

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



**Cinvestav**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Efecto de la proteína EiMyb23 sobre el enquistamiento  
de *Entamoeba invadens*”**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.B.P. JATZIRY DANIELA OCAMPO ULLOA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOQUÍMICA**

Directores de la Tesis

**Dr. Jesús Valdés Flores**

**Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**

Ciudad de México

Enero, 2025

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con el número de CVU 1132859 en el departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) en colaboración con el Posgrado en Ciencias Genómicas de 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”.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jesús Valdes Flores y a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga por confiar en mí, abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar este proyecto de investigación. Por su asesoría, paciencia y apoyo.

Al Dr. Guillermo Ávila Flores y el Dr. José Víctor Calderón Salinas por su asesoría y aportaciones que enriquecieron mi proyecto.

Al Consejo Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), al Departamento de Bioquímica del Cinvestav, al Colegio de Profesores del Departamento y al Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM).

A la Dra. Patricia Areli Cuellar Silva en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por su enorme colaboración en el proyecto. Por siempre tener la disponibilidad para ayudarme en la resolución de problemas.

A la Dra. Elizabeth J. Castañeda-Ortiz, Alan Jesé Rodríguez Almaraz y Cesar Adrián Rosales Zarza, de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por su enorme colaboración en el proyecto.

A la Dra. Abigail Betanzos Fernandez del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav por su ayuda con la microscopia confocal.

A la Dra. Daniela Lozano Amado de la Universidad de Stanford por la donación de la cepa IP-1 de *E. invadens*.

Al Q. B. P. José Manuel Galindo Rosales y a la Dra. Tea Anastasia Ruiz Luis, por su orientación en las cuestiones metodológicas. Por siempre tener la disponibilidad para ayudarme en la resolución de problemas.

A José Martín Velázquez Lozano, por su asistencia en la preparación del material que utilice durante mi investigación.

Al Dr. Luis Marat Álvarez Salas en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav al Dr. Edgar Morales Ríos en Departamento de Bioquímica Cinvestav.

A la Lic. Angélica González Ceja y la Lic. Priscila González Ceja por su orientación en las cuestiones administrativas desde el inicio de la maestría.

Al Ing. Luis Ernesto Castañeda, por su ayuda en la preparación de medio de cultivo y contribuciones en mi proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, el Ing. Fernando Moctezuma Rosas, la Lic. Sonia Rodríguez Davydenko, el Dr. Israel Canela Pérez, la Biol. Diana Laura Perez Osornio, por su gran apoyo y amistad.

Al Q.F.B. Hiram Lozano Ruiz, por su apoyo y orientación con unas microscopías y por su amistad.

A Dios, a mi familia, especialmente a mi madre Belda, mi Padre Hilarión y a mi hermana Keila, por su apoyo económico y moral. A mis hermanas Nelsy, Citlalli, mis sobrinos Yoltzin, Josué, Leduan y Mauricio. A mi amiga Suh, por su gran amistad y apoyo moral.

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1 Amibiasis .....	13
1.2 Epidemiología.....	13
1.3 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	14
1.3.1 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	15
1.3.2 El genoma de <i>E. histolytica</i> .....	16
1.3.3 Patogenicidad de <i>E. histolytica</i> .....	18
1.4 Proceso de enquistamiento en el género Entamoeba .....	19
1.4.1 Moléculas y procesos involucrados en el enquistamiento del género Entamoeba.....	20
1.4.2 Quitina desacetilasas .....	20
1.4.3 Quitinasas .....	20
1.4.4 Lectinas de Jacob .....	21
1.4.5 Lectinas de Gal/GalNAc.....	21
1.4.6 Formación de la pared del quiste .....	22
1.4.7 Vías celulares involucradas en el enquistamiento.....	25
1.5 Genoma y transcriptoma de <i>E. invadens</i> .....	28
1.6 Factores de transcripción Myb .....	30
1.6.1 Factores de transcripción Myb en el género Entamoeba .....	34
II. ANTECEDENTES .....	35
III. JUSTIFICACIÓN .....	39
IV. HIPOTESIS.....	39
V. OBJETIVOS.....	39
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
7.1 Sobreexpresión y silenciamiento de EiMyb23 en trofozoítos de <i>E. invadens</i> (cepa IP-1).....	41
7.2 Cultivo y enquistamiento de <i>E. invadens in vitro</i> . .....	42
7.3 Transfección y selección .....	42
7.4 Obtención de RNA .....	43
7.5 Ensayos de RT-PCR .....	43
7.6 Inmunofluorescencia .....	44
7.7 Búsqueda de motivos conservados en promotores de genes que se sobreexpresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento.....	44

7.8 Análisis ontológico de genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento .....	44
VIII. RESULTADOS.....	46
8.1 Análisis de los niveles de expresión de <i>eimyb23</i> y <i>jacob</i> en las condiciones transfectantes y basal de cultivo de <i>E. invadens</i> .....	46
8.2 Expresión y localización de la proteína EiMyb23 en las condiciones transfectantes y basal de cultivo de <i>E. invadens</i> .....	47
8.3 Efecto de la sobre-expresión e inhibición de EiMyb23 sobre el enquistamiento .....	51
8.4 Efecto de la sobreexpresión e inhibición de la expresión de EiMyb23 sobre el enquistamiento.....	53
8.5 Identificación de motivos en el promotor de los posibles genes blanco de EiMyb23 .....	55
8.6 Análisis ontológico de los genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento .....	58
IX. DISCUSIÓN .....	65
X. CONCLUSIONES .....	70
XI. PERSPECTIVAS .....	71
XII. REFERENCIAS .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	16
Figura 2. Proceso de enquistamiento en el género <i>Entamoeba</i> .....	23
Figura 3. Modelo de “wattle and daub” propuesto para la formación de la pared del quiste de <i>Entamoeba</i> .....	25
Figura 4. Vía de síntesis de quitina propuesta para <i>E. invadens</i> .....	27
Figura 5. Representación esquemática de la estructura principal, clasificación y funciones clave de los factores de transcripción Myb que se encuentran en eucariotas.....	32
Figura 6. Perfil de expresión de los genes Myb de <i>E. invadens</i> durante el enquistamiento y el desenquistamiento. ....	37
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de los repetidos R2 y R3 del DBD-MYB de las proteínas ortólogas de EiMyb23. ....	38
Figura 8. Vector de clonación pEi-ck-Myc. ....	41
Figura 9. Construcciones empleadas en este trabajo y niveles de expresión del gen <i>eimyb23</i> y <i>jacob</i> en trozofitos de <i>E. invadens</i> transfectantes y en la condición basal.....	47
Figura 10. Expresión y localización de la proteína EiMyb23 en trozofitos de <i>E. invadens</i> transfectantes. ....	49
Figura 11. Expresión y localización de la proteína EiMyb23 en trozofitos de <i>E. invadens</i> transfectantes. ....	50
Figura 12. Niveles de expresión de los genes <i>eimyb23</i> y <i>jacob</i> durante el enquistamiento de trozofitos de <i>E. invadens</i> transfectantes y en condición Wt. ....	52
Figura 13. Expresión de los genes <i>eimyb23</i> y <i>jacob</i> durante el enquistamiento-desenquistamiento. ....	53
Figura 14. Efecto de EiMyb23 sobre el enquistamiento. ....	55
Figura 15. Análisis ontológico de los posibles genes que sobre-expresan a las 48 h post-enquistamiento en <i>E. invadens</i> . Clasificación de acuerdo a: procesos biológicos. ....	59
Figura 16. Análisis ontológico de los posibles genes que sobre-expresan a las 48 h post-enquistamiento en <i>E. invadens</i> . Clasificación de acuerdo a: componentes celulares.....	60
Figura 17. Análisis ontológico de los posibles genes que sobre-expresan a las 48 h post-enquistamiento en <i>E. invadens</i> . Clasificación de acuerdo a: función molecular.....	61
Figura 18. Análisis ontológico de los posibles genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento en <i>E. invadens</i> . Clasificación de acuerdo a: procesos biológicos. ....	62

Figura 19. Análisis ontológico de los posibles genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento en *E. invadens*. Clasificación de acuerdo a: componentes celulares..... 63

Figura 20. Análisis ontológico de los posibles genes que inhiben a las 48 h post-enquistamiento en *E. invadens*. Clasificación de acuerdo a: función molecular. .... 64



## ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Características del genoma de <i>E. histolytica</i> .....	17
Tabla 2. Factores de virulencia presentes en <i>E. histolytica</i> .....	19
Tabla 3. Principales vías implicadas en la regulación del enquistamiento temprano y tardío .....	27
Tabla 4. Características del genoma de <i>E. invadens</i> .....	30
Tabla 5. Presencia de las proteínas Myb en protozoarios.....	33
Tabla 6. Motivos conservados en genes que se sobre-expresan a las ..... 48 h post-enquistamiento .....	56
Tabla 7. Motivos conservados en genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
CBD	Dominio de unión a quitina, del inglés <i>Chitin Binding Domain</i>
DBD-Myb	Dominio de unión al DNA de tipo Myb, del inglés <i>DNA Binding Domain</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. histolytica</i>	Entamoeba histolytica
<i>E. invadens</i>	Entamoeba invadens
EhCP	Cisteína proteasas específicas de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhRab	Subtipos de GTPasas específicas de <i>Entamoeba histolytica</i>
ERM	Elemento de reconocimiento de Myb, del inglés <i>Myb Recognition Element</i>
ESV	Vesículas específicas de enquistamiento, del inglés <i>Encystation-Specific Vesicles</i>
Gal/GalNAc	Galactosa/N-acetil-D-galactosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GO	Ontología genética, del inglés <i>Gene Ontology</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
hADH	Adhesina específica de Entamoeba histolytica
Hde	Horas durante el desenquistamiento
Hpe	Horas post-enquistamiento
LPPG	Lipopéptidofosfoglicano
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintasa, del inglés <i>Nitric Oxide Synthase</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SOD	Superóxido dismutasa, del inglés <i>Superoxide Dismutase</i>
SREHP	Proteína rica en serina de Entamoeba histolytica
TLR	Receptores tipo Toll, del inglés <i>Toll-Like Receptors</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato-N-acetilglucosamina

## RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito que provoca la amebiasis humana, la tercera causa de muerte por infecciones parasitarias que ascienden a cien mil muertes anuales. La infección comienza con la ingestión de quistes, que es el estadio de transmisión del parásito. Los factores de transcripción (FT) más abundantes en este parásito son del tipo Myb, los cuales poseen un dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD-Myb). Interesantemente, se reportó que EhMyb10 se sobreexpresa en trofozoítos que interactúan con células intestinales de ratón o cuando interactúan con explantes de colon humano. *E. histolytica* no es capaz de enquistar *in vitro*. Este proceso se estudia en el organismo modelo *E. invadens*. Los análisis transcripcionales de *E. invadens* durante el enquistamiento-desenquistamiento muestran cambios en la expresión de genes que codifican para factores de transcripción Myb. Entre ellos, el gen *eimyb23* (EIN\_359630), aumentó su expresión durante la conversión de trofozoíto a quiste a las 48 h de enquistamiento. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la sobre-expresión y el silenciamiento de EiMyb23 sobre el enquistamiento de este parásito. Para ello, establecimos transfectantes estables de trofozoítos de *E. invadens* que sobre-expresan o tienen inhibida la expresión del gen *eimyb23*. La modificación de la expresión del gen en las transfectantes se monitorizó por RT-PCR semi-cuantitativa e inmunofluorescencia; la diferenciación trofozoito a quiste se comprobó mediante tinción con blanco de calcoflúor. Tras lograr el modelo de sobreexpresión e inhibición de EiMyb23 en *E. invadens*, los resultados de la RT-PCR mostraron, respectivamente, incremento o disminución en la expresión del mRNA del gen *eimyb23* en respuesta a su sobreexpresión o silenciamiento. En los ensayos de inmunofluorescencia observamos resultados similares, donde se aprecia la localización perinuclear de la proteína EiMyb23 sobreexpresada, en comparación con el control vacío. Como esperábamos, la expresión del gen *eimyb23* se incrementó en cultivos de *E. invadens* incubados en medio de enquistamiento durante 8, 24, 48 y 72 h. Finalmente, el enquistamiento se incrementó en los trofozoitos que sobreexpresan a EiMyb23.

## ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is a parasitic protozoan that causes human amoebiasis, the third leading cause of death from parasitic infections, accounting for one hundred thousand deaths annually. Infection begins with the ingestion of cysts, the transmission stage of the parasite. The most abundant transcription factors (TFs) in this parasite are of the Myb type, which possess a highly conserved MYB DNA-binding domain (Myb-DBD). Interestingly, EhMyb10 has been reported to be overexpressed in trophozoites in interaction with mouse intestinal cells or with human colon explants. *E. histolytica* is not capable of encystment *in vitro*. This process is studied in the model organism *E. invadens*. Transcriptional analysis of *E. invadens* during encystation-ecyctation reveals global expression changes of genes encoding Myb transcription factors. Among them, the gene *eimyb23* (EIN\_359630) increased its expression during trophozoite-cyst conversion at 48 h of encystation. The aim of this project was to evaluate the effect of overexpression and silencing of EiMyb23 on *E. invadens* encystment. For this purpose, we established stable transfectants of *E. invadens* trophozoites overexpressing or silencing the *eimyb23* gene. Modification of gene expression in the transfectants was monitored by semiquantitative RT-PCR and immunofluorescence; trophozoite-cyst differentiation was verified by calcofluorine target staining. After achieving the EiMyb23 overexpression and inhibition model in *E. invadens*, RT-PCR results showed increased or decreased expression of EiMyb23 gene mRNA in response to its overexpression or silencing, respectively. In immunofluorescence assays, we observed similar results, where the perinuclear localization of the overexpressed EiMyb protein is appreciated compared to the empty control. As expected, *eimyb23* gene expression was increased in *E. invadens* cultures incubated in encystment medium for 8, 24, 48, and 72 hours. Finally, cyst differentiation increased 2.5-fold in overexpressing *E. invadens* trophozoites.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Amibiasis

La amibiasis humana es una infección causada por el parásito *Entamoeba histolytica* (Kantor *et al.*, 2018). Es la tercera causa de muerte por infecciones de parásitos.

*E. histolytica* se transmite principalmente a través de alimentos y agua contaminados con quistes de este parásito. La incidencia de la amibiasis es alta en zonas con condiciones sanitarias deficientes o con acceso limitado al agua potable (Lejeune *et al.*, 2009). Por el grave impacto que representa *E. histolytica* está clasificada como un patógeno de biodefensa prioritario de categoría B por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de EE. UU (Shirley *et al.*, 2018).

La enfermedad se puede manifestar en sintomática (representa un 10%) y asintomática (90%) (Haque *et al.*, 2002). El cuadro clínico de la amibiasis incluye colitis, con síntomas que pueden variar desde diarrea leve hasta disentería severa, con dolor abdominal y diarrea acuosa o sanguinolenta (Nagaraja y Ankri, 2019). Además, algunos pacientes desarrollan síntomas extraintestinales, como absceso hepático, pericarditis purulenta, abscesos pulmonares, neumonía, peritonitis, lesiones cutáneas e incluso abscesos cerebrales (Kantor *et al.*, 2018; Roediger y Lisker-Melman, 2020; Victoria-Hernández *et al.*, 2020). El diagnóstico y el tratamiento oportuno de esta enfermedad es importante porque un retraso en ello puede significar la muerte.

## 1.2 Epidemiología

La infección por *E. histolytica* es la fuente más común de enfermedad sintomática entre los protozoos intestinales en el mundo y representa de 35 a 50 millones de casos y 100,000 muertes por año. La amebiasis tiene una distribución mundial. Los países que se ven más afectados por la amibiasis incluyen a México, India, China, muchos de África, varios de América central y América del Sur, donde las condiciones socioeconómicas e higiénicas son deficientes (Ximénez *et al.*, 2009). En países desarrollados 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 (Ralston y William A. Petri, 2011).

En México se reportaron 91 mil 783 casos de amebiasis intestinal y 376 casos de absceso hepático amebiano, según los datos registrados en la semana 44 del año 2023 del Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). La infección ocupa el décimo lugar dentro de las patologías con mayor prevalencia. La amibiasis es frecuente en niños, estudiantes y población homosexual. Los niños corren un factor de riesgo particularmente alto porque son propensos a sufrir desnutrición y retraso del crecimiento debido a infecciones repetidas. (Mondal *et al.*, 2006).

El cultivo HM1:IMSS se estableció en 1967 a partir de una biopsia rectal de un hombre mexicano con disentería amebiana y se axenizó poco después en el Centro Médico Nacional IMSS. A pesar de haberse aislado hace más de 57 años, esta cepa se ha utilizado ampliamente para estudios de virulencia, inmunología, biología celular y bioquímica, además de estudios genéticos (Biller *et al.*, 2009).

### **1.3 *Entamoeba histolytica***

*E. histolytica* es un parásito anaerobio que pertenece al género *Entamoeba*, al filo *Amoebozoa*, y es considerado uno de los protozoarios parásitos más patógenos (Ragland *et al.*, 1994). Este parásito tiene dos estadios durante su ciclo de vida: trofozoito y quiste. Los quistes corresponden a la forma infectiva del parásito y se van a expulsar en la materia fecal, mientras que los trofozoitos son la forma invasiva del parásito y se encontrarán en el intestino del huésped y ocasionalmente en las evacuaciones líquidas o diarreicas (Southwick, 2020)

Los trofozoítos miden entre 20 y 50  $\mu\text{m}$ , tienen motilidad orientable, su citoplasma distingue entre el exoplasma, que sirve para la locomoción expulsando pseudópodos, y el endoplasma, que rodea el núcleo celular y se caracteriza por numerosas vacuolas. Habitan en el lumen, la pared o en ambos lugares del colon. Se multiplican por fisión binaria, crecen mejor en condiciones anaerobias y necesitan la presencia de bacterias o sustratos tisulares para su nutrición. (Fleta Zaragoza *et al.*, 2000).

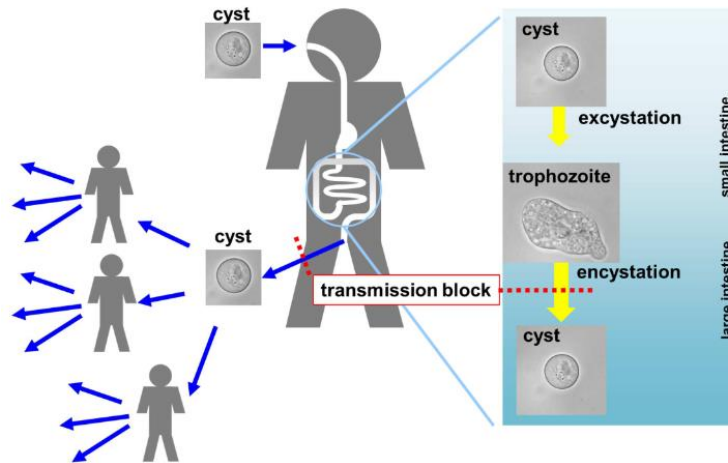
Por otra parte, el quiste presenta una estructura esférica u ovoide. Es de tamaño variable y mide de 5 a 20  $\mu\text{m}$ . Según su grado de madurez, presenta de uno a

cuatro núcleos y una capa gruesa de quitina que le brinda resistencia a entornos severos (temperatura, presión osmótica, pH y privación de nutrientes). Las formas quísticas iniciales (prequistes) contienen cuerpos retráctiles de cromatina, una vacuola yodófila y un solo núcleo, el cual se divide por fisión binaria para formar el quiste maduro tetranucleado; por esta razón los quistes en las deposiciones pueden tener de uno a cuatro núcleos. Pueden sobrevivir fuera del hospedador durante días o semanas, sobre todo en condiciones de baja temperatura y humedad (Fleta Zaragoza *et al.*, 2000).

### **1.3.1 Ciclo de vida de *E. histolytica***

El ciclo de vida de *E. histolytica* es bifásico, la infección inicia por la ingestión oral de quistes, que se pueden encontrar en diversos materiales o superficies que han sido contaminadas con materia fecal. Debido a su resistencia a ambientes severos pueden atravesar el estómago y el duodeno y llegar al intestino delgado, donde eclosionan y se convierten en trofozoítos proliferativos. Luego se mueven pasivamente hacia el intestino grueso, lo colonizan y proliferan (Figura 1) (Begum *et al.*, 2015; Moonah *et al.*, 2013).

Algunos trofozoítos proliferativos se pueden volver a diferenciar a quistes. Los quistes recién formados, junto con los trofozoítos, se excretan en las deposiciones. Sin embargo, solo los quistes pueden sobrevivir en el ambiente (Begum *et al.*, 2015; Moonah *et al.*, 2013). Por lo tanto, son los únicos responsables de la transmisión e infección de la amebiasis. De manera que evitar la formación de quistes es un punto clave para impedir la propagación de este parásito (Figura 1) (Mi-ichi *et al.*, 2016).



**Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *E. histolytica*.** Esquema de la infección por *E. histolytica* y transmisión de la amebiasis. El ciclo de vida de Entamoeba se compone esencialmente de las etapas de proliferación de trofozoítos y quiste latente. El trofozoito es la forma invasiva y miden de 20 a 50  $\mu\text{m}$ , presenta una forma variable (pleomorfa), motilidad orientable y presenta núcleos bien estructurados. El quiste es la forma infectiva y miden de 5 a 20  $\mu\text{m}$ , presentan una estructura esférica u ovoide y pueden contener de uno a cuatro núcleos. Tiene una pared de quitina que le permite la supervivencia fuera del huésped y su transmisión. El enquistamiento y el desenquistamiento son pasos de transición de trofozoítos a quistes y viceversa. La transmisión de la amebiasis está mediada únicamente por los quistes, por lo que el bloqueo del enquistamiento detiene la transmisión de esta enfermedad infecciosa (tomado de Mi-ichi *et al.*, 2016).

### 1.3.2 El genoma de *E. histolytica*

El estudio de *E. histolytica* entró en una nueva era después de la secuenciación del genoma de la cepa virulenta HM1:IMSS. El tamaño de su genoma es de aproximadamente 23.7 millones de pares de bases (Mbp) y se encuentra distribuido en 1496 *scaffolds* y 8201 genes predichos (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010). En un estudio reciente se reportaron 38 cromosomas con un tamaño de 26,879,087 bp con grandes diferencias en el contenido genético, el número de copias, la ploidía y las regiones intergénicas (Gilchrist *et al.*, 2012; Kawano-Sugaya *et al.*, 2020; Weedall *et al.*, 2012). Su genoma consiste en cromosomas lineales y un número de moléculas de DNA circulares de diferentes tamaños (Bhattacharya *et al.*, 2000). Tiene un alto contenido en adenina y timina (75,9%) y abundancia de secuencias repetitivas de DNA, lo que impide el ensamblaje de cromosomas (Clark *et al.*, 2007). La expresión génica en este organismo está regulada por promotores controlados por uno de tres elementos conservados TATA, GAAC e INR (Lorenzi *et al.*, 2010; Singh y Rogers, 1998).



El contenido de intrones es generalmente bajo: solo el 24% de los genes contienen intrones y solo el 6% contienen dos o más intrones (Pearson y Singh, 2010). Curiosamente, en *E. histolytica* se ha observado la presencia de proteínas que constituyen la maquinaria de *splicing*, y diferentes ensayos han mostrado evidencia de la funcionalidad de esta maquinaria (Valdés *et al.*, 2014).

Se ha mostrado evidencia de la evolución dinámica evidente del genoma de *E. histolytica* por una recombinación extensa, mutación rápida, silenciamiento de RNA y silenciamiento epigenético (Tovy y Ankri, 2010). El análisis del genoma revela una redundancia en los genes que codifican para los factores de virulencia tales como la lectina Gal/GalNAc, las cisteína-proteasas y amebaporos (Loftus *et al.*, 2005).

La regulación génica es crítica e importante para el proceso de adaptación ambiental, la transmisión del patógeno y en la conversión a quistes. Se han identificado familias de genes que tienen papeles biológicos importantes en *E. histolytica*: los genes de la vía de interferencia de RNA y los factores de transcripción que contienen el dominio Myb (DBD-Myb) (Ehrenkauf *et al.*, 2009; Meneses *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008). Todas las características del genoma de *E. histolytica* se pueden resumir en la Tabla 1.

<b>Tabla 1. Características del genoma de <i>E. histolytica</i></b>	
<b>Genoma</b>	
Tamaño (pb)	20,799,072
Contenido de GC (%)	24.2
Número de genes	8201
Longitud media del gen (pb)	1260.9
Número de genes/10 Kbp	3.9
Gen más largo (pb)	15,210
Gen más corto (pb)	147
Porcentaje de codificación (%)	49,7
Porcentaje de genes con intrones (%)	24.4
<b>Exones</b>	
Número	10,754
Número medio por gen	1.3

Contenido de GC (%)	28
Longitud media (pb)	962
Longitud total (pb)	10,340,284
<b>Intrones</b>	
Número	2,553
Contenido de GC (%)	19.3
Longitud media (pb)	74.1
Longitud total (pb)	189,260
<b>Regiones intergénicas</b>	
Contenido de GC (%)	20.5
Longitud media (pb)	708.7

Modificada de (Lorenzi *et al.*, 2010)

### 1.3.3 Patogenicidad de *E. histolytica*

La patogenicidad de este parásito implica principalmente: la citoadherencia, la lisis de las células del hospedero y la fagocitosis (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000). *E. histolytica* invade el tejido del huésped mediante diversos factores de virulencia. Una vez que ocurre el desenquistamiento en el intestino delgado, los trofozoitos entran en contacto con la capa mucosa del intestino por medio de lectinas que se unen a las mucinas colonicas (Singh y Ehrenkauf, 2009). La adherencia tiene múltiples efectos citotóxicos, entre ellos, aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pérdida de la integridad de la membrana, fragmentación del DNA, exposición a la fosfatidilserina (PS) y activación de la caspasa 3 (Bansal *et al.*, 2009). Adicionalmente, los trofozoitos pueden evadir el sistema inmune innato y adaptativo del huésped (Moonah *et al.*, 2013). Los distintos factores de virulencia de *E. histolytica* se pueden resumir en la Tabla 2.

**Tabla 2. Factores de virulencia presentes en *E. histolytica***

Factor de patogenicidad	Ejemplos	Referencias
<b>Adhesión</b>	Unión de la ameba 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
<b>Citólisis</b>	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 amebianas, Glicosidasas, $\beta$ -amilasa, Proteinasas, lo que disminuye la capa mucosa.	Chou y Austin, 2024; Leippe y Herbst, 2004; Manuel <i>et al.</i> , 2011; Martínez-López <i>et al.</i> , 2004; Stanley, 2003
<b>Fagocitosis</b>	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
<b>Respuesta inmune</b>	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- $\kappa$ B y la producción de diferentes citocinas como IL-8, IL-10 y TNF $\alpha$ . La infección induce apoptosis de las células del huésped, lo que requiere la activación de caspasas, independiente de Fas y TNF $\alpha$ .	Lotter <i>et al.</i> , 2009; Stanley, 2003; Wong-Baeza <i>et al.</i> , 2010
<b>Resistencia al estrés oxidante</b>	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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia de O <sub>2</sub> , NADPH, que cataliza la reducción de O <sub>2</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Peroxiredoxina, que reduce el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O, Fe-hidrogenasa participa en la supervivencia al estrés oxidativo, lo que inhibe la respuesta inmune del huésped.	Guo <i>et al.</i> , 2007

Tomada de (Saldivar Anaya, 2022)

#### 1.4 Proceso de enquistamiento en el género *Entamoeba*

A partir de aislados clínicos ha sido posible estudiar los quistes de *E. histolytica* sin embargo, a pesar de grandes esfuerzos, el estudio del proceso de enquistamiento no ha sido posible en esta especie. Por lo tanto, la búsqueda de un modelo *in vitro* que permita estudiar este aspecto particular de la biología del parásito se ha resuelto empleando a *E. invadens*, una especie aislada de reptiles

estrechamente relacionada que causa enfermedad invasiva (Eichinger, 1997; Singh y Ehrenkaufner, 2009).

#### **1.4.1 Moléculas y procesos involucrados en el enquistamiento del género *Entamoeba***

La pared del quiste de *E. invadens* se compone de tres elementos: quitina desacetilada (también conocida como quitosano) (Das *et al.*, 2006a), lectinas que se unen a la quitina (p. ej., Jacob y Jessie) o glucoproteínas de superficie (p. ej., lectina Gal/GalNAc de la membrana plasmática) (Clark *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2006a; Frisardi *et al.*, 2000) y enzimas que modifican la quitina o las proteínas de la pared del quiste (p. ej., quitina desacetilasa, quitinasa y cisteína proteasas) (de la Vega *et al.*, 1997; Dey *et al.*, 2009; Van Dellen *et al.*, 2006b).

#### **1.4.2 Quitina desacetilasas**

Existen dos desacetilasas de quitina de *E. invadens*, que convierten la quitina en quitosano (Das *et al.*, 2006a). El quitosano es una mezcla de N acetil glucosamina y glucosamina con una carga positiva. También está presente en las paredes de las esporas de *S. cerevisiae* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993). Se ha sugerido que la carga positiva de las fibrillas de quitosano contribuya a la unión de las proteínas de la pared del quiste, las cuales son ácidas (Das *et al.*, 2002; de la Vega *et al.*, 1997; Frisardi *et al.*, 2000). En un análisis de los monosacáridos de las paredes del quiste de *E. invadens* después de tratarse con SDS para eliminar proteínas reveló que el quitosano es el único homopolímero de azúcar presente (Das *et al.*, 2006a).

#### **1.4.3 Quitinasas**

Se ha descrito que las quitinasas recombinantes de *Entamoeba* tienen actividad endo y exo quitinasa. Las especies de *Entamoeba* codifican numerosas quitinasas con un dominio de glicohidrolasa de tipo 18 conservado (de la Vega *et al.*, 1997). Existen dos dominios que también son importantes: 1) el dominio de unión a quitina 8-Cys único (CBD) y 2) secuencias de baja complejidad que contienen repeticiones de heptapéptidos. El CBD se localiza en el extremo N terminal y también está presente en las lectinas Jessie de *E. histolytica* (Van Dellen *et al.*, 2002). La quitinasa y la lectina Jessie3 se unen a la pared del quiste de *E. invadens* por medio de este CBD 8-Cys (Van Dellen *et al.*, 2006b). Por otro lado, entre el CBD y los dominios de quitinasa se encuentran las repeticiones de

heptapéptido, que son ricas en serina y son parecidas a los dominios tipo mucina en otras glicoproteínas, también pueden ser los sitios de adición de azúcares unidos a O-fosfodiéster (Clark *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2000).

#### **1.4.4 Lectinas de Jacob**

La lectina de Jacob es una glicoproteína ácida de 100 kDa, que forma una capa densa y uniforme con un espesor de aproximadamente 100 nm. Consta de tres a seis dominios de unión ricos en cisteína dispuestos en tándem. La lectina de Jacob es la proteína más abundante que forma la pared del quiste. Las fibrillas de quitina están unidas por las lectinas de Jacob que durante las primeras fases de enquistamiento, se ensamblan en vesículas a partir de la quitina (Chatterjee *et al.*, 2009; Frisardi *et al.*, 2000).

Se ha reportado que al menos seis proteínas lectinas Jacob están presentes en las paredes del quiste de *E. invadens* y que los niveles de RNAm de cada gen aumentan durante el enquistamiento (Van Dellen *et al.*, 2006b). Entre los CBD, las lectinas Jacob tienen secuencias de baja complejidad que son ricas en serina como en el caso de la quitinasa (Van Dellen *et al.*, 2006a). Las lectinas Jacob sufren dos tipos de modificaciones postraduccionales: la primera es la escisión en sitios conservados en los espaciadores ricos en serina y treonina entre los CBD por cisteína proteasas y en segundo lugar, tienen azúcares unidos a O-fosfodiéster añadidos a los residuos de serina y treonina. Los glicanos unidos a O-fosfodiéster también están presentes en los proteofosfoglicano (PPG) en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* (Moody-Haupt *et al.*, 2000).

#### **1.4.5 Lectinas de Gal/GalNAc**

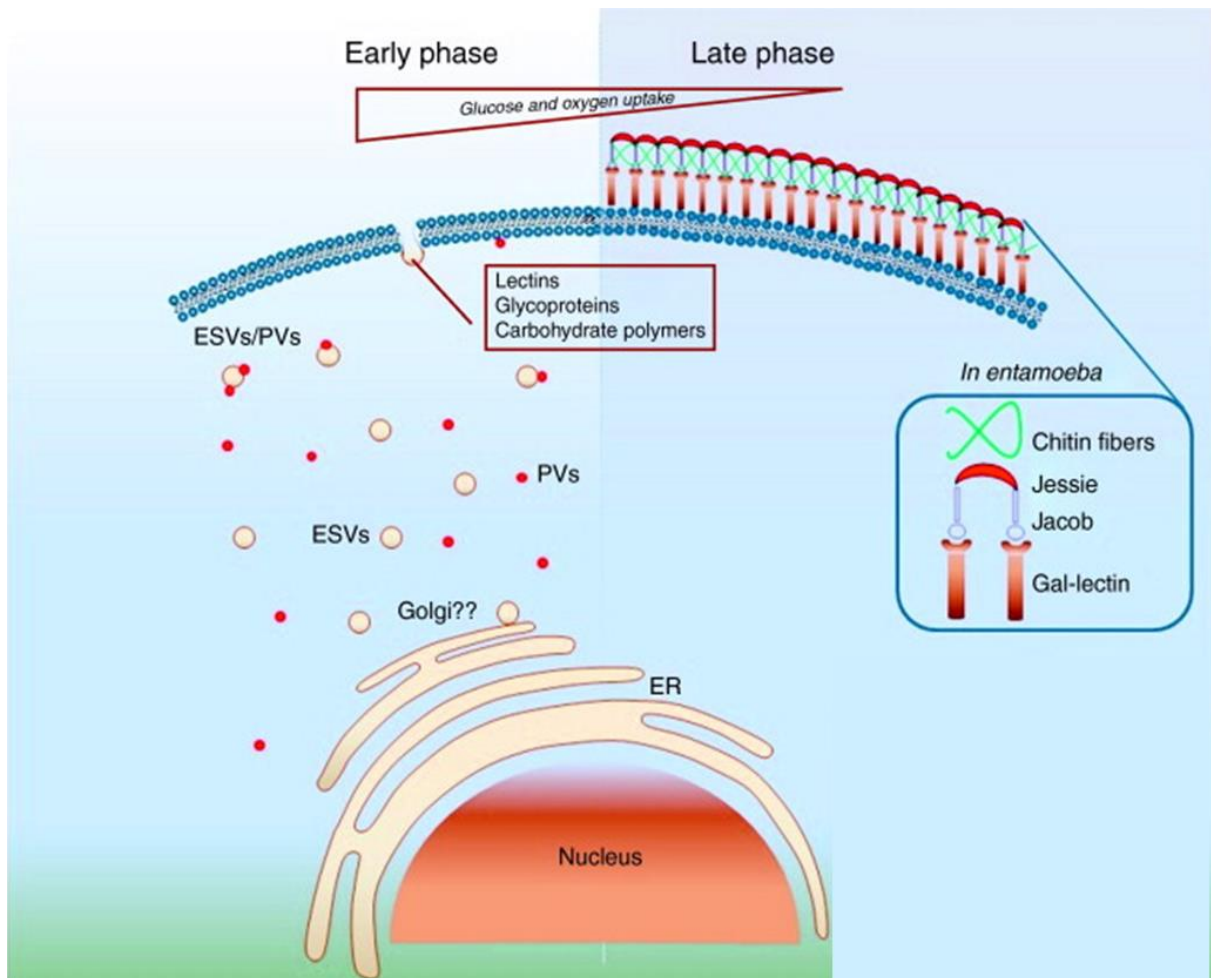
La adhesión ocurre principalmente a través de la lectina de superficie de los trofozoítos de *E. histolytica*, Galactosa/N-Acetil-D-Dalactosamina (Gal/GalNAc). Esta proteína heterotrimérica es integral de membrana y pesa 260 kDa. Está compuesta por una subunidad pesada (HgL) de 170 kDa, una ligera (LgL) de 31-35 kDa y una intermedia (IgL) de 150 kDa. La HgL contiene el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), que se une fuertemente a los residuos de Gal y GalNAc en el moco y las células huésped (Petri *et al.*, 2002). La lectina Gal/GalNAc también está involucrada en citotoxicidad, fagocitosis, transducción de señales y evasión del sistema del complemento (Trejos-Suárez y Castaño-

Osorio, 2009). Se ha reportado que la inhibición de la HgL mediante silenciamiento genético, anticuerpos neutralizantes y ligandos en exceso (incluidos Gal y mucinas) bloquea la adherencia y la muerte de las células huésped *in vitro* (Petri *et al.*, 2002). Además, se sabe que al truncar el extremo amino terminal de la LgL se tiene como resultado una eritrofagocitosis deficiente (Katz *et al.*, 2002).

Se ha sugerido que el enquistamiento de *E. invadens* probablemente depende en parte de la adhesión (Coppi y Eichinger, 1999). *E. invadens* adherida secreta catecolaminas, que de manera autocrina estimulan a las amebas a enquistarse (Coppi *et al.*, 2002). Además, en presencia de un exceso de galactosa, *E. invadens* forma quistes tetranucleados y produce lectinas Jacob y quitinasa (Frisardi *et al.*, 2000). La lectina Gal/GalNAc en la superficie de trofozoítos de *E. invadens* es capaz de unir azúcares en la lectina Jacob, y debido a que las lectinas Jacob no tienen hélices transmembrana hidrofóbicas carboxiterminal (TMH) ni ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI), es posible que la pared del quiste esté unida a la membrana plasmática por la lectina Gal/GalNAc (Clark *et al.*, 2007).

#### **1.4.6 Formación de la pared del quiste**

El enquistamiento se puede dividir en dos fases: temprana y tardía. En la fase temprana se generan abundantes vesículas pinocíticas y vesículas específicas de enquistamiento (del inglés, ESVs), desde el aparato de Golgi y el Retículo Endoplásmico (RE). Estas vesículas son las responsables de transportar los componentes que formaran la pared del quiste durante la fase tardía (Figura 2) (Aguilar-Díaz *et al.*, 2011).



**Figura 2. Proceso de enquistamiento en el género Entamoeba.** A la izquierda se muestran eventos tempranos como la generación de vesículas específicas de enquistamiento (ESVs) desde el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (RE) que transportan los componentes (recuadro rojo) que formarán la pared del quiste naciente, así como la presencia de abundantes vesículas pinocíticas (PVs). A la derecha se muestra el ensamblaje de los componentes de la pared del quiste fuera de la membrana plasmática, un evento asociado con la fase tardía del enquistamiento. Los componentes conocidos de la pared de quitina de Entamoeba se muestran asociados con la membrana y en el recuadro superior. En la parte superior de la figura se muestra una disminución gradual en la captación de glucosa y oxígeno entre fases. Abreviaturas: GalNAc, N-acetilgalactosamina (tomado de Aguilar-Díaz *et al.*, 2011).

Para explicar la formación de la pared del quiste de Entamoeba, se propuso el modelo “wattle and daub”, en donde se sugiere que la pared del quiste se forma en tres fases: “fundación”, “wattle” y “daub” (Figura 3) (Chatterjee *et al.*, 2009).

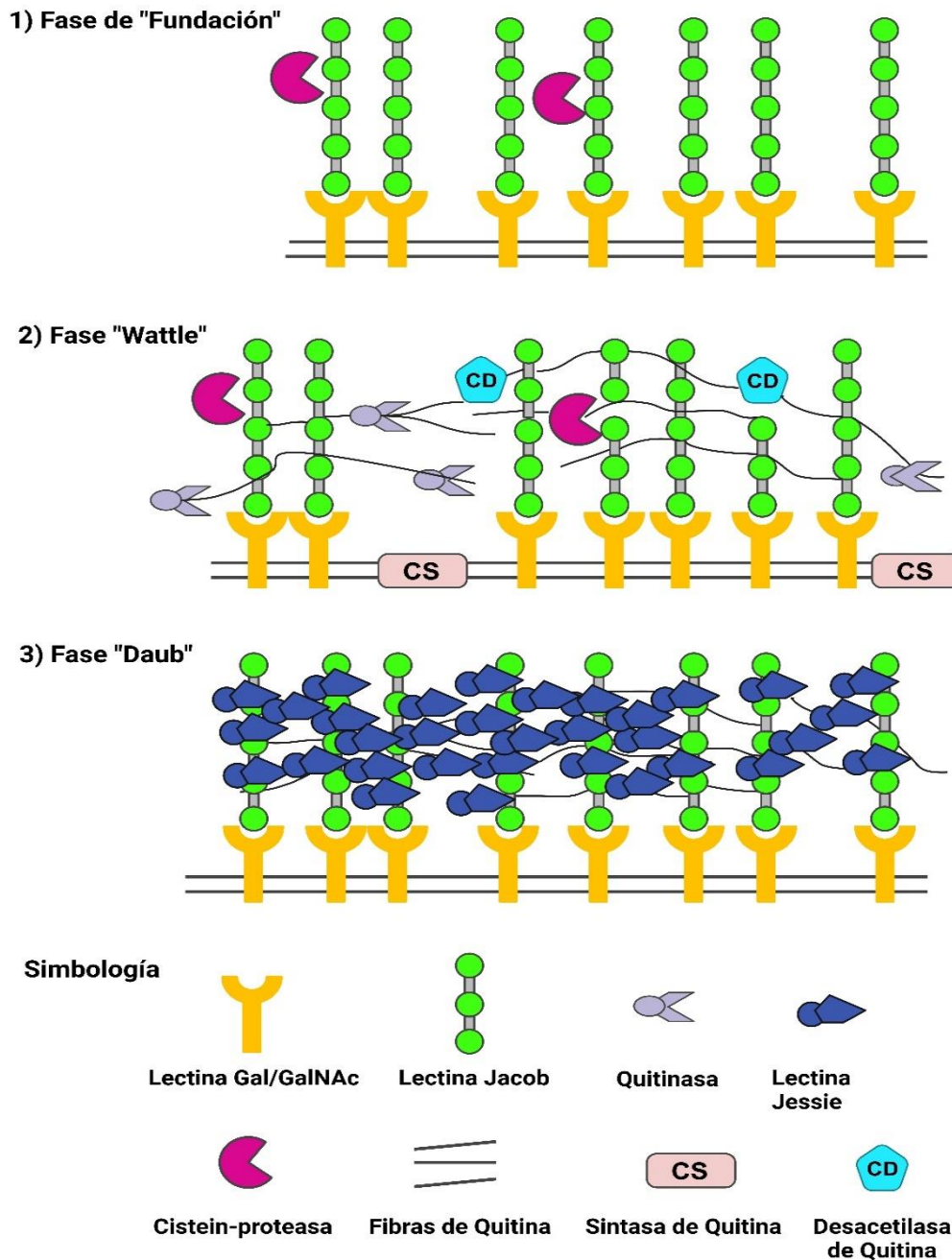
Inicialmente, las lectinas Jacob se unen a la superficie de la membrana plasmática de la ameba a través de las lectinas Gal/GalNAc (Figura 3) Después, las fibrillas de quitina, creadas en pequeñas vesículas que se translocan a varias posiciones en la membrana plasmática se entrecruzan con las lectinas Jacob

que son sintetizadas en vesículas durante la fase temprana del enquistamiento (Figura 3) (Chatterjee *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2006b; Frisardi *et al.*, 2000).

Finalmente, las lectinas Jessie son sintetizadas en la fase tardía del enquistamiento. Estas lectinas están compuestas por un CBD y un dominio auto-agregante C terminal, a través de este dominio se unen a las fibrillas de quitina promoviendo su auto-agregación. Esta auto-agregación hace que la pared se vuelva impermeable al paso de moléculas, confiriéndole una gran resistencia (Figura 3) (Chatterjee *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2006b; Van Dellen *et al.*, 2002).

Mediante un análisis de espectrometría de masas se confirmó que la pared del quiste de *E. invadens* contiene siete lectinas Jacob (EiJacob1 a EiJacob7), dos lectinas Jessie (EiJessie3a y EiJessie3b) y una quitinasa (EiChitinase1). Además, por secuenciación genómica se predijo que la pared del quiste está conformada por siete lectinas de Jacob (EiJacob1, EiJacob2, EiJacob3, EiJacob4, EiJacob5, EiJacob6 y EiJacob7), cinco lectinas Jessie (EiJessie1a, EiJessie1b, EiJessie1c, EiJessie3a y EiJessie3b) y tres quitinasas (EiChitinase1, EiChitinase2 y EiChitinase3) (Van Dellen *et al.*, 2006b).



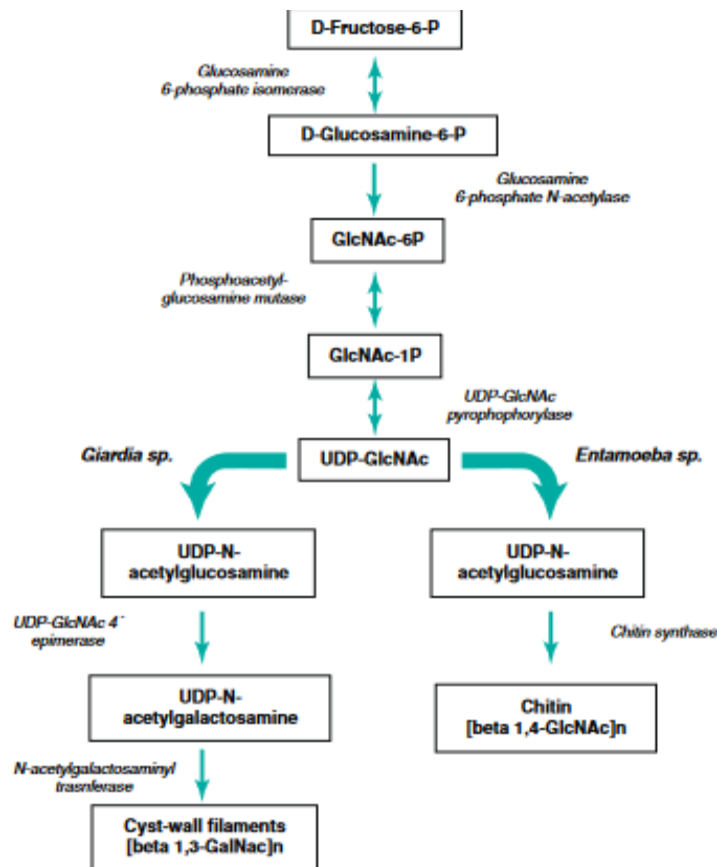


**Figura 3. Modelo de "wattle and daub" propuesto para la formación de la pared del quiste de Entamoeba.** Modelo de "wattle and daub" dividido en 3 fases. En la fase "fundación" las lectinas Jacob se adhieren a la superficie de la membrana plasmática de la amiba a través de las lectinas Gal/GalNAc. En la fase "wattle" las fibrillas de quitina, producidas en pequeñas vesículas se entrelazan con las lectinas Jacob. En la fase "Daub" se sintetizan las lectinas Jessie, culminando en la formación final del quiste (tomado de Chatterjee *et al.*, 2009; Samuelson y Robbins, 2011).

#### 1.4.7 Vías celulares involucradas en el enquistamiento

El proceso de enquistamiento en Entamoeba es un proceso complejo que está regulado por varias vías. Una vía principal es la degradación del glucógeno para la obtención de glucosa, que es requerida para la síntesis de quitina y producción

de energía (Samanta y Ghosh, 2012). La primera reacción comienza con la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa que degrada el glucógeno almacenado para obtener moléculas de D-glucosa. En la segunda y tercera reacción se genera la conversión de D-glucosa a D-glucosa-6-fosfato, y D-glucosa-6-fosfato a D-fructosa-6-fosfato, por las enzimas hexocinasa y Glucosa-6-fosfato-isomerasa, respectivamente. Interesantemente, se ha reportado que la inhibición de la enzima G6P<sub>i</sub> mediante el uso de un siRNA dirigido contra esta molécula, reduce la síntesis de quitina en un 62-64% en comparación con las células control (Aguilar-Díaz *et al.*, 2011; Samanta y Ghosh, 2012). La vía continúa con la participación de 4 enzimas, de las cuales la UDP-GlcNAc pirofosforilasa es la enzima que determina la velocidad de la vía y regulada alostéricamente por la glucosamina-6-fosfato. Finalmente, la vía se completa con la polimerización de GlcNAc y la formación de la quitina (Figura 4) (Aguilar-Díaz *et al.*, 2011). Existen otras vías que pueden regular el enquistamiento en el género *Entamoeba*, dependiendo de la fase de enquistamiento. Estas vías se indican en la tabla 3.



**Figura 4. Vía de síntesis de quitina propuesta para *E. invadens*.** Ruta biosintética que lleva a la producción de polímeros, principalmente de carbohidratos, en las paredes quísticas de *Entamoeba* y *Giardia*. Esta ruta es compartida por ambos parásitos hasta la síntesis de UDP-N-acetilglucosamina (GlcNAc), donde en *Entamoeba* es polimerizada por la quitina sintasa para formar la quitina, mientras que en *Giardia* se convierte en UDP-N-acetilgalactosamina (GalNAc). En cursiva se indican las enzimas que participan en cada paso de la vía (tomado de Aguilar-Díaz *et al.*, 2011).

**Tabla 3. Principales vías implicadas en la regulación del enquistamiento temprano y tardío**

Enquistamiento temprano		
Vía	Regulación	Significado
Señalización	Regulación positiva	Reprogramación
Reorganización Citoesqueleto	Regulación positiva	Adherencia de trofozoítos
Biosíntesis de quitina	Regulación positiva	Iniciación de la pared del quiste

Ensamblaje de Nucleosomas	Regulación positiva	Cromatina silenciosa
Transcripción mediada por factores Myb	Regulación positiva	Regulación transcripcional
Metabolismo del RNA	Regulación positiva	Post transcripcional
Glucólisis	Represión	Preparación para la latencia
Traducción, ensamblaje de ribosomas	Regulación a la baja	Preparación para la latencia
<b>Enquistamiento tardío</b>		
Proteínas de unión al RNA	Regulación positiva	Cuerpos cromatoides
Reparación del DNA	Regulación positiva	División nuclear
Mitosis	Regulación positiva	Intercambio de DNA
Carbohidratos, lípidos, metabolismo	Represión	Inactividad

Tomada de Naiyer *et al.*, 2019.

### 1.5 Genoma y transcriptoma de *E. invadens*

El genoma de *E. invadens* tiene una longitud de 40.88 MB siendo el más grande entre las especies de Entamoeba. La composición de nucleótidos (35 % A, 35 % T, 15 % G, 15 % C) es ligeramente menos rica en A+T que la de *E. histolytica* (70 % A y 75 % T) (Tabla 4) (Ehrenkauf *et al.*, 2013). Se encontró que el genoma de *E. invadens* codifica 11,549 transcritos y regula la transcripción a través de un motivo EiCPMGL (motivo promotor central de *E. invadens* similar a GAAC) localizado 30 nt río arriba del codón de inicio. Este elemento se asemeja a una fusión de los elementos GAAC e Inr de *E. histolytica* (Manna *et al.*, 2014).

El primer análisis transcriptómico del enquistamiento de *E. invadens*, fue utilizando microarreglos de DNA en un estudio de curso temporal después de la inducción de enquistamiento con el medio LYI-S-2 diluido al 47% y sin glucosa. Se estudiaron los genes asociados a las vías metabólicas por espectrometría de

masas. Se encontró que los metabolitos en la biosíntesis de la quitina y la expresión de sus genes aumentaron a las 8 h post-enquistamiento. La biosíntesis de glucógeno disminuyó, mientras que su degradación aumentó. Además, encontraron que en quistes maduros (72 h) había una regulación negativa de genes que codifican procesos metabólicos básicos (Jeelani *et al.*, 2012).

Un análisis de RNA-seq de 11,549 genes en *E. invadens* mostró cambios transcripcionales globales que ocurren en el enquistamiento y desenquistamiento. Se observó una regulación negativa de los genes asociados con la traducción y el ensamblaje de ribosomas, mientras que las proteínas nucleares asociadas con el ensamblaje de nucleosomas estaban reguladas positivamente, posiblemente para empaquetar el DNA en quistes (Ehrenkauffer *et al.*, 2013). Durante las 8 y 24 h de enquistamiento (fase temprana) muchos genes estaban regulados positivamente. Este patrón se revirtió en quistes de 48 y 72 h donde muchos genes estaban regulados negativamente. Por el contrario, se observó una tendencia inversa durante el desenquistamiento (Ehrenkauffer *et al.*, 2013).

Interesantemente, se demostró que entre los genes que se regulan positivamente en las primeras fases de enquistamiento se encuentran moléculas de señalización como las proteínas quinasas, las proteínas pequeñas activadoras de GTPasa y de señalización lipídica, la regulación transcripcional y proteínas con el DBD-Myb, además, genes del metabolismo del RNA, por ejemplo la RNAasa P y la proteína de edición del RNA pseudouridina sintasa (Ehrenkauffer *et al.*, 2013). Los genes de reparación del DNA y ensamblaje de la cromatina estaban regulados positivamente en quistes maduros que participan en la división nuclear (Singh *et al.*, 2011)

En otro estudio transcriptómico del enquistamiento de *E. invadens* utilizando microarreglos de DNA, los genes regulados positivamente codificaron transportadores de iones metálicos, proteínas citoesqueléticas, tráfico vesicular (GTPasas pequeñas), factores de transcripción Myb, algunos componentes del proteosoma y enzimas para la biosíntesis de quitina (De Cádiz *et al.*, 2013).

Se han identificado tres factores de transcripción con papeles importantes en el enquistamiento de Entamoeba. Dos de estos factores de transcripción -una

proteína Myb regulada por el desarrollo (drMyb), que se une a un motivo promotor de hexanucleótidos CCCCCC la cual fue descrita en *E. histolytica* (Ehrenkaufner *et al.*, 2009), y una proteína de unión al motivo regulador del enquistamiento (ERM-BP), que se une a un motivo promotor de heptanucleótidos, CAACAAA en los promotores de *E. invadens* (Manna *et al.*, 2018)

**Tabla 4. Características del genoma de *E. invadens***

<b>Genoma</b>	
Tamaño (pb)	40,888,805
Número de genes	11,975
Contenido de GC (%)	29,92
Longitud media del gen (pb)	1.354,16
Porcentaje de codificación (%)	39,66
<b>Exones</b>	
Número	17,958
Número medio por gen	1,50
Contenido de GC (%)	38,67
Longitud media (pb)	869,2
Longitud total (pb)	15,609,079

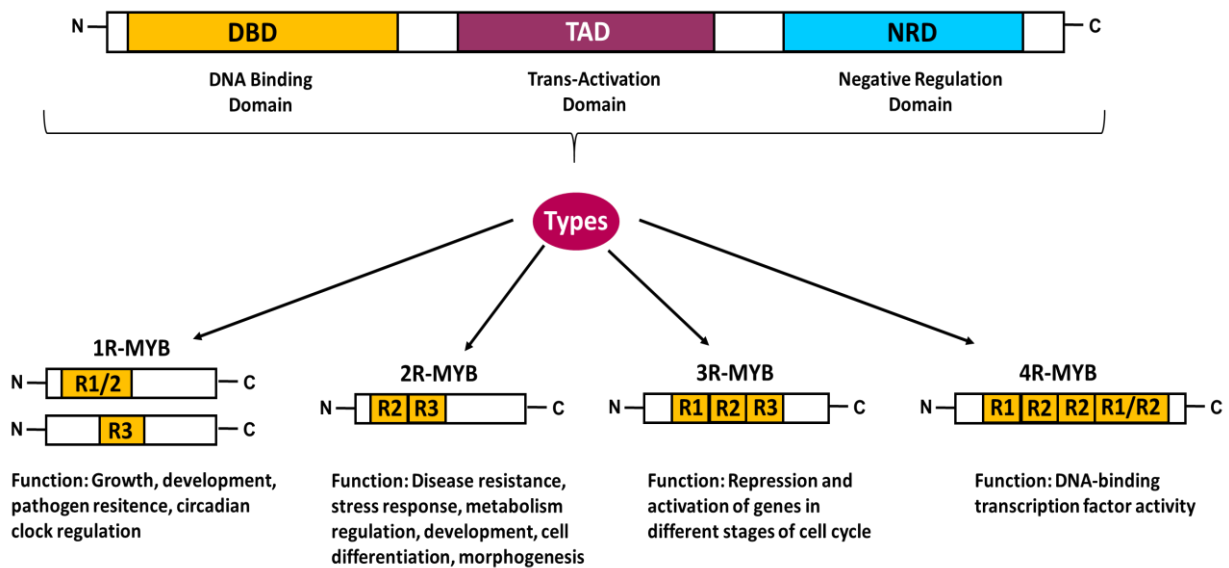
Modificada de Tanaka *et al.*, 2019

### 1.6 Factores de transcripción Myb

Los factores de transcripción de la familia Myb se encuentran en todos los linajes eucariotas y se considera que tienen más de mil millones de años (Kranz *et al.*, 2000; Lipsick, 1996; Rosinski y Atchley, 1998). Esta familia de genes debe su nombre al primer gen *myb* en identificarse, el 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 (Ganter y Lipsick, 1999; Lipsick y Wang, 1999). La contraparte celular de *v-myb* es el gen *c-myb*, el cual codifica para una proteína Myb de tres repeticiones (R1R2R3) que desempeña un papel fundamental en el control de la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, y es considerada como la estructura canónica de las proteínas Myb (Mucenski *et al.*, 1991).

Los miembros de la superfamilia Myb se caracterizan por un dominio de unión al DNA altamente conservado, denominado dominio Myb (DBD-Myb) conformado por hasta 4 repetidos (R1, R2, R3 y R4) de 50-54 aminoácidos. Cada repetido dentro del dominio Myb, da lugar a una estructura secundaria de hélice giro hélice (Du *et al.*, 2015; Dubos *et al.*, 2010). El DBD-Myb se encuentra predominantemente dentro del extremo N de las proteínas Myb (Stracke *et al.*, 2001); sin embargo, también se han descubierto dominios Myb dentro del extremo C de las proteínas Myb (Linger y Price, 2009). Cada repetido Myb consta de varios residuos de triptófano altamente conservados que están espaciados regularmente formando un núcleo hidrofóbico (Ogata *et al.*, 1994). La tercera hélice se intercala en el surco principal del DNA, conformando el sitio de reconocimiento (Azuara-Liceaga *et al.*, 2007; Dubos *et al.*, 2010; Oh y Reddy, 1999). Se ha 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).

La región C terminal de las proteínas Myb es característicamente muy variable de una proteína Myb a otra, y normalmente funciona como un dominio de activación o represión (Jia *et al.*, 2004; Jin y Martin, 1999; Kranz *et al.*, 2000; Stracke *et al.*, 2001). Esto da lugar a una amplia gama de variabilidad tanto estructural como funcional dentro de la superfamilia Myb. Las proteínas de la familia Myb están implicadas en muchos procesos celulares como la regulación del ciclo celular, la diferenciación y para mantener la integridad del genoma, ya sea como factores de transcripción, proteínas de unión a telómeros o participando en el splicing (Figura 5) (Dubos *et al.*, 2010).



**Figura 5. Representación esquemática de la estructura principal, clasificación y funciones clave de los factores de transcripción Myb que se encuentran en eucariotas.** Los factores de transcripción Myb contienen dominios específicos incluyendo el DBD-Myb (DBD en amarillo), el dominio de activación transcripcional (TAD en morado) y el dominio de represión negativa (NRD en azul). Estos factores se clasifican de acuerdo al número de dominios que poseen en su estructura y participan en distintas funciones (tomado de Biswas *et al.*, 2023).

Interesantemente, se encontró que existía un motivo altamente conservado, sin la estructura canónica de las proteínas 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-Hernández *et al.*, 2021).

Además, en parásitos protozoarios, las proteínas Myb controlan la expresión de genes implicados en estos mecanismos como la patogenicidad, la diferenciación celular y la evasión al sistema inmunitario del huésped, entre otros (Gomez *et al.*, 2010). Algunas de las proteínas la familia Myb identificadas en protozoarios se resumen en la Tabla 4.



**Tabla 5. 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	Jiang <i>et al.</i> , 2011; Ong <i>et al.</i> , 2006
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DdMyb1, MybR1R2R3, DdMYB2	Participan en la expresión del gen ACA, en la quimiotaxis y la agregación y diferenciación celular	Fukuzawa <i>et al.</i> , 2006; Otsuka y Haastert, 1998
	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>	gMyb2, 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 Silva <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> , 2002
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhMyb-dr, MybSHAQKY	Regulan la conversión de estadio	Ehrenkaufner <i>et al.</i> , 2009
	EhMybS3 MybSHAQKY	Se describió la estructura tridimensional de su DBD-Myb	Cárdenas-Hernández <i>et al.</i> , 2021
	EhMyb10 MybR2R3	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

Tomado de Saldivar Anaya, 2022

### 1.6.1 Factores de transcripción Myb en el género *Entamoeba*

Los factores de transcripción más abundantes en *E. histolytica* son las proteínas Myb (Iyer *et al.*, 2008). Mediante 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 con longitudes de 93-707 aminoácidos.

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). 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-Gandarilla *et al.*, 2018). Las familias I y III están relacionadas a la función de factores de transcripción, ya que la familia I exhibe homología y alta identidad con el factor de transcripción c-Myb humano, mientras que la familia III que agrupa proteínas SHAQKYF pueden formar complejos DNA-proteína de forma específica (Meneses *et al.*, 2010).

La primera proteína Myb descrita en *E. histolytica* fue EhMyb-dr, perteneciente a la familia SHAKQYF, con uno o dos dominios Myb y compartiendo un motivo conservado (SH[A/L]QKY[R/F]) (Rose *et al.*, 1999). EhMyb-dr regula la expresión de genes relacionados con el proceso de enquistamiento al interactuar con motivos ricos en C en sus promotores (Singh y Ehrenkauf, 2009).

Otra proteína de tipo Myb que también se ha reportado en *E. histolytica* es EhMybS (EhMybS3). Esta proteína tiene un DBD-Myb altamente conservado, estructurado y con residuos intrínsecamente desordenados. Además, cuenta con DBD-Myb SHAQKF similar a los Myb de la familia Reveille (RVE), importantes en la regulación del ciclo circadiano de las plantas. EhMybS3 es la única proteína con DBD-Myb que tiene descrita su estructura tridimensional (PDB: 6NVZ), la cual está compuesta por tres  $\alpha$  hélices y posee un núcleo hidrofóbico, similar a otras proteínas Myb (Cárdenas-Hernández *et al.*, 2021).

Se ha reportado que la proteína EhMyb10 puede participar en procesos de virulencia y enquistamiento en *E. histolytica* (Gilchrist *et al.*, 2012; Weber *et al.*,

2016). EhMyb10 es una proteína de 17.9 kDa que conserva el DBD hélice-giro-hélice en sus repetidos R2 y R3. Esta proteína 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- $\alpha$ ) (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).

## II. ANTECEDENTES

En un análisis del transcriptoma de *E. invadens* a través de RNAseq se demostró que casi el 50% de todos los genes modifican su expresión durante el proceso de diferenciación. Se observó una sobre-expresión de la fosfolipasa D, Rab, BspA, fosfatasas y genes relacionados con la formación de la pared del quiste durante el enquistamiento, también se identificaron genes que codifican proteínas que contiene DBD-Myb y presentaban patrones de expresión diferenciales (Ehrenkauf *et al.*, 2013).

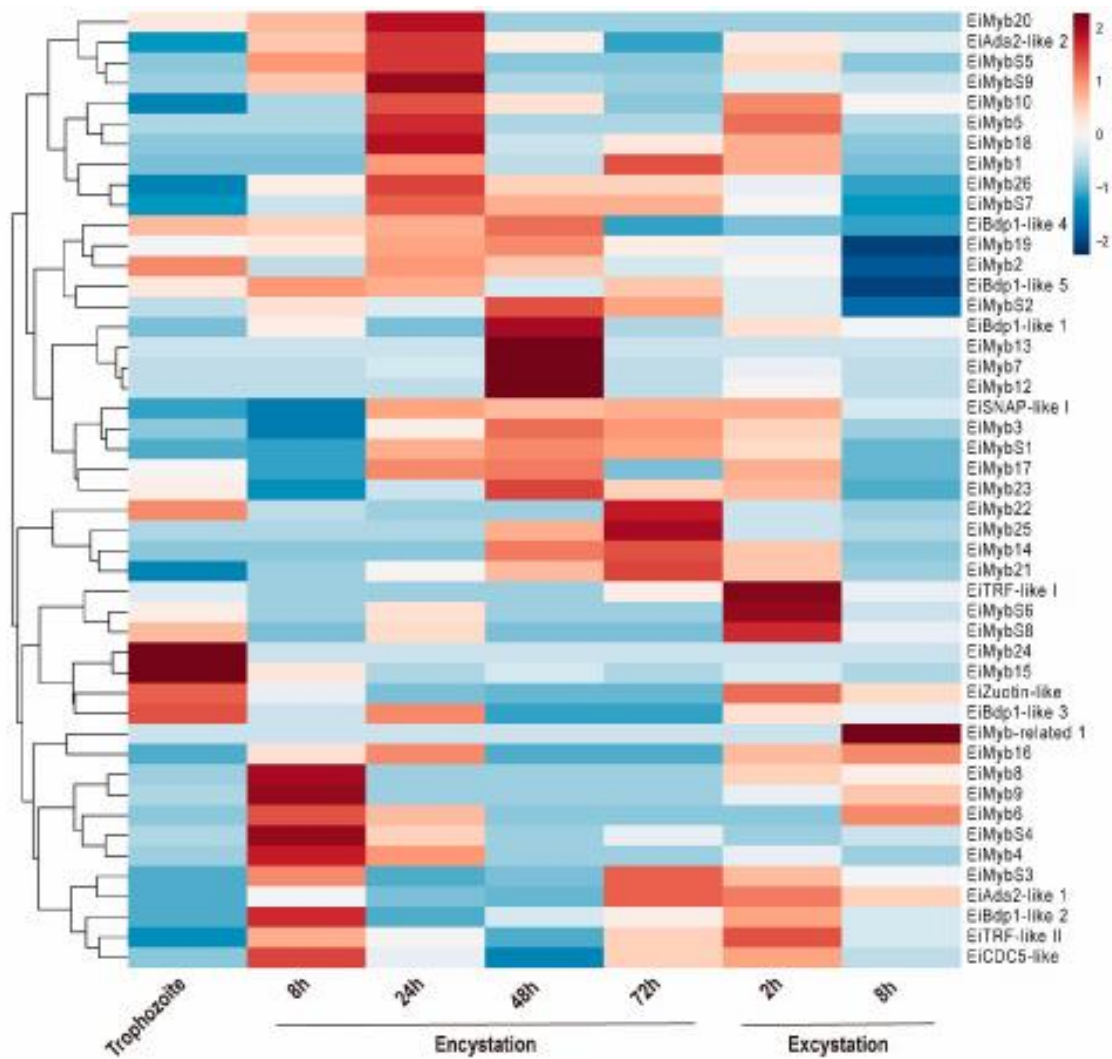
Previamente, se había identificado en *E. invadens* cuarenta y cuatro genes que codifican proteínas que contienen DBD-Myb, nueve que contienen un motivo SHAQKYF y veintitrés anotados como Myb putativo o hipotético sin ninguna caracterización adicional de estas proteínas. Además, los genes que codifican para estas proteínas cambian su expresión durante la formación del quiste, lo que indica que la expresión génica está regulada por un conjunto particular de genes en diferentes etapas del enquistamiento (De Cádiz *et al.*, 2013; Singh y Ehrenkauf, 2009).

En un análisis bioinformático a partir del conjunto de datos de RNAseq de *E. invadens* en AmoebaDB (Ehrenkauf *et al.*, 2013) estudió el papel de las proteínas Myb durante la diferenciación de este parásito. Inicialmente, se identificaron 48 proteínas que contienen DBD-Myb en lugar de 44, como se había

reportado previamente (Cuellar *et al.*, 2024). Teniendo más proteínas que su pariente cercano, *E. histolytica*, que tiene 32 proteínas Myb (Meneses *et al.*, 2010). Centrado en la diferenciación de quistes, Se analizaron los perfiles de expresión de los genes *eimyb* de durante el enquistamiento (8, 24, 48 y 72 h después de la transferencia al medio de enquistamiento) y desenquistamiento (2 y 8 h después de la inducción del desenquistamiento). Los patrones de expresión de los 48 genes *eimyb* en *E. invadens* en condiciones de enquistamiento se visualizaron mediante un análisis de mapa de calor. Se observó que solo 14 se expresaron en la etapa de trofozoíto, siendo *eimyb15* y *eimyb24* los que tuvieron la mayor expresión. En *E. histolytica*, su ortólogo es EhMyb10, lo que significa que EhMyb10 podría ser esencial para el parásito y, por lo tanto, un objetivo potencial para dirigir una terapia (Figura 6) (Cuellar *et al.*, 2024).

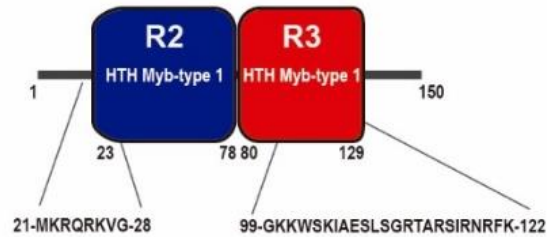
Durante el enquistamiento temprano (8 h), se expresaron 23 genes *eimyb*, siendo *eimyb9* y *eimybs4* los más expresados. Durante la progresión del enquistamiento (24, 48 y 72 h), se expresaron 23, 30 y 23 genes *eimyb*, respectivamente. A las 24 h, *eimybs9*, *eimyb18* y *eimyb20* tienen la mayor expresión. En el enquistamiento tardío (48 h), *eimyb7*, *eimyb12* y *eimyb13* son los más expresados. A las 72 h de enquistamiento, *eimyb22* y *eimyb25* son los que más se expresan. Por otro lado, la exquistación es un proceso importante que asegura la diseminación de *E. invadens* (Figura 6) (Cuellar *et al.*, 2024).

Curiosamente, el gen *eimyb23* (EIN\_359630) presentó cambios en su expresión durante la conversión trofozoito-quiste, teniendo la mayor expresión a las 48 h de enquistamiento (Figura 6) (Cuellar *et al.*, 2024). Este gen codifica para la proteína EiMyb23, un factor de transcripción que pertenece a la familia EiMybR2R3, con un peso de 17.3 kDa y 150 aa, su pI teórico es 9.68. Esta proteína tiene dos repetidos tipo myb HTH y relacionados al dominios SANT. Mediante un alineamiento de las secuencia de sus repetidos R2 y R3 se observó que había similitud con las secuencias de la proteína EhMyb10 de *E. histolytica*, TvMyb1 de *Trichomonas vaginalis* y c-MybR2R3 de plantas (Figura 7).

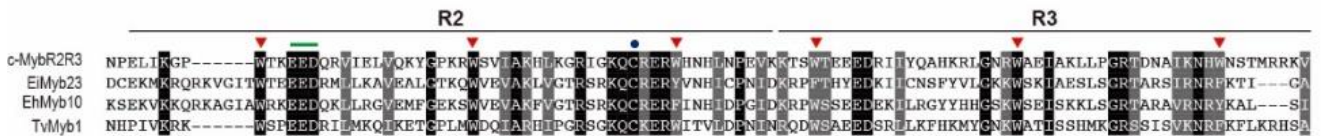


**Figura 6. Perfil de expresión de los genes Myb de *E. invadens* durante el enquistamiento y el desenquistamiento.** Mapa de calor de agrupamiento jerárquico de genes *eimyb*; cada columna representa un gen y cada fila representa una condición. Los colores del gráfico representan el nivel de expresión genética de la muestra [Log2 (TPM)]. El azul significa que la expresión genética es baja en la muestra, mientras que el rojo muestra que el gen se expresa fuertemente. Los datos se obtuvieron de AmoebaDB (tomado de Cuellar *et al.*, 2024).

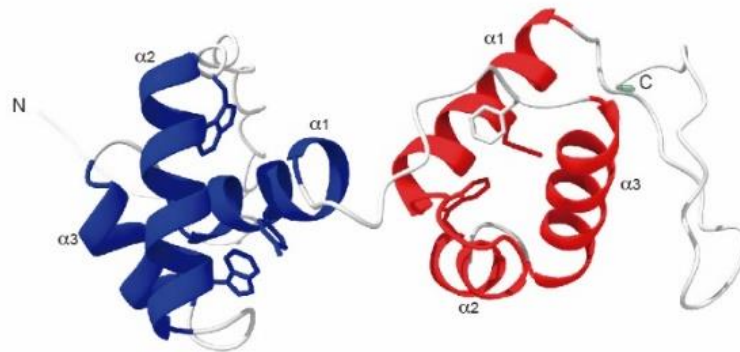
A



B



C



**Figura 7. Alineamiento de las secuencias de los repetidos R2 y R3 del DBD-MYB de las proteínas ortólogas de EiMyb23.** A) Estructura de la proteína EiMyb23 en la que se muestran los repetidos R2 y R3 y las señales de localización nuclear predichas. b) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del DBD-MYB de las proteínas de Myb de c-MybR2R3 (*Homo sapiens*), EhMyb10 (*E. histolytica*), TvMyb1 (*T. vaginalis*). Las flechas rojas en el alineamiento destacan los residuos de triptófano conservados en diferentes especies. C) Estructura tridimensional de la proteína EiMyb23 obtenido por AlphaFold 3 y visualizado con Chimera en la que se observan los repetidos R2 (azul) y R3 (rojo).

### III. JUSTIFICACIÓN

*E. histolytica*, el agente causante de la amibiasis, infecta al humano vía quistes, cuya formación ha sido principalmente estudiada en *E. invadens*. Los mecanismos moleculares que ocurren durante este proceso no se han dilucidado completamente. Se ha reportado que el gen *eimyb23*, el cual codifica para un ortólogo de la proteína EhMyb10, presenta un aumento en su expresión durante la conversión de trofozoíto a quiste. De este modo, el comprender la función y regulación de la proteína EiMyb23 durante el enquistamiento de *E. invadens* permitirá aportar información de la regulación de su proteína ortóloga en *E. histolytica*, por lo tanto, sumar información de los mecanismos moleculares durante la diferenciación trofozoito a quiste, lo que permitiría desarrollar nuevos fármacos quimioterapéuticos que podrían prevenir la conversión de quistes y, en consecuencia, la transmisión de la amibiasis.

### IV. HIPOTESIS

La sobreexpresión o la inhibición del gen EiMyb23 afectará el proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens*

### V. OBJETIVOS

Objetivo general:

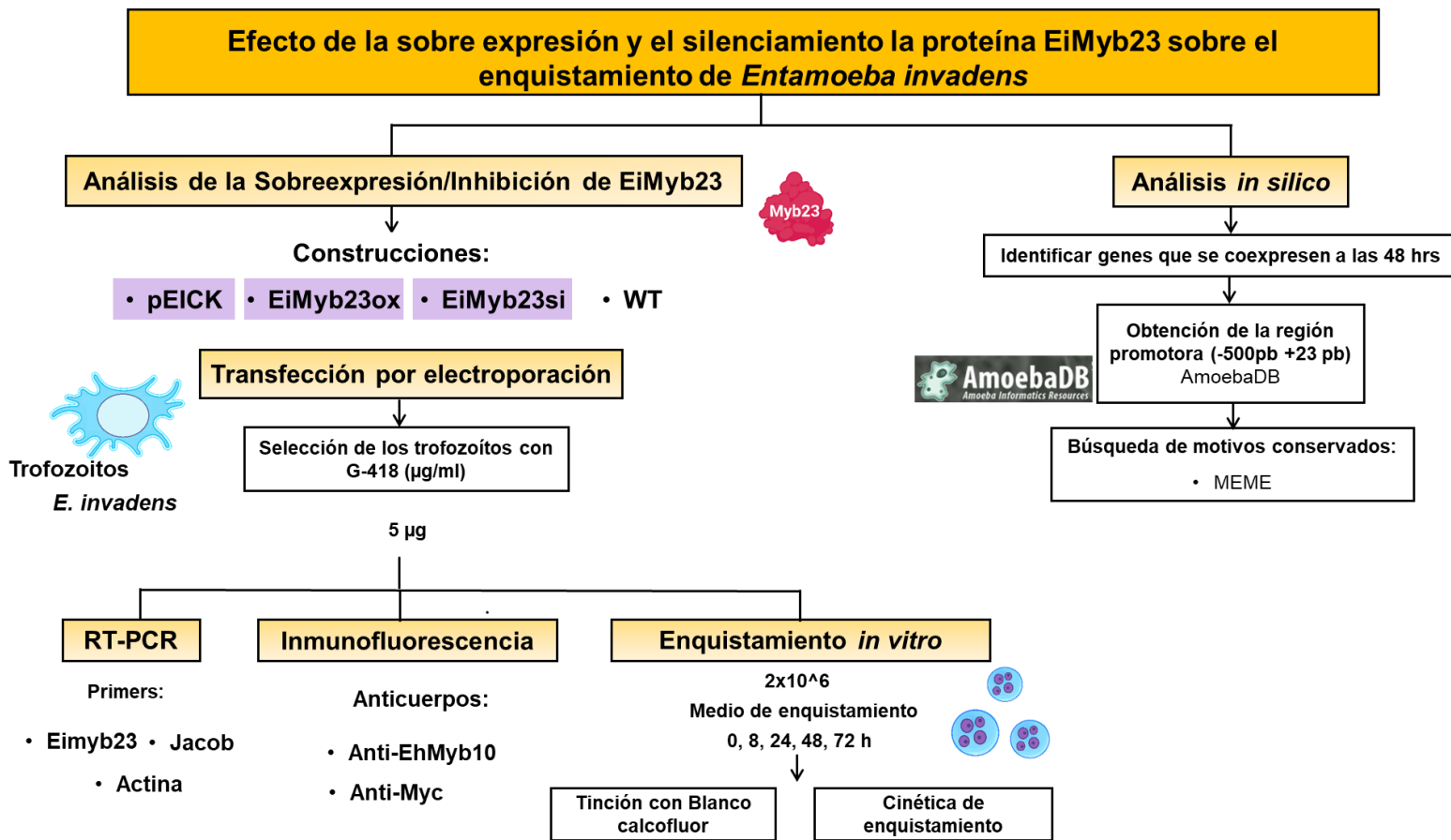
- Evaluar el efecto EiMyb23 sobre el enquistamiento de *E. invadens*

Objetivos particulares:

- Obtener un modelo de sobreexpresión e inhibición del gen *eimyb23* (EIN\_359630) en *E. invadens*
- Analizar el efecto de la sobreexpresión o inhibición de *eimyb23* sobre el enquistamiento.
- Identificar *in silico* genes blanco de EiMyb23.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En base a los objetivos específicos se diseñó la siguiente estrategia experimental:



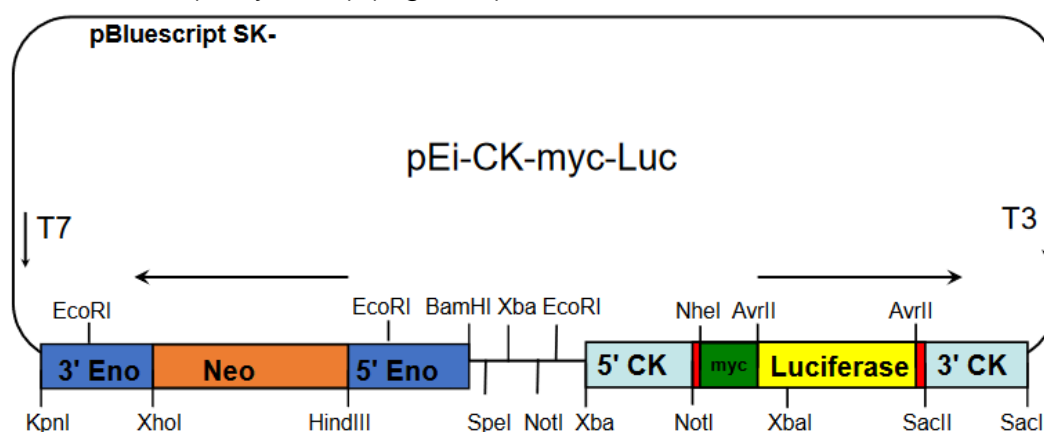


## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Sobreexpresión y silenciamiento de EiMyb23 en trofozoítos de *E. invadens* (cepa IP-1)

Los plásmidos pEiCK-myc (vacío), EiMyb23ox y EiMyb23si fueron proporcionados por la Dra. Elisa Irene Azuara de la UACM, cuyo grupo de trabajo clonó la secuencia completa del gen *eimyb23* *Ein*\_en el plásmido pEi-ck-Myc en sentido y anti-sentido respectivamente. Este vector permite sobreexpresar a las proteínas en los trofozoítos de *E. invadens* y analizar el fenotipo resultante. El vector permite la sobreexpresión de la proteína fusionada a una etiqueta Myc y también contiene el gen de resistencia a la neomicina flanqueado por regiones 5' y 3' del gen de la *enolasa* para selección.

Para realizar la clonación a los oligonucleótidos que amplifican la secuencia del gen completo se les añadió el sitio para la enzima de restricción *AvrII* tanto en el oligonucleótido sentido como antisentido, debido a que es el único sitio de clonación. Se diseñó para el gen EIN\_359630 un oligonucleótido en sentido (5' CTACCTAGGATGCAGACCGAGTCCTCG 3') para tener la condición de sobreexpresión (EiMyb23ox) y un oligonucleótido antisentido (5'CTACCTAGGTCACCGAGAGTTTCCCCCCT3') para la condición de silenciamiento (EiMyb23si) (Figura 8).



**Figura 8. Vector de clonación pEi-ck-Myc.** El vector pBluescript SK- se modificó para contener el gen de la *luciferasa* de *Photinus pyralis* flanqueado por las secuencias promotoras del gen CKII para dirigir la expresión génica. Además, se introdujo una secuencia que codifica para una etiqueta Myc y sitios de restricción *NheI* y *AvrII* para insertar el gen de interés. El vector también contiene el gen de resistencia a la neomicina flanqueado por regiones 5' y 3' de enolasa para la selección. El plásmido puede utilizarse como vector para la transfección transitoria y estable de *E. invadens* (Ehrenkauffer y Singh, 2012).

## **7.2 Cultivo y enquistamiento de *E. invadens in vitro*.**

Se cultivaron trofozoítos de *E. invadens* (cepa IP-1) axénicamente a 28° C en medio LYI-S-2 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, Extracto de levadura, digerido de hígado neutralizado, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, Cisteína C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, citrato férrico amónico) suplementado con 10% de suero bovino, 3 % de vitaminas de Diamond (Sigma-Aldrich), y 1x Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich). Para cosecharlos, los cultivos se incubaron en hielo por 15 min y se centrifugaron a 4,500 rpm durante 15 min. Para inducir el enquistamiento de 8x10<sup>5</sup> a 2x10<sup>6</sup> trofozoítos se incubaron en medio sin glucosa y con sus nutrientes diluidos al 47% (Ehrenkauf and Singh, 2012). Para la cinética de enquistamiento, las células se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 1 mL de sarkosil al 0.01% (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se contó el número de quistes resistentes a los detergentes utilizando una cámara de Neubauer y se confirmó la presencia de los quistes mediante tinción con Calcofluor White (Sigma-Aldrich). Los experimentos de RT-PCR se iniciaron con suspensiones celulares obtenidas de cultivos incubados en medio de enquistamiento durante 0, 24, 48 y 72 h. Las cinéticas de enquistamiento se iniciaron con suspensiones celulares obtenidas de cultivos crecidos durante 72 h.

## **7.3 Transfección y selección**

La transfección se hizo por el método de electroporación, siguiendo el protocolo descrito por Ehrenkauf and Singh (2012). Las amibas se cosecharon a 4,500 rpm durante 15 min, y el pellet obtenido se resuspendió con el buffer ZM (NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, acetato de magnesio 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.09 mM). Se transfirieron a una celda con una separación de 2 mm. Los parásitos se electroporaron con el vector pEiCK-myc, EiMyb23ox, EiMyb23si a 1,5 kV, 25 µF, 2 pulsos y con valor medio de ~0,2 ms. Después de la transfección, se transfirieron a tubos de vidrio con 15 ml de medio LYI-S-2 y se dejaron recuperarse a 25 °C. La selección del fármaco se inició 24 h post-transfección con 50 µg/ml, luego se redujo a 5 µg/mL de medio con el antibiótico G418 (Ehrenkauf and Singh, 2012).

#### 7.4 Obtención de RNA

RNA total se aislaron con el reactivo de TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la muestra fue homogenizada y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de proteínas. Se agregaron 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de trizol utilizado, se agitó durante 15 segundos con un vortex y se dejó la muestra durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 15 min a una temperatura 4 °C. Finalizada la centrifugación se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipitó el RNA de la fase acuosa utilizando 500 µL de isopropanol, se mezcló el homogenado y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4 °C. Por último, se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la muestra con la tapa del tubo abierta y después el tubo se almacenó a -20 °C.

#### 7.5 Ensayos de RT-PCR

El cDNA se sintetizó con la SuperScript™IV (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este cDNA se usó como molde para hacer las PCR semicuantitativas. Los oligonucleótidos que se utilizaron para los diferentes genes de interés fueron los siguientes: *eimyb23* F: 5'-CTACCTAGGATGCAGACCGAGTCCTCG-3' y R: 5'-CTACCTAGGTCACCAGAGTTTCCCCCT-3; *jacob* F:5'-CTGGCGCATCAACAAAACCA-3 y R: 5'-ACTCGTTGTCGTGCTTCCC; *neomicina* F:5'-GATACTTTCTCGGCAGGAGCAAG-3 y R:CAGACAATCGGCTGCTCTGATG-3; *actina* F: 5'-CCCTATGGAAATGCATGGCAATG-3 y R: 5'-TACCCGTAAATGGACGTCCAATC-3. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio y las bandas se cuantificaron por análisis densitométrico empleando el programa ImageJ. La expresión relativa de los genes *eimyb23* y *jacob* se calculó con base en la expresión del gen *actina*.

A partir de 1 µg de RNA obtenido de los trofozoítos transfectados con los plásmidos pEiCK-myc, EiMyb23ox y EiMyb23si se sintetizó cDNA, el cual se empleó en ensayos de RT-PCR.

## **7.6 Inmunofluorescencia**

Los trofozoítos se cosecharon a 4,500 rpm, se cultivaron en cubreobjetos, y se fijaron y permeabilizaron con etanol absoluto a -20 °C durante 30 min. Las preparaciones celulares se bloquearon con suero al 10% diluido en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Las amibas se incubaron con anticuerpos anti-EhMyb10 de conejo (1:100) y anti-Myc10 de conejo (1:100), durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 568 de ratón o Alexa Fluor™ 488 de conejo (ThermoFisher; 1:100) durante 1 h. Finalmente, se tiñeron los núcleos con DAPI/Vectashield (4',6-diamidino-2-fenilindol) y las muestras se observaron en un microscopio confocal utilizando el software ZEISS ZEN con la ayuda de la Dra. Abigail Betanzos Fernández en el Departamento de Infectómica y Patogenésis Molecular del Cinvestav.

## **7.7 Búsqueda de motivos conservados en promotores de genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento**

Se utilizó la base de datos de AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>) (Amos *et al.*, 2022) para obtener la región de -500 pb río arriba y -23 pb del ATG de los genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 post-enquistamiento. Las secuencias obtenidas de los promotores se descargaron y se analizaron empleando la plataforma MEME suite (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) y STREME (<https://meme-suite.org/meme/tools/streme>) versión 5.5.7, y se utilizó como parámetro de búsqueda secuencias de 6-12 nucleótidos y un valor de  $p=0.01$ .

## **7.8 Análisis ontológico de genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento**

Se hizo un análisis de Enriquecimiento de ontología genética (Gene Ontology Enrichment, por sus siglas en inglés) de los genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento, empleando la base de datos AmoebaDB con un valor de  $p<0.05$ . El análisis ontológico, se llevó a cabo en las plataformas

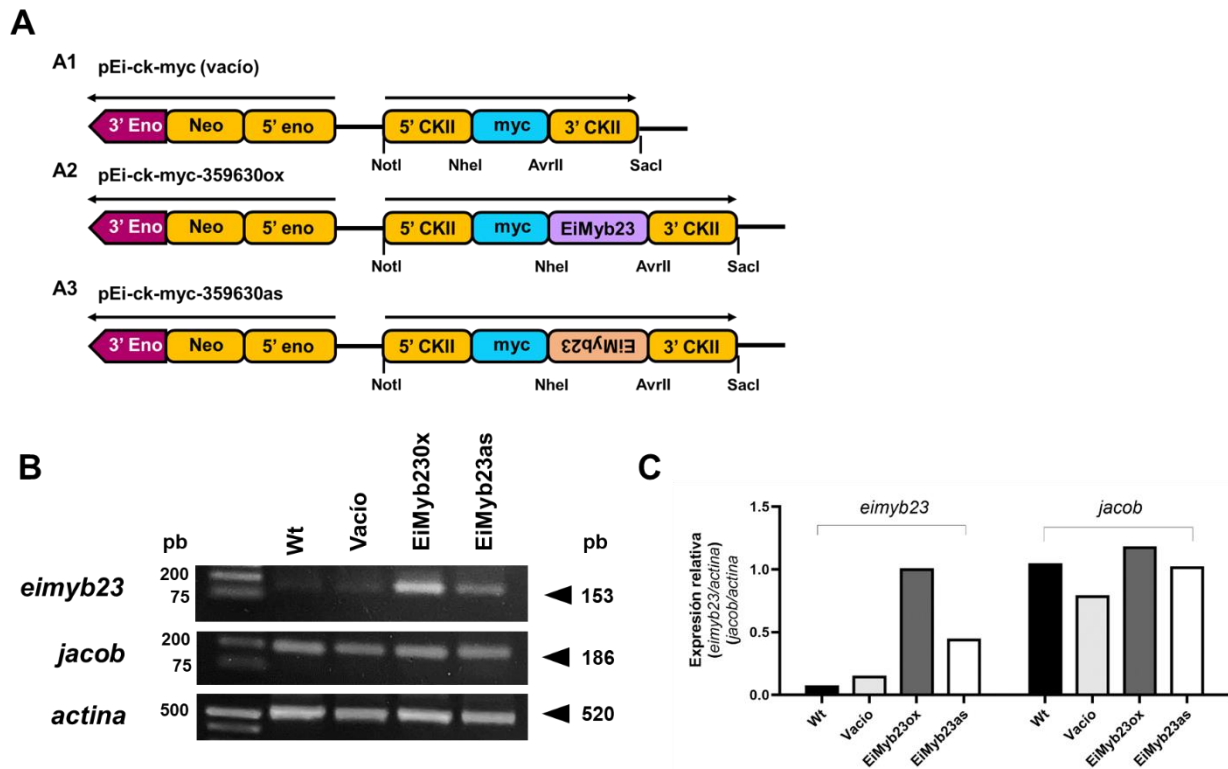
AmoebaDB y REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al., 2011) siguiendo los criterios: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Análisis de los niveles de expresión de *eimyb23* y *jacob* en las condiciones transfectantes y basal de cultivo de *E. invadens*

En este trabajo sobreexpresamos e inhibimos la expresión del gen *eimyb23* para analizar su efecto sobre el enquistamiento. Para ello, inicialmente corroboramos el establecimiento de transfectantes estables de trofozoítos de *E. invadens* que sobre expresan o que silencian la expresión el gen *eimyb23*. Para ello, a partir de cDNAs obtenidos de los trofozoitos transfectados con los plasmidos pEiCK-myc (vacío), EiMyb23ox (sobre expresadores) que tenía el gen *eimyb23* clonado en sentido y EiMyb23si (silenciados) que tenía el gen clonado en antisentido, y de trofozoitos sin transfectar (condición Wt) se hicieron ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa empleando oligonucleótidos específicos para *eimyb23*. Adicionalmente, se incluyó como control al gen *jacob* (EIN\_080050) el cual es un gen que se induce su expresión durante el enquistamiento. De esta manera, determinamos también para determinar si el gen relacionado con el enquistamiento, *jacob* se modificaba en las condiciones transfectantes y basal se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar este gen.

Los ensayos mostraron, respectivamente, incremento o disminución en la expresión del mRNA del gen *eimyb23* en las condiciones de sobreexpresión o de silenciamiento en comparación con el vector vacío y la condición basal (Figura 9). Estos datos indican que se estableció un modelo de sobre-expresión y silenciamiento del gen *eimyb23* en *E. invadens* y también sugieren una posible relación de la expresión del gen *eimyb23* con el proceso de enquistamiento.



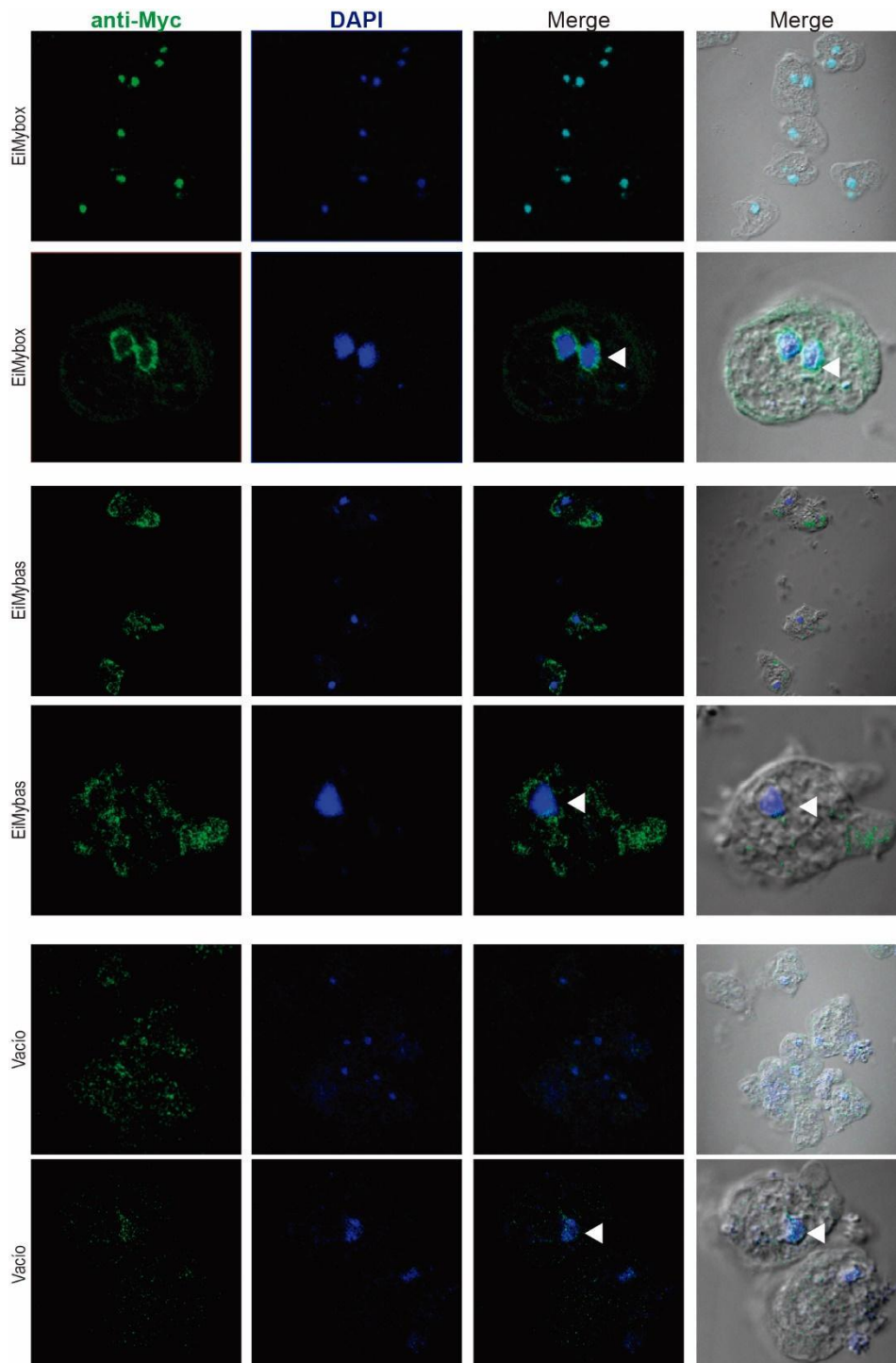
**Figura 9. Construcciones empleadas en este trabajo y niveles de expresión del gen *eimyb23* y *jacob* en trofozoitos de *E. invadens* transfectantes y en la condición basal. (A) Esquema de las construcciones empleadas en este trabajo las cuales tienen el gen *EiMyb23* (EIN\_359630) (A1). El gen fue amplificado y usado para sustituir el gen *Myc* en el plásmido *pEi-ck-Myc* en la misma orientación (*pEi-ck-EiMyb23*; A2) y en la opuesta (*pEi-ck EiMyb23as*; A3) con fines de sobreexpresión y silenciamiento, respectivamente. (B) Las construcciones se transfectaron en trofozoitos y se seleccionaron con 5  $\mu$ g de G418, posteriormente se aisló RNA y se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los fragmentos de los genes amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y las bandas se cuantificaron por análisis densitométrico empleando el programa ImageJ. (C) La expresión relativa de los genes *eimyb23* y *jacob* en las transformantes de trofozoitos que tenían los plásmidos de vector vacío (V), sobreexpresión (Ox) y silenciamiento (Si) se normalizó con base en la expresión del gen de *actina*.**

## 8.2 Expresión y localización de la proteína *EiMyb23* en las condiciones transfectantes y basal de cultivo de *E. invadens*

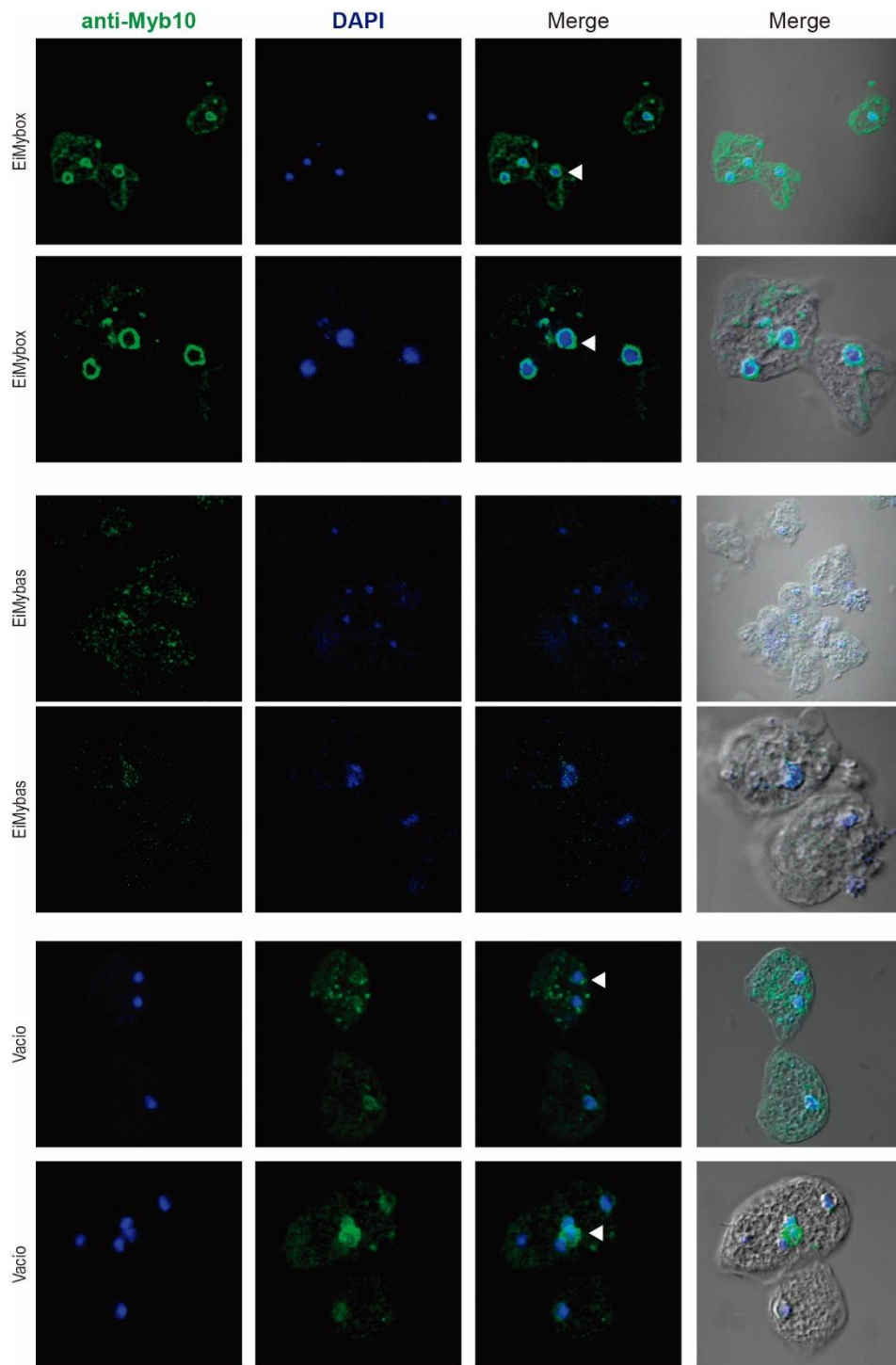
Para evaluar la presencia y localización de la proteína *EiMyb23* en los trofozoitos transfectados en las diferentes condiciones se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, empleando un anticuerpo específico comercial contra la etiqueta *Myc* que está codificada en el plásmido *pEi-ck-Myc*; esta etiqueta permite reconocer a la proteína fusionada a una bandera de *Myc*. En las imágenes de microscopía confocal observamos resultados similares a los de

ensayos de RT-PCR, donde se aprecia un incremento de la proteína EiMyb23 sobreexpresada, en comparación con el control vacío. Además, se puede observar en estas imágenes que EiMyb23 tiene una localización perinuclear, co-localizando con el marcador nuclear DAPI. Sin embargo, también se puede detectar en el citoplasma y en la membrana celular (figura 10). Adicionalmente, se hicieron inmunofluorescencias con un anticuerpo específico contra la proteína EhMyb10 de *E. histolytica* que esperábamos cruzara con la proteína EiMyb23 debido a que pertenecen al mismo grupo ortólogo (OG6\_106827). En estos ensayos se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo antiEhMyb10, el cual reconoció una proteína con localización perinuclear en las tres condiciones, sin embargo, más abundante en la condición de sobreexpresión (Figura 11).





**Figura 10. Expresión y localización de la proteína EiMyb23 en trozofitos de *E. invadens* transfectantes.** Los trozofitos se transfectaron con los plásmidos pEiCK-myc, EiMyb23ox, EiMyb23si, se cosecharon y se trataron para hacer el ensayo de inmunofluorescencia. Se utilizó el anticuerpo Anti-Myc. En verde se muestra la señal correspondiente al anticuerpo Anti-Myc y en azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI con un aumento de 60X.



**Figura 11. Expresión y localización de la proteína EiMyb23 en trozofitos de *E. invadens* transfectantes.** Los trozofitos se transfectaron con los plásmidos pEiCK-myc, EiMyb23ox, EiMyb23si, se cosecharon y se trataron para hacer el ensayo de inmunofluorescencia. Se utilizó el anticuerpo Anti-Myb10. En verde se muestra la señal correspondiente al anticuerpo Anti-Myb10 y en azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI con un aumento de 60X.

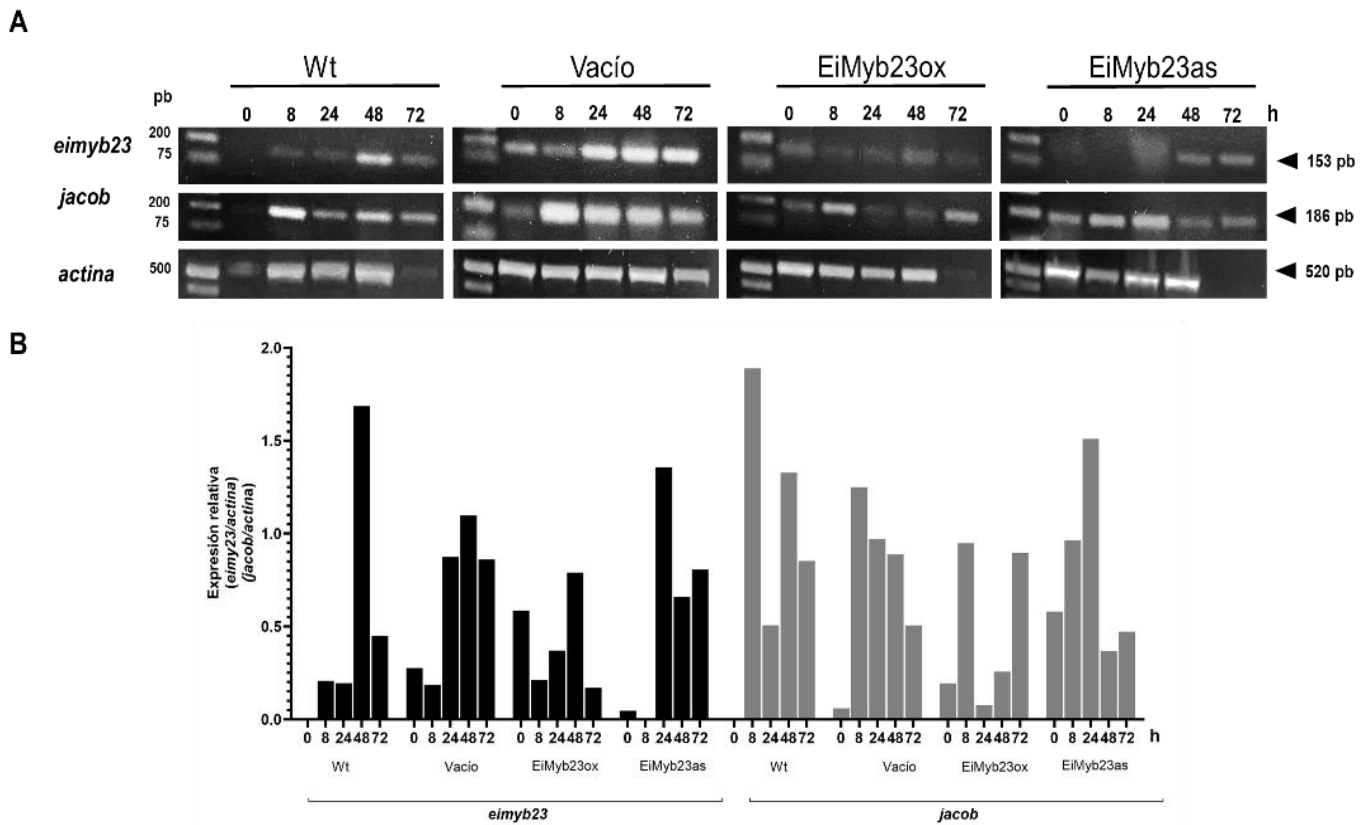
### 8.3 Efecto de la sobre-expresión e inhibición de EiMyb23 sobre el enquistamiento

Para evaluar el efecto que tiene la sobre-expresión e inhibición de EiMyb23 sobre el enquistamiento, se indujo el enquistamiento *in vitro* en trofozoitos de las condiciones pEiCK-myc (vacío), EiMyb23ox, EiMyb23as y Wt. La inducción se hizo usando el medio LYI-S-2 al 47% y sin glucosa a diferentes tiempos: 0, 8, 24, 28 y 72 h (Ehrenkaufner y Singh, 2012). Posteriormente, se obtuvo el RNA de las células en cada uno de los tiempos y se sintetizó el cDNA para hacer RT-PCR semi-cuantitativa empleando oligonucleótidos específicos para *eimyb23*. Además, para determinar si el gen relacionado con el enquistamiento, *jacob* se modificaba en las condiciones transfectantes y basal durante el enquistamiento se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar este gen.

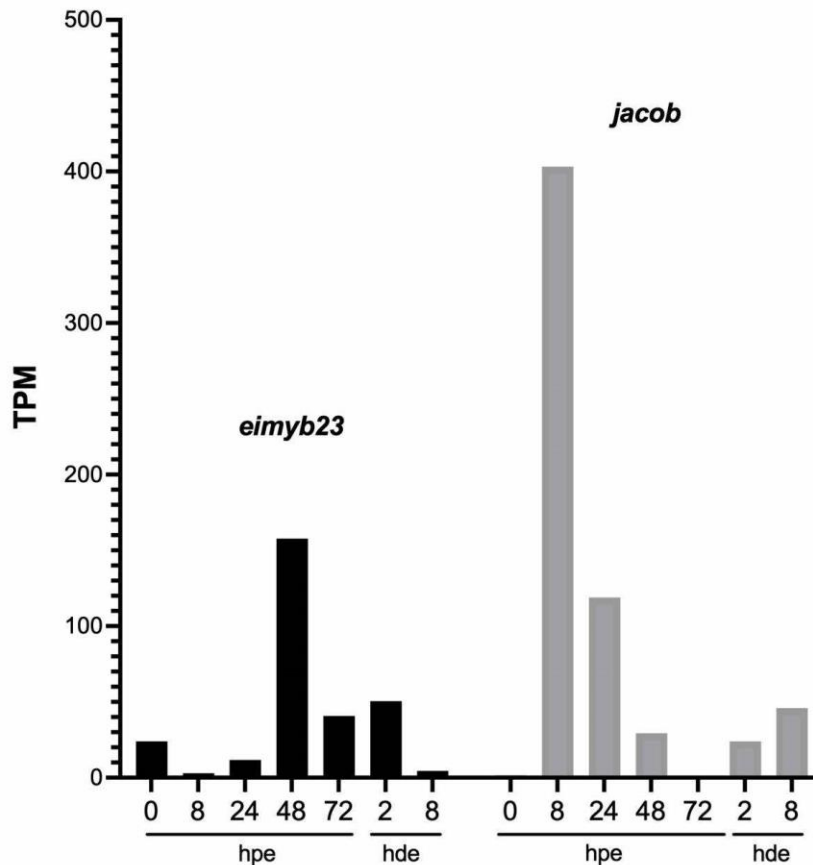
Los resultados mostraron variaciones en los niveles de expresión de *eimyb23* en las 4 condiciones durante los diferentes tiempos de enquistamiento. En la condición de sobre-expresión el nivel de expresión de *eimyb23* disminuyó a las 8 h post-enquistamiento, sin embargo, aumentó a las 24 y 48 h, para posteriormente disminuir su expresión a las 72 h (Figura 12A), lo cual correlacionó con lo previamente reportado por Ehrenkaufner y cols. (2013) (Figura 13).

En contraste con la condición antisentido, se observa una disminución en el tiempo inicial 0 h y a las 8 h post-enquistamiento, luego contrario a lo esperado aumenta su expresión a las 48 y 72 h (Figura 12A). Con respecto a las condiciones controles, en el vector vacío se observa un incremento significativo en la expresión de *eimyb23* con respecto al tiempo de enquistamiento. Mientras que en la condición Wt a las 8 h se observa un aumento de *eimyb23*, seguida de una disminución a las 24 h, luego un incremento de nuevo y finalmente se observa una caída en su expresión a las 72 h. Interesantemente, se observó el punto de mayor expresión del gen *eimyb23* a las 48 h en las condiciones Wt, Vacío y de sobre-expresión pero no en la antisentido. Por otro lado, los resultados de la expresión del gen *Jacob*, mostraron variaciones en la expresión de este gen en las condiciones vacío, de sobre-expresión y antisentido, en comparación con la Wt las cuales también correlacionaron con los datos previamente obtenidos por Ehrenkaufner y cols. (2013) (Figura 13). Además, se

observó mayor expresión de este gen a las 8 h en las condiciones Wt, Vacío y de sobre-expresión pero no en la antisentido.



**Figura 12. Niveles de expresión de los genes *eimyb23* y *jacob* durante el enquistamiento de trofozoitos de *E. invadens* transfectantes y en condición Wt. (A) RT-PCRs de los genes *eimyb23* y *jacob* en trofozoitos de las condiciones pEiCK-myc (vacío), EiMyb23ox, EiMyb23as y Wt durante 0, 8, 24, 48 y 72 h post-enquistamiento. El análisis se hizo en un gel de agarosa al 1%. (B) La expresión relativa de *eimyb23* y *jacob* normalizada a la expresión del gen de *actina* se midió con el programa ImageJ.**



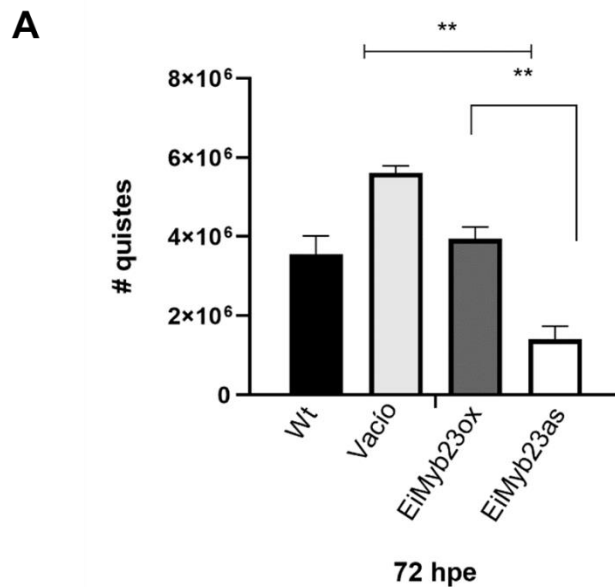
**Figura 13. Expresión de los genes *eimyb23* y *jacob* durante el enquistamiento-desenquistamiento.** Transcritos por millón del gen *eimyb23* y *jacob* durante el enquistamiento-desenquistamiento de trofozoitos de *E. invadens* obtenidos en AmoebaDB. Los niveles de expresión del gen *eimyb23* se indican en barras negras, y los niveles del gen *jacob* se muestran en barras grises, mostrando variaciones en la expresión de ambos genes. El eje X muestra el tiempo en horas post-enquistamiento (hpe) y horas durante el desenquistamiento (hde), mientras que el eje Y representa los valores de TPM (Ehrenkaufner *et al.*, 2013).

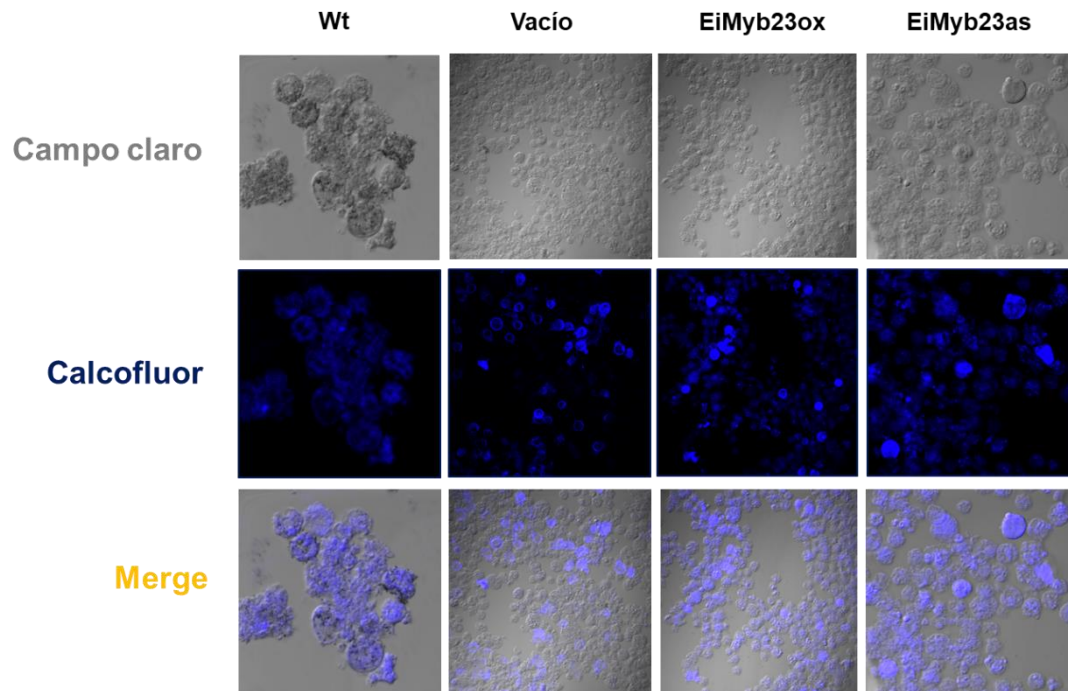
#### 8.4 Efecto de la sobreexpresión e inhibición de la expresión de EiMyb23 sobre el enquistamiento.

Para analizar el efecto de la sobreexpresión e inhibición de la expresión de EiMyb23 sobre el enquistamiento de *E. invadens*. Se hizo una cinética de enquistamiento a partir del  $1 \times 10^6$  trofozoitos y se analizó el número de quistes obtenidos en cada condición a las 72 h post-enquistamiento. Para ello, se indujo el enquistamiento *in vitro* en trofozoitos de las condiciones pEiCK-myc (vacío), EiMyb23ox, EiMyb23as y Wt. La inducción se hizo usando el medio LYI-S-2 al 47% y sin glucosa. Posteriormente, se rompieron los trofozoitos con detergente Sarcoxyl 0.01% para romper a los trofozoitos que no se diferenciaron a quiste;

posteriormente, se contaron los quistes en cámara de Neubauer para cada una de las condiciones.

Los resultados mostraron diferencias en el número de quistes entre las diferentes condiciones. Interesantemente, como se observa en el panel A, el enquistamiento aumentó en la condición de sobre expresión y en el vector vacío en comparación con la inhibición. Finalmente, se comprobó la presencia de los quistes mediante tinción con Blanco de Calcofluor y con el análisis de las imágenes por microscopia confocal que se muestran en el panel b, donde la cantidad de quistes se correlaciona con los resultados del panel A (Figura 14).



**B**








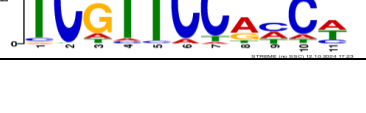
**Figura 14. Efecto de EiMyb23 sobre el enquistamiento. (A)** Número de quistes de las condiciones pEiCK-myc (vacío), EiMyb23ox, EiMyb23as y Wt 72 h post-enquistamiento **(B)** Imágenes por microscopía confocal de las tinciones con Blanco de Calcoflúor. Hpe: horas post-enquistamiento.

### 8.5 Identificación de motivos en el promotor de los posibles genes blanco de EiMyb23

Para determinar los posibles genes blanco de la proteína EiMyb23 se hizo la búsqueda de motivos conservados en genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento en la base de datos AmoebaDB a partir del transcriptoma obtenido durante el enquistamiento-desenquistamiento obtenido por Ehrenkauf *et al.*, 2013 empleando un fold change de 1.8. A partir de este análisis se obtuvieron 2070 genes que se sobreexpresan y 2372 genes que disminuyen su expresión. Posteriormente se obtuvieron los promotores de los genes (-500pb +23 pb) en AmoebaDB y empleando la herramienta STREME se buscaron motivos conservados empleando como criterio un tamaño de 6 a 12 nt (Tabla 6 y 7).

Los resultados mostraron 15 motivos enriquecidos estadísticamente en los 2070 genes que se sobre-expresan a las 48 h, entre los cuales, interesantemente, se encontró la secuencia AAAC dentro del motivo de 11 nt AAWAACTATA, la secuencia TAATA dentro del motivo TAATAAAAA de 9 nt y la secuencia CCC dentro del motivo AAACCCT de 7 nt. Con respecto a los 2372 genes que se silencian a las 48 h post-enquistamiento se identificaron 15 motivos enriquecidos estadísticamente, entre los cuales, interesantemente, se encontró la secuencia CCC dentro del motivo AACCTAMW de 9 nt y la secuencia GAAC dentro del motivo GAACTYVAAAAN (Tabla 6 y 7).

**Tabla 6. Motivos conservados en genes que se sobre-expresan a las 48 h post-enquistamiento**





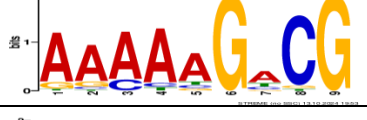
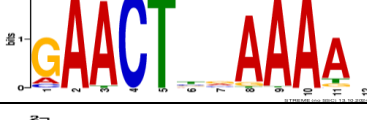





Secuencia	Logo	Significancia	Tamaño (nt)	#Genes donde aparece
AATTATAGTAAA		Valor-E- 4.8e-013	12	868 (41.9%)
AAWAACTATA		Valor-E 7.4e-009	11	638 (30.8%)
AAAAAGAGAAA A		Valor-E 6.8e-008	12	699 (33.8%)
ATAATAAWAWT A		Valor-E 5.3e-005	12	640 (30.9%)
AAATCGGGA		Valor-E 3.6e-004	9	261 (12.6%)
TAATAAAAA		Valor-E 5.3e-004	9	770 (37.2%)
ATAATAAA		Valor-E 9.4e-004	8	479 (23.1%)
TCGTTCCAHCW		Valor-E 1.8e-003	11	189 (9.1%)



WTTAWTAWTA AW		Valor-E 4.1e-003	12	718 (34.7%)
AAACTATAWW		Valor-E 4.1e-003	10	562 (27.1%)
AATGGTATT		Valor-E 5.8e-003	9	497 (24.0%)
AAAATGGTTT		Valor-E 1.6e-002	10	302 (14.6%)
ACAAAACAA		Valor-E 1.7e-002	9	741 (35.8%)
AAACCCT		Valor-E 2.1e-002	7	166 (8.0%)
GAWGAAGA		Valor-E 2.2e-002	8	568 (27.4%)

**Tabla 7. Motivos conservados en genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento**

Secuencia	Logo	Significancia	Tamaño (nt)	#Genes donde aparece
WTATTAWTAAT AW		Valor-E- 5.3e-010	13	780 (32.9%)
WTTATAGTAAA		Valor-E- 2.6e-007	11	1087 (45.8%)
TAATTAATTAAT		Valor-E- 8.8e-004	12	368 (15.5%)
CWTCATC		Valor-E- 3.8e-003	7	978 (41.2%)

TAATAATAAAA		Valor-E- 5.9e-003	11	910 (38.4%)
AACCCTAMW		Valor-E- 7.2e-003	9	181 (7.6%)
AACTATAATTW A		Valor-E- 1.2e-002	12	669 (28.2%)
AAACTATA		Valor-E- 2.3e-002	8	560 (23.6%)
AAAAAGACG		Valor-E- 3.5e-002	9	501 (21.1%)
GAACTYVAAAA N		Valor-E- 4.2e-002	12	857 (36.1%)
AATAGAA		Valor-E- 5.1e-002	7	699 (29.5%)
CATTTTTGGGT T		Valor-E- 5.1e-002	12	437 (18.4%)
AAAATGTTATT M		Valor-E- 5.7e-002	12	247 (10.4%)
TTTATWATAAA		Valor-E- 6.1e-002	11	919 (38.7%)
AAAAAGAAAAA		Valor-E- 8.9e-002	11G	950 (40.1%)

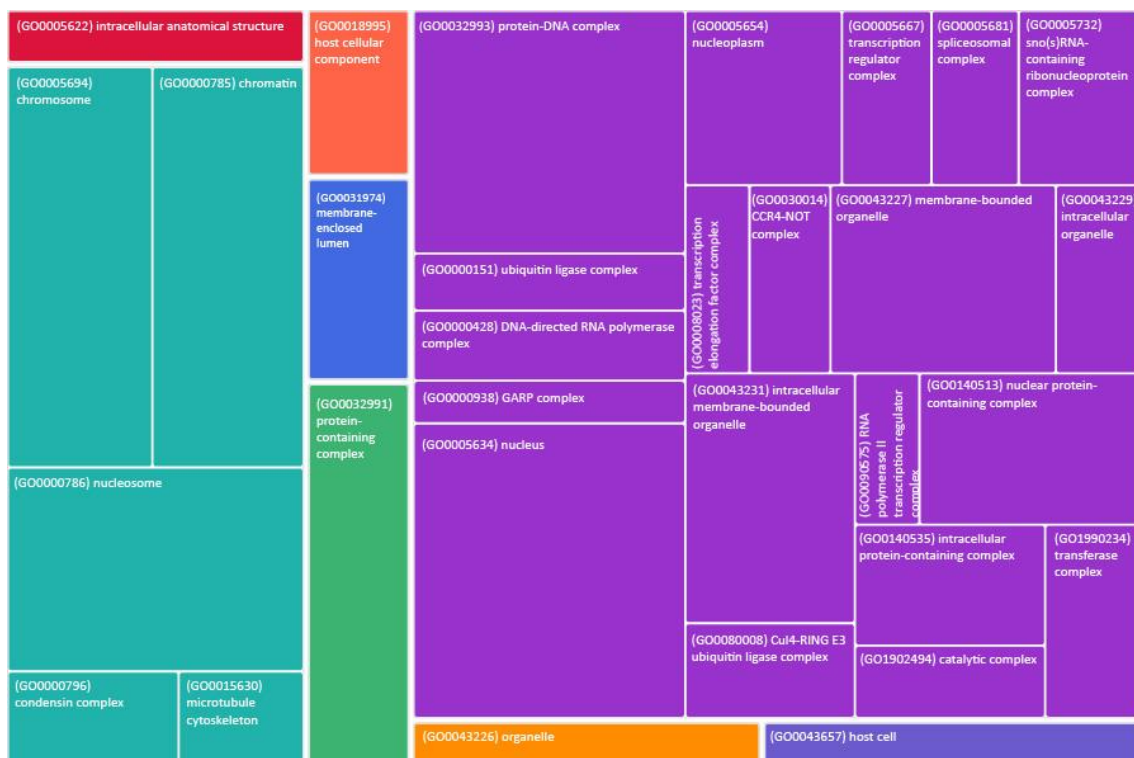
## 8.6 Análisis ontológico de los genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento

Con la finalidad de conocer las funciones biológicas de los genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento se llevó a cabo un análisis ontológico en la base de datos AmoebaDB, que permite clasificar a los genes en



agrupaciones, proporcionando una visión general de los principales procesos biológicos durante el enquistamiento.

En cuanto a los componentes celulares, predominan estructuras como el cromosoma (GO0005694), cromatina (GO0000785) y nucleosoma (GO0000786), vinculadas con la regulación génica. Además, complejos proteicos como el complejo de DNA-polimerasa dirigida por RNA (GO0000428) y el complejo de ligasa de ubiquitina (GO0000151), componentes reguladores de la transcripción (GO0005667) y ensamblajes de ribonucleoproteínas (GO0005732). Finalmente, se identificaron organelos delimitados por membranas, como el núcleo (GO0005634), junto con estructuras asociadas al citoesqueleto, como los microtúbulos (GO0015630), que son esenciales para los procesos de división celular y los cambios morfológicos durante el enquistamiento (Figura 16).



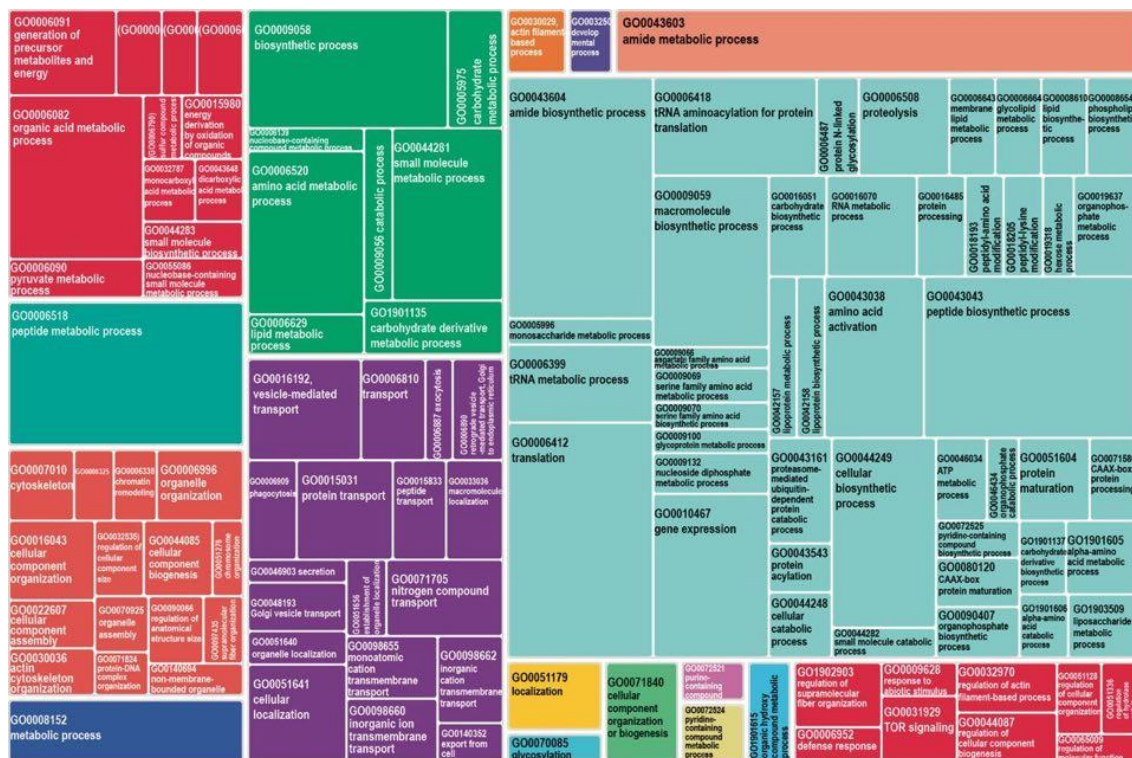
**Figura 16. Análisis ontológico de los posibles genes que sobre-expresan a las 48 h post-enquistamiento en *E. invadens*. Clasificación de acuerdo a: componentes celulares.** El análisis ontológico se hizo mediante la herramienta REVIGO, que agrupa términos de ontología genética relacionados en categorías. Los colores representan agrupaciones, proporcionando una visión general de los principales componentes celulares durante el enquistamiento.

Las funciones moleculares predominantes en estos genes sobre-expresados son actividad de unión, como unión a proteína (GO0005515), unión a fosfolípidos (GO0005543) y unión a lípidos (GO0008289), importantes en la regulación y señalización. Otra función fue la regulación de la transcripción, mediante factores de transcripción de unión al DNA (GO0003700), posiblemente para controlar la transcripción durante el proceso de enquistamiento, También se encontró actividad de quinasas (GO:0004691, GO0004672), actividad de ciclasas y ligasas (GO0003993, GO0016971), hidrolasas y oxidorreductasas (GO0003676, GO0016491), actividad de unión a ácidos nucleicos, DNA y RNA (GO0003677, GO0003676), actividades de ubiquitinación (GO0008270) y modificación postraduccional (GO0004842).



**Figura 17. Análisis ontológico de los posibles genes que sobre-expresan a las 48 h post-enquistamiento en *E. invadens*. Clasificación de acuerdo a: función molecular.** El análisis ontológico se hizo mediante la herramienta REVIGO, que agrupa términos de ontología genética relacionados en categorías. Los colores representan agrupaciones, proporcionando una visión general de las principales funciones moleculares durante el enquistamiento.

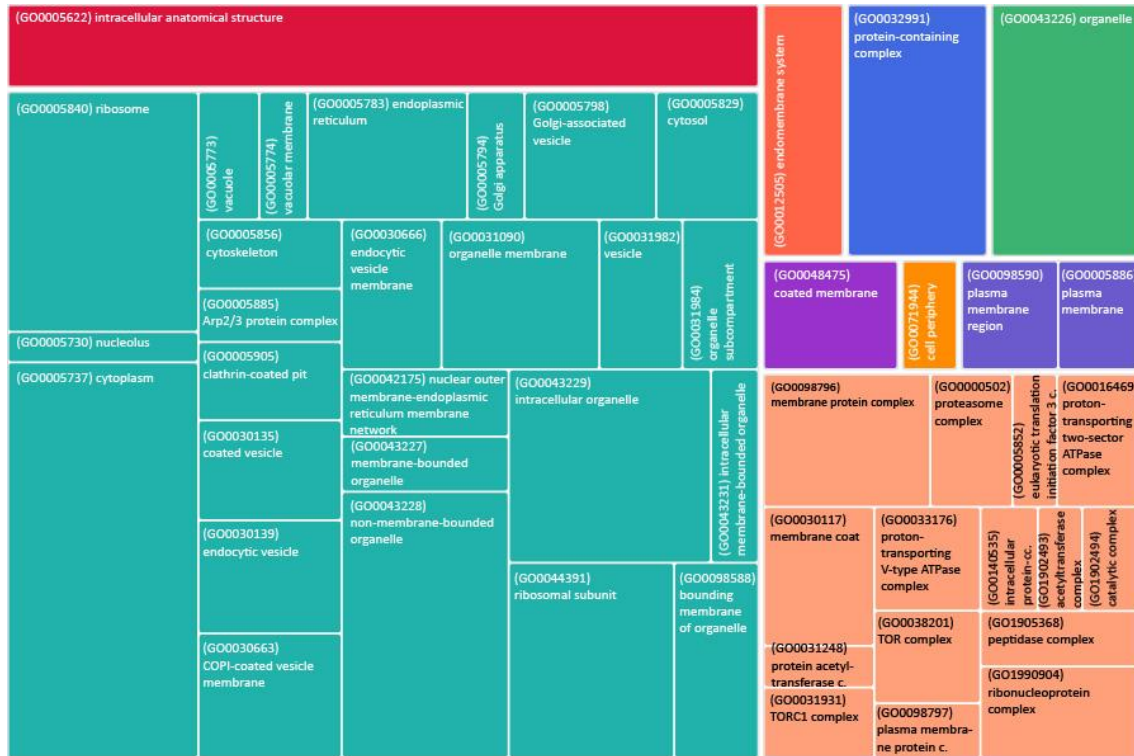
Los procesos biológicos en los que están implicados los genes que se inhiben a las 48 son metabolismo de lípidos (GO0006629) y de carbohidratos derivados (GO1901135), señalando una reducción en el procesamiento de moléculas esenciales para el almacenamiento y obtención de energía. También se destacan el metabolismo de ácidos orgánicos (GO0006082), biosíntesis de macromoléculas, péptidos y de amidas (GO0009059, GO0043043 y GO0043603, respectivamente). La organización del citoesqueleto (GO007010) y transporte vesicular (GO0016192) sugiriendo una reorganización estructural y la reducción en el movimiento intracelular, posiblemente orientado en la preparación del estado quístico. Adicionalmente, se encontró la traducción (GO0006412), modificación de RNA (GO0006399) y la expresión génica (GO0010467), indicando una regulación negativa general de la transcripción.



**Figura 18. Análisis ontológico de los posibles genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento en *E. invadens*. Clasificación de acuerdo a: procesos biológicos.** El análisis ontológico se hizo mediante la herramienta REVIGO, que agrupa términos de ontología genética relacionados en categorías. Los colores representan agrupaciones, proporcionando una visión general de los principales procesos biológicos durante el enquistamiento.

Por otro lado, entre los componentes celulares, se encuentran promordialmente las estructuras intracelulares (GO0005622), organelos (GO0043226), complejo

proteico (GO0032991), componentes del RE (GO0005783) y Aparato de Golgi (GO0005794). Componentes de transporte, vesícula endocítica (GO0030139) y componentes de membrana plasmática (GO0005886). También, complejos y subunidades del ribosoma (GO0005840, GO0044391), proteasoma (GO0000502) y complejo de transporte de protones (GO0016469).



**Figura 19. Análisis ontológico de los posibles genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento en *E. invadens*. Clasificación de acuerdo a: componentes celulares.** El análisis ontológico se hizo mediante la herramienta REVIGO, que agrupa términos de ontología genética relacionados en categorías. Los colores representan agrupaciones, proporcionando una visión general de los principales componentes celulares durante el enquistamiento.

Las funciones moleculares que destacan son actividades de ligasa (GO0004812, GO0016875), unión a proteínas (GO0005515) y a RNA (GO0003723), actividades hidrolíticas, tales como actividad peptidasa (GO0008233), endopeptidasa (GO0004175) y exonucleasa (GO0004527). Actividades de transferasa (GO0016758, GO0004659, GO0016757) y fosforilación de proteínas (GO0016301). Adicionalmente, funciones de unión a iones de hierro (GO0005506) y unión a cationes (GO0043169), actividad isomerasa (GO0016853) y actividad oxidorreductasa (GO0016491).





## IX. DISCUSIÓN

El estudio de *E. histolytica* entró en una nueva era después de la secuenciación del genoma de la cepa virulenta HM1:IMSS. La regulación génica es crítica e importante para el proceso de adaptación ambiental, la transmisión del patógeno y en la conversión de trofozoito a quiste. Se han identificado familias de genes que tienen papeles biológicos importantes en *E. histolytica*: los genes de la vía de interferencia de RNA y los factores de transcripción que contienen el DBD-Myb (Ehrenkaufner *et al.*, 2009; Meneses *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008). Los factores de transcripción más abundantes en *E. histolytica* son las proteínas con DBD-Myb (Iyer *et al.*, 2008).

Debido a la importancia del proceso de enquistamiento, se ha intentado estudiar induciendo este proceso *in vitro* en *E. histolytica*, sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible. Por lo tanto, se utiliza a *E. invadens*, como modelo de estudio del enquistamiento (Eichinger, 1997; Singh y Ehrenkaufner, 2009). En un estudio bioinformático se demostró que *E. invadens* tiene 48 proteínas que contienen DBD-Myb codificadas en su genoma. Estos genes modulan su expresión durante los procesos de enquistamiento-desenquistamiento, y las proteínas codificadas tienen uno, dos y cuatro repetidos conservados imperfectos (R) en su dominio de unión DBD-Myb. Por lo tanto, estas proteínas pueden desempeñar un papel crucial como moduladores de la transcripción en *E. invadens*, permitiendo la invasión y formación de quistes en su huésped reptil (Cuellar *et al.*, 2024).

Interesantemente, el gen *eimyb23* (EIN\_359630) presentó cambios en su expresión durante la conversión trofozoito-quiste, teniendo la mayor expresión a las 48 h de enquistamiento (Cuellar *et al.*, 2024; Ehrenkaufner *et al.*, 2013). Este gen codifica para la proteína EiMyb23 perteneciente a la familia EiMybR2R3. Mediante un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de sus repetidos R2 y R3 se observó que había similitud con las secuencias de la proteína EhMyb10 de *E. histolytica*, TvMyb1 de *Trichomonas vaginalis* y c-MybR2R3 de plantas.

En este estudio se evaluó el efecto de la sobre expresión y el silenciamiento de EiMyb23 sobre el enquistamiento de *E. invadens*. Para ello, establecimos transfectantes estables de trofozoítos de *E. invadens* que sobre expresan o inhiben la expresión del gen *eimyb23*. La modificación de la expresión del gen

en las transfectantes se monitorizó por RT-PCR semi-cuantitativa e inmunofluorescencia. En los resultados de las RT-PCR observamos un incremento o disminución en la expresión del gen *eimyb23* en las condiciones de sobreexpresión o de silenciamiento en comparación con el vector vacío y la condición basal (Figura 9). Estos resultados establecen un modelo experimental adecuado para analizar el papel de EiMyb23 en el enquistamiento.

La localización subcelular de EiMyb23, evaluada mediante inmunofluorescencia, reveló que la proteína se encuentra principalmente en el núcleo y en la región perinuclear. Este resultado sugiere que EiMyb23 actúa en la regulación transcripcional, lo esperado para los factores de transcripción de tipo Myb, que regulan la transcripción en respuesta a cambios ambientales y durante la diferenciación celular (Arratia y Aguirre, 2013). Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron que EiMyb23 también se localiza en el citoplasma y la membrana celular, lo que sugiere funciones adicionales en el transporte intracelular y la estabilidad de la membrana, probablemente en asociación con proteínas de señalización y estructuras celulares importantes para la diferenciación y adaptación celular (Figura 10 y 11).

Los factores de transcripción con el DBD Myb, aparecen como candidatos clave en la regulación del proceso de enquistamiento, al participar en la modulación de redes génicas que controlan tanto la diferenciación celular como la resistencia a cambios ambientales. Algunos estudios resaltan la importancia de estas proteínas en la adaptación de protozoarios al estrés, sugiriendo que muchas proteínas Myb, como EiMyb23 podría regular varios procesos en *E. invadens* como la virulencia, el ciclo de vida y el enquistamiento (Arratia y Aguirre, 2013; Cuellar *et al.*, 2024; Ehrenkaufner *et al.*, 2009; Meneses *et al.*, 2010)

En este estudio, se encontró que el gen *eimyb23* presenta una expresión diferencial durante el proceso de enquistamiento en *E. invadens*, observándose un mayor incremento en su expresión a las 48 h de inducción del enquistamiento. En el caso de *eimyb23*, tanto nuestros resultados experimentales como los datos de AmoebaDB presentan el punto más alto de expresión a las 48 horas en condiciones de sobre-expresión y Wt (Ehrenkaufner *et al.*, 2013). Esta correlación sugiere que los mecanismos reguladores de *eimyb23* que inducen un incremento en su expresión hacia la mitad del proceso de enquistamiento podrían ser

intrínsecos y mantenerse independientemente de las manipulaciones experimentales, mostrando un posible papel de este gen en esta etapa del enquistamiento. Los resultados de la transcriptómica y nuestros datos de RT-PCR durante el enquistamiento, muestran una caída en los niveles de expresión a las 72 horas, lo cual indica una posible reducción basal de *eimyb23* con respecto al inicio de las etapas finales del proceso de enquistamiento.

Para el gen *jacob*, también observamos correlación con los datos de transcriptómica reportados (Ehrenkaufner *et al.*, 2013). La expresión de *jacob* alcanza niveles altos en las primeras horas post-enquistamiento, especialmente a las 8 h en las condiciones Wt y de sobre-expresión. Este resultado es consistente con lo reportado por la literatura, donde se describe que *jacob* desempeña un papel central en la iniciación y regulación de los primeros pasos del proceso de enquistamiento en el género Entamoeba. (Frisardi *et al.*, 2000). El aumento de la expresión de este gen en las primeras 8 horas y la disminución posterior, sugiere que este gen sigue un patrón de expresión controlado y crucial en el enquistamiento en *E. invadens* y es replicable en diferentes contextos experimentales.

Nuestros resultados experimentales muestran correlación con los datos previos (Figura 13) (Ehrenkaufner *et al.*, 2013) en los puntos clave de expresión de *eimyb23* y *jacob*, indicando posiblemente que los patrones de expresión de estos genes pueden estar altamente conservados durante el proceso de enquistamiento. La correlación de los picos y caídas en los niveles de expresión de nuestros datos y en los valores basales de AmoebaDB mostrados da soporte a la idea de que el papel de *eimyb23* está altamente regulado y es importante en las diferentes etapas de enquistamiento en *E. invadens*. Adicionalmente, esto concuerda con estudios previos donde se ha descrito la importancia de los factores de transcripción Myb en la regulación de procesos de diferenciación y virulencia en otros protozoarios, como *Plasmodium falciparum* y *Giardia lamblia* (Gissot *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2002).

Por otro lado, la inducción del enquistamiento en trofozoítos en las condiciones de sobre-expresión, silenciamiento, vector vacío y Wt, los resultados mostraron que la sobreexpresión de EiMyb23 aumenta significativamente el número de quistes formados en la condición de sobre-expresión en comparación con las

condiciones de silenciamiento y el control (Figura 14). Estos hallazgos sugieren que EiMyb23 participa en la regulación de la diferenciación de trofozoítos a quistes, probablemente a través de la activación y control de redes génicas. Estudios previos asocian las proteínas Myb con la regulación de genes implicados en la respuesta al estrés, la diferenciación celular y el enquistamiento, tanto en protozoarios como en otros organismos (Ambawat *et al.*, 2013; Arratia y Aguirre, 2013; Biswas *et al.*, 2023; Gissot *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008; Singh y Ehrenkaufner, 2009). La regulación diferencial de EiMyb23 en las fases iniciales y tardías del enquistamiento sugiere que este factor de transcripción presenta una regulación controlada con respecto a la fase de enquistamiento. En el enquistamiento temprano, EiMyb23 parece estar reprimido para permitir la reorganización inicial de la célula, mientras que en el enquistamiento tardío se observa un aumento en su expresión, indicando que EiMyb23 podría activar genes implicados en la maduración y subsistencia del quiste.

Interesantemente, en nuestro trabajo encontramos presencia de motivos ricos en C, se reportó un motivo específico en los promotores de genes regulados por EhMyb-dr en *E. histolytica* un motivo de seis citosinas (CCCCC), al cual se unen proteínas nucleares del protozoario. Este motivo es común en los promotores de genes regulados durante el enquistamiento, lo que muestra su importancia en la regulación de la transición entre etapas (Ehrenkaufner *et al.*, 2009). En nuestros resultados, se identificaron secuencias conservadas como AAACCCT en los genes inhibidos a las 48 horas, lo cual sugiere que la regulación mediada por EiMyb23 también podría depender de motivos ricos en C, similar a los observados en *E. histolytica* (Tabla 5).

En otro estudio se reporta que *E. invadens*, al igual que *E. histolytica*, posee el motivo central GAAC (GAACTACAAA), el cual está asociado con el control de la tasa de transcripción y es crucial en los promotores de genes relacionados con el enquistamiento (Manna *et al.*, 2014). Nuestros resultados mostraron secuencias GAAC en genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento, lo que destaca la función conservada de este motivo en la regulación de genes específicos de fase y el control transcripcional en las etapas de enquistamiento en *E. invadens*. Adicionalmente, se identificaron motivos enriquecidos A/TAAACCCT en genes de alta expresión y otros asociados a una menor

expresión basal (GAATGATG), en *E. histolytica* (Hackney *et al.*, 2007). En nuestros resultados observamos motivos como AAWAACTATA en genes que sobre-expresan a las 48 horas los cuales coinciden con motivos similares a los reportados en la literatura. Por lo tanto, los motivos ricos en C (por ejemplo CCC y GAAC) y otros motivos enriquecidos en genes que sobre-expresan o se inhiben durante el enquistamiento, propone que los genes en *E. invadens* responden a una red reguladora conservada en el género Entamoeba que permite la adaptación a condiciones de estrés y el proceso de enquistamiento.

Con la finalidad de conocer las funciones biológicas de los genes que se sobre-expresan y se inhiben a las 48 h post-enquistamiento se llevó a cabo un análisis ontológico en la base de datos AmoebaDB, que permite clasificar a los genes en 3 categorías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares (Figuras 14-18). Dentro de la categoría de procesos biológicos los genes sobre-expresados están relacionados con la regulación del ciclo celular, el procesamiento de RNA, el metabolismo de ácidos nucleicos y la biosíntesis de compuestos necesarios para la estabilidad genómica. Posiblemente se relacionan con el enquistamiento al asegurar la integridad del material genético durante este proceso. Además, se observó que había implicación en la respuesta a estrés sugiriendo que la célula prende los mecanismos para hacer frente a las condiciones ambientales desfavorables.

Con respecto a las funciones moleculares, se encontró que destacaban la unión a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos quizá indicando un incremento en las interacciones moleculares críticas para la regulación celular y molecular durante el enquistamiento. La presencia de factores de transcripción de unión al DNA sugiere una regulación activa de la expresión génica, posiblemente para regular la expresión de genes necesarios durante el proceso de enquistamiento. Adicionalmente, se observaron actividades enzimáticas, como la actividad de quinasa y la actividad de transferasa, que son esenciales para modificar proteínas y regular su función. En conjunto estas funciones moleculares parecen ser esenciales para que *E. invadens* se adapte las condiciones ambientales y a las necesidades de supervivencia en el estado enquistado.

También se encontró que los genes sobre-expresados están asociados con estructuras relacionadas con la regulación génica, como el nucléosoma, el

núcleo y la cromatina. Estas asociaciones revelan una gran importancia en la actividad de empaquetamiento de DNA y la regulación de la transcripción durante el enquistamiento. Además, la presencia de complejos de ribonucleoproteínas y componentes del citoesqueleto sugiere la reorganización celular y estabilidad durante este proceso.

Por otro lado, los genes que se inhiben a las 48 h post-enquistamiento están asociados principalmente a estructuras como el ribosoma, el RE y el aparato de Golgi. Esto indica que la síntesis, modificación de proteínas y transporte intracelular son minimizadas para reducir el consumo energético del parásito durante el enquistamiento. Asimismo, los genes que se silencian se relacionan principalmente con actividades enzimáticas y de unión que están implicadas en procesos metabólicos y de regulación proteica. La inhibición de actividades como la ligasa de aminoacil-tRNA, la actividad de peptidasa y la actividad de endopeptidasa apuntan una reducción en la síntesis y procesamiento proteica, lo cual es consistente de la conservación de recursos en el parásito durante el enquistamiento.

## **X. CONCLUSIONES**

- Nuestros estudios preliminares parecen confirmar que hemos obtenido el modelo de sobreexpresión e inhibición de la proteína EiMyb23 en *E. invadens* confirmado mediante ensayos RT-PCR e IF.
- La proteína EiMyb23 tiene una localización principalmente perinuclear distribuida en el citoplasma y la membrana en los trofozoítos de *E. invadens*.
- Durante el enquistamiento, la sobreexpresión o inhibición de EiMyb23 aumenta y disminuye respectivamente la expresión de los genes *eimyb23* y *jacob*.
- Los cultivos de trofozoitos que sobreexpresan la proteína EiMyb23 producen 2.5 veces más quistes cuando se les induce a diferenciación.

## XI. PERSPECTIVAS

- Analizar por WB la sobre-expresión y silenciamiento de EiMyb23
- Analizar el efecto de la sobreexpresión o inhibición de eimy23 sobre el enquistamiento a los tiempos 8, 24 y 48 h.
- Identificar y analizar otros genes *myb* en *E. invadens* para dilucidar el papel de estas proteínas en la patogenicidad del parásito, para continuar investigando el papel de las proteínas Myb en el género Entamoeba

## XII. REFERENCIAS

Aguilar-Díaz, H., Carrero, J.C., Argüello-García, R., Laclette, J.P., Morales-Montor, J., 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? Trends Parasitol. 27, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.06.003>

Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., Yadav, R.C., 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. Physiol. Mol. Biol. Plants 19, 307. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>

Amos, B., Aurrecochea, C., Barba, M., Barreto, A., Basenko, E.Y., Bazant, W., Belnap, R., Blevins, A.S., Böhme, U., Brestelli, J., Brunk, B.P., Caddick, M., Callan, D., Campbell, L., Christensen, M.B., Christophides, G.K., Crouch, K., Davis, K., DeBarry, J., Doherty, R., Duan, Y., Dunn, M., Falke, D., Fisher, S., Flicek, P., Fox, B., Gajria, B., Giraldo-Calderón, G.I., Harb, O.S., Harper, E., Hertz-Fowler, C., Hickman, M.J., Howington, C., Hu, S., Humphrey, J., Iodice, J., Jones, A., Judkins, J., Kelly, S.A., Kissinger, J.C., Kwon, D.K., Lamoureux, K., Lawson, D., Li, W., Lies, K., Lodha, D., Long, J., MacCallum, R.M., Maslen, G., McDowell, M.A., Nabrzyski, J., Roos, D.S., Rund, S.S.C., Schulman, S.W., Shanmugasundram, A., Sitnik, V., Spruill, D., Starns, D., Stoeckert, C.J., Jr, Tomko, S.S., Wang, H., Warrenfeltz, S., Wieck, R., Wilkinson, P.A., Xu, L., Zheng, J., 2022. VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. Nucleic Acids Res. 50, D898–D911. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab929>

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 Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas 16, 98–108. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72081-3](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72081-3)

Azuara-Liceaga, E.I., Sanchez-Buena, S., Meneses, E., Briebe, L.G., Orozco, E., 2007. Identification of myb transcription factors in Entamoeba histolytica. FASEB J. 21, A1031–A1031. <https://doi.org/10.1096/fasebj.21.6.A1031-c>

- 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 Negl. Trop. Dis.* 3, e551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000551>
- Begum, S., Quach, J., Chadee, K., 2015. Immune Evasion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to Disease. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01394>
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., Bhattacharya, S., 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 30, 401–410. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00189-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00189-7)
- 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, 4107–4120. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900022>
- Biswas, D., Gain, H., Mandal, A., 2023. MYB transcription factor: A new weapon for biotic stress tolerance in plants. *Plant Stress* 10, 100252. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100252>
- 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*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1869, 140601. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140601>
- Chadee, K., Petri, W.A., Innes, D.J., Ravdin, J.I., 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80, 1245–1254. <https://doi.org/10.1172/JCI113199>
- Chatterjee, A., Ghosh, S.K., Jang, K., Bullitt, E., Moore, L., Robbins, P.W., Samuelson, J., 2009. Evidence for a “wattle and daub” model of the cyst wall of entamoeba. *PLoS Pathog.* 5, e1000498. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000498>
- Chou, A., Austin, R.L., 2024. *Entamoeba histolytica* Infection, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Clark, C.G., Alsmark, U.C.M., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P.G., Samuelson, J., Noël, C.J., Hirt, R.P., Embley, T.M., Gilchrist, C.A., Mann, B.J., Singh, U., Ackers, J.P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillén, N., Duchêne, M., Nozaki, T., Hall, N., 2007. Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv. Parasitol.* 65, 51–190. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(07\)65002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(07)65002-7)



- Coppi, A., Eichinger, D., 1999. Regulation of *Entamoeba invadens* encystation and gene expression with galactose and *N*-acetylglucosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00085-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00085-7)
- Coppi, A., Merali, S., Eichinger, D., 2002. The Enteric Parasite *Entamoeba* Uses an Autocrine Catecholamine System during Differentiation into the Infectious Cyst Stage\*. *J. Biol. Chem.* 277, 8083–8090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111895200>
- Cornick, S., Chadee, K., 2017. *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers* 5, e1283386. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283386>
- Cuellar, P., Castañeda-Ortiz, E.J., Rosales-Zarza, C., Martínez-Rodríguez, C.E., Canela-Pérez, I., Rodríguez, M.A., Valdés, J., Azuara-Liceaga, E., 2024. Genome-Wide Classification of Myb Domain-Containing Protein Families in *Entamoeba invadens*. *Genes* 15, 201. <https://doi.org/10.3390/genes15020201>
- da Silva, M.S., Perez, A.M., da Silveira, R. de C.V., de Moraes, C.E., Siqueira-Neto, J.L., Freitas-Junior, L.H., Cano, M.I.N., 2010. The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiol.* 10, 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-136>
- Das, S., Stevens, T., Castillo, C., Villasenõr, A., Arredondo, H., Reddy, K., 2002. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int. J. Parasitol.* 32, 655–675. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00006-1)
- Das, S., Van Dellen, K., Bulik, D., Magnelli, P., Cui, J., Head, J., Robbins, P.W., Samuelson, J., 2006a. The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitosan (deacetylated chitin). *Mol. Biochem. Parasitol.* 148, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.002>
- Das, S., Van Dellen, K., Bulik, D., Magnelli, P., Cui, J., Head, J., Robbins, P.W., Samuelson, J., 2006b. The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitosan (deacetylated chitin). *Mol. Biochem. Parasitol.* 148, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.002>
- De Cádiz, A.E., Jeelani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., Nozaki, T., 2013. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PloS One* 8, e74840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074840>
- de la Vega, H., Specht, C.A., Semino, C.E., Robbins, P.W., Eichinger, D., Caplivski, D., Ghosh, S., Samuelson, J., 1997. Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85, 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02817-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02817-4)
- Dey, T., Basu, R., Ghosh, S.K., 2009. *Entamoeba invadens*: Cloning and molecular characterization of chitinases. *Exp. Parasitol.* 123, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.008>

- Du, H., Liang, Z., Zhao, S., Nan, M.-G., Tran, L.-S.P., 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. *Sci. Rep.* 5, 11037. <https://doi.org/10.1038/srep11037>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- 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*. *Cell. Microbiol.* 11, 898–910. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01300.x>
- Ehrenkaufer, G.M., Singh, U., 2012. Transient and stable transfection in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 184, 59–62. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.04.007>
- Ehrenkaufer, G.M., Weedall, G.D., Williams, D., Lorenzi, H.A., Caler, E., Hall, N., Singh, U., 2013. The genome and transcriptome of the enteric parasite *Entamoeba invadens*, a model for encystation. *Genome Biol.* 14, R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r77>
- Eichinger, D., 1997. Encystation of entamoeba parasites. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 19, 633–639. <https://doi.org/10.1002/bies.950190714>
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 318–331. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.318>
- 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. *Mol. Cell* 8, 351–361. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00321-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00321-5)
- Fleta Zaragoza, J., Bueno Lozano, O., Bueno Lozano, M., 2000. Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. *Med. Integral* 36, 96–101.
- Frisardi, M., Ghosh, S.K., Field, J., Van Dellen, K., Rogers, R., Robbins, P., Samuelson, J., 2000. The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect. Immun.* 68, 4217–4224. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4217-4224.2000>
- 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* 133, 1715–1724. <https://doi.org/10.1242/dev.02327>
- Ganter, B., Lipsick, J.S., 1999. Myb and Oncogenesis, in: Vande Woude, G.F., Klein, G. (Eds.), *Advances in Cancer Research*. Academic Press, pp. 21–60. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60773-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60773-3)

- Ghosh, S., Frisardi, M., Ramirez-Avila, L., Descoteaux, S., Sturm-Ramirez, K., Newton-Sanchez, O.A., Santos-Preciado, J.I., Ganguly, C., Lohia, A., Reed, S., Samuelson, J., 2000. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3815–3821. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3815-3821.2000>
- Gilchrist, C.A., Ali, I.K.M., Kabir, M., Alam, F., Scherbakova, S., Ferlanti, E., Weedall, G.D., Hall, N., Haque, R., Petri, W.A., Caler, E., 2012. A Multilocus Sequence Typing System (MLST) reveals a high level of diversity and a genetic component to *Entamoeba histolytica* virulence. *BMC Microbiol.* 12, 151. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-151>
- 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. *J. Mol. Biol.* 346, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.045>
- Gomez, C., Ramirez, M.E., Calixto-Galvez, M., Medel, O., Rodríguez, M.A., 2010. Regulation of Gene Expression in Protozoa Parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 726045. <https://doi.org/10.1155/2010/726045>
- Guo, X., Houpt, E., Petri, W.A., 2007. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. *Curr. Opin. Immunol., Host-pathogen interactions/Immunological Techniques* 19, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.005>
- Hackney, J.A., Ehrenkaufer, G.M., Singh, U., 2007. Identification of putative transcriptional regulatory networks in *Entamoeba histolytica* using Bayesian inference. *Nucleic Acids Res.* 35, 2141–2152. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm028>
- Haque, R., Duggal, P., Ali, I.M., Hossain, M.B., Mondal, D., Sack, R.B., Farr, B.M., Beaty, T.H., Petri, W.A., 2002. Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children. *J. Infect. Dis.* 186, 547–552. <https://doi.org/10.1086/341566>
- Haque, R., Huston, C.D., Hughes, M., Houpt, E., Petri, W.A., 2003. Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* 348, 1565–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022710>
- 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*\*. *J. Biol. Chem.* 283, 31021–31029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805023200>
- 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. *Int. J. Parasitol.* 38, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.07.018>
- Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., Escueta-de Cadiz, A., Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., Nozaki, T., 2012. Metabolic profiling of the protozoan parasite

Entamoeba invadens revealed activation of unpredicted pathway during encystation. PloS One 7, e37740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037740>

Jia, L., Clegg, M.T., Jiang, T., 2004. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes. Plant Physiol. 134, 575–585. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027201>

Jiang, I., Tsai, C.-K., Chen, S.-C., Wang, S., Amiraslanov, I., Chang, C.-F., Wu, W.-J., Tai, J.-H., Liaw, Y.-C., Huang, T., 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 Res. 39, 8992–9008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr558>

Jin, H., Martin, C., 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. Plant Mol. Biol. 41, 577–585. <https://doi.org/10.1023/a:1006319732410>

Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J.N., Bouriotis, V., 1993. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 8005–8008.

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. <https://doi.org/10.1155/2018/4601420>

Katz, U., Ankri, S., Stolarsky, T., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D., 2002. Entamoeba histolytica expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gal-lectin are less virulent. Mol. Biol. Cell 13, 4256–4265. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0344>

Kawano-Sugaya, T., Izumiyama, S., Yanagawa, Y., Saito-Nakano, Y., Watanabe, K., Kobayashi, S., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., 2020. Near-chromosome level genome assembly reveals ploidy diversity and plasticity in the intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica. BMC Genomics 21, 813. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07167-9>

Kranz, H., Scholz, K., Weisshaar, B., 2000. c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. Plant J. Cell Mol. Biol. 21, 231–235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00666.x>

Leippe, M., Herbst, R., 2004. Ancient Weapons for Attack and Defense: the Pore-forming Polypeptides of Pathogenic Enteric and Free-living Amoeboid Protozoa. J. Eukaryot. Microbiol. 51, 516–521. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00286.x>

Lejeune, M., Rybicka, J.M., Chadee, K., 2009. Recent Discoveries in the Pathogenesis and Immune Response Toward Entamoeba Histolytica. Future Microbiol. 4, 105–118. <https://doi.org/10.2217/17460913.4.1.105>

Li, B., Espinal, A., Cross, G.A.M., 2005. Trypanosome telomeres are protected by a homologue of mammalian TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5011–5021. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.5011-5021.2005>

Linger, B.R., Price, C.M., 2009. Conservation of Telomere protein complexes: Shuffling through Evolution. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 434. <https://doi.org/10.3109/10409230903307329>

Lipsick, J.S., 1996. One billion years of Myb. *Oncogene* 13, 223–235.

Lipsick, J.S., Wang, D.M., 1999. Transformation by v-Myb. *Oncogene* 18, 3047–3055. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202745>

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, D., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Norbertczak, H., Price, C., Wang, Z., Guillén, N., Gilchrist, C., Stroup, S.E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N.M., Petri, W.A., Clark, C.G., Embley, T.M., Barrell, B., Fraser, C.M., Hall, N., 2005. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–868. <https://doi.org/10.1038/nature03291>

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 Negl. Trop. Dis.* 4, e716. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000716>

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 Pathog.* 5, e1000434. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000434>

Manna, D., Ehrenkaufer, G.M., Singh, U., 2014. Regulation of gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*: identification of core promoter elements and promoters with stage-specific expression patterns. *Int. J. Parasitol.* 44, 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.06.008>

Manna, D., Lentz, C.S., Ehrenkaufer, G.M., Suresh, S., Bhat, A., Singh, U., 2018. An NAD<sup>+</sup>-dependent novel transcription factor controls stage conversion in *Entamoeba*. *eLife* 7, e37912. <https://doi.org/10.7554/eLife.37912>

Manuel, C.P.J., Monroy, V.S., D'Artagnan, V.M.J., 2011. *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito. *Enfermedades Infecc. Microbiol.* 31, 63–70.

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. *Cell. Microbiol.* 6, 367–376. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00363.x>

Meneses, E., Cárdenas, H., Zárate, S., Brieba, L.G., Orozco, E., López-Camarillo, C., Azuara-Liceaga, E., 2010. The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene* 455, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.02.004>

Mi-ichi, F., Yoshida, H., Hamano, S., 2016. *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. *PLoS Pathog.* 12, e1005845. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005845>

Mondal, D., Petri, W.A., Sack, R.B., Kirkpatrick, B.D., Haque, R., 2006. *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 1032–1038. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.12.012>

Moody-Haupt, S., Patterson, J.H., Mirelman, D., McConville, M.J., 2000. The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *J. Mol. Biol.* 297, 409–420. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3577>

Moonah, S.N., Jiang, N.M., Jr, W.A.P., 2013. Host Immune Response to Intestinal Amebiasis. *PLOS Pathog.* 9, e1003489. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003489>

Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Potter, S.S., 1991. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677–689. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90099-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90099-k)

Nagaraja, S., Ankri, S., 2019. Target identification and intervention strategies against amebiasis. *Drug Resist. Updat.* 44, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.04.003>

Naiyer, S., Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2019. Advances in *Entamoeba histolytica* Biology Through Transcriptomic Analysis. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01921>

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. *Exp. Parasitol., Immunology and Cell Biology of Protozoan Parasites* 126, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.014>

Nakada-Tsukui, K., Sekizuka, T., Sato-Ebine, E., Escueta-de Cadiz, A., Ji, D., Tomii, K., Kuroda, M., Nozaki, T., 2018. AIG1 affects in vitro and in vivo virulence in clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 14, e1006882. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006882>

- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y., 1994. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* 79, 639–648. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90549-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90549-5)
- Oh, I.H., Reddy, E.P., 1999. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18, 3017–3033. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202839>
- 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*. *Eukaryot. Cell* 5, 391–399. <https://doi.org/10.1128/ec.5.2.391-399.2006>
- Otsuka, H., Haastert, P.J.M.V., 1998. A novel Myb homolog initiates *Dictyostelium* development by induction of adenyl cyclase expression. *Genes Dev.* 12, 1738–1748. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1738>
- Pearson, R.J., Morf, L., Singh, U., 2013. Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress-responsive genes through a novel transcription factor in the protozoan pathogen *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 288, 4462–4474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.423467>
- Petri, W.A., Haque, R., Mann, B.J., 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 39–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160959>
- Ragland, B.D., Ashley, L.S., Vaux, D.L., Petri, W.A., 1994. *Entamoeba histolytica*: Target Cells Killed by Trophozoites Undergo DNA Fragmentation Which Is Not Blocked by Bcl-2. *Exp. Parasitol.* 79, 460–467. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1107>
- Ralston, K.S., William A. Petri, J., 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 27, 254. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.02.006>
- 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. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 341. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00341>
- Roediger, R., Lisker-Melman, M., 2020. Pyogenic and Amebic Infections of the Liver. *Gastroenterol. Clin. North Am., Infections of the Liver and Biliary System* 49, 361–377. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.013>
- 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. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 20, 641–652. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00638.x>

Rosinski, J.A., Atchley, W.R., 1998. Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J. Mol. Evol.* 46, 74–83. <https://doi.org/10.1007/pl00006285>

Saldivar Anaya, M., 2022. Efecto del factor de transcripción EhMyb10 sobre genes de *Entamoeba histolytica* involucrados en la interacción con células epiteliales (masterThesis). Tesis (M.C.)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

Samanta, S.K., Ghosh, S.K., 2012. The chitin biosynthesis pathway in *Entamoeba* and the role of glucosamine-6-P isomerase by RNA interference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 186, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.09.011>

Samuelson, J., Robbins, P., 2011. A simple fibril and lectin model for cyst walls of *Entamoeba* and perhaps *Giardia*. *Trends Parasitol.* 27, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.09.002>

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. *Parasitol. Res.* 119, 1337–1351. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06621-7>

Shirley, D.-A.T., Farr, L., Watanabe, K., Moonah, S., 2018. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect. Dis.* 5, ofy161. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>

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. *Microb. Cell Graz Austria* 2, 235–246. <https://doi.org/10.15698/mic2015.07.214>

Singh, N., Bhattacharya, S., Paul, J., 2011. *Entamoeba invadens*: dynamics of DNA synthesis during differentiation from trophozoite to cyst. *Exp. Parasitol.* 127, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.013>

Singh, U., Ehrenkauf, G.M., 2009. Recent insights into *Entamoeba* development: identification of transcriptional networks associated with stage conversion. *Int. J. Parasitol.* 39, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.004>

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. *J. Biol. Chem.* 273, 21663–21668. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21663>

Southwick, F.S., 2020. *Infectious Diseases: A Clinical Short Course*, 4th Edition. McGraw-Hill Education.



- Stanley, S.L., 2003. Amoebiasis. *The Lancet* 361, 1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12830-9)
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B., 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 447–456. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00199-0)
- 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*. *Mol. Microbiol.* 46, 971–984. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03233.x>
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., Šmuc, T., 2011. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE* 6, e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
- Tanaka, M., Makiuchi, T., Komiyama, T., Shiina, T., Osaki, K., Tachibana, H., 2019. Whole genome sequencing of *Entamoeba nuttalli* reveals mammalian host-related molecular signatures and a novel octapeptide-repeat surface protein. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007923. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007923>
- 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 Pathog.* 9, e1003824. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003824>
- Tovy, A., Ankri, S., 2010. Epigenetics in the unicellular parasite *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol.* 5, 1875–1884. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.140>
- Trejos-Suárez, J., Castaño-Osorio, J.C., 2009. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio* 13, 100–110.
- Valdés, J., Nozaki, T., Sato, E., Chiba, Y., Nakada-Tsukui, K., Villegas-Sepúlveda, N., Winkler, R., Azuara-Liceaga, E., Mendoza-Figueroa, M.S., Watanabe, N., Santos, H.J., Saito-Nakano, Y., Galindo-Rosales, J.M., 2014. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J. Proteomics, Special Issue: “Proteomics, mass spectrometry and peptidomics”*, Cancun 2013 111, 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.027>
- Van Dellen, K., Ghosh, S.K., Robbins, P.W., Loftus, B., Samuelson, J., 2002. *Entamoeba histolytica* Lectins Contain Unique 6-Cys or 8-Cys Chitin-Binding Domains. *Infect. Immun.* 70, 3259–3263. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3259-3263.2002>
- Van Dellen, K.L., Bulik, D.A., Specht, C.A., Robbins, P.W., Samuelson, J.C., 2006a. Heterologous Expression of an *Entamoeba histolytica* Chitin Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 203–206. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.203-206.2006>

- Van Dellen, K.L., Chatterjee, A., Ratner, D.M., Magnelli, P.E., Cipollo, J.F., Steffen, M., Robbins, P.W., Samuelson, J., 2006b. Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryot. Cell* 5, 836–848. <https://doi.org/10.1128/EC.5.5.836-848.2006>
- Verma, K., Srivastava, V.K., Datta, S., 2020. Rab GTPases take centre stage in understanding *Entamoeba histolytica* biology. *Small GTPases* 11, 320–333. <https://doi.org/10.1080/21541248.2018.1528840>
- Victoria-Hernández, J.A., Ventura-Saucedo, A., López-Morones, A., Martínez-Hernández, S.L., Medina-Rosales, M.N., Muñoz-Ortega, M., Ávila-Blanco, M.E., Cervantes-García, D., Barba-Gallardo, L.F., Ventura-Juárez, J., 2020. Case report: Multiple and atypical amoebic cerebral abscesses resistant to treatment. *BMC Infect. Dis.* 20. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05391-y>
- Waldman, B.S., Schwarz, D., Wadsworth, M.H., Saeij, J.P., Shalek, A.K., Lourido, S., 2020. Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*. *Cell* 180, 359-372.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.013>
- 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. *Sci. Rep.* 6, 35852. <https://doi.org/10.1038/srep35852>
- Weedall, G.D., Clark, C.G., Koldkjaer, P., Kay, S., Bruchhaus, I., Tannich, E., Paterson, S., Hall, N., 2012. Genomic diversity of the human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Genome Biol.* 13, R38. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-5-r38>
- 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*. *BioMed Res. Int.* 2010, 254521. <https://doi.org/10.1155/2010/254521>
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., Gómez, A., 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infect. Genet. Evol.*, Includes papers from the Special Issue “Parasitology in Mexico” 9, 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008>
- Zhang, H., Ehrenkaufer, G.M., Pompey, J.M., Hackney, J.A., Singh, U., 2008. Small RNAs with 5'-polyphosphate termini associate with a Piwi-related protein and regulate gene expression in the single-celled eukaryote *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 4, e1000219. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000219>