimerasa II única (RNAPol II) resistente a α -amanitina (Lioutas y Tannich, 1995). Esta enzima tiene un dominio C-terminal (CTD) que carece de la secuencia repetida de hetapéptidos; sin embargo, cuenta con secuencia enriquecida en serinas, las cuales pueden fosforilarse, por lo que es posible que la RNAPol II también sea blanco de cinasas y fosfatasa para regular su actividad catalítica (Clark *et al.*, 2007). También se han identificado genes que codifican para FTs como: TFII E, F y H, TBP (*TATA-box binding protein* por sus siglas en inglés) y proteínas relacionadas (TRFs) (Castañón *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 1997), factores asociados a TBP (TAFs) 1, 5, 6, 10, 12 y 13, proteínas modificadoras de histonas, proteínas de cisteína, cinasas relacionadas con la transducción de señales, metiltransferasas y proteínas relacionadas a FTs o que se unen al DNA (Pearson y Singh, 2010).

A partir de la publicación de la primera secuencia del genoma de *E. histolytica* por Loftus *et al.* (2005), se realizó una variedad de estudios utilizando microarreglos de hibridación y RNA-seq para analizar el transcriptoma y conocer el perfil de expresión génica de este parásito (Hackney *et al.*, 2007; Hon *et al.*, 2013; Naiyer *et al.*, 2019; Weber *et al.*, 2016). En el trabajo de Hackney *et al.* (2007) y Naiyer *et al.* (2019) se clasificaron los genes según sus niveles de expresión, construyendo histogramas para identificar genes con expresión diferencial con respecto al estado basal. Además, se reconocieron motivos reguladores en la región promotora de los genes que presentan un nivel de expresión similar, utilizando estadística Bayesiana (Hackney *et al.*, 2007). Los motivos reguladores se buscaron tanto río arriba como río abajo del codón ATG, solos o en combinación con otros sitios que podrían estar asociados con una alta expresión génica y que son necesarios para una transcripción eficiente. Cabe mencionar que también se identificaron algunos genes relacionados con la virulencia y supervivencia del parásito, como amebaporos y cisteína proteasas que mostraron una expresión alta y, otros como los pertenecientes a la familia AIG1, en categorías de expresión media y baja (Naiyer *et al.*, 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1. Factores de transcripción (FTs) en *E. histolytica*

Los FTs son proteínas que se unen a secuencias cortas de DNA, de manera específica a través de sus dominios de unión al DNA (DBD: *DNA-binding domain*, por sus siglas en inglés), localizadas en los promotores de genes. Los organismos eucariontes se distinguen por tener una gran diversidad de FTs específicos de cada familia (Iyer *et al.*, 2005), los cuales regulan la expresión genica al interactuar en el complejo de pre-iniciación, modulando la actividad de la RNA polimerasa, lo que induce o inhibe la transcripción de los genes en un momento particular y en respuesta a diferentes señales extracelulares, por el sistema regulador denominado regulón (Lee e Young, 2000; Nakashima *et al.*, 2009).

Antes de comenzar la transcripción, en organismos eucariontes el complejo de preiniciación (PIC, por sus siglas en inglés) se ensambla alrededor del sitio de inicio de la transcripción, después PIC interacciona con otros motivos río arriba para facilitar la función de la RNA polimerasa II, luego para iniciar la transcripción, la proteína TBP que se ha establecido como un FT universal y esencial requerido por los tres tipos de RNA polimerasa para reconocer el promotor e iniciar la transcripción en eucariontes, se une al DNA y recluta proteínas en PIC (Berk, 1999; Hernández *et al.*, 1993). La composición y secuencia del promotor mínimo dirige la formación de PIC y define el sitio de inicio de la transcripción, lo que implica la interacción de los FTs generales como TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH, que se ensamblan en el promotor central antes de la transcripción (Hochheimer y Tjian 2003). Las secuencias que reconocen estos factores se encuentran río arriba del sitio Inr (Loftus *et al.*, 2015).

E. histolytica posee FTs similares a los del humano y son capaces de modular la actividad transcripcional de los genes; además, reconocen secuencias de DNA en aproximadamente 500 pb río arriba del promotor mínimo (Azuara-Liceaga, 2005; Romero *et al.*, 2007). En el genoma de este parásito se han identificado genes que codifican para factores de transcripción similares a los de los eucariontes superiores como: Myb, bZIP, C2H2Znfinger, CBF/NYA, HMG1, WRKY, STAT y HSE que requiere de uno o más factores putativos similares a HSTF. Los FTs con dominio Myb son los predominantes en *E. histolytica* (Iyer *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2017).

De todos los FTs identificados en este parásito, solo se han caracterizado algunos pocos y se encuentran implicados en diversos procesos (Tabla 4).

Tabla 4. Factores de transcripción identificados en *E. histolytica*.

Función	Factor de transcripción	Referencias
Enquistamiento	NF-Y	Manna y Singh, 2019
	EhMyb-dr	Ehrenkaufner <i>et al.</i> , 2007
	ERM-BP	Manna <i>et al.</i> , 2018
Colonización intestinal	EhHMGB1	Abhyankar <i>et al.</i> , 2008
	EhMyb10	Meneses <i>et al.</i> , 2010
	EhMyb-SHAQKYF	Gilchrist <i>et al.</i> , 2006
Virulencia	URE3-BP	Gilchrist <i>et al.</i> , 2001
	EhURE1BP (EhTSN)	Cázares-Apatiga <i>et al.</i> , 2017
	EhEBP1	Gilchrist <i>et al.</i> , 2001
	EhEBP2	Schaenman <i>et al.</i> , 2001
	EhGATA	Huerta <i>et al.</i> , 2020
Otros	TATA-box binding protein (EhTBP)	Luna-Arias <i>et al.</i> , 1999 de Dios <i>et al.</i> , 2005
	C/EBP	Gómez <i>et al.</i> , 1998 Marchat <i>et al.</i> , 2002
	Ehp53	Mendoza <i>et al.</i> , 2003
	EhPC4	Hernández de la Cruz <i>et al.</i> , 2016

2.2. Proteínas Myb

La familia de genes *myb* debe su nombre al oncogén *v-myb* del virus de mieloblastosis aviar (AMV, *myeloblastosis* por su nombre en inglés), que causa leucemia aguda en animales y transforma células hematopoyéticas en cultivo y fue el primer gen *myb* en identificarse (Ganter y Lipsick, 1999; Lipsick y Wang, 1999). Esta familia de genes está ampliamente distribuida en todos los eucariontes, desde los unicelulares hasta los mamíferos y plantas. Se le atribuyen muchas funciones durante procesos vitales para la célula como: la regulación del ciclo celular, la diferenciación y para mantener la integridad del genoma, ya sea como FTs,

proteínas de unión a telómeros o participando en el *splicing* (Dubos *et al.*, 2010). De forma general, las proteínas Myb se caracterizan por tener un Dominio de unión al DNA tipo Myb (DBD-Myb) conformado por repetidos imperfectos (de uno a cuatro), los cuales están formados por un número variable de aminoácidos (alrededor de 50-54). Cada repetido presenta una estructura de tres α -hélices, donde la segunda y tercera α -hélices de cada uno de los repetidos forman un arreglo hélice-giro-hélice (Du *et al.*, 2015; Dubos *et al.*, 2010), con tres residuos de triptófano separados por 18 ó 19 aminoácidos y formando un núcleo hidrofóbico en la estructura 3D (Dubos *et al.*, 2010; Lipsick, 1996, Ogata *et al.*, 1996; Oh y Reddy, 1999). La tercera hélice se intercala en el surco principal del DNA, por lo que aquí se da el sitio de reconocimiento (Azuara *et al.*, 2007; Dubos *et al.*, 2010; Oh y Reddy, 1999).

En la Tabla 5 y Figura 3, se muestran las proteínas Myb descritas hasta el momento y el número de repetidos que presentan en los diferentes organismos (Dubos *et al.*, 2010; Oh y Reddy, 1999).

Tabla 5. Repetidos en proteínas Myb

Proteína Myb	Número de repetidos	Estructura
R1-Myb	1	1R-Myb
2R-Myb	2	R2R3-Myb
3R-Myb	3	R1R2R3-Myb
4R-Myb	4	R1R2R3R1/2-Myb

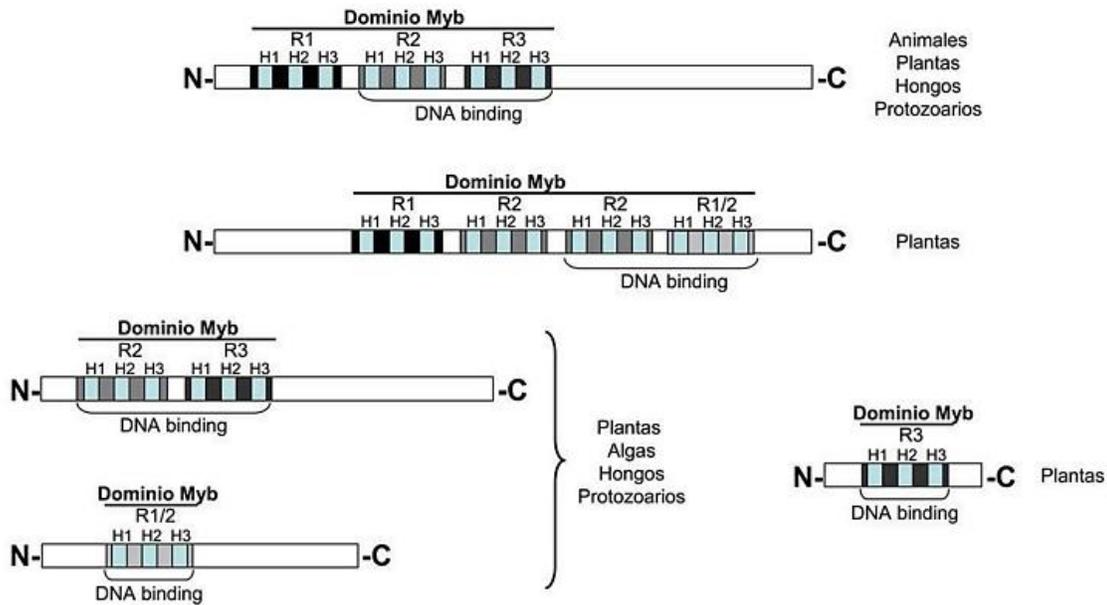


Figura 3. Factores de transcripción Myb. Se muestra el número y posición de los repetidos y se señala en qué organismos se han identificado (tomado de Arratia y Aguirre, 2013).

Diferentes análisis han demostrado que los repetidos R2 y R3 son estrictamente necesarios para la unión de Myb con el DNA, ya que interactúan con el surco principal y se unen de forma cooperativa al motivo de secuencia de DNA específico, mientras que R1 ayuda a estabilizar el complejo formado por R2R3-DNA (Dubos *et al.*, 2010; Oh y Reddy, 1999). Posteriormente, se encontró que existía un motivo altamente conservado, sin la estructura canónica de Myb en las familias R1, al que se denominó SHAQKYF (Thibeaux *et al.*, 2013). La proteína con este dominio, conocida como Myb-SHAQKYF, se ha encontrado principalmente en plantas como *Glycine max* (soya), *Oryza sativa* (arroz), *Arabidopsis thaliana* (de la familia de las brasicáceas), *Solanum tuberosum* (papa) y *Solanum lycopersicum* (jitomate); en algas como el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*; y en amibas como *Dictyostelium discoideum* y *E. histolytica* (Cárdenas *et al.*, 2021).

2.2.1. Proteínas Myb en eucariontes

Se han identificado tres genes relacionados con *v-myb*: *c-myb*, *A-myb* y *B-myb* en vertebrados, insectos, hongos y mohos mucilaginosos (Lipsick, 1996; Weston, 1998). Estas proteínas Myb poseen un DBD altamente conservado de tres repetidos cerca de su extremo

amino, además de que se ha podido identificar un dominio de activación transcripcional en la sección hidrofílica (parte central) presente en las proteínas *c-myb* y *A-myb*, pero no en *B-Myb* y un dominio regulador conservado en la sección carboxilo terminal (Figura 4) (Arratia y Aguirre; Lipsick, 1996; Oh y Reddy, 1999). *A-myb* y *B-myb* que también contienen el DBD-Myb y comparten homología con regiones de *c-myb* (Weston, 1998). *A-myb* se encontró que se expresa predominantemente en células germinales, células epiteliales mamarias de ratones preñados, en ovarios, centros germinales del bazo (células B) y en el sistema nervioso central durante el desarrollo (Arratia y Aguirre, 2013; Davidson *et al.*, 2013). *B-myb* tiene una expresión ubicua y se ha implicado en el control de la proliferación celular, en especial en la transición G1/S del ciclo celular (Bergholtz *et al.*, 2001; Sitzermann *et al.*, 1996). El oncogén viral *v-myb* del AMV causante de leucemia aguda en animales se ha comparado con *c-myb*, ya que ambas están envueltas en procesos que afectan el crecimiento y la diferenciación en varios tipos celulares (Lipsick y Wang, 1999; Weston y Bishop, 1989). Con respecto a *c-Myb*, éste posee repetidos R1-R2-R3 y se ha reconocido como la estructura canónica de los genes *myb* (Figura 4).

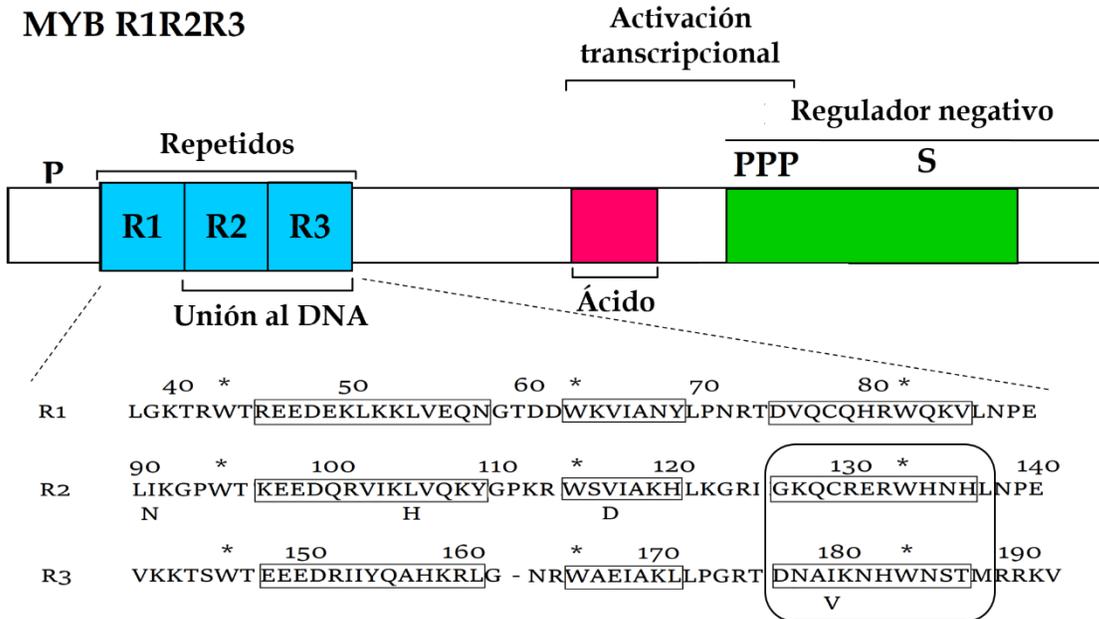


Figura 4. Estructura de *c-Myb* humana. El DBD está compuesto por una serie de repetidos altamente conservados (azul). En magenta se marca el dominio de activación transcripcional ácido (ausente en *B-Myb* y en proteínas *Myb* de invertebrados). En verde se marca el dominio regulador negativo conservado. P indica los sitios de fosforilación. S indica sitios de SUMOilación. El alineamiento en la parte inferior muestra la secuencia de aminoácidos en cada uno de los repetidos.

Los triptófanos conservados se encuentran marcados con asteriscos. Cada repetido conserva la estructura de tres α -hélices, donde la segunda y la tercera hélice se intercalan con el surco principal del DNA, siendo el sitio donde se da el reconocimiento (enmarcado en negro). Modificado de Davidson *et al.*, (2013)

A diferencia de los animales, en plantas las proteínas Myb son los FTs más abundantes, ya que se han identificado cientos de genes *myb* en diferentes organismos, de los cuales el 40-60% comparten homología con *c-myb* de vertebrados (Dubos *et al.*, 2010, Arratia y Aguirre, 2013). Las proteínas Myb participan en la morfogénesis celular y en el control del ciclo celular, regulan el metabolismo primario y secundario, la fotosíntesis, el movimiento y el ciclo circadiano, contribuyen en la respuesta al estrés biótico y abiótico para la formación de la raíz y el control de la biosíntesis de la pared celular, entre muchas otras funciones (Dubos *et al.*, 2010, Arratia y Aguirre, 2013; Feller *et al.*, 2011). En estos organismos se identificó que el DBD-Myb se encuentra ricamente conservado y contiene de 1 a 4 repetidos imperfectos (R0, R1, R2 y R3) (Hong *et al.*, 2022). Las proteínas que contienen DBD R2R3-Myb son la familia más grande de FTs en plantas (Rabinowics *et al.*, 1999).

Los parásitos protozoarios requieren de un control fino y preciso de su expresión génica. Con estudios recientes se ha identificado que varios procesos involucrados en la regulación de la expresión génica que requieren de componentes entre los cuales se encuentran los FTs (Gómez *et al.*, 2010; Walters y Temesvari, 2021). De los FTs identificados en parásitos prorozoarios, las proteínas Myb se encontró que participan en procesos como en la patogenicidad, la diferenciación celular y la evasión al sistema inmunitario del huésped, entre otros eventos celulares, ya que deben mantener un control muy estricto en la expresión de genes implicados en estos mecanismos (Gómez *et al.*, 2010). Algunos de los miembros de la familia Myb identificados en protozoarios se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Presencia de las proteínas Myb en protozoarios

Organismo	Factores Myb	Función	Referencia
<i>Plasmodium falciparum</i>	PfMyb1: Homólogo de Myb1	Necesario para el crecimiento dentro del eritrocito y regula genes clave involucrados en la regulación y progresión del ciclo celular	Gissot <i>et al.</i> , 2005
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TvMyb1-3	Reprime o activa ap65-1. Se une a MRE-1 y MRE-2f	Ong <i>et al.</i> , 2006 Jiang <i>et al.</i> , 2011
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DdMyb1, MybR1R2R3, DdMYB2	Participan en la expresión del gen ACA, en la quimiotaxis y la agregación y diferenciación celular	Otsuka y Van Haaster, 1998 Fukuzawa <i>et al.</i> , 2006
	MybR1R2R3, DdMyb3	Se relacionan con la maduración de esporas y la síntesis de SDF-1 y SDF-2	
	MybR1R2R3, Myb E, MybSHAQKY	Están involucrados con la formación del tallo y cuerpo fructífero)	
<i>Giardia lamblia</i>	gMb2, MybR1R1	Relacionados con la síntesis de proteínas de la pared del quiste, durante el proceso de enquistamiento	Huang <i>et al.</i> , 2008 Sun <i>et al.</i> , 2002
<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania amazonensis</i>	TRF-like (TRF1 y TRF2)	Involucrados con la protección de los telómeros del extremo cromosómico	da Siva <i>et al.</i> , 2010 Li <i>et al.</i> , 2005
<i>Toxoplasma gondii</i>	BFD1 Myb,R2R3	Diferenciación de taquizoíto a bradizoíto	Waldman <i>et al.</i> , 2020
	EhMyb-dr, MybSHAQKY,	Regulan la conversión de estadio	Ehrenkauf <i>et al.</i> , 2009
<i>Entamoeba histolytica</i>	MybR2R3, EhMyb10	Regulación transcripcional de genes que participan en transducción, transporte vesicular, choque térmico y virulencia	Meneses <i>et al.</i> , 2010
	EhTRF-like	Proteger el DNA telomérico	Rendón-Gandarilla <i>et al.</i> , 2018

2.2.2. Proteínas Myb en *E. histolytica*

Con el análisis filogenético del DBD se predijo que las proteínas Myb constituyen los FTs específicos más abundantes en *E. histolytica* (Iyet *et al.*, 2008). Para determinar el papel de las proteínas que contienen el DBD-Myb en *E. histolytica*, se realizó un estudio genómico en el que se utilizaron los marcos de lectura abierta que codifican para DBD-Myb y comparando la secuencia con *c-myb* de humano, se identificaron 32 proteínas Myb que tienen longitudes que van desde los 93 hasta los 707 aminoácidos. De estas proteínas, 15 poseen repetidos del tipo DBD-R2R3Myb y 17 tienen una repetición R2 o R3. Mediante análisis de inferencia filogenética y homología, se clasificó a la mayoría de las proteínas Myb en tres familias: 14 proteínas en la familia I (EhMybR2R3), 5 proteínas en la familia II (proteínas de unión a telómeros) y 9 en la familia III (EhMybSHAQKYF), (Meneses *et al.*, 2010) (Tabla 7). Las proteínas teloméricas de la familia II de *E. histolytica* tienen una función similar a las proteínas homólogas TRF1 y TRF2 humanas, las cuales protegen los extremos de los telómeros (Fairall *et al.*, 2001; Rendón *et al.*, 2018). Las familias I y III están relacionadas a la función de FTs, ya que la familia I exhibe homología y alta identidad con el FT c-Myb humano, corroborando su función como FT en el trabajo de Meneses *et al.*, (2010), mientras que a familia III que agrupa proteínas SHAQKYF pueden formar complejos DNA-proteína de forma específica (Meneses *et al.*, 2010).

Tabla 7. Familias con DBD-Myb en *E. histolytica*

Familia	Número de dominios	Referencias
I	Contienen dos DBD (MybR2R3) y son las que presentan mayor homología con c-Myb y estructuralmente al DBD Myb de las plantas.	Meneses <i>et al.</i> , 2010 Pearson y Singh, 2010
II	Presentan un solo DBD. Esta familia es similar a proteínas humanas de unión a telómeros.	Pearson y Singh, 2010
III	Contienen un solo dominio DBD. Esta familia es similar a proteínas SHAQKYF presentes en algas y <i>Dictyostelium discoideum</i>	Meneses <i>et al.</i> , 2010 Pearson y Singh, 2010

El primer FT con DBD-Myb descrito en *E. histolytica* fue EhMyb-dr, perteneciente a la familia SHAKQY, teniendo solo uno o dos dominios Myb y compartiendo un motivo conservado (SH[A/L]QKY[R/F]) (Rose *et al.*, 1999). A través de este dominio, EhMyb-dr

interactúa con motivos ricos en C en promotores de genes relacionados con el proceso de enquistamiento. EhMyb-dr juega un papel importante durante el desarrollo de este parásito, ya que regula la expresión de varios genes específicos en cada etapa de conversión de estadio en su ciclo de vida, (Ehrenkauffer *et al.*, 2009).

Otro FT Myb es EhMybS (EhMybS3), que cuenta con DBD-Myb SHAQKF similar a los Myb de la familia Reveille (RVE), importantes en la regulación del ciclo circadiano de las plantas, y mediante análisis *in silico* se identificó que poseen un DBD-Myb altamente conservado, estructurado y con residuos intrínsecamente desordenados. EhMybS3 es la única proteína con DBD-Myb en la que se ha descrito su estructura tridimensional, la cual está compuesta por tres hélices α y posee un núcleo hidrofóbico, similar a otras proteínas Myb (Cárdenas *et al.*, 2021).

Los factores de unión a repetidos teloméricos (TFR) TRF-like I, II y III se encontraron en este parásito, demostrándose mediante análisis *in silico* que comparten similitud con TRF humano: EhTFR-like I y II con TRF1, mientras que EhTFR-like III con TRF2. Estas EhTRF-like se encontraron ubicadas en la región telomérica, además de que EhTFR-like III forma complejos DNA-proteína específicos con estas secuencias (Rendón-Gandarilla *et al.*, 2018). Hasta la fecha, solo las proteínas EhMybdr, EhMybS3 y EhMyb10 se han caracterizado en esta amiba.

2.2.3. EhMyb10

EhMyb10 es una proteína de 153 aminoácidos que tiene una masa molecular de 17.9 kDa y conserva el DBD hélice-giro-hélice en sus repetidos R2 y R3 (Figura 5). Mediante ensayos de EMSA, se comprobó que este FTs reconoce una secuencia consenso en los promotores, conocida como elemento de reconocimiento a Myb (ERM) (TAACGG) (Meneses *et al.*, 2010). Existen otros 246 genes en *E. histolytica* que contienen el ERM en sus promotores, de los cuales 16 son cinasas, 7 codifican para proteínas con seis repeticiones ricas en leucina, similares a BspA (involucrada en la invasión tisular y la quimiotaxis hacia TNF- α (Silvestre *et al.*, 2015), 8 son miembros de la familia AIG1 (regulan la adhesión de las células del huésped) (Nakada-Tsukui *et al.*, 2018), y otros son genes diana como los de la familia *hsp70* (que codifican para proteínas de choque térmico) (Santos *et al.*, 2020).

En un análisis transcripcional del genoma de *E. histolytica* realizado en trofozoítos aislados del colon de ratones CBA/J infectados en etapas tempranas (día 1) y tardías (día 29), comparados con parásitos en cultivo, reveló que el gen *ehmyb10* aumentó su expresión 2.87 veces, desde el primer día de invasión al tejido intestinal (Gilchrist *et al.*, 2006), mientras que al haber estado en contacto con explantes de colon humano (para reflejar el proceso de invasión intestinal) reflejó un incremento de 1.9 veces en su expresión (Weber *et al.*, 2016). Este hallazgo sugiere que este FT participa de manera relevante en procesos de virulencia en *E. histolytica*.

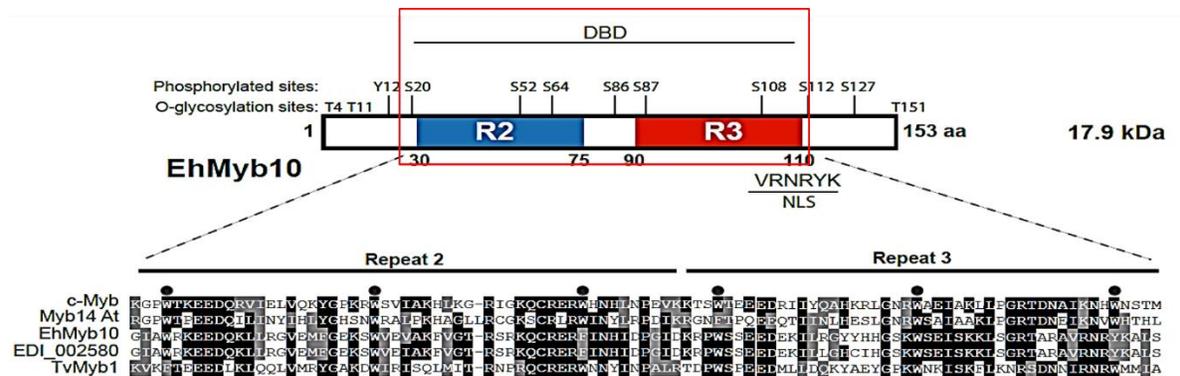


Figura 5. Estructura de los repetidos R2 y R3 de EhMyb10. En el cuadro rojo se resaltan los repetidos R2 y R3 que tienen interacción con el DNA en el dominio DBD-Myb. Se muestra también la secuencia de la señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) y los posibles sitios de fosforilación y O-glicosilación. Los puntos negros en el alineamiento destacan los residuos de triptófano conservados en diferentes especies: c-Myb (*Homo sapiens*), Myb14 At (*A. thaliana*), EhMyb10 (*E. histolytica*), EDI_002580 (*Entamoeba dispar*), TvMyb1 (*T. vaginalis*). Tomado de Azuara-Liceaga *et al.*, 2015

3. JUSTIFICACIÓN

Entamoeba histolytica es un parásito que produce daño epitelial importante gracias a sus factores de virulencia, los cuales pueden ser regulados a nivel transcripcional por factores de transcripción tipo EhMyb.

Dado que el factor EhMyb10 se expresa de manera significativa durante la invasión y colonización intestinal, es de relevancia conocer si afecta la expresión de genes que codifican para factores de virulencia, así como su repercusión sobre la barrera epitelial.

4. HIPÓTESIS

EhMyb10 afecta la transcripción de genes que codifican para factores de virulencia *de E. histolytica*, favoreciendo la colonización intestinal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar la participación del factor de transcripción EhMyb10 en la regulación transcripcional de genes relacionados con la virulencia de *E. histolytica* y su efecto en la barrera epitelial intestinal.

5.2. Objetivos particulares

1. Analizar *in silico* los promotores de genes de *E. histolytica* que contengan el elemento de reconocimiento a Myb (ERM) y que modifiquen su expresión durante la colonización intestinal.
2. Correlacionar la expresión de genes de *E. histolytica* involucrados con la colonización intestinal y la expresión de EhMyb10, mediante análisis *in silico*.
3. Determinar la expresión de posibles genes blanco en trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10.
4. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 en trofozoítos sobre diferentes propiedades de virulencia *in vitro* (efecto citopático y permeabilidad epitelial).

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

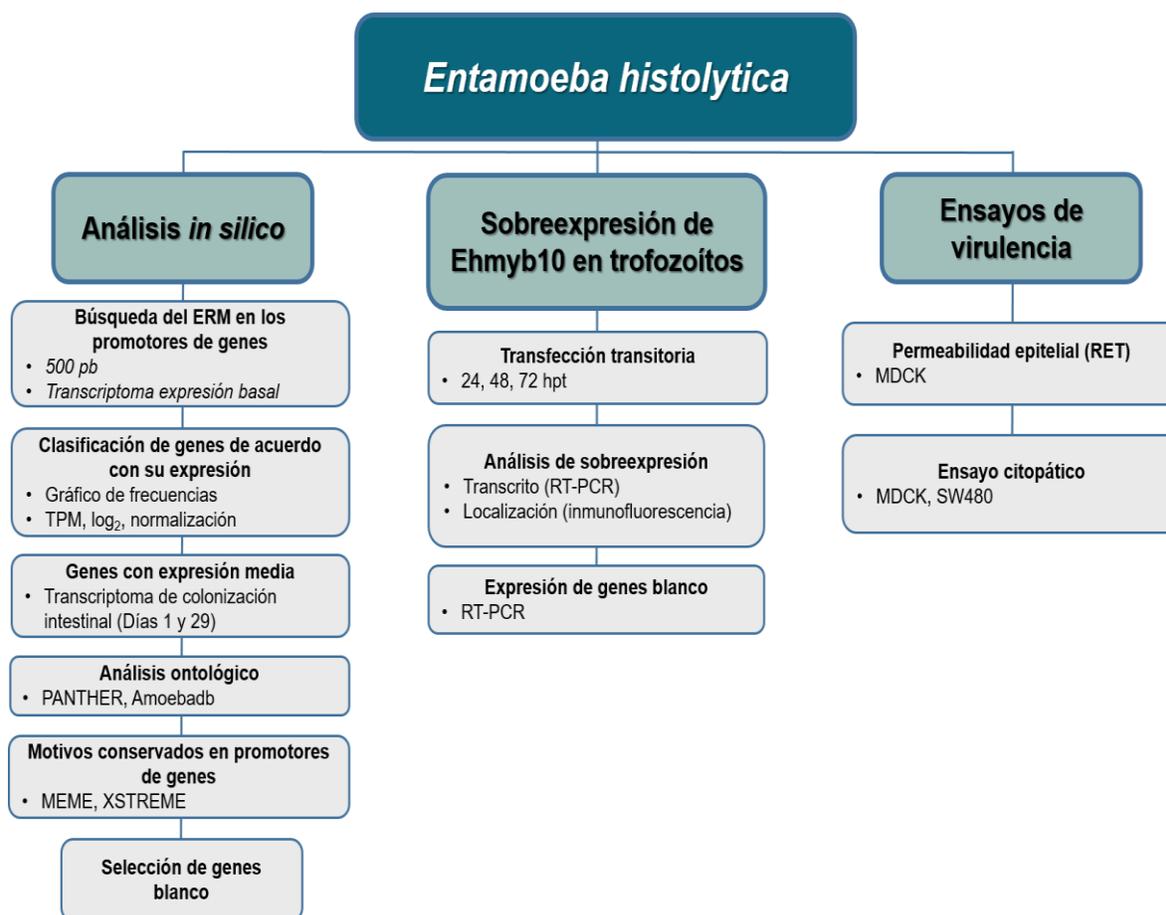


Figura 6. Estrategia experimental general

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis bioinformático

7.1.1. Búsqueda del Elemento de Reconocimiento a Myb (ERM) en los promotores de genes de *E. histolytica*

Para identificar los genes que tienen el ERM en sus regiones promotoras, se realizó una búsqueda empleando el motivo ([C/T]AAC[G/T]G) que corresponde al ERM canónico, como se describió en Meneses *et al.*, (2010). Para ello se tomaron como referencia 500 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG). Esta actividad se realizó con ayuda del M. en C. Helios Cárdenas Hernández. Mediante este análisis se identificaron 846 genes que tienen la secuencia del ERM en sus posibles regiones reguladoras.

7.1.2. Clasificación de genes con ERM de acuerdo a su nivel de expresión basal

Una vez seleccionados los genes que contienen el ERM, se obtuvieron los valores de expresión en transcritos por millón (TPM), a partir del transcriptoma en condiciones basales de cultivo publicado por Shabardina *et al.* (2018) y empleando la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>). Los valores de expresión basal en TPM se procesaron de la siguiente forma: 1) se obtuvo el \log_2 de los TPM; 2) se calculó la media de estos valores (\bar{X}) y desviación estándar (DS) de los datos; 3) cada valor se normalizó con la siguiente ecuación: $(\log_2 \text{TPM} - \bar{X})/DS$. Con los valores normalizados se realizó un gráfico de frecuencias, utilizando el programa R y posteriormente, se calculó el percentil de 70 a 85 para clasificar a los genes de acuerdo a sus niveles de expresión en: muy baja, baja, moderada, alta y muy alta (Hackney *et al.*, 2007; Naiyer *et al.*, 2019). Empleando estadística Bayesiana se calculó la probabilidad de que EhMyb10 perteneciera a alguno de los 5 grupos, encontrándose que pertenece al grupo de expresión moderada. Por tal motivo, se seleccionaron 591 genes con expresión moderada. Para este análisis se contó con la ayuda del M. en C. Carlos Martínez, Profesor de la Academia de Matemáticas, UACM.

7.1.3. Selección de genes con ERM que modifican su expresión durante la colonización intestinal

Se realizó una búsqueda exhaustiva de publicaciones de transcriptoma (RNA-seq y/o microarreglos) de *E. histolytica*, relacionados con eventos de virulencia. De estos trabajos, se seleccionó el transcriptoma de Gilchrist *et al.* (2006), disponible en la base de datos AmoebaDB. En dicho trabajo, se utilizó el modelo de ratón CBA/J y se analizaron los días 1 y 29 de colonización intestinal. En este reporte, el gen *ehmyb10* aumentó 2.87 y 1.25 veces en el día 1 y 29, respectivamente. Empleando la base de datos AmoebaDB se analizaron los 591 genes que tienen el ERM y que pertenecen al grupo de expresión moderada, para identificar a aquellos que modificaron su expresión durante la colonización intestinal al menos ± 1.5 veces en los días 1 y 29 de colonización intestinal.

7.1.4. Análisis ontológico de los genes

Los genes que contienen el ERM y que modificaron su expresión durante la colonización intestinal se analizaron primeramente mediante un análisis de enriquecimiento de palabras (WE: *Word Enrichment* por sus siglas en inglés), empleando la base de datos AmoebaDB y un valor de $p < 0.05$.

En tanto que el análisis ontológico, se llevó a cabo en las plataformas AmoebaDB y PANTHER Classification System (<http://www.pantherdb.org/geneListAnalysis.do>), siguiendo los criterios: procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y clases de proteínas.

7.1.5. Identificación de motivos conservados en promotores de genes con ERM

Se utilizó la base de datos de AmoebaDB para obtener la región de 500 pb río arriba del ATG de cada uno de los 162 genes que contienen el ERM y que modificaron su expresión durante la colonización intestinal. Las secuencias obtenidas de los promotores se analizaron empleando la plataforma MEME suite (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) y XSTREME (<https://meme-suite.org/meme/tools/xstreme>) versión 5.4.1, y como parámetro de búsqueda de los motivos se eligieron secuencias con 6-12 nucleótidos.

7.2 Cultivo de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HMI:IMSS se crecieron en cultivo axénico, en tubos de vidrio, a 37 °C, en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978) con 20% de suero bovino adulto (Microlab) inactivado por calor, 3% de vitaminas (Diamond *et al.*, 1978), penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100 µg/mL). En los diferentes experimentos, los trofozoítos se utilizaron en su fase logarítmica de crecimiento.

7.3 Sobreexpresión de EhMyb10 en trofozoítos

7.3.1. Transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

Los plásmidos pKT3M (control) (Saito-Nakano *et al.*, 2004) y pKT3M-*ehmyb10* fueron proporcionados por la Dra. Elisa Irene Azuara de la UACM, cuyo grupo de trabajo clonó la secuencia completa del gen *ehmyb10* en el plásmido pKT3M (entre los sitios de restricción *SmaI* y *XhoI*). La construcción pKT3M-*ehmyb10* contiene: dos promotores, el de actina (que permite la expresión del gen de resistencia a *neomicina*) y el de cisteína sintasa (que dirige la expresión del gen *ehmyb10*). Esta construcción también tiene una etiqueta 3-myc en el extremo 5' del gen *ehmyb10*, lo cual permite expresar a la proteína con una bandera de myc (Figura 7).

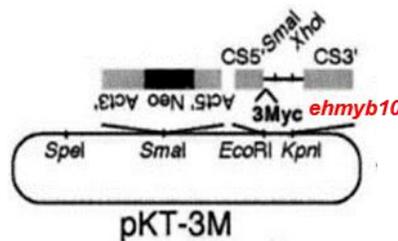


Figura 7. Vector de clonación pKT3M (modificado de Saito-Nakano *et al.*, 2004).

Ambos plásmidos se expandieron en bacterias *E. coli* DH5α, empleando el método de transformación. Se utilizaron 50 µL de células competentes a las cuales se les agregaron 20 ng de cada uno de los plásmidos (pKT3M y pKT3M-*ehmyb10*). La mezcla se incubó a 4°C durante 30 min y se sometió a choque térmico de 42°C por 45 seg con agitación vigorosa. Posteriormente, se incubó a 4°C por 3 min y se adicionaron 300 µL de medio LB, para

incubar el tubo en agitación por 1 h a 37°C. Tras la incubación, las células transformadas se sembraron en placas con medio LB-agar adicionado con ampicilina (100 µg/mL). Después, se sembraron ~50 µL de la transformación con asa bacteriológica y se pusieron a incubar a 37°C toda la noche.

7.3.2. Extracción de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se aisló de las bacterias transformadas empleando el kit MAXI de QIAGEN®. Las colonias bacterianas seleccionadas se inocularon en 1.5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), en matraces. Después de 24 h de incubación a 37°C, con agitación vigorosa (300 rpm), los cultivos fueron diluidos 1:500 en 500 ml de medio LB + ampicilina y se incubaron a 37°C 12-16 h con agitación de ~300 rpm. Para cosechar las bacterias, éstas se centrifugaron a 8,000 rpm por 15 min a 4°C y se obtuvo la pastilla, la cual se resuspendió con 10 mL de buffer de resuspensión (P1) usando vórtex, hasta que no quedaron grumos. Posteriormente, se agregaron 10 mL de buffer de lisis (P2) y se mezcló por inversión 6 veces hasta obtener una consistencia viscosa y azulada. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente (TA), se agregaron 10 mL de buffer de neutralización (P3), lo que promovió la aparición de una textura blanca y esponjosa. Inmediatamente, las muestras se mezclaron 6 veces por inversión, se incubaron 20 min a 4°C y se centrifugaron a 8,500 rpm por 30 min. El sobrenadante se pasó por una columna del kit de QIAGEN, previamente equilibrada con 10 mL de tampón de equilibrio (QBT), dejando que la columna se vaciara por gravedad. Posteriormente, la columna se lavó dos veces con 30 mL de buffer de lavado (QC) para eliminar contaminantes. A continuación, se realizó la elución del DNA pasando 15 mL de buffer de elución (QF) por la columna, la cual fue colocada en un tubo cónico de 50 mL con 10.5 mL de isopropanol. El DNA se precipitó por centrifugación a 8,500 rpm durante 30 min a 4°C y la pastilla resultante se lavó con 5 ml de etanol al 70% a TA y centrifugación a 10,000 rpm por 10 min. El exceso de etanol se eliminó de la pastilla dejando secar las muestras a TA y una vez secas, se resuspendieron en 150 µL de agua inyectable. La integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1% y su concentración se cuantificó mediante Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). El DNA plasmídico se almacenó a 4°C, hasta su uso.

7.3.3. Transfección transitoria

Trofozoítos ($\sim 1 \times 10^6$) con crecimiento logarítmico se cultivaron en tubos de vidrio pequeños. De forma paralela 5 μg de cada plásmido se mezclaron con 150 μL de medio TYI-S-33 sin suero y 5 μL de Superfect (QIAGEN). Se pusieron las mezclas en vórtex por 10 s y se incubaron por 10 min a TA. Pasado el tiempo, se adicionó 1 mL de medio TYI-S-33 con suero tibio. Estas mezclas se añadieron a los trofozoítos pegados a los tubos y se adicionó, además 1 mL de medio completo. Los tubos se incubaron de forma horizontal, por 10 min a 37°C con 5% de CO_2 , después se añadieron 6 mL de medio TYI-S-33 completo y se incubaron por 3 h más. Pasado el tiempo, los tubos se incubaron a 4°C y una vez despegados, los parásitos se transfirieron a tubos grandes de vidrio. Los trofozoítos se utilizaron a las 24, 48 y 72 h post-transfección (hpt) en diferentes ensayos.

7.3.4. Ensayos de inmunofluorescencia

En placas de cultivo con 12 pozos se colocaron cubreobjetos previamente desinfectados con alcohol y sobre ellos se añadieron $\sim 8 \times 10^5$ trofozoítos suspendidos en 500 μL de medio TYI-S-33 complementado con suero, por pozo. La adhesión de los trofozoítos a los cubreobjetos se permitió por 2 h, después de lo cual se extrajo el medio e inmediatamente los parásitos se fijaron con etanol absoluto (~ 1 mL por pozo) frío a -20°C , durante 30 min. Pasado el tiempo, se realizaron tres lavados con PBS y las preparaciones se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% durante 1 h a 37°C . Al cabo de tres lavados con PBS, en una cámara húmeda, se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo primario anti-myc de ratón (1:500), toda la noche a 4°C . Después de tres lavados con PBS, las preparaciones se incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488 (1:250), durante 2 h a 37°C . Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el marcador nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) por 10 min a TA y protegidas de la luz. A continuación, se llevaron a cabo dos lavados con PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos, utilizando el preservador de fluorescencia Vectashield (Vector). Las muestras se sellaron con barniz de uñas y se analizaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss (LS700), empleando el programa ZEN Light Edition. Además, en este programa se cuantificó la intensidad de

fluorescencia de la proteína EhMyb10 exógena en la célula completa y en el núcleo, empleando al menos 30 células.

7.4 Análisis de la expresión de genes blanco de EhMyb10 en *E. histolytica*

7.4.1. Extracción y cuantificación de DNA genómico

El DNA genómico de los trofozoítos se extrajo empleando el kit Wizard® Genomic DNA (Promega). Los trofozoítos (4×10^6) se centrifugaron a 8,000 rpm durante 10 min. La pastilla resultante se lavó con 20 μ L de PBS, se agitó vigorosamente para suspender a las amibas y se centrifugó a 8,000 rpm por 10 seg para retirar el PBS. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 600 μ L de solución de lisis de núcleos (NL), empleando una pipeta hasta homogenizar completamente la muestra. Después, se agregaron 3 μ L de RNasa, se mezcló por inversión 2-5 veces y se incubó por 30 min a 37°C, seguido de una incubación de 5 min a TA. A la muestra se le añadieron 200 μ L de solución de precipitación de proteínas (PPS), se agitó con vórtex y se centrifugó a 8,000 por 4 min. El sobrenadante (con el DNA), se transfirió a un tubo limpio de 1.5 mL, se agregaron 600 μ L de isopropanol a TA, se mezcló suavemente por inversión hasta ver “hebras” blancas y se centrifugó 1 min a 8,000 rpm a TA. La pastilla se lavó con 600 μ L de etanol al 70% a TA y se centrifugó 1 min a 8,000 rpm a TA. La pastilla se dejó secar, se le añadieron 100 μ L de solución de rehidratación de DNA y se incubó a 65°C durante 1 h, procurando mezclar de forma periódica, dando golpecitos al tubo. El DNA genómico se almacenó a 4°C.

7.4.2. Extracción y cuantificación de RNA total

El RNA total de los trofozoítos (1×10^6) se obtuvo empleando 1 mL de TRIzol® Reagent (Sigma-Aldrich, USA). Después de homogenizar la muestra, se incubó por 5 min a TA y se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se agitó por inversión por 30 segundos y se incubó 3 minutos a TA. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, se tomó la fase acuosa (donde se encuentra el RNA), se le adicionaron 0.5 mL de isopropanol frío, se agitó suavemente por inversión, se incubó por 10 min a TA y se centrifugó a 11,000 rpm por 20 min a 4°C. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 75%, centrifugando cada vez a 10,000 rpm. La pastilla se secó y resuspendió en 30-50 μ L de agua inyectable. El RNA total se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

7.4.3. Tratamiento con DNasa

El RNA total (1.5 µg en 8 µL) se incubó con 1 µL de DNasa I libre de RNasa (Promega) y 1 µL de buffer B 10x, a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo agregando 1 µL de solución *Stop* (EGTA 20 mM pH 8.0) y por incubación a 65°C durante 10 min. La muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.4.4. Síntesis de cDNA

El RNA tratado con DNasa (1 µg), se mezcló con 1 µL de oligo DT (Promega), se llevó a un volumen final de 5 µL y se incubó a 70°C por 5 min y a 4°C por 5 min. Paralelamente, se preparó una mezcla con 3 µL de buffer Improm II 5x, 2.4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs, 1 µL de inhibidor RNAsin, 1 µL de transcriptasa reversa y 7 µL de agua. Esta mezcla se incubó con la solución de RNA y oligo DT, a 25°C por 5 min (alineamiento), después a 42°C por 60 min (extensión) y finalmente a 70°C por 15 min (para desactivar la transcriptasa reversa). El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.4.5. Diseño de oligonucleótidos para PCR

La secuencia de los genes analizados (*ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70*, *cotr*, *ehmyb10* y *s2 40s*, como control de carga) se obtuvo en formato fasta, en la página AmoebaDB. El diseño de los iniciadores de estos genes se llevó a cabo en los programas *Primer designing tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y *Primer3Plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). La especificidad de las secuencias obtenidas se corroboró mediante alineamiento (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Las características de los oligonucleótidos diseñados se mencionan en la Tabla 9.

Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes analizados.

ID	Nombre	Secuencia del oligonucleótido	T _m (°C)	Tamaño
EHI_096180	Ras family protein (<i>ras</i>)	S TGGACAGTGAGTTTGACGAT	53.8	139 pb
		A GCAGCTGATGTAGTAGGAGC	55.1	
EHI_105240	BAR/SH3 domain containing protein (<i>bar/sh3</i>)	S CCTCCAACAAAACCAAATCAA	59.8	168 pb
		A TTGTGTTTGACGACGTTGGT	60	
EHI_115150	AIG1 family protein (<i>aig1-1</i>)	S AATTGGAGAAACAGGTGTTG G	58.9	239 pb
		A TCCCTTGTAATCCTTCAGCTT T	59.3	
EHI_126560	AIG1 family protein, putative (<i>aig1-2</i>)	S ACACAAAATGGGTTGAGGTG A	54.8	136 pb
		A CCACCTACTACACCCTCGAA	55.7	
EHI_148990	Heat shock protein 70, putative (<i>hsp70</i>)	S CAACAGGAGCAATCAAAGCA	60	240 pb
		A TTGACCAATCAATTCCTCCTG	59.9	
EHI_192520	Transcriptional coactivator, putative (<i>cotr</i>)	S ACTTCCATTTGACGGTGACA	54.3	145 pb
		A TGAAATTCCTTTTTGTCCTGG T	52.8	
EHI_020280	40S ribosomal protein S2, putative (<i>s2 40s</i>)	S GAGATCACAACGGTCATGCT	62	190 pb
		A CTGACACGAACTGAACCACA	55	
EHI_129790	Myb-like DNA-binding domain containing protein (<i>ehmyb10</i>)	S AGACCATGGAGTTCAGAAGA AGATG	56.3	204 pb
		A ACAGCACGAGCAGTTCTTCCA	59	

* Anotación de acuerdo a la base de datos AmoebaDB. S: sentido, A: antisentido

7.5 Ensayos de virulencia

7.5.1. Cultivo de las líneas celulares epiteliales

Las células epiteliales intestinales SW480 (adenocarcinoma de colon humano) y renales MDCK (caninas), se cultivaron a confluencia en una atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C. Las células SW480 se cultivaron en medio DMEM-F12 (Progenes), suplementado con SFB al 10%, penicilina (100 mg/mL) y estreptomycin (100 mg/mL); en tanto que las células MDCK se crecieron en medio DMEM (Progenes), suplementado con penicilina (100 mg/mL), estreptomycin (100 mg/mL) y suero fetal bovino (SFB) al 10%.

7.5.2. Medición de resistencia eléctrica transepitelial (RET)

Las células MDCK crecidas a confluencia en filtros Transwell (6.5 mm de diámetro y 0.4 micrómetros de poro, Corning) se incubaron por la parte apical con trofozoítos (2x10⁴) y la RET se monitoreo durante 45 min con ayuda de un voltímetro EVOM (World Precision Instruments). Las células epiteliales incubadas solo con medio de cultivo se utilizaron como control. La RET de cada pozo se normalizó de acuerdo a su correspondiente valor inicial, previo al tratamiento. Las mediciones se realizaron por triplicado y en experimentos independientes.

7.5.3. Ensayo citopático

Células SW480 y MDCK (8x10⁴ células/pozo) crecidas a confluencia en placas de 96 pozos, se incubaron con trofozoítos (25,000) resuspendidos previamente en 200 µL de PBS, a 37°C durante 30-45 min, hasta observar aproximadamente un 80% de destrucción de las monocapas. La acción citopática de los trofozoítos se detuvo incubando las placas a 4°C durante 15 min y los parásitos se eliminaron con 6 lavados de PBS frío. La monocapa celular restante se fijó con 100 µL de glutaraldehído al 2.5% por pozo, durante 15 min a TA y se lavó dos veces con PBS. Posteriormente, se agregaron 80-100 µL de azul de metileno al 1% y las células epiteliales se incubaron por 10 min. Después de dos lavados con 200 µL de amortiguador de boratos 0.01 M, las monocapas se fotografiaron. El colorante se extrajo de las células agregando 200 µL de HCl 0.1 N e incubando la placa a 37°C por 30 min. La suspensión se cuantificó por espectrofotometría en placas de Elisa, a una longitud de onda de

660 nm. Las mediciones se realizaron por sextuplicado, en experimentos independientes. Como control de no destrucción de las monocapas, las células no se trataron con trofozoítos y solo se incubaron con PBS.

7.5.4. Análisis estadístico

Los datos graficados representan la media y el error estándar de experimentos independientes. Los valores presentados fueron comparados empleando la prueba estadística de Anova (*t-Student*), donde la significancia representa *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, y ****, $p < 0.0001$. Las gráficas y el análisis estadístico se llevaron a cabo en el programa GraphPad Prism5.

8. RESULTADOS

8.1. Identificación *in silico* del ERM en el promotor de genes de *E. histolytica*

La presencia del ERM en los 8,201 promotores de genes de *E. histolytica* se determinó mediante análisis *in silico*, empleando la secuencia canónica [(C/T)AAC(T/G)G] que reconoce c-Myb de humano y analizando 500 pb río arriba del ATG, en la base de datos AmoebaDB. De esta manera, se identificaron 846 genes que poseen el ERM en sus posibles regiones promotoras. Posteriormente, analizamos el transcriptoma obtenido de trofozoítos en condiciones basales de cultivo por Shabatina *et al.*, 2018 y depositado en la base de datos AmoebaDB. A partir de esta revisión, se identificaron 812 genes y se obtuvo el valor numérico de su expresión en transcritos por millón (TPM).

8.2. Expresión diferencial de genes con ERM en condiciones basales de cultivo

El nivel de expresión de estos 812 genes derivados de trofozoítos en condiciones basales, se clasificó de manera similar al descrito por Hackney *et al.*, (2007) y Naiyer *et al.*, (2019). En esta clasificación, los autores consideraron los valores de TPM para construir una gráfica de frecuencias y poder así establecer 5 categorías de expresión (muy baja, baja, moderada, alta y muy alta), considerando las líneas de corte entre el percentil 70-85%. En nuestro caso, la gráfica de frecuencias, construida con los TPM de los 812 genes, mostró una distribución normal (Figura 9). De acuerdo a las categorías mencionadas, la mayoría de los genes presentan una expresión moderada (591), seguidos por una expresión muy baja (68 genes), muy alta (60 genes), baja (51 genes), mientras que solo 42 genes poseen una expresión alta (Tabla 10 y Figura 9).

Tabla 10. Niveles de expresión de genes con expresión basal.

Categoría (nivel de expresión)	Número de genes	Rango (log ₂ TPM)
muy baja	68	-2.70948 – -1.4395315
baja	51	-1.4395315 – -1.0364334
moderada	591	-1.0364334 – 1.0364334
alta	42	1.0364334 – 1.4395315
muy alta	60	1.4395315 – 3.43538

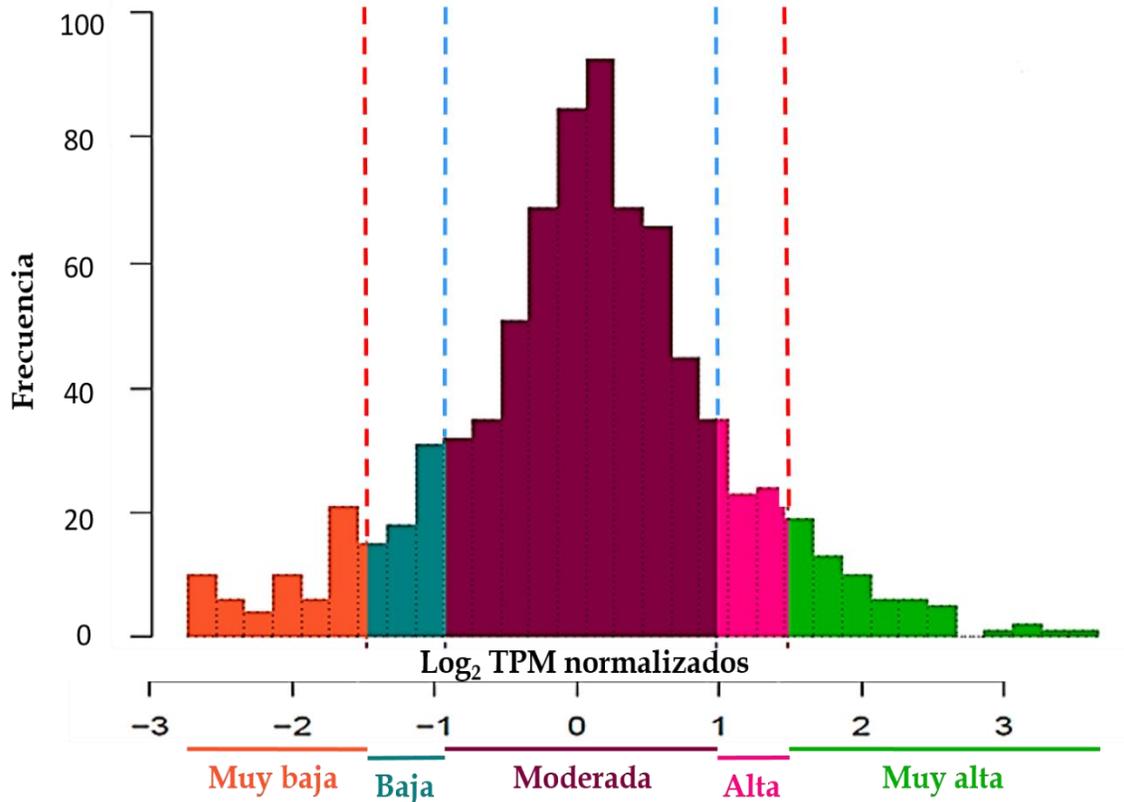


Figura 9. Clasificación de los genes que contienen el ERM, según su nivel de expresión en trofozoítos en condiciones basales. Histograma del log₂ de los TPM normalizados $[(\log_2 \text{TPM} - \bar{X})/DS]$ provenientes de trofozoítos en condiciones basales de cultivo. La clasificación de los grupos se realizó de acuerdo al cálculo del percentil 70% (líneas azules punteadas) y 85% (líneas rojas punteadas).

8.3. Correlación de la expresión de genes que presentan el ERM, con la expresión de *ehmyb10*

Con base en el clasificador Bayesiano ingenuo (*Naive Bayes*) que permite asumir si hay ausencia o presencia de una característica en una clase que no esté relacionada con esa ausencia o presencia (Manning *et al.*, 2008), se analizó la probabilidad de que *ehmyb10* perteneciera a alguna de estas categorías de expresión, lo que además arroja un cierto valor de verosimilitud. De acuerdo a su expresión basal, *ehmyb10* tiene un valor de TPM de 59.48, cuyo log₂ es de 1.02588189 y una verosimilitud de 3.34×10^{-1} , lo cual permite ubicarlo en la categoría de expresión moderada. Por esta razón, seleccionamos el grupo de 591 genes con expresión moderada, como posibles genes blanco de EhMyb10.

8.4. Identificación de genes con ERM que modifican su expresión durante la colonización intestinal

A continuación, se analizaron los cambios de expresión de estos 591 genes seleccionados como posibles blancos de EhMyb10, en el transcriptoma de trofozoítos que colonizaron (día 1) e invadieron (día 29) el colon de ratones (Gilchrist *et al.*, 2006), empleando la base de datos AmoebaDB. Con esta información, seleccionamos aquellos genes que modificaron su expresión al menos ± 1.5 veces, en el día 1 y 29, comparados con los genes derivados de trofozoítos en condiciones basales de cultivo. A partir de este análisis, solo 162 genes modificaron su expresión durante la colonización e invasión intestinal.

8.5. Análisis de enriquecimiento de palabras en los posibles genes blanco de EhMyb10

En seguida, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de palabras (WE: *Word Enrichment*, por sus siglas en inglés) de estos 162 genes que modifican su expresión durante la colonización e invasión intestinal, empleando la base de datos AmoebaDB y que tuvieran un valor estadístico de $p < 0.05$. A partir de este análisis de WE, en el grupo de genes seleccionados, se identificaron palabras enriquecidas estadísticamente de acuerdo con su anotación en la base de datos AmoebaDB. Las palabras estadísticamente más enriquecidas fueron: protein > hypothetical > conserved > AIG1 > Nip7 > ribosome > biogenesis (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de enriquecimiento de palabras en los genes seleccionados

Nombre (ID)	Recuento de resultados	Fold enrichment	Valor de P
protein	137	1.07	0.03958007
hypothetical	98	1.12	0.04900974
conserved	21	1.79	0.00624066
AIG1	5	8.57	0.00025102
NIP7	3	25.72	0.00013819
ribosome	3	11.87	0.00178734
biogenesis	3	10.29	0.00276342
tetratricopeptide	1	51.44	0.01944078
DCAMKL3	1	51.44	0.01944078
SRP54	1	51.44	0.01944078
tartrate	1	51.44	0.01944078
thiamine	1	51.44	0.01944078
PSF1	1	51.44	0.01944078
GINS	1	51.44	0.01944078
oxysterol	1	51.44	0.01944078
CDC45	1	51.44	0.01944078
chaperonin	1	51.44	0.01944078
chaperonin-containing	1	51.44	0.01944078
45	1	51.44	0.01944078
intracellular	1	51.44	0.01944078
USO1	1	51.44	0.01944078
Kd	1	51.44	0.01944078
U1	1	51.44	0.01944078
zeta	1	25.72	0.0385059
L-myo-inositol-1-phosphate	1	25.72	0.0385059
subfamily	1	25.72	0.0385059
motor	1	25.72	0.0385059
DNAJ	1	25.72	0.0385059
N-acetylglucosaminyltransferase	1	25.72	0.0385059
inorganic	1	25.72	0.0385059
pyrophosphatase	1	25.72	0.0385059

8.6. Análisis ontológico de los posibles genes blanco de EhMyb10

Con la finalidad de conocer las funciones biológicas de los 162 genes seleccionados, se llevó a cabo un análisis ontológico en la base de datos AmoebaDB y la plataforma PANTHER, que permite clasificar a los genes en 4 categorías: procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y categorías de proteínas.

En lo relativo a los procesos biológicos (114 genes), encontramos las subcategorías de regulación biológica (*biological regulation*), proceso celular (*cellular process*), proceso de desarrollo (*developmental process*), localización (*localization*), proceso metabólico (*metabolic process*), respuesta a estímulos (*response to stimulus*) y señalización (*signaling*) como sobrerrepresentadas. Entre las categorías que resguardaron mayor cantidad de genes fueron los que están relacionados con “procesos celulares” (50) como factores generales de transcripción, chaperoninas, proteínas andamio/adaptadoras y proteasas. Por otra parte, “procesos metabólicos” con 35, específicamente factores generales de transcripción, chaperonas, proteínas de tráfico de membrana y andamio/adaptadoras (Figura 10A y Tabla 12).

En la categoría de componentes celulares (75), encontramos 24 genes en la subcategoría de “complejos que contienen proteínas” (*protein containing complex*), como proteínas de tráfico de membrana y andamio/adaptadoras. Mientras que 51 genes se ubican en la subcategoría de “entidad anatómica celular” (*cellular anatomical entity*), como proteínas de tráfico de membrana y andamio/adaptadoras y factores generales de transcripción (Figura 10B y Tabla 12).

Referente a sus funciones moleculares (61), las subcategorías de actividad dependiente de ATP (*ATP-dependent activity*), unión (*binding*), actividad catalítica (*catalytic activity*), actividad motora del citoesqueleto (*cytoskeletal motor activity*), regulador de funciones moleculares (*molecular function regulator*), actividad reguladora de la transcripción (*transcription regulatory activity*) y actividad de transportador (*transporter activity*). De las subcategorías con mayor número de individuos encontramos a proteínas “de unión” con 25 como chaperonas, proteínas andamio/adaptadoras y factores de procesamiento del RNA. En tanto que, 23 genes codifican para proteínas con “actividad catalítica” como proteínas activadoras de GTPasas, RNA helicasas, chaperonas y proteasas (Figura 10C y Tabla 12).

Con respecto a la categoría de clases de proteínas (65), encontramos subcategorías como proteínas del metabolismo del DNA (*DNA metabolism protein*), proteínas del metabolismo del RNA (*RNA metabolism protein*), Chaperonas (*chaperone*), proteínas del citoesqueleto (*cytoskeletal protein*), regulador transcripcional específico del gen (*gene-specific transcriptional regulator*), proteína de tráfico de membrana (*membrane traffic protein*), enzimas de interconversión de metabolitos (*metabolite interconversion enzyme*), enzimas modificadoras de proteínas (*protein modifying enzyme*), modulador de actividad de unión a proteínas (*protein-binding activity modulator*), proteínas de andamio/adaptador (*scaffold/adaptor protein*), proteínas de transferencia/transporte (*transfer/carrier protein*), proteínas de traducción (*translational protein*), transportadoras (*transporter*) (Figura 10D y Tabla 12).

Estos genes posibles blanco de EhMyb10 se clasifican en categorías donde se encuentran factores de virulencia como proteasas, chaperonas, reguladores del citoesqueleto, y proteínas andamio/adaptadoras, entre otros, sugiriendo que su regulación transcripcional por este FT podría afectar las propiedades de virulencia de *E. histolytica*.

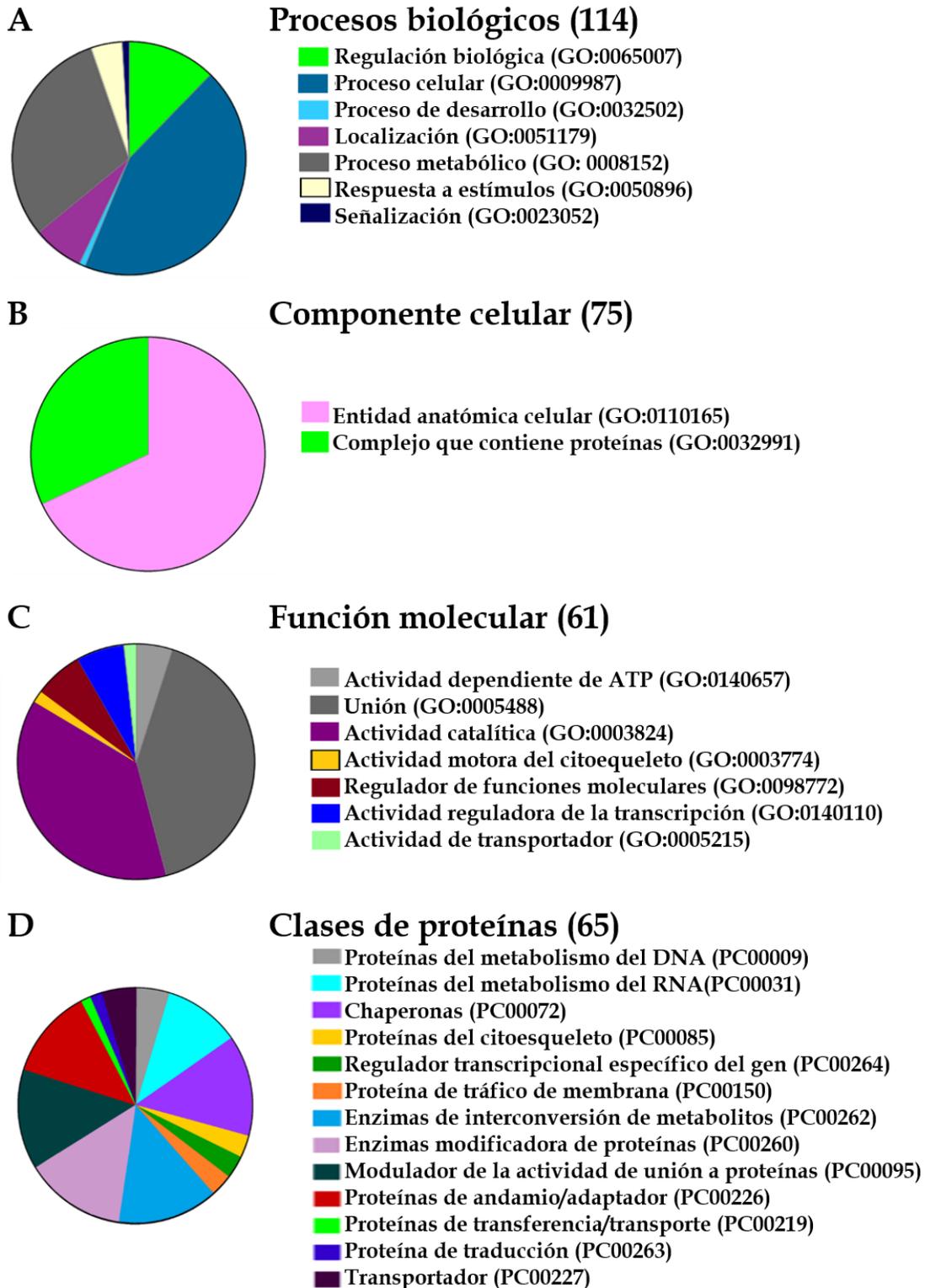


Figura 10. Análisis ontológico de los posibles genes blanco de EhMyb10. Clasificación de acuerdo a: procesos biológicos, componentes celulares, función molecular y clases de proteínas.

Tabla 12. Clasificación funcional de los posibles genes blanco de EhMyb10.

Término ontológico	Subcategoría	Número de genes
Procesos biológicos (114)	Biological regulation	14
	Cellular process	50
	Developmental process	1
	Localization	8
	Metabolic process	35
	Response to stimulus	5
	Signaling	1
Componentes celulares (75)	Cellular anatomical entity	51
	Protein containing complex	24
Funciones moleculares (61)	ATP-dependent activity	3
	Binding	25
	Catalytic activity	23
	Cytoskeletal motor activity	1
	Molecular function regulator	4
	Transcription regulatory activity	4
	Transporter activity	1
Clases de proteínas (65)	Proteínas del metabolismo del DNA	3
	proteínas del metabolismo del RNA	7
	Chaperonas	9
	proteínas del ciotesqueleto	2
	regulador transcripcional específico del gen	2
	proteína de tráfico de membrana	2
	enzimas de interconversión de metabolitos	9
	enzimas modificadoras de proteínas	9
	modulador de actividad de unión a proteínas	9
	proteínas de transferencia/transporte	1
	proteínas de andamio/adaptoras	8
	proteínas de traducción	1
transportadoras	3	

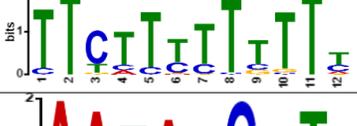
8.7. Identificación de motivos en el promotor de los posibles genes blanco de EhMyb10

La presencia del ERM en los promotores de los 162 genes seleccionados, se validó usando la plataforma MEME suite, la cual permite identificar motivos conservados en ácidos nucleicos y proteínas. En esta suite, empleando las herramientas MEME y XSTREME, se

buscaron motivos con un tamaño de 6 a 12 nt en las 500 pb río arriba del ATG de cada uno de los 162 genes. Siguiendo este procedimiento, se identificaron 8 motivos enriquecidos estadísticamente y entre éstos se encontró el ERM en los 162 genes, con un tamaño de 9 nt (WYAACTGAA), siendo más grande al usado en nuestra búsqueda inicial [(C/T)AAC(T/G)G].

Por otra parte, el motivo AAAAARAAWGA también se encontró en los 162 genes analizados, mientras que un elemento de respuesta a choque térmico (AAAAAAAAGAAA) (Silar y Thiele, 1991) se identificó en 63 genes y la secuencia AAAACCCTW solo se encontró en 31 genes (Tabla 13).

Tabla 13. Motivos conservados en los genes seleccionados con ERM.

Secuencia	Logo	Significancia	Tamaño (nt)	# Genes donde aparece
WYAACTGAA		Valor-E - 2.00E-04	9	162 (100%)
AAAAARAAWGA		Valor-E -6.4e-016	12	162 (100%)
TTCTTTTTTTY		Valor E- 4.5e-058	12	151 (93.2%)
AATATCATY		Valor-E - 2.10E+00	9	89 (54.9%)
CAAAAASAAAD		Valor-E - 2.50E-01	11	84 (51.9%)
AAAAAAAAGAAA		Valor-E - 3.00E+00	12	63 (38.9%)
AAAAACTAAAA		Valor-E - 5.30E-02	12	52 (32.1%)
AAAACCCTW		Valor-E - 3.00E+00	9	31 (19.1%)

La presencia de estos motivos en los posibles genes blanco de EhMyb10 abre la posibilidad a una co-regulación de su expresión, mediada por otros factores de transcripción.

8.8. Análisis de la expresión de posibles genes blanco de EhMyb10 en los transcriptomas de colonización intestinal y explantes de colon

Ante la imposibilidad de analizar los 162 posibles genes blanco de EhMyb10, en este trabajo seleccionamos solo 5 genes, de acuerdo con las categorías arrojadas en el análisis ontológico relacionadas con virulencia y que modifican su expresión durante la colonización intestinal. Además, se consideró la presencia de dominios transmembranales y péptido señal en las proteínas codificadas por estos genes. Con estos parámetros, los genes estudiados fueron aquellos que codifican para las proteínas: un miembro de la familia de GTPasas Ras (EHI_096180, *ras*), dos proteínas AIG1 (EHI_115150, *aig1-1* y EHI_129790, *aig1-2*), una proteína andamio/adaptadora BAR/SH3 (EHI_105240, *bar/sh3*) y la chaperona HSP70 (EHI_148990, *hsp70*). También se seleccionó un coactivador de la transcripción (EHI_192520, *cotr*) como control de expresión alta y porque resultados preliminares del laboratorio de la Dra. Elisa Azuara demuestran en un análisis de interactoma, su posible asociación con EhMyb10 (datos no publicados).

Adicionalmente, revisamos los cambios de expresión que tuvieron estos 6 genes en el transcriptoma obtenido mediante RNAseq por Weber *et al.*, (2016), donde analizaron trofozoítos que interaccionaron con explantes de colon. Para hacer comparables los datos de este transcriptoma y los del microarreglo de Gilchrist *et al.*, (2006), obtuvimos los valores de *fold change* (FC). En la figura 11 se observan los valores de FC de los genes seleccionados en las siguientes condiciones: 1) basal, trofozoítos en cultivo, 2) adaptación al intestino en el modelo murino (día 1), 3) invasión intestinal en ratones (día 29), y 4) trofozoítos que interaccionaron con explantes de colon humano.

Los resultados muestran que el gen *ras* aumenta su expresión durante la colonización e invasión intestinal de ratones (FC = 2); sin embargo, en los trofozoítos que interaccionaron con explantes de colon, la expresión de este gen disminuye ligeramente (FC = 0.87), en comparación con la condición basal. El gen *bar/sh3* incrementa su expresión en todas las condiciones analizadas, siendo mayor en trofozoítos interaccionados con explantes de colon

(FC = 2.38). Los genes *aig1-1* y *aig1-2* aumentan su expresión durante la colonización intestinal (FC = 2.55) y en trofozoítos interaccionados con explantes de colón (FC = 3.39 y 14.9, respectivamente); sin embargo, durante la invasión intestinal el incremento es ligero e incluso menor al control, para ambos genes (FC = 1.36 y 0.85, respectivamente). El gen *hsp70* disminuyó su expresión en todas las condiciones analizadas: durante la colonización el FC = 0.46, en invasión FC = 0.68 y en explantes de colon FC = 0.27. En tanto que el gen *cotr* sube su expresión a los días 1 y 29 de interacción intestinal (FC = 5.78 y 5.43, respectivamente), mientras que se reprime en el modelo de explante de colon (FC = 0.92). Finalmente, el gen *ehmyb10* aumentó su expresión en todas las condiciones analizadas, siendo el día 1 de colonización intestinal, donde se observa el valor más alto (FC = 6.1) (Figura 11).

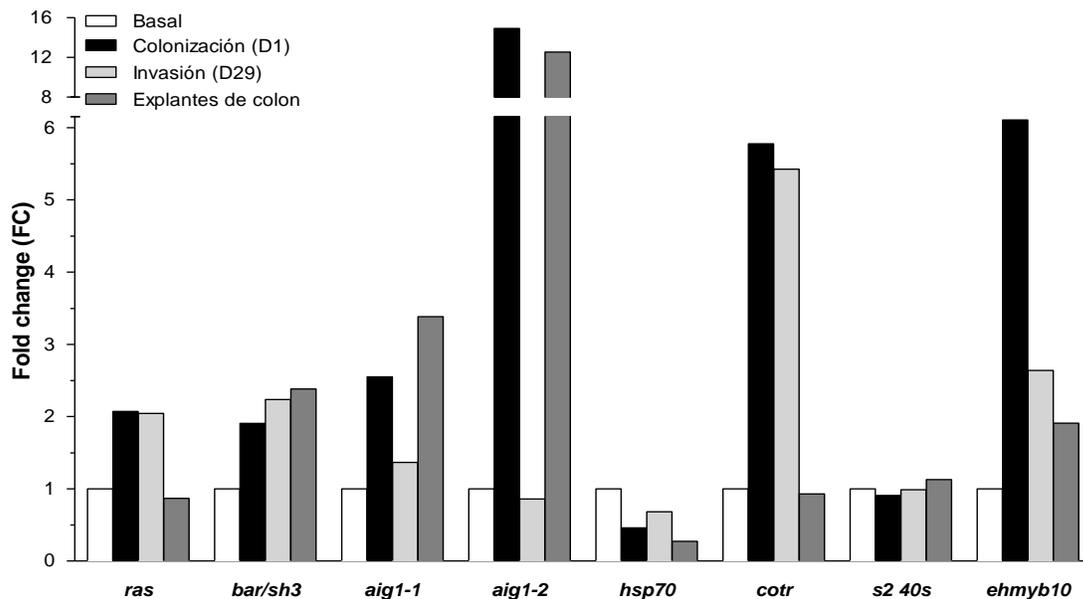


Figura 11. Cambios de expresión de los posibles genes blanco de EhMyb10 en diferentes condiciones. Los niveles de expresión de los genes *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70*, *cotr* y *ehmyb10* derivados de los transcriptomas reportados por Gilchrist *et al.* (2006) y Weber *et al.* (2016), se compararon de acuerdo a su FC y empleando el gen *s2 40s* como gen de expresión constitutiva. Todos los datos fueron normalizados con respecto a la condición basal.

Estos datos sugieren fuertemente que la sobreexpresión de EhMyb10 en todas las condiciones analizadas, podría estar relacionada con la regulación de la expresión de los genes *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70* y *cotr*, sin embargo, es necesario demostrar esta hipótesis de manera experimental.

8.9. Análisis de la expresión de los genes seleccionados en condiciones basales de cultivo

La expresión de los posibles genes blanco de EhMyb10 se analizó mediante ensayos de RT-PCR, empleando oligonucleótidos específicos para los genes *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70*, *cotr* y *ehmyb10*. Además, se incluyeron oligonucleótidos para amplificar el gen *s2 40s* de expresión constitutiva (Tabla 9). Con la finalidad de corroborar si los oligonucleótidos estuvieron bien diseñados, se obtuvo RNA total a partir de trofozoítos crecidos en condiciones basales de cultivo, el cual fue procesado a cDNA y por medio de RT-PCR se amplificaron los genes seleccionados. En la figura 12 se muestran los amplicones del tamaño esperado y correspondientes a los genes *ras*, *bar/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70*, *cotr*, *ehmyb10* y *s2 40s*, demostrando que los oligonucleótidos funcionan y que estos genes se expresan en condiciones basales (Figura 12). En este ensayo se incluyeron dos controles: en el control positivo se empleó como molde DNA genómico (DNAg); y en el control negativo se usó como molde RNA tratado con DNasa (RT-), para verificar que las muestras no estuvieran contaminadas con DNA.

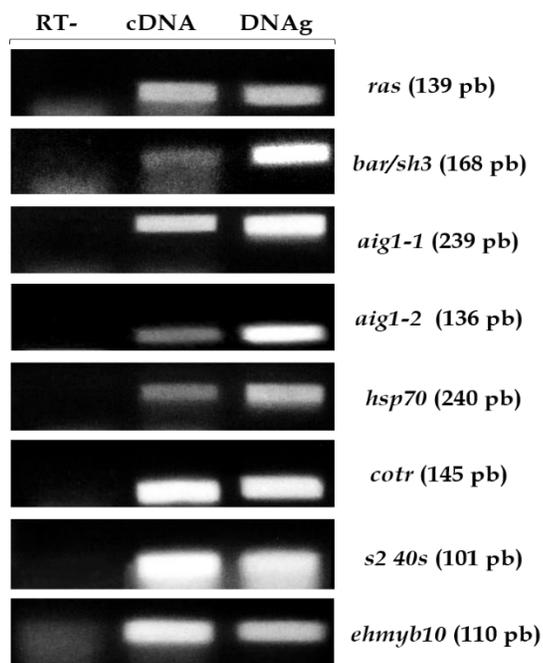


Figura 12. Amplificación de *ehmyb10* y posibles genes blanco de trofozoítos en condiciones basales de cultivo. A partir de 1 µg de RNA obtenido de trofozoítos, se sintetizó cDNA, el cual se empleó como molde para amplificar los genes de interés mediante ensayos de RT-PCR, y con ayuda de oligonucleótidos específicos. RT-: control negativo donde se empleó como molde RNA tratado con DNasa. DNAg: control positivo donde se empleó como molde DNA genómico.

8.10. Expresión y localización de EhMyb10 en trofozoítos mutantes

Con la finalidad de determinar el efecto de EhMyb10 sobre los posibles genes blanco seleccionados, se generaron trofozoítos mutantes que sobreexpresaran a este factor de transcripción, mediante ensayos de transfección transitoria de las construcciones pKT3M y pKT3M-*ehmyb10*. La sobreexpresión de *ehmyb10* se corroboró en los trofozoítos transfectados a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hpt), mediante ensayos de RT-PCR y empleando oligonucleótidos específicos para *ehmyb10*. Además, se emplearon oligonucleótidos para amplificar los genes *s2 40s* de expresión constitutiva y el de *neomicina* para comprobar que los trofozoítos estuvieran transfectados. A partir de cDNA se realizaron ensayos de RT-PCR, los cuales demuestran que el gen *ehmyb10* incrementó su expresión desde las 24 hpt (2 veces), siendo máxima a las 72 hpt (3.5 veces) en los trofozoítos transfectados con el plásmido pKT3M-*ehmyb10*, en comparación con las amibas conteniendo el plásmido pKT3M (Figura 13). En cuanto al gen de *neomicina*, éste se empieza a expresar desde las 24 hpt en los trofozoítos que sobreexpresan *ehmyb10* y los que solo cuentan con el vector vacío, comienzan su expresión a partir de las 48 hpt.

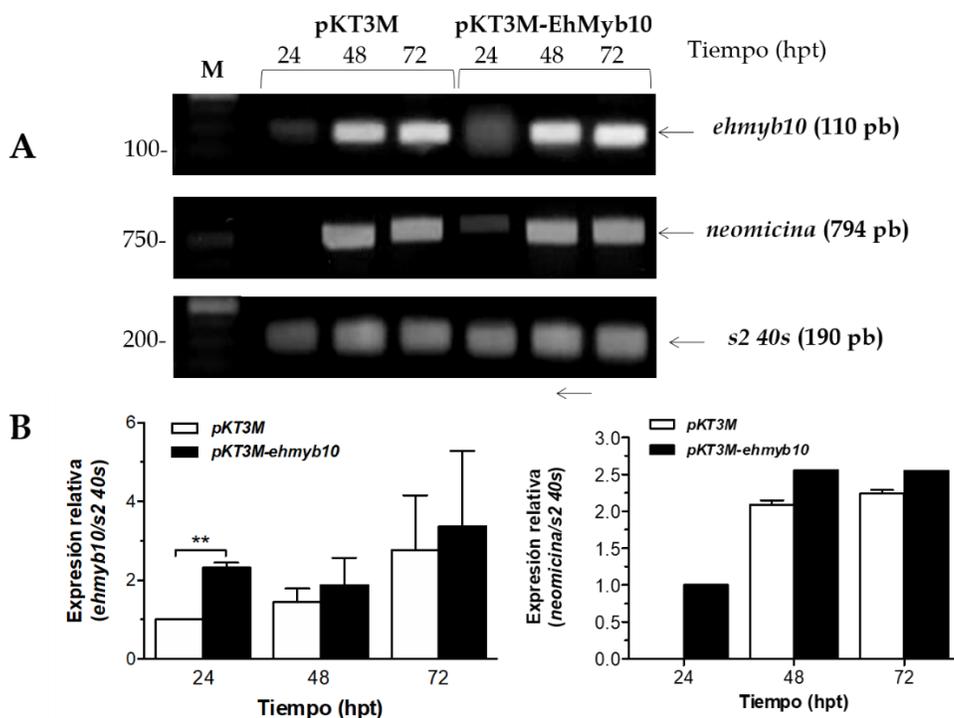
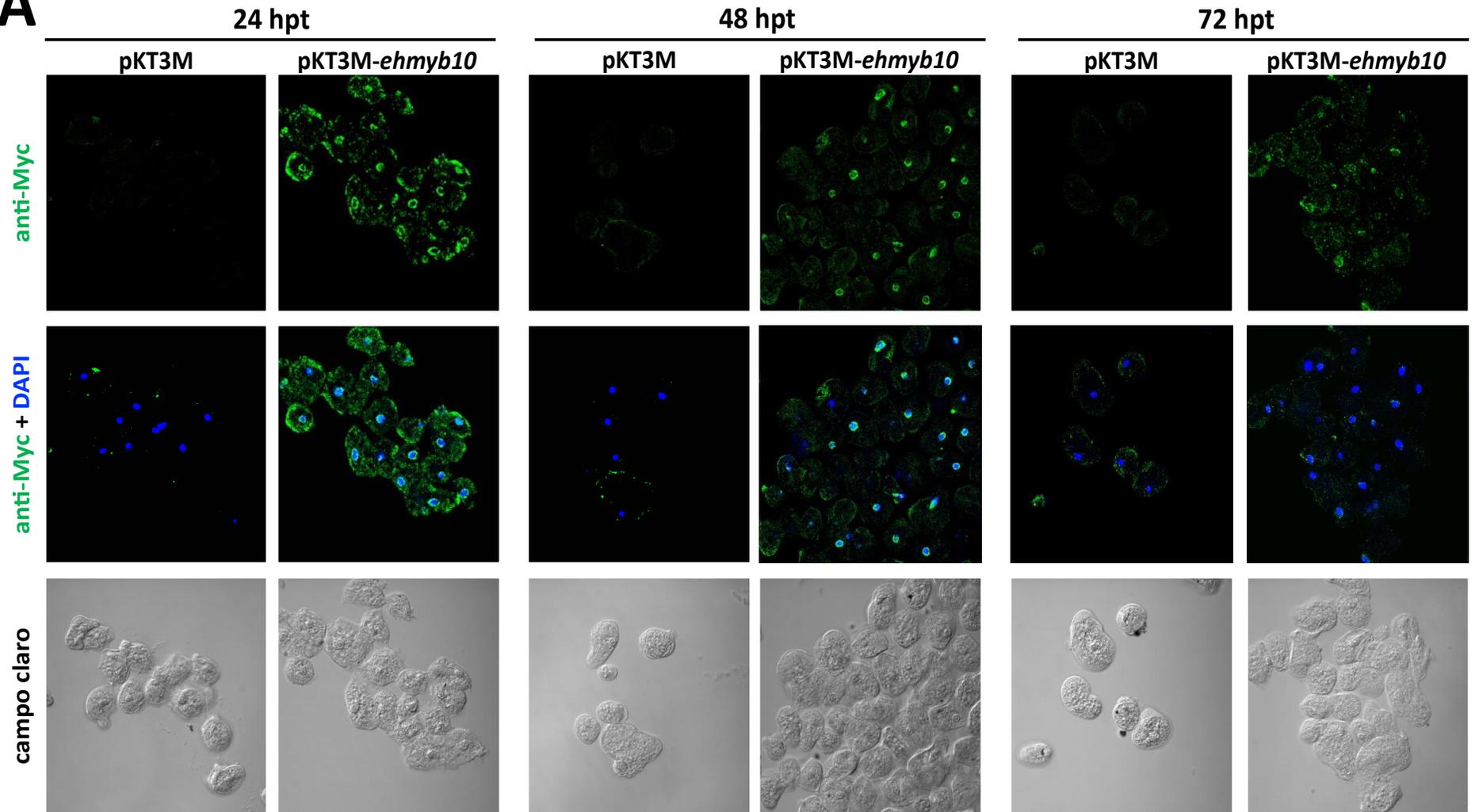


Figura 13. Sobreexpresión del gen *ehmyb10*. A partir de 1 µg de RNA obtenido de los trofozoítos transfectados con los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmyb10* y cosechados a las 24, 48 y 72 hpt se sintetizó cDNA, el cual se empleó en ensayos de RT-PCR. Los productos de PCR se separaron en un

gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ y las bandas se cuantificaron por análisis densitométrico empleando el programa ImageJ. La expresión relativa de los genes *ehmyb10* y *neomicina* se calculó con base en la expresión del gen *s2 40s*. Diferencia significativa (**, $p < 0.01$).

La presencia y localización de la proteína EhMyb10 en los trofozoítos transfectados se corroboró mediante ensayos de inmunofluorescencia, empleando un anticuerpo específico contra la etiqueta Myc presente en el plásmido pKT3M-*ehmyb10*, la cual permite reconocer solo la expresión de EhMyb10 exógena. Las imágenes de microscopía confocal muestran que EhMyb10 exógena se expresa desde las 24 hpt y hasta las 72 hpt, comparada con los trofozoítos control (transfectados con pKT3M) (Figura 14A). Al cuantificar la intensidad de fluorescencia en todos los tiempos, se observó que la mayor cantidad de proteína se encuentra a las 24 hpt y va disminuyendo con el tiempo, respecto a las amibas control (Figura 14B). Además, en estas imágenes EhMyb10 se localizó principalmente en la periferia nuclear, co-localizando con el marcador nuclear DAPI, aunque también se puede detectar en el citoplasma y en la membrana celular (Figura 14A). La localización nuclear de EhMyb10 es más evidente a las 24 hpt (Figura 14C).

A

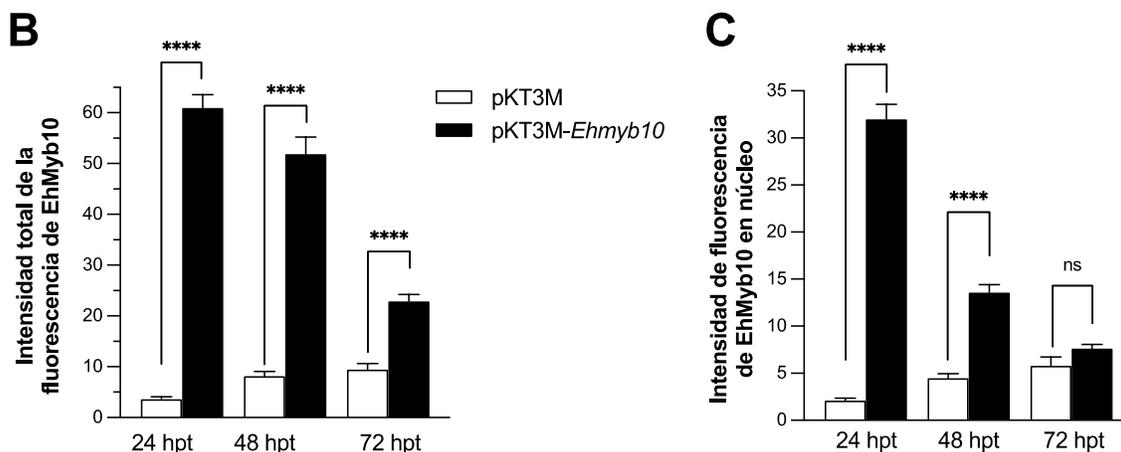


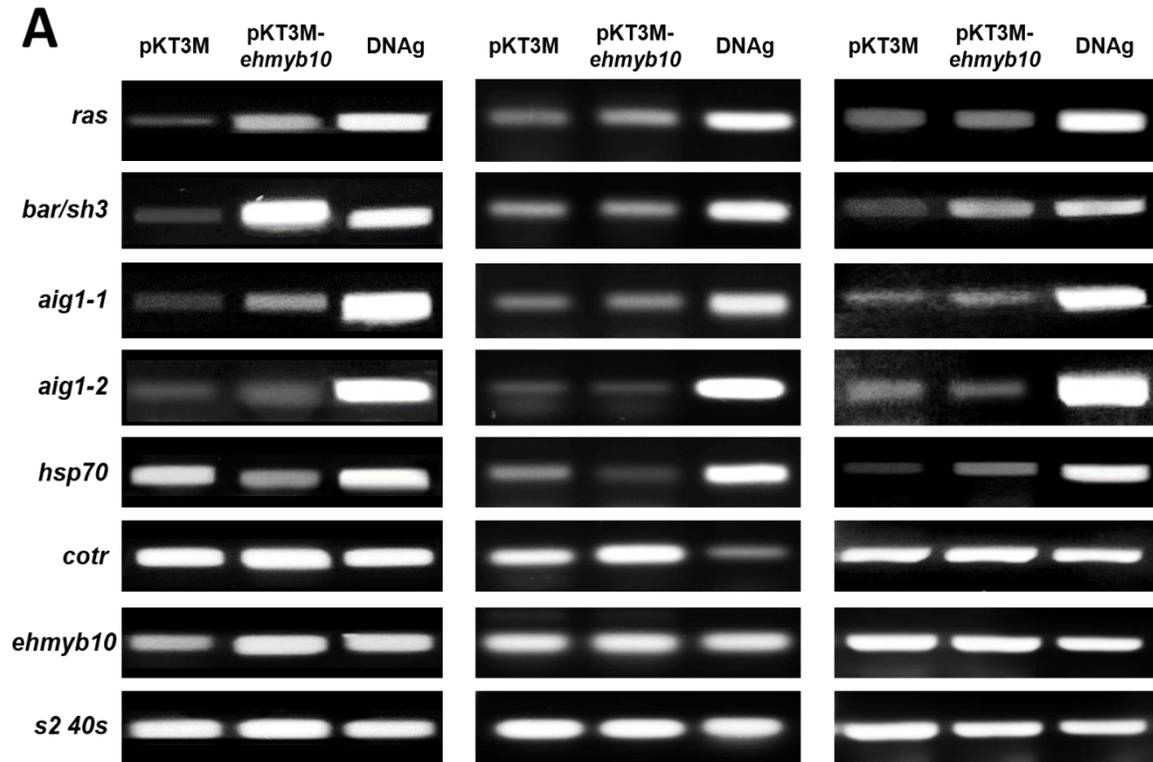
Figura 14. Localización subcelular de la proteína EhMyb10 en trofozoítos transfectados. Los trofozoítos se transfectaron con los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmyb10* y se cosecharon a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hpt). A) Posteriormente, las amibas se trataron para inmunofluorescencia, para lo cual se fijaron en cubreobjetos, se incubaron con el anticuerpo primario anti-myc, seguido del anticuerpo secundario Alexa 488 y se analizaron por microscopía confocal. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. La intensidad total (B) o nuclear (C) de fluorescencia de al menos 20 imágenes de cada condición se cuantificó en el programa ZEN Light Edition y las diferencias significativas se analizaron en el programa GraphPad Prism5 (ns, no significativa; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

8.11. Expresión de los genes seleccionados en trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10

Una vez corroborada la expresión y localización de EhMyb10 en los trofozoítos mutantes, se analizó el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 sobre la expresión de los 6 genes blanco seleccionados, mediante ensayos de RT-PCR. La expresión relativa de cada gen se determinó, cuantificando densitométricamente las bandas correspondientes a cada amplicón y comparándolas con la obtenida para el gen *s2 40s* (Figura 15). Con respecto a los genes *ras*, *bar/sh3* y *aig1-2* se observa un incremento en su expresión, principalmente a las 24 hpt, en trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10, comparados con los controles (transfectados con pKT3M). La mayor expresión la tiene el gen *ras* (5.25 veces), seguido del *bar/sh3* (4 veces) y después el *aig1-2* (2 veces), a las 24 hpt. En tanto que el gen *aig1-1* también aumenta su expresión en los trofozoítos transfectados con pKT3M-*ehmyb10* a las 24 y 72 hpt (2.2 veces), pero poco a las 48 hpt (1.25 veces). A pesar de que los resultados arrojados por los transcriptomas mostraron una expresión alta del gen *cotr*, en los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10, este gen aumentó levemente su expresión, principalmente a las 48

hpt (1.4 veces) y 72 hpt (1.3 veces). De manera interesante, el gen *hsp70* disminuyó su expresión a las 24 hpt (0.46 veces) y 48 hpt (0.2 veces), pero se incrementó significativamente a las 72 hpt (3.35 veces).

Los resultados experimentales indican que la sobreexpresión de EhMyb10 afecta de manera diferencial la expresión de los genes *ras*, *bas/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70* y *cotr*.



B

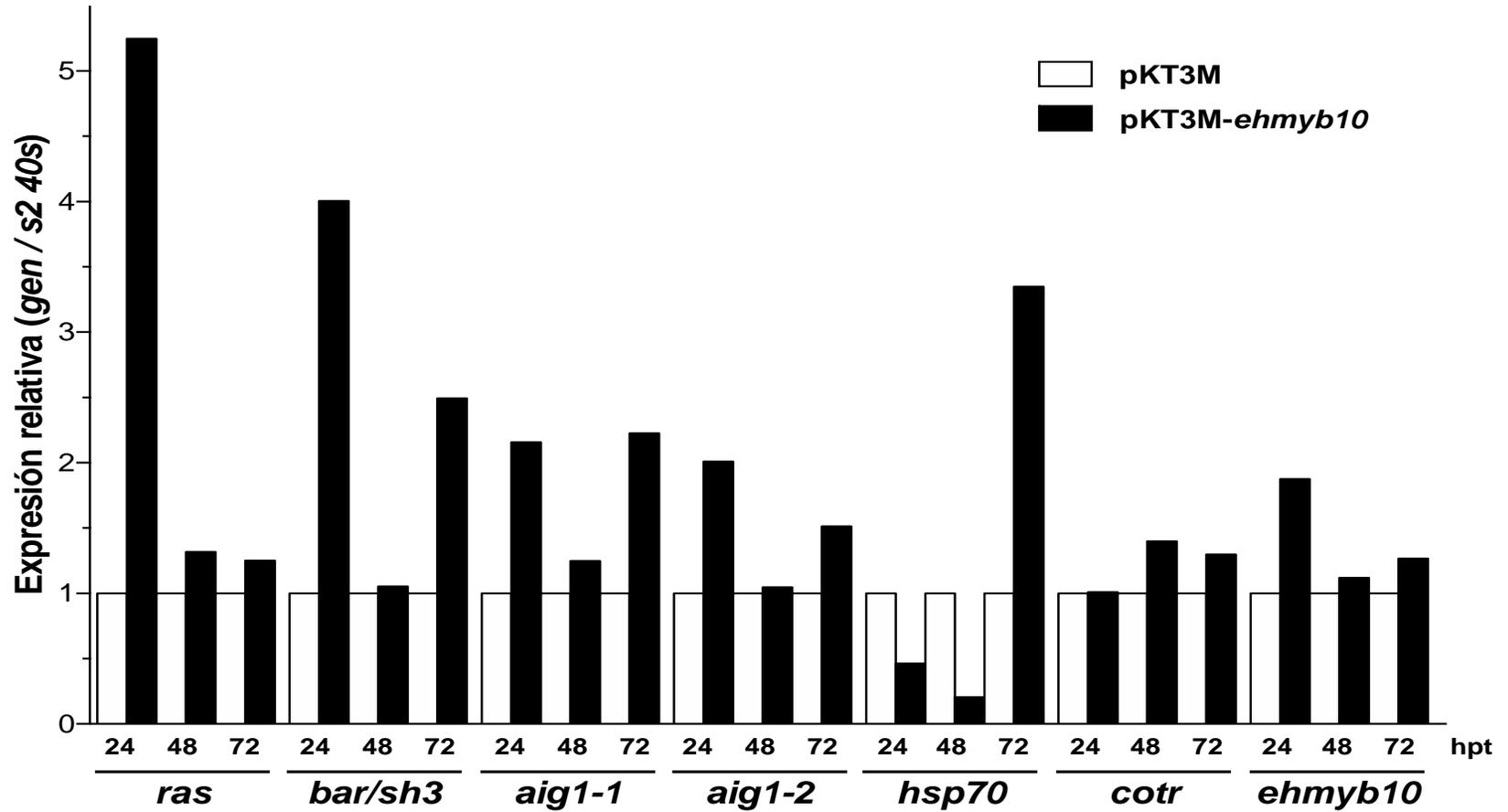


Figura 15. Expresión de los posibles genes blanco en trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10.

A partir de 1 µg de RNA obtenido de los trofozoítos transfectados con los plásmidos pKT3M y pKT3M-*ehmyb10* y cosechados a las 24, 48 y 72 hpt se sintetizó cDNA, el cual se empleó en ensayos de RT-PCR. A) Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con redgel. B) Las bandas se cuantificaron por análisis densitométrico, empleando el programa ImageJ. La expresión relativa de cada gen se calculó con base en la expresión del gen *s2 40s* y cada tiempo se normalizó con los trofozoítos control (pKT3M).

8.13. Efecto de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 sobre la permeabilidad epitelial

Una vez verificado el efecto de EhMyb10 sobre la expresión de algunos genes involucrados en la virulencia de este parásito, analizamos su relación con algunas propiedades de virulencia. En primer lugar, evaluamos las alteraciones producidas por los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10, sobre el daño en la permeabilidad epitelial, a través de ensayos de resistencia eléctrica transepitelial (RET). En este caso se utilizaron monocapas de células epiteliales MDCK crecidas a confluencia, las cuales se incubaron con trofozoítos transfectados con pKT3M (control) o pKT3M-*ehmyb10* y durante 45 min se monitoreo la RET. Los resultados mostraron que la RET de las células epiteliales disminuyó drásticamente desde los primeros minutos de incubación con los trofozoítos sin transfectar (WT), en comparación con las células mantenidas en medio DMEM y sin parásitos (control) (Figura 16A). La caída en la RET se hace más pronunciada conforme pasa el tiempo, siendo máxima a los 45 min (~35%) y es estadísticamente significativa. Por su parte, las células epiteliales incubadas con los trofozoítos transfectados también exhiben una reducción de sus valores de RET desde los primeros minutos de incubación (Figura 16B-D), aunque el efecto producido por los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 es significativamente mayor que el generado por los trofozoítos transfectados con pKT3M, principalmente a las 48 y 72 hpt (Figura 16C,D). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EhMyb10 aumenta la capacidad de los trofozoítos para alterar la permeabilidad epitelial.

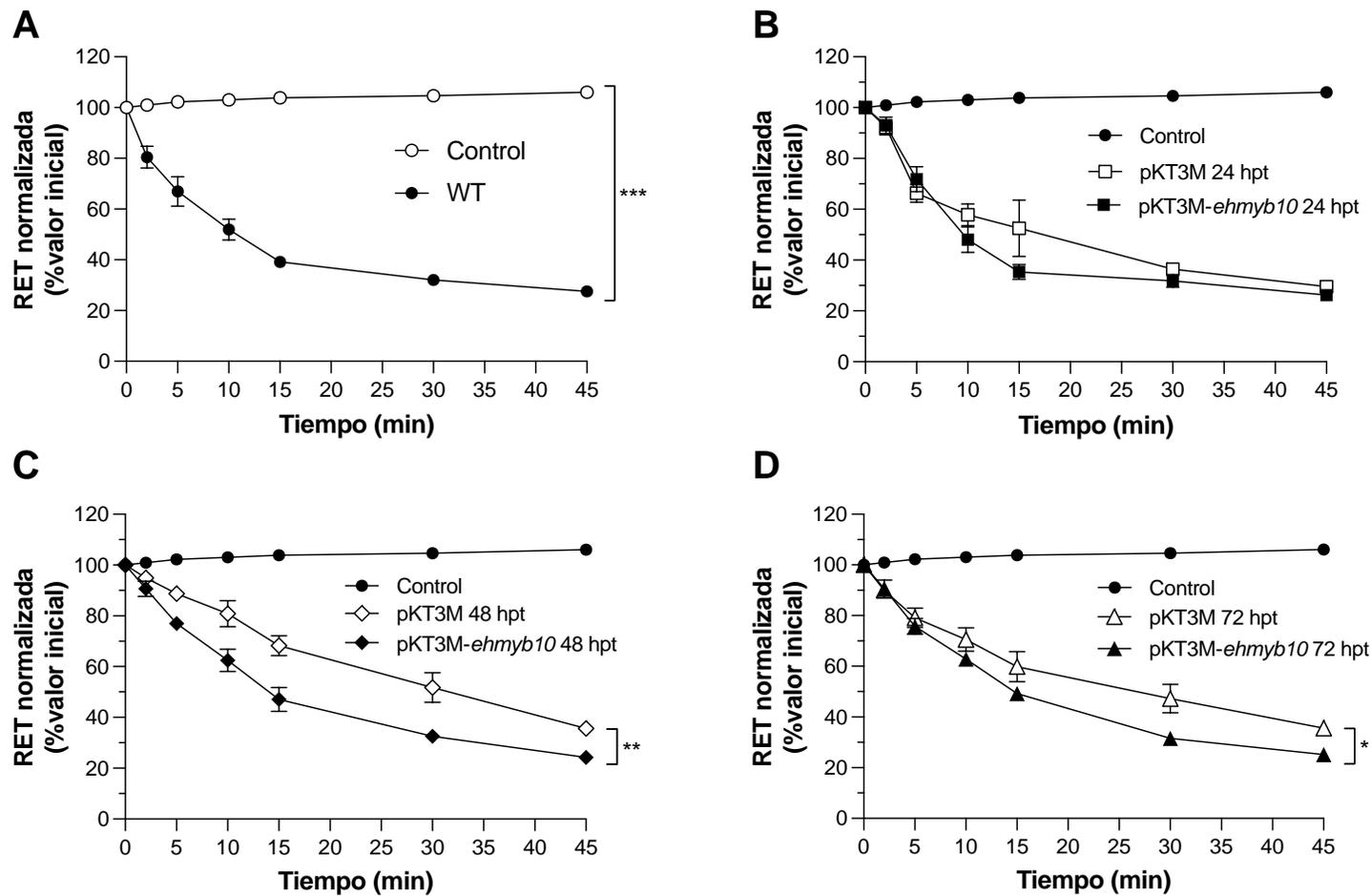


Figura 16. RET de células epiteliales incubadas con trofozoítos transfectados. Células confluentes MDCK crecidas en filtros Transwell, se mantuvieron sin tratamiento (control) o se incubaron con trofozoítos (2×10^4) sin transfectar (WT) (A) o transfectados con los vectores pKT3M y pKT3M-*ehmyb10* y cosechados a las 24 hpt (B), 48 hpt (C) y 72 hpt (D). La RET se monitoreo durante 45 min y los valores se normalizaron de acuerdo al valor inicial de cada Transwell. Diferencia significativa (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

8.14 Efecto de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 sobre el daño citopático en células epiteliales

Por otra parte, se evaluó la capacidad citopática de los trofozoítos que sobreexpresaban EhMyb10 sobre monocapas epiteliales. Células epiteliales MDCK y SW480 se incubaron con trofozoítos sin transfectar (WT) o transfectados con los vectores pKT3M y pKT3M-*ehmyb10*, durante aproximadamente 30-45 min y posteriormente se analizó el daño celular mediante la tinción de la monocapa restante con azul de metileno. Los resultados indicaron que los trofozoítos WT dañaron en un 36-45% la monocapa de células MDCK; en cambio, los trofozoítos transfectados con pKT3M dañaron menos a las células (6-35%) (Figura 17A). Cabe destacar que el mayor efecto lo tuvieron los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10, pues dañaron la monocapa en un 30-47%, siendo significativamente mayor que los trofozoítos pKT3M, en todos los tiempos de transfección (Figura 17A). Algo similar sucedió con las células SW480, aunque el daño no fue tan drástico (42-47%), pero de igual manera la sobreexpresión de EhMyb10 produjo que los trofozoítos dañaran significativamente más a las células intestinales, en todos los tiempos de transfección analizados (Figura 17B).

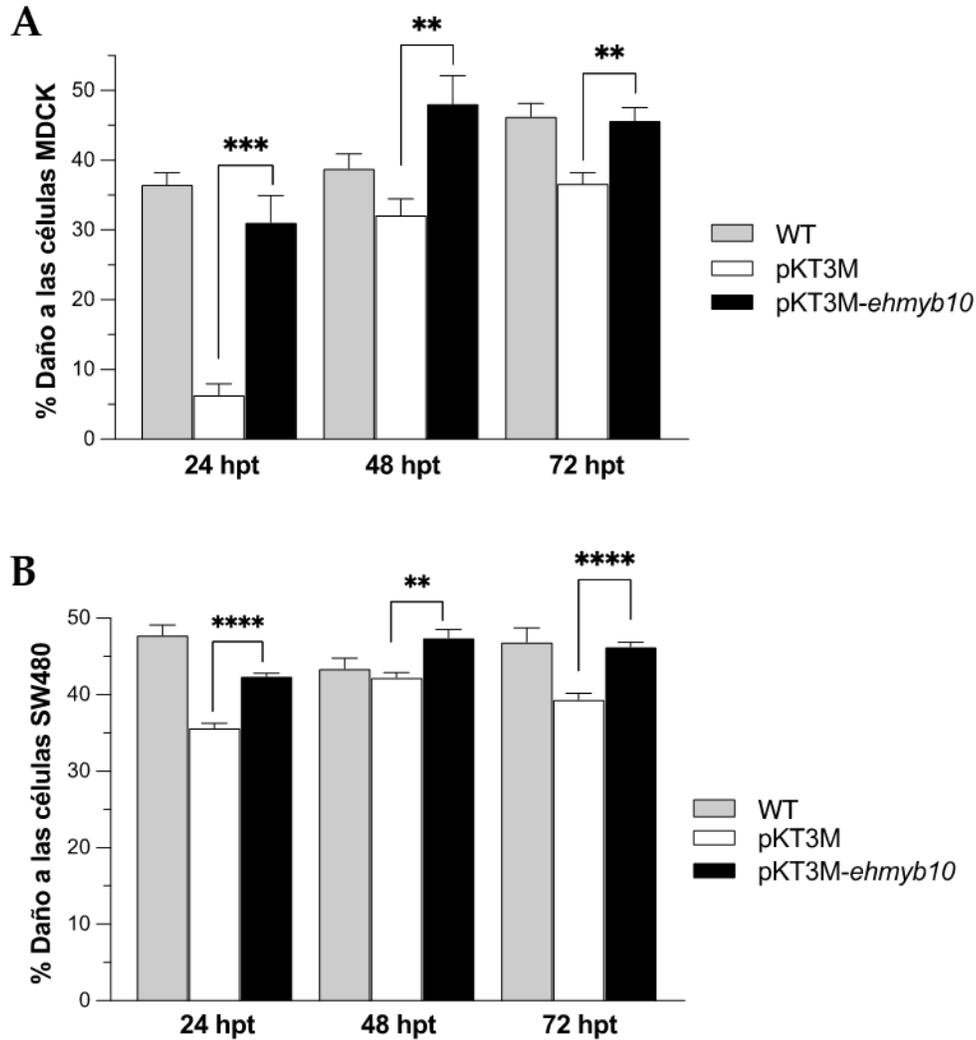


Figura 17. Efecto citopático de trofozoítos transfectados sobre células epiteliales. Monocapas de células MDCK (A) y SW480 (B), se crecieron a confluencia y se incubaron con trofozoítos (25,000) sin transfectar (WT) o transitoriamente transfectados a las 24, 48 y 72 hpt con los vectores pKT3M y pKT3M-*ehmyb10*. La destrucción de las células se evaluó mediante tinción con azul de metileno de la monocapa restante. El colorante eluido se cuantificó por espectrometría a $\lambda=660$ nm. Diferencia significativa (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Estos hallazgos junto con los de RET, sugieren que la sobreexpresión de EhMyb10 afecta la virulencia de los trofozoítos, haciéndolos más agresivos para perturbar la función y viabilidad epitelial, posiblemente con la participación de los genes *ras*, *bas/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70* y *cotr*.

9. DISCUSIÓN

A partir de la secuenciación del genoma de *E. histolytica* y la construcción de bibliotecas de cDNA, se ha estudiado la expresión génica de este parásito (Loftus *et al.*, 2005; Edman *et al.*, 1987; Huber *et al.*, 1987). Además, se han empleado técnicas que permiten analizar el transcriptoma de *E. histolytica*, como microarreglos y RNA-seq. Estas herramientas han permitido comprender los cambios en la expresión génica, al identificar aumentos o disminuciones en la expresión de los genes bajo diferentes condiciones, tales como: invasión al colónica y hepática (Ehrenkaufner *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015), interacciones con células y tejidos del huésped como células epiteliales y explantes de colon (Gilchrist *et al.*, 2006; Naiyer *et al.*, 2019; Thibeaux *et al.*, 2013), diferencias entre cepas virulentas y no virulentas, durante el desenquistamiento (Ehrenkaufner *et al.* 2009) y bajo condiciones de estrés (Hackney *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2006).

Los cambios de expresión de los genes, sobretodo de aquellos involucrados en procesos vitales como sobrevivencia, división celular y virulencia, requieren de la participación de proteínas como los FTs que regulan su expresión. Dentro de estas proteínas se encuentran las proteínas Myb, ampliamente distribuidas en organismos eucariontes como protistas, hongos, algas, plantas y animales; y están involucradas en procesos como el ciclo celular, el desarrollo, el crecimiento, la diferenciación, la regulación del metabolismo, etc. (Arratia y Aguirre, 2013; Oh y Reddy, 1999). En particular, en *E. histolytica* las proteínas Myb son los FTs más abundantes (Loftus *et al.*, 2005).

La familia de proteínas Myb se encuentra muy conservada a lo largo de la escala evolutiva y en *E. histolytica* se han identificado 32 proteínas divididas en 3 subfamilias (Meneses *et al.*, 2010). En particular en la familia I (EhMybR2R3), encontramos a EhMyb10, la cual posee los repetidos R2 y R3 en su dominio de unión al DNA (DBD Myb). A través de ensayos EMSA se demostró este dominio DBD Myb es capaz de unirse al motivo ERM canónico [(T/C)AAC(T/G)G], sugiriendo que este FT tiene la capacidad de unirse a la región promotora de los posibles genes blanco (Meneses *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuales son esos genes blanco y cómo participa durante los diferentes eventos relacionados con la virulencia de este parásito. Es por esto que en este trabajo realizamos un robusto análisis *in silico*, en el cual analizamos la presencia de la secuencia

ERM canónica en las regiones promotoras de todos los genes codificantes de *E. histolytica* para identificar a aquellos que podrían estar regulados por el FT EhMyb10. Debido a que uno de los principales procesos de virulencia incluye a la colonización e invasión epitelial, analizamos el transcriptoma reportado por Gilchrist *et al.* (2006) donde estudiaron trofozoítos que colonizaron (día 1) e invadieron (día 29) el intestino de ratones. Este proceso nos permitió identificar a 162 genes que contenían la secuencia ERM canónica en su región promotora, tenían una expresión moderada y modificaban su expresión al menos ± 1.5 veces durante la interacción intestinal, sugiriendo que pueden ser posibles genes blanco de EhMyb10.

Con la intención de delimitar este grupo de genes, empleamos de primera instancia un análisis de WE, para identificar palabras relacionadas con virulencia o funciones relacionadas. En particular nos interesaron las palabras: NIP7, AIG1, chaperonina y Mon1-Ccz1. En humano, la proteína NIP7 es importante para la proliferación celular y la biosíntesis de rRNA, se requiere para la maduración de la subunidad 18S rRNA y su silenciamiento provoca un desequilibrio de la proporción de las subunidades 40s/60s (Morello *et al.*, 2011). Aunque en *E. histolytica*, no se ha reportado ninguna función para esta proteína, quizá tenga funciones similares a la de humano, participando en la biosíntesis del rRNA y en la proliferación celular, pero esto debe ser demostrado experimentalmente. Con respecto a AIG1, se ha referido que su sobreexpresión en trofozoítos resulta en un incremento de las protrusiones de la superficie celular y en un aumento de la adhesión de los parásitos a eritrocitos, aunque contradictoriamente disminuye la formación de abscesos hepáticos en hámsteres. Estos resultados sugieren que los genes *aig1* pueden tener funciones contrastantes en la virulencia, dependiendo del fondo genético del parásito, del ambiente y del huésped (Nakada-Tsukui *et al.*, 2018). Además, se ha reportado una mayor expresión de cepas virulentas cuando se comparan con no virulentas (Biller *et al.*, 2010). En cuanto a las chaperoninas, se sabe que son nanomáquinas ubicuas y esenciales que asisten en el plegamiento de las proteínas, de una manera dependiente de ATP (Horovitz *et al.*, 2022). En *E. histolytica* se ha descrito la presencia de varias chaperoninas como Cpn10 y Cpn60, así como con la Hsp70, en los mitosomas, organelos que contienen un sistema típico mitocondrial de replegamiento de proteínas, por lo que, se sugiere que al igual que en otros sistemas, las chaperoninas de este patógeno cumplen una función similar (van der Giezen *et*

al., 2005). Finalmente, de manera interesante, se identificó el ERM en regiones de promotores de genes que codifican para proteínas Hsp70 en *Tritrichomonas foetus*, los cuales también tienen patrones de expresión similares a los genes *myb* (Alonso *et al.*, 2022). Por otra parte, el GEF (factor intercambiador de guanina, por sus siglas en inglés) Mon1-Ccz1 activa a Rab7, a lo largo de la maduración endosomal y fusión endolisosomal (Borchers *et al.*, 2021). En *E. histolytica*, la formación y maduración endosomal son procesos básicos para la supervivencia de este parásito con alta capacidad fagocítica y donde varios miembros de la familia Rab, como EhRab7A y EhRb7B, pero no Mon1-Ccz1, han sido descritos e involucrados en procesos relacionados con la virulencia de este organismo (Betanzos *et al.*, 2019).

Adicionalmente, llevamos a cabo un análisis ontológico para identificar dentro de estos 162 genes seleccionados, aquellos que codifican para proteínas con funciones relacionadas de alguna manera con la virulencia. Los hallazgos revelaron proteínas involucradas en procesos biológicos, de componentes celulares y con funciones moleculares, dentro de las que cabe resaltar: FTs, correguladores de la transcripción, proteasas, chaperonas, chaperoninas, de choque térmico, GTPasas, andamio/adaptadoras y de tráfico vesicular. Estas proteínas no solo son vitales para funciones relacionadas con la transcripción, nutrición, tráfico celular y supervivencia celular, sino que también participan en procesos de virulencia como adhesión, fagocitosis y lisis celular (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000; Faust y Guillen, 2012; Nakada-Tsukui *et al.*, 2010). Así, estas proteínas podrían ser blanco de regulación a nivel transcripcional por el factor EhMyb10.

Los promotores de estos 162 genes no solo podrían ser regulados por EhMyb10, sino también por otros FTs, por lo que nos dimos a la tarea de buscar motivos conservados en estas regiones, donde quizá se unan otras proteínas que modulen la transcripción. En primer lugar, cabe mencionar que en todos los 162 genes analizados se encontró el ERM, aunque su longitud fue mayor (9 nt) a la secuencia canónica reportada de c-Myb (6 nt). Es de notar el grado de conservación del ERM en este parásito eucariote unicelular, sugiriendo un mecanismo de regulación génica similar al descrito en eucariotes superiores. Además, en los promotores putativos encontramos otros 7 motivos. En particular la secuencia AAAAARAAWGA también se presentó en los promotores de los 162 genes y se ha

reportado su presencia en genes que codifican para helicasas de RNA, para proteínas relacionadas con la traducción y para proteínas con repeticiones WD40 (Naiyer *et al.*, 2019). Por su parte, el motivo TTCTTTTTTTY se identificó en la mayoría de los genes analizados (151) y codifican para proteínas de ensamblaje de los nucleosomas, proteínas ribosómicas, peroxirredoxina y proteínas relacionadas con el plegamiento de histonas (Naiyer *et al.*, 2019). El motivo AAAAAAAGAAA está presente en 63 genes, los cuales codifican para proteínas de choque térmico (Silar y Thiele, 1991). En tanto, que los otros 4 motivos identificados en los promotores de algunos de los 162 genes, no han sido reportados, ni se les ha asociado con alguna función biológica amibiana. En resumen, la presencia de motivos conservados en la región promotora de estos genes, sugiere una posible regulación transcripcional por EhMyb10 y por otros elementos reguladores comunes.

En general, el análisis bioinformático realizado en este trabajo de tesis, señala de manera interesante que existen genes con el ERM en su posible región promotora, susceptibles a regulación transcripcional por el FT EhMyb y que, debido a su nivel de expresión similar durante la colonización e invasión epitelial, es posible que participen en conjunto en procesos relacionados con la virulencia de este parásito.

Debido a que no es posible analizar experimentalmente los 162 posibles genes blanco de EhMyb10, seleccionamos solo 6 de ellos: *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70*, *ras*, *bas/sh3* y *cotr*. Estos genes se eligieron porque presentaron cambios importantes de expresión en el transcriptoma de colonización e invasión epitelial (Gilchrist *et al.*, 2006) y en amibas que interaccionan con explantes de colon humano (Weber *et al.*, 2016), porque algunos codifican para proteínas con péptido señal o con regiones transmembranales, y sobretodo porque se han relacionado con eventos de virulencia.

Se seleccionó el gen *aig1* porque forma parte de una familia que tiene abundantes miembros, los cuales tienen ERM, además estuvo representado en los análisis de WE y por que, como se sugirió anteriormente, participa en procesos de adhesión y de formación de abscesos hepáticos amibianos, además de que tiene una mayor expresión en cepas virulentas (Biller *et al.*, 2010; Nakada-Tsukui *et al.*, 2018).

En los eucariontes, la superfamilia Ras son pequeñas GTPasas que funcionan como interruptores moleculares ubicuos, y se encuentran involucradas en una amplia variedad de

importantes procesos celulares como: la proliferación celular, el ensamble del citoesqueleto y el tráfico de membranas intracelulares. Esta superfamilia se puede dividir en varias subfamilias: Ras, Rho/Rac, Ran, Rab y Sar/Arf. Particularmente, las familias Rho, Rab y Arf regulan la organización de la actina y el transporte y tráfico vesicular y están presentes en *E. histolytica* (Reiner y Lundquis, 2018). Debido al gran número de genes presentes en el genoma de este parásito que codifican para estas pequeñas GTPasas (4,170 anotados en AmoebaDB) (Amoeba Informatics Resources, 2021), se sugiere que tienen un papel prominente en la biología y virulencia de *E. histolytica* (Aurrecoechea *et al.*, 2011). La familia EhRho con aproximadamente 20 miembros, incluye los homólogos Rho, Rac y Cdc42, y modulan la dinámica del citoesqueleto de actina, a través de múltiples efectores (Bosch y Siderovski, 2013). Las proteínas EhRho también participan en la migración, quimiotaxis, adherencia al epitelio intestinal, en la muerte y fagocitosis de las células del huésped (Franco-Barraza *et al.*, 2006). Por su parte, la gran variedad de genes *ehrab* (~100), señala su importancia durante el tráfico vesicular, principalmente en eventos de virulencia (Saito-Nakano *et al.*, 2005); sin embargo, solo pocas EhRabs se han caracterizado durante eventos endocíticos y de fagocitosis. En eucariontes superiores, las proteínas Arf son reguladores principales de la formación de vesículas durante el tráfico intracelular (D'Souza-Schorey y Chavrier, 2006). Dado el grado de conservación en la secuencia primaria y estructuralmente, entre las proteínas Arf1 de humano y de *E. histolytica*, cuando se encuentran inactivas (unidas al GDP), es posible que la proteína amibiana sufra un cambio conformacional similar a la de humano, cuando intercambia al GDP por GTP (forma activa). Hasta el momento, el mecanismo de acción de EhArf1 y su interacción con otras moléculas de la maquinaria de tráfico, aún se desconocen en este parásito (Serbzhinskiy *et al.*, 2015).

El genoma de *E. histolytica* contiene varios genes *heat shock* que codifican para las proteínas Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 y Hsp101 (Olivos-García *et al.*, 2016). En particular, Hsp70 presenta dos isoformas, EhHsp70-A y EhHsp70-B, con 637 y 656 aminoácidos, respectivamente; y sus parámetros cinéticos de hidrólisis de ATP son bajos y en concordancia con lo reportado para los miembros de esta familia. El análisis por dicroísmo circular de ambas isoformas, muestra diferencias en sus estructuras secundarias, pero similitudes en su estabilidad térmica. Además, EhHsp70 está presente en el núcleo y en el citoplasma y se sobreexpresa ligeramente cuando los trofozoítos son sometidos a agentes

oxidantes o calor (Santos *et al.*, 2010). De manera importante se ha reportado que la actividad de Hsp70 es esencial durante la formación de abscesos hepáticos amibianos (Santos *et al.*, 2015).

Las proteínas con dominio BAR están muy conservadas entre los organismos eucariontes. Se cree que funcionan como dímeros al unirse. Las proteínas con dominios BAR helicoidales anfipáticos N-terminales (N-BAR) como endofilinas y anfifisinas, funcionan en la endocitosis (Peter *et al.*, 2004). EhBAR, la proteína que contiene el dominio BAR/SH3 que elegimos se determinó que aumentaba su expresión junto con proteínas implicadas en la unión a actina y la organización del citoesqueleto. Esta proteína BAR/SH3 se encontró en fagosomas tempranos, pero no en los fagosomas completamente formados además de que se encontraba presente dentro de pseudópodos extensos, lo que la ubica en procesos fagocíticos (Sateriale *et al.*, 2016).

Los coactivadores transcripcionales se unen a los FTs para aumentar la tasa de transcripción de un gen o un conjunto de genes al estabilizar la formación del complejo de RNA polimerasa y habilitando la región promotora del gen que se transcribirá (Courey, 2008). Se encuentran en el núcleo y se unen con un activador o FT que contiene un DBD (McKenna y O'Malley, 2002). La actividad de los coactivadores puede estar relacionada a actividades enzimáticas como acetilación de histonas, las cuales modifican los estados de compactación de la cromatina, permitiendo la activación transcripcional (Näär *et al.*, 2001). En *E. histolytica* se ha identificado que un ortólogo de un coactivador positivo humano, EhPC4, facilita la migración de trofozoítos y la destrucción de células epiteliales del colon del huésped, lo que implica que EhPC4 tiene un impacto en la virulencia del parásito (de la Cruz *et al.*, 2014).

Con la finalidad de probar la asociación entre EhMyb10 y los genes *aig1-1*, *aig1-2*, *hsp70*, *ras*, *bas/sh3* y *cotr*, se transfectó la longitud completa del gen *Ehmyb10*. La sobreexpresión de este FT se validó mediante ensayos de RT-PCR e inmunofluorescencia, encontrando que conforme pasa el tiempo se incrementa la cantidad de transcrito y que la proteína se localiza principalmente en el núcleo de los trofozoítos, sitio donde los FTs ejercen principalmente su función (Whiteside y Goodbourn, 1993). A continuación, se analizó el transcrito de los genes de interés, encontrando sobreexpresión de *ras*, *bas/sh3*, *aig1-1*, *aig1-2* y *cotr*, y disminución

del mRNA de *hsp70*, similar a lo reportado en los transcriptomas de invasión y colonización intestinal (Gilchrist *et al.*, 2006) y de explantes de colon (Weber *et al.*, 2016). A pesar de que estos resultados deben ser corroborados mediante análisis de RT-qPCR y de western blot, es posible sugerir que la sobreexpresión del FT EhMyb10 afectó la expresión de estos genes, posiblemente a nivel transcripcional, aunque esto debe ser igualmente demostrado de manera experimental.

Finalmente, se analizó el resultado de la sobreexpresión de EhMyb10 en la virulencia de los trofozoítos evaluando dos propiedades, el daño en la barrera epitelial y su efecto citopático. Nuestros hallazgos, demostraron que el aumento de EhMyb10 volvió más eficientes a los trofozoítos para alterar la permeabilidad epitelial, y, además, causaron más daño a las monocapas intestinales, comparados con los trofozoítos control. Así, los datos sugieren que el incremento en la cantidad de EhMyb10 podría regular genes involucrados en la colonización e invasión intestinal, como los propuestos en este estudio, y posiblemente otros como la lectina Gal/GalNAc, la adhesina EhADH, algunas cisteína proteasas como la EhCP112, pequeñas GTPasas como EhRabB y EhRab7, miembros de la maquinaria ESCRT y proteínas del citoesqueleto, cuya participación durante la invasión de la mucosa intestinal está ampliamente caracterizada (Faust y Guillen, 2012). Además, queda por elucidar la participación de este FT en diversos procesos de este parásito como: la formación del absceso hepático amibiano, durante el enquistamiento, ante el estrés oxidativo y la evasión de la respuesta inmune del huésped.

10. CONCLUSIONES

El análisis *in silico* nos permitió identificar que, en condiciones basales de cultivo, *E. histolytica* tiene una expresión moderada de 162 genes, los cuales modifican su expresión al menos ± 1.5 veces durante la colonización intestinal. Estos genes contienen en su promotor un ERM con un tamaño de 9 nt, lo que sugiere que son posibles genes blanco de EhMyb10, los cuales codifican para proteínas involucradas en la regulación de la transcripción, proteasas, de tráfico vesicular, GTPasas, chaperonas, chaperoninas, de choque térmico, andamio/Adaptadoras, del citoesqueleto, etc.

Con la sobreexpresión de EhMyb10 se incrementó el transcrito de genes como *aig1*, relacionados con la fagocitosis (*bar/sh3*) la señalización celular, el tráfico vesicular (*ras*), con actividades co-reguladoras (*cotr*), y una disminución del mRNA de choque térmico (*hsp70*) al compararlos con los trofozoítos control. De igual manera, también observamos un incremento en la permeabilidad y del efecto citopático de células epiteliales e intestinales producida por los trofozoítos con la sobreexpresión de este FT, lo que sugiere que EhMyb10 regula de forma transcripcional la expresión de genes relacionados en la virulencia al interactuar con células intestinales.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de EhMyb10 en ensayos de virulencia *in vitro* (movilidad, adhesión y eritrofagocitosis) de *E. histolytica* realizando un silenciamiento o la sobreexpresión.
- Analizar por RT-qPCR la sobreexpresión de EhMyb10
- Utilizar microscopía electrónica de transmisión para obtener resultados más finos de la localización subcelular de esta proteína.
- Utilizar herramientas como CHIP-seq para obtener una visión más amplia de como este FT puede tener más interacciones DNA-proteína con todo el genoma de *E. histolytica*.
- Analizar la virulencia *in vivo* de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 en el intestino de ratones

12. REFERENCIAS

1. Abhyankar, M. M., Hochreiter, A. E., Hershey, J., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O., Sobral, B. W., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr, & Gilchrist, C. A. (2008). Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryotic cell*, 7(9), 1565–1572. <https://doi.org/10.1128/EC.00123-08>
2. Acuna-Soto, R., Maguire, J. H., & Wirth, D. F. (2000). Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *The American journal of gastroenterology*, 95(5), 1277–1283. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.01525.x>
3. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2015). *Molecular biology of the cell*. (6th edition). Garland Science
4. Alonso, A. M., Scholnicov, N., Diambra, L., & Cóceres, V. M. (2022). In-depth comparative analysis of *Trichomonas foetus* transcriptomics reveals novel genes linked with adaptation to feline host. *Scientific reports*, 12(1), 10057. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14310-x>
5. Arratia J., Aguirre J. (2013). Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP* 16(2), 98-108. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72081-3](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72081-3).
6. Azuara-Liceaga E, F.-S. E.-C.-c. (2005). *Entamoeba histolytica*: structural and functional analysis of the *E. histolytica* ADH112 gene promoter. *Exp Parasitol*
7. Azuara-Liceaga E., Rendón-Gandarilla F., Santiago-Jiménez J. C., Cárdenas-Hernández H., Castañeda-Ortiz E. J. Valdés-Flores J., Hernández D., García-Rivera G., Orozco E., Betanzos A. (2015). Characterization of EhMyb10 transcription factor in *Entamoeba histolytica*. XVIII International Seminar on Amebiasis. Campeche, México
8. Azuara-Liceaga E., Sanchez-Buena S., Meneses E., Brieba L. G., Orozco E. (2007). Identification of myb transcription factors in *Entamoeba histolytica*. *The Faseb Journal* 21(6), A1031-A1031. <https://doi.org/10.1096/fasebj.21.6.A1031-c>
9. Bansal, D., Ave, P., Kerneis, S., Frileux, P., Boché, O., Baglin, A. C., Dubost, G., Leguern, A. S., Prevost, M. C., Bracha, R., Mirelman, D., Guillén, N., & Labruyère,

- E. (2009). An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(11), e551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000551>
10. Bergholtz, S., Andersen, T. O., Andersson, K. B., Borrebaek, J., Lüscher, B., & Gabrielsen, O. S. (2001). The highly conserved DNA-binding domains of A-, B- and c-Myb differ with respect to DNA-binding, phosphorylation and redox properties. *Nucleic acids research*, 29(17), 3546–3556. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.3546>
 11. Berk A. J. (1999). Activation of RNA polymerase II transcription. *Current opinion in cell biology*, 11(3), 330–335. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80045-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80045-3)
 12. Betanzos, A., Bañuelos, C., & Orozco, E. (2019). Host Invasion by Pathogenic Amoebae: Epithelial Disruption by Parasite Proteins. *Genes*, 10(8), 618. <https://doi.org/10.3390/genes10080618>
 13. Biller, L., Davis, P. H., Tillack, M., Matthiesen, J., Lotter, H., Stanley, S. L., Jr, Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2010). Differences in the transcriptome signatures of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *BMC genomics*, 11, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-63>
 14. Biller, L., Schmidt, H., Krause, E., Gelhaus, C., Matthiesen, J., Handal, G., Lotter, H., Janssen, O., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (2009). Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics*, 9(17), 4107–4120. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900022>
 15. Borchers, A. C., Langemeyer, L., & Ungermann, C. (2021). Who's in control? Principles of Rab GTPase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *The Journal of cell biology*, 220(9), e202105120. <https://doi.org/10.1083/jcb.202105120>
 16. Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Experimental & molecular medicine*, 45(3), e15. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.30>

17. Campos P. J. M., Sánchez M. V., Villalba M. J. D. (2011). *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito. *Enfermedades infecciosas y Microbiología*, 31(2), 63-70 <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei112e.pdf>
18. Cárdenas-Hernández, H., Titau-Delgado, G. A., Castañeda-Ortiz, E. J., Torres-Larios, A., Brieba, L. G., Del Río-Portilla, F., & Azuara-Liceaga, E. (2021). Genome-wide and structural analysis of the Myb-SHAQKYF family in *Entamoeba histolytica*. *Biochimica et biophysica Acta (BBA). Proteins and proteomics*, 1869(4), 140601. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140601>
19. Castañon-Sanchez, C. A., Luna-Arias, J. P., de Dios-Bravo, M. G., Herrera-Aguirre, M. E., Olivares-Trejo, J. J., Orozco, E., & Hernandez, J. M. (2010). *Entamoeba histolytica*: a unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein expression and purification*, 70(1), 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.12.007>
20. Cázares-Apátiga, J., Medina-Gómez, C., Chávez-Munguía, B., Calixto-Gálvez, M., Orozco, E., Vázquez-Calzada, C., Martínez-Higuera, A., & Rodríguez, M. A. (2017). The Tudor Staphylococcal Nuclease Protein of *Entamoeba histolytica* Participates in Transcription Regulation and Stress Response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 52. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00052>
21. Chacín-Bonilla, Leonor. (2013). Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Revista médica de Chile*, 141(5), 609-615. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872013000500009>
22. Chadee, K., Petri, W. A., Jr, Innes, D. J., & Ravdin, J. I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of clinical investigation*, 80(5), 1245–1254. <https://doi.org/10.1172/JCI113199>
23. Chávez M. B., González R. A. (2013). *Entamoeba histolytica*: la estructura interna de un destructor por naturaleza. *Revista Ciencia*, 64(2), 42-49. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/64_2/PDF/EntamoebaHistolytica.pdf

24. Chou A, Austin RL. *Entamoeba histolytica*. [Updated 2021 Apr 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557718/>
25. Clark, C. G., Alsmark, U. C., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noël, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Ackers J. P., Bhattacharya S., Bhattacharya A., Lohia A., Gullén N., Duchêne M. Nozaki T., Hall, N. (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in parasitology*, 65, 51–190. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(07\)65002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(07)65002-7)
26. Cornick, S., Chadee, K. (2017). *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue barriers*, 5(1), e1283386. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283386>
27. Courey. A. J. (2008). *Mechanisms in transcriptional regulation*. Malden, MA: Blackwell. ISBN 978-1-4051-0370-1. OCLC 173367793.
28. D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5), 347–358. <https://doi.org/10.1038/nrm1910>
29. da Silva, M. S., Perez, A. M., da Silveira, R., de Moraes, C. E., Siqueira-Neto, J. L., Freitas, L., Jr, & Cano, M. I. (2010). The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC microbiology*, 10, 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-136>
30. Davidson, C. J., Guthrie, E. E., & Lipsick, J. S. (2013). Duplication and maintenance of the Myb genes of vertebrate animals. *Biology open*, 2(2), 101–110. <https://doi.org/10.1242/bio.20123152>
31. de Dios-Bravo, G., Luna-Arias, J. P., Riverón, A. M., Olivares-Trejo, J. J., López-Camarillo, C., & Orozco, E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. *The FEBS journal*, 272(6), 1354–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04566.x>
32. de la Cruz, O. H., Muñoz-Lino, M., Guillén, N., Weber, C., Marchat, L. A., López-Rosas, I., Ruíz-García, E., Astudillo-de la Vega, H., Fuentes-Mera, L., Álvarez-

- Sánchez, E., Mendoza-Hernández, G., & López-Camarillo, C. (2014). Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*. *Journal of proteomics*, *111*, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.041>
33. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *72*, 431–432.
34. Du, H., Liang, Z., Zhao, S., Nan, M. G., Tran, L. S., Lu, K., Huang, Y. B., & Li, J. N. (2015). The Evolutionary History of R2R3-MYB Proteins Across 50 Eukaryotes: New Insights Into Subfamily Classification and Expansion. *Scientific reports*, *5*, 11037. <https://doi.org/10.1038/srep11037>
35. Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, *15*(10), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
36. Edman, U., Meza, I., & Agabian, N. (1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(9), 3024–3028. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.3024>
37. Ehrenkaufer, G. M., Eichinger, D. J., & Singh, U. (2007). Trichostatin A effects on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC genomics*, *8*, 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-216>
38. Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, *11*(6), 898–910. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01300.x>
39. Espinosa-Cantellano, M., & Martínez-Palomo, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clinical microbiology reviews*, *13*(2), 318–331. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.318>
40. Fairall, L., Chapman, L., Moss, H., de Lange, T., & Rhodes, D. (2001). Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and

- TRF2. *Molecular cell*, 8(2), 351–361. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00321-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00321-5)
41. Faust, D. M., & Guillen, N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection*, 14(15), 1428–1441. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.013>
 42. Feller A. Machemer K., Braun E. L., Grotewold E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 66, 94-116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04459.x>
 43. Franco-Barraza, J., Zamudio-Meza, H., Franco, E., del Carmen Domínguez-Robles, M., Villegas-Sepúlveda, N., & Meza, I. (2006). Rho signaling in *Entamoeba histolytica* modulates actomyosin-dependent activities stimulated during invasive behavior. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(3), 117–131. <https://doi.org/10.1002/cm.20105>
 44. Fukuzawa, M., Zhukovskaya, N. V., Yamada, Y., Araki, T., & Williams, J. G. (2006). Regulation of *Dictyostelium* prestalk-specific gene expression by a SHAQKY family MYB transcription factor. *Development (Cambridge, England)*, 133(9), 1715–1724. <https://doi.org/10.1242/dev.02327>
 45. Ganter, B., & Lipsick, J. S. (1999). Myb and oncogenesis. *Advances in cancer research*, 76, 21–60. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60773-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60773-3)
 46. Gay, L., Melenotte, C., Lakbar, I., Mezouar, S., Devaux, C., Raoult, D., Bendiane, M. K., Leone, M., & Mège, J. L. (2021). Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. *Frontiers in immunology*, 12, 698121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.698121>
 47. Gilchrist, C. A., Holm, C. F., Hughes, M. A., Schaenman, J. M., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *The Journal of biological chemistry*, 276(15), 11838–11843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007375200>
 48. Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D. J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkaufner, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (2006). Impact of intestinal

- colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Molecular and biochemical parasitology*, 147(2), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.02.007>
49. Gissot, M., Briquet, S., Refour, P., Boschet, C., & Vaquero, C. (2005). PfMyb1, a *Plasmodium falciparum* transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation. *Journal of molecular biology*, 346(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.045>
50. Gomez, C., Ramírez E., M., Calixto-Gálvez, M., Medel, O., & Rodríguez, M. A. (2010). Regulation of gene expression in protozoa parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 726045. <https://doi.org/10.1155/2010/726045>.
51. Gómez, C., Pérez, D.G., López-Bayghen, E., and Orozco, E. (1998) Transcriptional analysis of the EhPgp1 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem* 273: 7277–7284.
52. Guo, X., Houpt, E., & Petri, W. A., Jr (2007). Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. *Current opinion in immunology*, 19(4), 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.005>
53. Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E., Petri, W. A., Jr (2003). Amebiasis. *The New England journal of medicine*, 348(16), 1565–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022710>
54. Hernandez N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes & Dev.* 7: 1291–1308.
55. Hernández, María Laura, & Acosta, Luis E. (2021). Caracterización del dimorfismo sexual y reconocimiento de machos dimórficos en el complejo *Discocyrtus prospicuus* (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae): una aproximación desde la morfometría geométrica. *Revista mexicana de biodiversidad*, 92, e923545. Epub 25 de octubre de 2021. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3545>
56. Hernández de la Cruz, O., Marchat, L. A., Guillén, N., Weber, C., López Rosas, I., Díaz-Chávez, J., Herrera, L., Rojo-Domínguez, A., Orozco, E., & López-Camarillo, C. (2016). Multinucleation and Polykaryon Formation is Promoted by the EhPC4 Transcription Factor in *Entamoeba histolytica*. *Scientific reports*, 6, 19611. <https://doi.org/10.1038/srep19611>

57. Hernández, R., Luna-Arias, J. P., & Orozco, E. (1997). Comparison of the *Entamoeba histolytica* TATA-binding protein (TBP) structure with other TBP. *Archives of medical research*, *28 Spec No*, 43–45.
58. Hochheimer, A., & Tjian, R. (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes & development*, *17*(11), 1309–1320. <https://doi.org/10.1101/gad.1099903>
59. Hon, C. C., Weber, C., Sismeiro, O., Proux, C., Koutero, M., Deloger, M., Das, S., Agrahari, M., Dillies, M. A., Jagla, B., Coppee, J. Y., Bhattacharya, A., & Guillen, N. (2013). Quantification of stochastic noise of splicing and polyadenylation in *Entamoeba histolytica*. *Nucleic acids research*, *41*(3), 1936–1952. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1271>
60. Hong, Y., Ahmad, N., Zhang, J., Lv, Y., Zhang, X., Ma, X., Xiuming, L., & Na, Y. (2022). Genome-wide analysis and transcriptional reprogrammings of MYB superfamily revealed positive insights into abiotic stress responses and anthocyanin accumulation in *Carthamus tinctorius* L. *Molecular genetics and genomics: MGG*, *297*(1), 125–145. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01839-1>
61. Horovitz, A., Reingewertz, T. H., Cuéllar, J., & Valpuesta, J. M. (2022). Chaperonin Mechanisms: Multiple and (Mis)Understood?. *Annual review of biophysics*, *51*, 115–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-082521-113418>
62. Huang, Y. C., Su, L. H., Lee, G. A., Chiu, P. W., Cho, C. C., Wu, J. Y., & Sun, C. H. (2008). Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, *283*(45), 31021–31029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805023200>
63. Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., & Rozenblatt, S. (1987). *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Molecular and biochemical parasitology*, *24*(3), 227–235. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90154-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90154-x)
64. Huerta, M., Reyes, L., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Betanzos, A., Díaz-Hernández, M., Galindo, A., Bolaños, J., Cárdenas, H., Azuara-Liceaga, E., Chávez-Munguía, B., & Orozco, E. (2020). A noncanonical GATA transcription factor of

- Entamoeba histolytica* modulates genes involved in phagocytosis. *Molecular microbiology*, 114(6), 1019–1037. <https://doi.org/10.1111/mmi.14592>
65. Iyer, L. M., Koonin, E. V., Leipe, D. D., & Aravind, L. (2005). Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic acids research*, 33(12), 3875–3896. <https://doi.org/10.1093/nar/gki702>
66. Iyer, L. M., Anantharaman, V., Wolf, M. Y., & Aravind, L. (2008). Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *International journal for parasitology*, 38(1), 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.07.018>
67. Jiang, I., Tsai, C. K., Chen, S. C., Wang, S. H., Amiraslanov, I., Chang, C. F., Wu, W. J., Tai, J. H., Liaw, Y. C., & Huang, T. H. (2011). Molecular basis of the recognition of the ap65-1 gene transcription promoter elements by a Myb protein from the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic acids research*, 39(20), 8992–9008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr558>
68. Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Hernandez, R., Ochner, C., 2018. *Entamoeba histolytica*: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 4601420.
69. Lee T. I., Young R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics*, 34, 77-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.77>
70. Leippe, M., & Herbst, R. (2004). Ancient weapons for attack and defense: the pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 51(5), 516–521. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00286.x>
71. Li, B., Espinal, A., & Cross, G. A. (2005). Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5011–5021. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.5011-5021.2005>
72. Li J, Cui Z, Li X, Zhang L. (2021). Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. *Res Vet Sci.* 136, 174-181. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.02.021. Epub 2021 Feb 27. PMID: 33676155.

73. Lioutas, C., & Tannich, E. (1995). Transcription of protein-coding genes in *Entamoeba histolytica* is insensitive to high concentrations of alpha-amanitin. *Molecular and biochemical parasitology*, 73(1-2), 259–261. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00101-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00101-6)
74. Lipsick J. S. (1996). One billion years of Myb. *Oncogene*, 13(2), 223–235.
75. Lipsick J. S. (2010). The C-MYB story--is it definitive?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17067–17068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012402107>
76. Lipsick J. S., & Wang D. M. (1999). Transformation by v-Myb. *Oncogene*, 18(19), 3047–3055. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202745>
77. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., ... Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433(7028), 865–868. <https://doi.org/10.1038/nature03291>
78. Lorenzi, H. A., Puiu, D., Miller, J. R., Brinkac, L. M., Amedeo, P., Hall, N., & Caler, E. V. (2010). New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(6), e716. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000716>
79. Lorenzi, H., Thiagarajan, M., Haas, B., Wortman, J., Hall, N., & Caler, E. (2008). Genome wide survey, discovery and evolution of repetitive elements in three *Entamoeba* species. *BMC genomics*, 9, 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-595>
80. Lotter, H., González-Roldán, N., Lindner, B., Winau, F., Isibasi, A., Moreno-Lafont, M., Ulmer, A. J., Holst, O., Tannich, E., & Jacobs, T. (2009). Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS pathogens*, 5(5), e1000434. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000434>
81. Luna-Arias JP, Hernandez-Rivas R, de Dios-Bravo G, Garcia 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. *Microbiol* 145(1):33– 40. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-1-33>
82. MacFarlane, R. C., Singh, U. (2006). Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infection and immunity*, 74(1), 340–351. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.340-351.2006>
83. Manna, D., Lentz, C. S., Ehrenkaufner, G. M., Suresh, S., Bhat, A., & Singh, U. (2018). An NAD⁺-dependent novel transcription factor controls stage conversion in *Entamoeba*. *eLife*, 7, e37912. <https://doi.org/10.7554/eLife.37912>
84. Manna, D., & Singh, U. (2019). Nuclear Factor Y (NF-Y) Modulates Encystation in *Entamoeba* via Stage-Specific Expression of the NF-YB and NF-YC Subunits. *mBio*, 10(3), e00737-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00737-19>
85. Manning C. D., Raghavan P., Shütze. (2008). *Introduction to information retrieval*. Cambridge University Press.
86. 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(11), 725–737. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00220.x>
87. Marie, C., & Petri, W. A., Jr (2014). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annual review of microbiology*, 68, 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103550>
88. Martínez-López, C., Orozco, E., Sánchez, T., García-Pérez, R. M., Hernández-Hernández, F., & Rodríguez, M. A. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular microbiology*, 6(4), 367–376. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00363.x>
89. McKenna, N. J., & O'Malley, B. W. (2002). Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology*, 143(7), 2461–2465. <https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8892>
90. Mendoza, L., Orozco, E., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., García, E., & Gariglio, P. (2003). Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the

- mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 4), 885–893. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25892-0>
91. 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(1-2), 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.02.004>
92. Morello, L. G., Hesling, C., Coltri, P. P., Castilho, B. A., Rimokh, R., & Zanchin, N. I. (2011). The NIP7 protein is required for accurate pre-rRNA processing in human cells. *Nucleic acids research*, 39(2), 648–665. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq758>
93. Näär, A. M., Lemon, B. D., & Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annual review of biochemistry*, 70, 475–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.475>
94. Naiyer, S., Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2019). Advances in *Entamoeba histolytica* Biology Through Transcriptomic Analysis. *Frontiers in microbiology*, 10, 1921. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01921>
95. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., & Nozaki, T. (2010). Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Experimental parasitology*, 126(3), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.014>
96. Nakada-Tsukui, K., Sekizuka, T., Sato-Ebine, E., Escueta-de Cadiz, A., Ji, D. D., Tomii, K., Kuroda, M., & Nozaki, T. (2018). AIG1 affects in vitro and in vivo virulence in clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *PLoS pathogens*, 14(3), e1006882. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006882>
97. Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant physiology*, 149(1), 88–95. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129791>
98. 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*, 7, 492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00492>

99. Oh I.H., Reddy E. (1999). The myb gene family in cell growth differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18, 3017-3033. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202839>
100. Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Santos, F., Luis-García, E. R., Gudiño, M., & Pérez-Tamayo, R. (2016). The oxygen reduction pathway and heat shock stress response are both required for *Entamoeba histolytica* pathogenicity. *Current genetics*, 62(2), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0543-5>
101. Ong, S. J., Hsu, H. M., Liu, H. W., Chu, C. H., & Tai, J. H. (2006). Multifarious transcriptional regulation of adhesion protein gene ap65-1 by a novel Myb1 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic cell*, 5(2), 391–399. <https://doi.org/10.1128/EC.5.2.391-399.2006>
102. Otsuka, H., & Van Haastert, P. J. (1998). A novel Myb homolog initiates *Dictyostelium* development by induction of adenylyl cyclase expression. *Genes & development*, 12(11), 1738–1748. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1738>
103. Pearson, R. J., & Singh, U. (2010). Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cellular microbiology*, 12(12), 1681–1690. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01524.x>
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), 495–499. <https://doi.org/10.1126/science.1092586>
104. Petri, W. A., Jr, Haque, R., & Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual review of microbiology*, 56, 39–64.
105. Purdy, J. E., Pho, L. T., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Molecular and biochemical parasitology*, 78(1-2), 91–103. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02614-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02614-x)
106. Rabinowicz, P. D., Braun, E. L., Wolfe, A. D., Bowen, B., & Grotewold, E. (1999). Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics*, 153(1), 427–444. <https://doi.org/10.1093/genetics/153.1.427>

107. Ragland, B. D., Ashley, L. S., Vaux, D. L., & Petri, W. A. Jr (1994). *Entamoeba histolytica*: Target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Experimental Parasitology*, 79(3), 460–467.
108. Rawat A, Singh P, Jyoti A, Kaushik S, Srivastava VK. Averting transmission: A pivotal target to manage amoebiasis. *Chem Biol Drug Des*. 2020 Aug;96(2):731-744. doi: 10.1111/cbdd.13699. Epub 2020 May 25. PMID: 32356312.
109. Reiner, D. J., & Lundquist, E. A. (2018). Small GTPases. *WormBook : the online review of C. elegans biology, 2018*, 1–65. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.67.2>
110. Rendón-Gandarilla, F. J., Álvarez-Hernández, V., Castañeda-Ortiz, E. J., Cárdenas-Hernández, H., Cárdenas-Guerra, R. E., Valdés, J., Betanzos, A., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillen, A., Orozco, E., López-Canovas, L., & Azuara-Liceaga, E. (2018). Telomeric Repeat-Binding Factor Homologs in *Entamoeba histolytica*: New Clues for Telomeric Research. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 341. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00341>
111. 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-82>
112. Rose, A., Meier, I., & Wienand, U. (1999). The tomato I-box binding factor LeMYBI is a member of a novel class of myb-like proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 20(6), 641–652. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00638.x>
113. Ross, A. G., Olds, G. R., Cripps, A. W., Farrar, J. J., & McManus, D. P. (2013). Enteropathogens and chronic illness in returning travelers. *The New England journal of medicine*, 368(19), 1817–1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1207777>
114. Saavedra E., Olivos G. A. (2017). Amibiasis. *Revista ciencia*, 68(1), 14-17.
115. Saikumar, P., Murali, R., & Reddy, E. P. (1990). Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8452–8456.
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8452>
116. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., & Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry*, 279(47), 49497–49507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403987200>
117. Santos, F., Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Enríquez-Flores, S., Nequiz-Avendaño, M., Cortes, A., De la Luz León-Avila, G., Saavedra, E., Pérez-Tamayo, R., & Olivos-García, A. (2020). Functional characterization and subcellular distribution of two recombinant cytosolic HSP70 isoforms from *Entamoeba histolytica* under normal and stress conditions. *Parasitology research*, 119(4), 1337–1351. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06621-7>
118. Santos, F., Nequiz, M., Hernández-Cuevas, N. A., Hernández, K., Pineda, E., Encalada, R., Guillén, N., Luis-García, E., Saralegui, A., Saavedra, E., Pérez-Tamayo, R., & Olivos-García, A. (2015). Maintenance of intracellular hypoxia and adequate heat shock response are essential requirements for pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, 17(7), 1037–1051. <https://doi.org/10.1111/cmi.12419>
119. Sateriale, A., Miller, P., & Huston, C. D. (2016). Knockdown of Five Genes Encoding Uncharacterized Proteins Inhibits *Entamoeba histolytica* Phagocytosis of Dead Host Cells. *Infection and immunity*, 84(4), 1045–1053. <https://doi.org/10.1128/IAI.01325-15>
120. Schaenman, J. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (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(2), 1602–1609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006866200>
121. 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. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23869>

122. Shirley, D. T., Farr, L., Watanabe, K., & Moonah, S. (2018). A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open forum infectious diseases*, 5(7), ofy161. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>
123. Shirley, D. A., & Moonah, S. (2016). Fulminant Amebic Colitis after Corticosteroid Therapy: A Systematic Review. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(7), e0004879. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004879>
124. Silar, P., Butler, G., & Thiele, D. J. (1991). Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Molecular and cellular biology*, 11(3), 1232–1238. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.3.1232-1238.1991>
125. Silvestre, A., Plaze, A., Berthon, P., Thibeaux, R., Guillen N., & Labruyère, E. (2015). In *Entamoeba histolytica*, a BspA family protein is required for chemotaxis toward tumour necrosis factor. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 2(7), 235-246. <https://doi.org/10.15698/mic2015.07.214>
126. SINAVE. *Boletín epidemiológico*; (2 junio, 2022). Vol. 39, semana 20. Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica.
127. Singh, U., & Ehrenkauf, G. M. (2009). Recent insights into Entamoeba development: identification of transcriptional networks associated with stage conversion. *International journal for parasitology*, 39(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.004>
128. Singh, U., Rogers, J. B. (1998). The novel core promoter element GAAC in the hgl5 gene of *Entamoeba histolytica* is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), 21663–21668. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21663>
129. Sitzmann, J., Noben-Trauth, K., Kamano, H., & Klempnauer, K. H. (1996). Expression of B-Myb during mouse embryogenesis. *Oncogene*, 12(9), 1889–1894.
130. SSA (10 de enero de 2016). Sabías... que es la amebiasis o amibiasis. Secretaria de Salud, recuperado de <https://www.gob.mx/salud/articulos/sabias-que-es-la-amebiasis-o-amibiasis>
131. Stanley S. L., Jr (2003). Amoebiasis. *Lancet (London, England)*, 361(9362), 1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)

132. Sun, C. H., Palm, D., McArthur, A. G., Svärd, S. G., & Gillin, F. D. (2002). A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, *46*(4), 971–984. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03233.x>
133. Thibeaux, R., Weber, C., Hon, C. C., Dillies, M. A., Avé, P., Coppée, J. Y., Labruyère, E., Guillén, N. (2013). Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. *PLoS pathogens*, *9*(12), e1003824. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003824>
134. van der Giezen, M., León-Avila, G., & Tovar, J. (2005). Characterization of chaperonin 10 (Cpn10) from the intestinal human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Microbiology (Reading, England)*, *151*(Pt 9), 3107–3115. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28068-0>
135. Verma, K., Srivastava, V. K., & Datta, S. (2020). Rab GTPases take centre stage in understanding *Entamoeba histolytica* biology. *Small GTPases*, *11*(5), 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>
136. Waldman, B. S., Schwarz, D., Wadsworth, M. H., 2nd, Saeij, J. P., Shalek, A. K., & Lourido, S. (2020). Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*. *Cell*, *180*(2), 359–372.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.013>
137. Walters, H. A., & Temesvari, L. A. (2021). Target acquired: transcriptional regulators as drug targets for protozoan parasites. *International journal for parasitology*, *51*(8), 599–611. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.12.007>
138. Weber, C., Guigon, G., Bouchier, C., Frangeul, L., Moreira, S., Sismeiro, O., Gouyette, C., Mirelman, D., Coppee, J. Y., & Guillén, N. (2006). Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell*, *5*(5), 871–875. <https://doi.org/10.1128/EC.5.5.871-875.2006>
139. Weber, C., Koutero, M., Dillies, M. A., Varet, H., Lopez-Camarillo, C., Coppée, J. Y., Hon, C. C., Guillén, N. (2016). Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. *Scientific reports*, *6*, 35852. <https://doi.org/10.1038/srep35852>

140. Weston, K., & Bishop, J. M. (1989). Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell*, 58(1), 85–93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90405-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90405-4)
141. Wieser J., Adams T. H. (1995). flbD encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev*, 9, 491-502.
142. Wilson, I. W., Weedall, G. D., & Hall, N. (2012). Host-Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: what have we learned from their genomes? *Parasite immunology*, 34(2-3), 90–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01325.x>
143. Whiteside, S. T., & Goodbourn, S. (1993). Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *Journal of cell science*, 104 (Pt 4), 949–955. <https://doi.org/10.1242/jcs.104.4.949>
144. Wong-Baeza, I., Alcántara-Hernández, M., Mancilla-Herrera, I., Ramírez-Saldívar, I., Arriaga-Pizano, L., Ferat-Osorio, E., López-Macías, C., & Isibasi, A. (2010). The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 254521. <https://doi.org/10.1155/2010/254521>