

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

Efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 en la virulencia
de *Entamoeba histolytica*

TESIS

PRESENTA:

JOSÉ LUIS SANTOS BARRERA

DIRECTORA: DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA
CO DIRECTORA: DRA. PATRICIA ARELI CUELLAR SILVA



Ciudad de México, Octubre 2025

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO

Presidente: Dra. Lilia López Canovas

Secretario: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Vocal: Dra. Patricia Areli Cuellar Silva

Plantel de Adscripción:

Del Valle, UACM.

Directora

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Codirectora

Dra. Patricia Areli Cuellar Silva
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Lilia López Canovas
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Silvia Castellanos Castro
Academia de Biología
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del posgrado en Ciencias Genómicas en el plantel del Valle de la UACM, bajo la dirección de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, en codirección con la Dra. Patricia Cuellar Silva. Este proyecto contó con el apoyo de los proyectos UACM-CCYT-CON-14 y CBF-2025-I-3795 proporcionado por el Colegio de Ciencia y Tecnología de la UACM y la SECIHTI, respectivamente, además de la beca de Estancia Posdoctoral SECIHTI, otorgada a la Dra. Cuellar (CVU 333090).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por la beca concedida para la elaboración del trabajo recepcional o tesis 2024 con el número de folio/UACM/CCyR/RT- 0522-2024-03-04 registrado, para la culminación de mis estudios de licenciatura.

Con profunda estima y reconocimiento, extendo mi más sincera gratitud a mi Directora de trabajo recepcional, la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, por su dedicación y disponibilidad, que impulsaron mi crecimiento y orientación académica, gracias a su compromiso y profesionalismo, fundamentales para lograr concluir exitosamente mis estudios de Licenciatura.

Agradezco a la Dra. Patricia Areli Cuellar Silva que, desde el momento en que inicié mi estancia en el laboratorio 2 del Posgrado de Ciencias Genómicas, siempre mostró su interés y disposición para orientar y guiar mi desarrollo académico. Gracias a sus innumerables enseñanzas, impulsó mi entusiasmo e interés por la línea de investigación, asesorando y aconsejando siempre de la mejor forma, permitiendo así mi desarrollo dentro del laboratorio.

Agradezco a la Dra. Abigail Betanzos Fernández y a su auxiliar la M. en C. Angélica Silva Olivares del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav, por su apoyo en la observación de las muestras por medio de microscopía confocal e interpretación de resultados.

Expreso mi gratitud a los lectores de tesis, Dra. Lilia López Canovas, Dr. Máximo Berto Martínez Benítez y Dra. Silvia Castellanos Castro, por las observaciones y sugerencias cruciales para la consolidación de este trabajo.

Agradezco al grupo de trabajo del laboratorio 2 del Posgrado de Ciencias Genómicas, a la Dra. Elizabeth Jaqueline Castañeda, a la M. en C. Claudia Castillo Mercado, así como a mi compañera de generación Danna Paola Ixyalit Aguirre Casimiro, quien me alentó en todo momento a concluir la tesis. Así mismo a mis compañeros Aldahir y Alan. ¡A quienes hicieron que mi estancia en el laboratorio se convirtiera en una experiencia única e inolvidable!

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres (Arturo Santos Jiménez y María Cristina Barrera Torres) por su incondicional apoyo y comprensión durante todo este tiempo. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

Agradezco sinceramente a mi Tutora de Tesis la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga y Codirectora Dra. Patricia Areli Cuellar Silva, por su invaluable orientación y sabios consejos durante todo el proceso de investigación. Su experiencia y conocimientos han sido cruciales para mi desarrollo académico.

Este logro también se lo debo mi pareja, Pamela Joseline Vargas Díaz, quien siempre comprendió y apoyo en todo momento gracias por creer en mí y estar a mi lado en todo momento.

A mi hermana y sobrinos Jessica, Ernesto y Angel, quienes me brindan apoyo emocional, distracciones necesarias y palabras de aliento que me mantuvieron enfocado en mi objetivo.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos los cuales siempre se mantuvieron interesados a lo largo de mi desarrollo personal y académico alentando en cada momento en cada uno de mis logros.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos que de alguna manera me inspiraron a emprender este proyecto. Sus experiencias, historias y contribuciones fueron fundamentales para su desarrollo.

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1.INTRODUCCIÓN	9
1.1 Amebiasis	9
1.2 Epidemiología de la amebiasis	9
1.3 Tratamiento contra la amebiasis	10
1.4 Biología del parásito y ciclo de vida	11
1.5 Propiedades y factores de virulencia de <i>Entamoeba histolytica</i>	12
1.5.1. Adhesión	13
1.5.2 Citopatogenicidad	15
1.5.3. Fagocitosis	15
1.6 Genoma de <i>E. histolytica</i>	16
1.7 Regulación de la expresión génica en <i>E. histolytica</i>	18
1.8 Factores de transcripción	19
1.9 Dominios de unión al DNA (DBD) de los FT	20
2. ANTECEDENTES PARTICULARES	21
2.1 FT Myb y proteínas con el DBD-MYB en <i>E. histolytica</i>	21
2.2 Análisis transcriptómicos en <i>E. histolytica</i>	23
2.3 El factor de transcripción EhMyb10	24
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	29
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1 Análisis <i>in silico</i>	31
7.2 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	31
7.3 Transfección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> con la construcción pEhEx-ehmyb10	31
7.4 Extracción y cuantificación de DNA genómico	32
7.5 Extracción y cuantificación de RNA total	32

7.6 Tratamiento con DNasa y síntesis de cDNA	33
7.7 Análisis de la expresión de <i>ehmyb10</i> por RT-PCR (semi-cuantitativa y cuantitativa)	33
7.8 Extracción de proteínas totales de trofozoítos transfectados	35
7.9 Análisis de la expresión de proteínas mediante SDS-PAGE y Western Blot	35
7.10 Obtención de los anticuerpos anti-EhMyb10	36
7.11 Análisis de la localización por inmunofluorescencia indirecta (IFI)	36
7.12 Curva de crecimiento y determinación del tamaño celular	37
7.13 Análisis de virulencia de los diferentes grupos de <i>E. histolytica</i>	38
7.13.1 Ensayos de adhesión	38
7.13.2. Ensayos de eritrofagocitosis	38
7.13.3 Ensayos citopáticos	39
7.13.4. Ensayos de migración	39
7.14. Construcción y secuenciación de bibliotecas y obtención de los transcriptomas de trofozoítos pEhEx y EhMyb10ox	40
8. RESULTADOS	41
8.1 Determinación <i>in silico</i> de la estructura tridimensional de EhMyb10	41
8.2 Interacción proteína-proteína de EhMyb10	42
8.3 Sobreexpresión de <i>ehmyb10</i> en trofozoítos transfectados de <i>E. histolytica</i>	44
8.4 Sobreexpresión y localización de la proteína EhMyb10 en trofozoítos transfectados EhMyb10ox.	46
8.5 Análisis del crecimiento y determinación del tiempo de duplicación de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	49
8.6 Tamaño de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	52
8.7 Adhesión de trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	53
8.8 Migración de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	54
8.9 Eritrofagocitosis	54
8.10 Trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 en el daño citopático de células epiteliales	55
8.11 Análisis del transcriptoma de los trofozoítos EhMyb10ox	59
9. DISCUSIÓN	62
10. CONCLUSIONES	69
11. REFERENCIAS	70
12.ANEXO	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción del metronidazol.	11
Tabla 2. Características del genoma de <i>Entamoeba histolytica</i>	17
Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en los trofozoítos transfectados con el plásmido pEhEx- <i>ehmyb10</i>	26
Tabla 4. Descripción de las proteínas que se asocian a EhMyb10 identificadas en el interactoma	44
Tabla 5. Genes que modifican su expresión del grupo EhMyb10ox obtenidos por RNAseq	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	12
Figura 2. Genoma de <i>E. histolytica</i>	17
Figura 3. Moléculas relacionadas con virulencia reveladas mediante ensayos transcriptómicos	19
Figura 4. Estructura tridimensional del DBD de c-Myb y EhMyb10	25
Figura 5. Condiciones de amplificación del gen <i>ehmyb10</i>	34
Figura 6. Péptido utilizado para la producción de anticuerpos anti-EhMyb10	36
Figura 7. Cámara de Neubauer	37
Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína EhMyb10	41
Figura 9. Interactoma <i>in silico</i> del factor de transcripción EhMyb10 de <i>E. histolytica</i>	43
Figura 10. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>ehmyb10</i> en trofozoítos transfectados (50 µg/µL)	45
Figura 11. Inmunodetección de la proteína EhMyb10	46
Figura 12. Localización subcelular de EhMyb10 en trofozoítos transfectados	48
Figura 13. Imágenes por microscopía de luz de los diferentes tiempos de cultivo	50
Figura 14. Gráficas de la curva de crecimiento de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	51
Figura 15. Tamaño de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	52
Figura 16. Ensayos de adhesión de eritrocitos a trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	53
Figura 17. Migración celular de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10	54
Figura 18. Eritrofagocitosis de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10	55
Figura 19. Efecto citopático sobre células epiteliales de trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10	56
Figura 20. Sobreexpresión de la proteína EhADH112 en la condición EhMyb10ox	57
Figura 21. EhADH112 aumenta su expresión y se localiza en el núcleo en los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10	58
Figura 22. Visualización de disimilitud entre los diferentes grupos analizados mediante el gráfico MDSplot.	60
Figura. 23. Volcano plot de los genes expresados diferencialmente en los grupos EhMyb10ox vs pEhEx	60

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AHA	Absceso hepático amebiano
ATP	Adenosín trifosfato
bHLH	Hélice-Bucle-Hélice básico
BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés bovine serum albumin
c-Myb	Protooncogen MYB, del inglés Myb proto-oncogene
°C	Grados Celsius
Ca²⁺	Ión calcico con carga +2
CaBP	Proteínas de unión a calcio, del inglés calcium-binding proteins
CTD	Dominio carboxilo terminal, del inglés Carboxy-terminal domain
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés Deoxyribonucleic acid
DBD	Dominio de unión al DNA, del inglés DNA binding domain
ERM	Elemento de reconocimiento a Myb
EhMyb10r	Proteín EhMyb10 recombinante
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético, del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético, del inglés ethylene glycol tetraacetic acid
FT	Factor de transcripción
GO	Ontología de genes, del inglés Gene Ontology
GST	Glutación S-transferasa
HRP	Peroxidasa de rábano, del inglés horseradish peroxidase
HATs	Acetiltransferasas de histonas
HLH	Proteínas hélice-giro-hélice, del inglés Helix-Loop-Helix proteins
HDACs	Desacetilasa de histonas, del inglés Histone Deacetylase
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Mb	Megabases
mL	mililitros
mRNA	RNA mensajero
MYB	Factor de transcripción relacionado v-Myb derivado del virus del Mieloblastoma
mM	Milimolar
M	Molar
μL	Microlitros
μg	Microgramos

μm	Micrómetros
μM	Micromolar
nm	Nanómetros
M	Molar
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTMs	Modificaciones postraduccionales, del inglés post-translational modification
kDa	Kilodaltones
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos, del inglés phosphate buffered saline
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction
qPCR	PCR cuantitativa, del inglés Real-time polymerase chain reaction
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés Ribonucleic acid
RNAPII	RNA polimerasa II
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Geles desnaturalizantes de poliacrilamida, del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TMK	Cinasas transmembranales, del inglés transmembrane kinases repeat binding factors
tAD	Dominio de transactivación central, del inglés transactivation domain
WB	Inmunodetección del inglés, Western Blot

RESUMEN

La amebiasis es una enfermedad que se transmite por la ingestión de quistes de *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) a través de alimentos contaminados y provoca hasta 100,000 muertes anuales en todo el mundo. Los trofozoítos, invasivos y móviles, se adhieren al intestino, causando diarrea y colitis, en casos más severos, estos migran al hígado generando abscesos. Análisis transcriptómicos muestran que *E. histolytica* modula la expresión de genes durante la invasión de tejidos. Las proteínas Myb son factores de transcripción (FT) muy abundantes en *E. histolytica* que se unen al DNA a través del dominio Myb (DBD-MYB) que puede tener de 1 a 4 repetidos (1R a 4R). EhMyb10 es un factor de transcripción 2R que reconoce el elemento de respuesta a Myb (MRE), que consiste en la secuencia consenso TAACGG. Su expresión se incrementa en condiciones asociadas a la patogenicidad, por ejemplo, durante la interacción con el tejido de colon, lo que sugiere que podría participar en la regulación de genes implicados en los mecanismos de infección y virulencia. Por lo tanto, en este trabajo sobreexpresamos a EhMyb10 en trofozoítos de *E. histolytica* y lo confirmamos por medio de qRT-PCR, WB e inmunofluorescencia (IFI). Los ensayos de IFI muestran una distribución nuclear consistente con su papel como FT. También analizamos propiedades de virulencia como migración, fagocitosis y citotoxicidad, y observamos que, en comparación con los trofozoítos control, los que sobreexpresan a EhMyb10 tienen un comportamiento más virulento. Los trofozoítos transfectados poseen mayor capacidad de adherir, fagocitar, migrar y degradar células epiteliales; esto podría conducir a la desregulación de la homeostasis en el huésped parasitado y podría desencadenar una amebiasis más severa. En este trabajo observamos también que la adhesina EhADH112, una molécula implicada en las principales propiedades de virulencia de *E. histolytica*, está sobreexpresada en trofozoítos transfectados con EhMyb10. Por análisis de transcriptómica observamos la expresión de 6,656 genes que corresponden al 81% del genoma de *E. histolytica*. De estos genes, 64 se sobreexpresan y 47 se reprimen de manera significativa. ($FC \pm 1.8$, $p < 0.05$). Entre los genes sobreexpresados encontramos principalmente genes que codifican para proteínas AIG1 que han sido reportadas en adhesión. Por otro lado, los genes reprimidos codifican principalmente para proteínas de choque térmico. Finalmente, con este trabajo determinamos la importancia de los FT en la regulación de la virulencia de *E. histolytica* y nos permitirá identificar moléculas clave de este proceso.

ABSTRACT

Amebiasis is a disease transmitted through *E. histolytica* cyst ingestion from contaminated food that causes up to 100,000 annual deaths. The trophozoites, the invasive and motile form, adhere to the intestine, causing diarrhea and colitis, and in more severe cases, these migrate to the liver, causing hepatic abscess. Transcriptomic analysis shows that *E. histolytica* modulates gene expression during tissue invasion. Myb proteins are abundant transcription factors in *E. histolytica* that bind to DNA through the Myb-DNA Binding Domain (MYB-DBD) that can have from 1 to four repeats (1R to 4R). EhMyb10 is a 2R transcription factor that recognises Myb response element (MRE) TAACGG. It increases its expression in virulence conditions, for example, during colonic tissue interaction which suggests that it could be involved in regulating the expression of virulence-related genes. Therefore, we overexpressed EhMyb10 in *E. histolytica* trophozoites and confirmed its overexpression through qRT-PCR, WB, and immunofluorescence assays (IFI). IFI assays show a nuclear distribution consistent with its role as a transcription factor. We also analyzed virulence properties such as migration, phagocytosis, and cytotoxicity, and we observed that in comparison with control trophozoites, EhMyb10ox trophozoites are more virulent. EhMyb10ox trophozoites adhere and phagocytize more erythrocytes; they also migrate more and damage epithelial cells in a higher percentage. This could trigger a more severe amebiasis due to a dysregulation of host homeostasis. In this work, we also observed that the adhesin EhADH112, a molecule involved in the main virulence properties of *E. histolytica*, is overexpressed in EhMyb10ox trophozoites. Through transcriptomic analysis, we observed the expression of 6656 genes that correspond to 81% of the *E. histolytica* genome. Sixty-four genes are overexpressed, and 47 are repressed significantly. Among the overexpressed genes, we found some that codify for AIG proteins that have been reported in virulence. On the other hand, the repressed genes codify mainly for heat shock proteins. Finally, this work allows us to determine the importance of transcription factors regulating *E. histolytica* virulence and will allow us to identify key molecules involved in amebiasis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amebiasis

El parásito protozooario entérico *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la disentería amebiana y el absceso hepático amebiano (AHA). Esta amiba de divergencia temprana es un claro ejemplo de la evolución del parásito con su único huésped natural, los seres humanos. Este parásito presenta múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria y se aprovecha del huésped para lograr su crecimiento, división y posterior enquistamiento (Di Cristanziano *et al.*, 2021), habilidades que le permiten perpetuarse y así continuar con la infección.

Las amibas normalmente residen en el intestino grueso, donde pueden penetrar la mucosa intestinal y diseminarse a otros órganos (Martínez-Palomo 1998). Por ello, la amebiasis se puede clasificar en tres grupos: infección no invasiva, la cual permanece confinada en la luz intestinal donde generalmente el portador es asintomático; enfermedad intestinal, que se caracteriza por la invasión de la mucosa intestinal; y enfermedad extraintestinal, que invade vasos sanguíneos y sitios extraintestinales como hígado, cerebro y pulmones (Alavi, 2007).

1.2 Epidemiología de la amebiasis

E. histolytica es la especie patógena responsable de la amebiasis en todo el mundo (Stensvold *et al.*, 2011). Cabe mencionar que el género *Entamoeba* incluye al menos siete especies que infectan el lumen intestinal humano: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. coli*, *E. hartmanni* y *E. polecki*. Sin embargo, solo las primeras cuatro especies son morfológicamente idénticas en trofozoítos y quistes. Aunque solo *E. histolytica* ha sido bien reconocida, de entre ellas, como agente etiológico de amebiasis intestinal (Ali, 2015).

E. histolytica es responsable de alrededor de 55,500 muertes anuales (Global Burden of Disease, 2010). Principalmente afecta a países en vías de desarrollo debido a que no se ha logrado erradicar la propagación fecal-oral, además de prácticas antihigiénicas y/o desnutrición. Por ello ocupa el tercer lugar entre las causas mundiales de morbilidad por infección parasitaria (Shirley *et al.*, 2018).

La prevalencia de la infección, provocada por especies de *Entamoeba*, es poco conocida. Particularmente, la amebiasis es una de las 20 principales causas de enfermedad en México. De acuerdo con el *Boletín de Vigilancia Epidemiológica* (2025). Los estados con mayor incidencia de amebiasis intestinal son Chiapas con 10,894 casos, Oaxaca con 5,881 casos, Guerrero con 4,021 mientras que el Estado de México reportó 3,675 casos y Tabasco con 3,407. Cabe señalar que los resultados son tanto preliminares como casos probables. En el caso del absceso hepático amebiano, nuevamente Chiapas ocupó el primer lugar con 6,255 casos, seguido de la CDMX con 2,536 casos, Veracruz con 2,489 casos, Tabasco con 2,077 y Oaxaca con 2,059 casos. Hasta la fecha se han realizado algunos estudios epidemiológicos aislados utilizando herramientas moleculares para diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar* (Sanchez-Guillen *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2016). En Sudamérica, se han realizado estudios mediante diagnóstico microscópico de especies de *Entamoeba*; sin embargo, los estudios discriminatorios entre las distintas especies son relativamente escasos. En Estados Unidos, California y Texas han mostrado una mayor tasa de mortalidad relacionada con amebiasis (Gunther *et al.*, 2011). Aunque existen datos sobre la frecuencia de infecciones humanas por *Entamoeba* en el continente americano, no existe un análisis global de la prevalencia, distribución de este protozooario por área geográfica o grupo de edad que permita el diagnóstico, de modo que la incidencia y los datos estadísticos pueden estar altamente subestimados.

Por otro lado, es complejo estudiar los factores que determinan la patogenicidad de *E. histolytica* debido a que la amebiasis es un padecimiento multifactorial en el que se ven implicadas las características del huésped, del parásito y del ambiente (Chacín-Bonilla, 2013). Por ejemplo, la desnutrición, el alcoholismo, el embarazo o el tratamiento con corticosteroides aumentan el riesgo de complicaciones y mortalidad cuando se presenta una infección por *E. histolytica* (Shirley y Moonah, 2016).

1.3 Tratamiento contra la amebiasis

Actualmente no existe ninguna medida preventiva para evitar la propagación contra la amebiasis; solo se cuenta con el tratamiento de metronidazol (Shirley *et al.*, 2019), el cual puede causar efectos secundarios graves como confusión, neuropatía periférica, sabor metálico, náuseas, vómitos y diarrea (Weir y Le, 2023).

Los tratamientos prolongados pueden causar trastornos neurológicos graves debido al riesgo de neurotoxicidad acumulativa (Hernández-Ceruelos *et al.*, 2019). El metronidazol ingresa al parásito por una difusión pasiva, ejerciendo así su efecto citotóxico a través de radicales libres que interactúan con los ácidos nucleicos, provocando la fragmentación y muerte del parásito (Weir y Le, 2023). Los mecanismos de acción del metronidazol implican 4 eventos señalados en la Tabla 1.

Tabla 1. Mecanismo de acción del metronidazol

EVENTOS	CARACTERISTICAS
Difusión pasiva a través de la membrana celular	El compuesto entra al organismo a través de la membrana celular de patógenos anaeróbicos y aeróbicos.
Activación reductora	Dada por proteínas de transporte intracelular, alterando la estructura química de la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa, impulsando la absorción del fármaco, promoviendo la formación de radicales libres citotóxicos.
Interacciones intracelulares	Las partículas citotóxicas interactúan con el DNA de la célula huésped, dando como resultado la rotura de la cadena de DNA y la desestabilización de la doble hélice.
Descomposición de productos citotóxicos	Debido a la reacción con metabolitos de DNA y formación de aductos con guanosina.

Elaborada a partir de Weir y Le, 2023.

El diseño de métodos novedosos de tratamiento y prevención de la enfermedad podría ayudar a disminuir la incidencia de amebiasis y para ello se requiere generar conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de factores de virulencia de *E. histolytica*, lo que permitirá una mejor comprensión de la biología molecular y celular de la patogénesis.

1.4 Biología del parásito y ciclo de vida

E. histolytica, es un organismo unicelular que se reproduce por fisión binaria y presenta un ciclo de vida bifásico, que se deriva de dos etapas biológicas en las cuales su morfología es diferente. Una de ellas es el trofozoíto, comúnmente llamado amiba, que habita, se nutre y multiplica dentro del intestino del hospedero humano y es capaz de destruir casi cualquier tipo de célula y tejido.

Se reconoce por presentar una forma ameboide característica con la formación de pseudópodos para su locomoción y por ser la forma invasiva del parásito. La segunda etapa, el quiste, asegura la persistencia del parásito en el ambiente externo, ya que puede sobrevivir de días a semanas debido a la protección que le confieren sus paredes conformadas por quitina (*CDC-DPD-X-Amebiasis*, s. f.) y es responsable de iniciar la infección en nuevos hospederos cuando los quistes son ingeridos al consumir agua o alimentos contaminados. Después de la ingestión del quiste, el trofozoíto desenquista en el intestino delgado; bajo ciertas condiciones relacionadas con el estrés, algunos trofozoítos enquistan en el colon y son excretados en las heces, infectando así nuevos huéspedes (Echinger, 2001) (Figura 1).

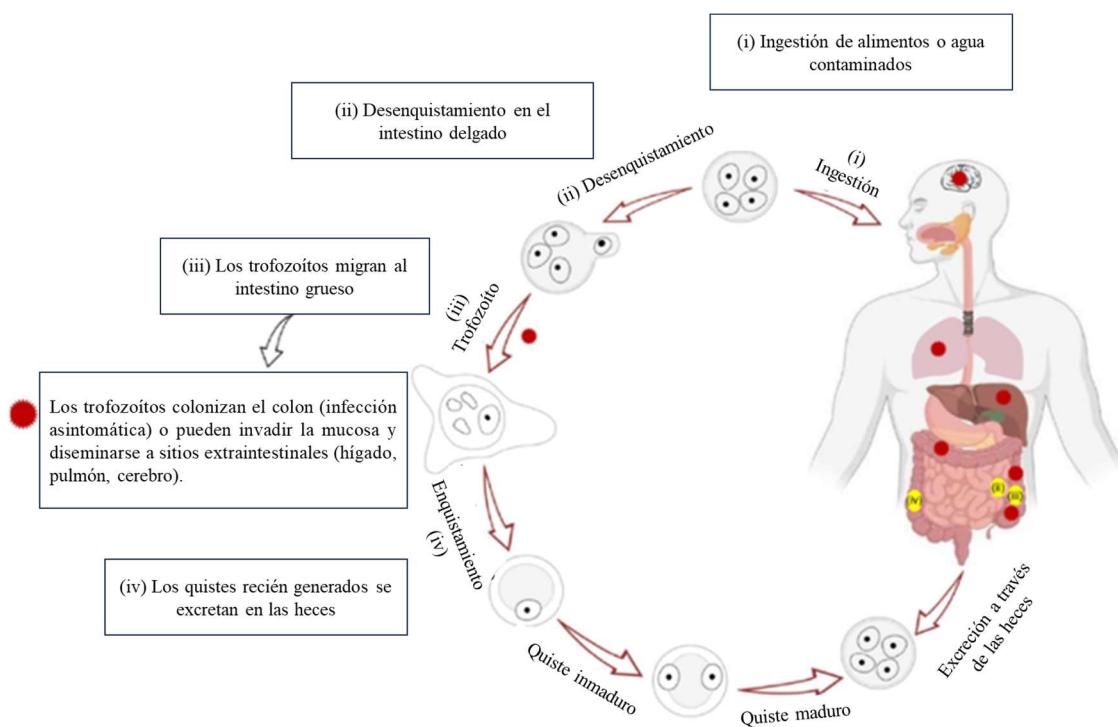


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. i) Ingestión de alimentos o agua contaminados con quistes, ii) desenquistamiento en el intestino delgado, iii) migración de los trofozoítos al intestino grueso, ● colonización de los trofozoítos en el colon e invasión a otros órganos. iv) Nueva generación de quistes en el colon y excreción en las heces (Tomado y modificado de Begum *et al.*, 2021).

1.5 Propiedades y factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*

Para la persistencia de *E. histolytica* son fundamentales su rápida reproducción, así como la presencia de mecanismos de virulencia. Un parásito exitoso debe sobrevivir durante toda la vida del huésped sin dañarlo. Para ello, los trofozoítos se establecen en la luz intestinal, donde se alimentan de la microbiota residente (Wilson *et al.*, 2012).

Este proceso involucra la acción sincronizada de propiedades de virulencia, entre las que se han caracterizado la adhesión, citólisis y fagocitosis. La adhesión se caracteriza por la unión del parásito a células del hospedero (epitelio intestinal) (Priyadarshi *et al.*, 2022). La virulencia de *E. histolytica* es intrínseca y depende de la capacidad infecciosa (capacidad de colonización intestinal) y de la capacidad invasiva (capacidad de diseminarse y destruir tejidos del huésped) (Gitler *et al.*, 1986; Fonte-Galindo, 2000). Desde 1975, se han descrito diferentes tipos de factores de virulencia, los cuales son utilizados por el parásito para invadir exitosamente el intestino grueso y los tejidos extraintestinales (Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000).

1.5.1. Adhesión

Uno de los principales factores que media la adhesión del parásito *E. histolytica* depende principalmente de la lectina galactosa/N-acetil-d-galactosamina (Gal/GalNac) (Singh *et al.*, 2016), un complejo proteico heterotrimérico. La lectina Gal/GalNac está formada por un heterodímero de 260 kDa que consta de una subunidad pesada (Hgl, 170 kDa) y una subunidad ligera (Lgl, 35/31 kDa), unidas por enlaces disulfuro (Petri *et al.*, 2002). La subunidad pesada Hgl es una molécula clave en la adherencia amebiana, ya que reconoce carbohidratos en la superficie de la célula huésped a través de una región rica en cisteína, dando lugar a la reorganización del citoesqueleto del parásito (Cornick *et al.*, 2016). Así mismo, una proteína de unión al elemento regulador 3 del factor de transcripción de unión a Ca^{2+} (URE3BP) regula la expresión génica de genes asociados a la virulencia, ya que se une al elemento promotor del gen *hgl5* de la lectina Gal/GalNac. (Gilchrist *et al.*, 2006).

Por otro lado, EhCPADH es un complejo de 124 kDa, el cual está formado por una Cisteína Proteasa (EhCP112) y una Adhesina (EhADH), las cuales controlan el estrés oxidativo, así como la evasión de la respuesta inmune por parte del huésped, también contribuyen a la degradación de las uniones estrechas, las uniones adherentes y los desmosomas alterando las barreras epiteliales (Cuellar *et al.*, 2017; Hernández-Nava *et al.*, 2017). La EhADH es una proteína de 75 kDa que contiene 3 dominios: un dominio Bro1, un dominio linker y un dominio de adhesión. El dominio Bro1 está localizado en el extremo amino terminal (1-400 aa) y es característico de la familia ALIX/AIP1.

Las proteínas que pertenecen a esta familia desempeñan funciones muy diversas como adhesión, remodelación del citoesqueleto, regulación del pH, entre otras. Se ha descrito que el dominio Bro1 también participa en el tráfico de membrana endocítico y la remodelación del citoesqueleto, todo ello derivado de su dominio Bro1. Este dominio le confiere múltiples funciones para interactuar con diferentes moléculas. En levadura, la pérdida de la función de Bro1 perjudica la regulación negativa de las proteínas de la superficie celular que normalmente experimentan endocitosis y entrega a la vacuola, el equivalente funcional del lisosoma en eucariotas superiores (Forsberg *et al.*, 2001). La región linker se encuentra en la porción media de la proteína y se traslapa ligeramente con el dominio Bro1 (246-446 aa) y ha sido denominada así debido a que contiene residuos susceptibles a la fosforilación que podrían modificar la función de la proteína. Finalmente, el dominio de adhesión (444-687 aa) Presenta una estructura con forma de “V” descrita solamente para esta proteína y que contribuye a la unión de eritrocitos, ya que su sobreexpresión incrementa el porcentaje de unión de eritrocitos a trofozoítos (Zanatta *et al.*, 2024).

Zanatta y colaboradores en 2024 generaron proteínas recombinantes de los tres dominios de la EhADH112 y realizaron ensayos de *pull-down* con lisados de *E. histolytica*, seguidos de espectrometría de masas e identificaron las moléculas que se unen a estas regiones relacionadas con la virulencia. Estos ensayos mostraron que el dominio Bro1, se asocia con la lectina Gal/GalNac, EhCPs, componentes de la maquinaria ESCRT y proteínas del citoesqueleto. Por otro lado, cuando se analizaron las propiedades de virulencia de trofozoítos que sobreexpresan cada uno de estos dominios, se encontró que el dominio Bro1 aumentó las propiedades de virulencia, la capacidad de destruir monocapas celulares, además de un aumento de la permeabilidad de las células epiteliales CaCo y daño del hígado de hámster. En el caso del dominio Linker, identificaron su participación en el transporte de colesterol y la unión con GTPasa. Finalmente, aunque el dominio ADH produjo un mayor efecto sobre la adherencia y la fagocitosis, la destrucción de las monocapas fue mínima, mientras que el daño de colon e hígado fue mayor (Zanatta *et al.*, 2024).

1.5.2 Citopatogenicidad

En el genoma de *E. histolytica* se han identificado 86 genes que codifican para proteasas de diferentes familias: metaloproteasas, proteasas de serina y asparagina, así como de cisteína. Las cisteínas proteasas (CP) son una de las proteínas más características de *E. histolytica*, ya que se encuentran relacionadas con el daño tisular que le causa al huésped, de las cuales la EhCP1, EhCP2 y EhCP5 se expresan abundantemente. Por otro lado, EhCP5 y EhCP112 se secretan y localizan en la membrana del trofozoíto (Roy *et al.*, 2022; Argüello-García *et al.*, 2023). Cabe señalar que EhCP1, EhCP2 y EhCP5 degradan los componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina, la laminina y el colágeno, lo que contribuye a la invasión del parásito en el hospedero y al daño tisular que caracteriza la infección amebiana (Bruchhaus *et al.*, 1996; Espinosa-Cantellano *et al.*, 2000), por lo que las CP desempeñan un papel clave en la patogénesis de *E. histolytica*, incluyendo la penetración de células/tejidos, la hidrólisis de proteínas del huésped o del parásito, la autofagia y la evasión de la respuesta inmune del huésped (Argüello-García *et al.*, 2023). Por otro lado, varios estudios sugieren que la señalización de Ca^{2+} también está involucrada en la capacidad de *E. histolytica* para inducir muerte celular, ya que el bloqueo del aumento de Ca^{2+} intracelular en el parásito previene el inicio del proceso de citólisis (Aucott *et al.*, 1991).

1.5.3. Fagocitosis

La fagocitosis se asocia íntimamente con la biología del parásito *E. histolytica*, ya que es el resultado de la renovación de la membrana plasmática, gracias a que el trofozoíto ingiere fragmentos celulares, líquidos, partículas inertes, eritrocitos y hasta células del sistema inmune gracias a la acción de componentes del citoesqueleto de actina, moléculas de superficie M17, cisteína proteasas, GTPasas, entre otras (Naiyer *et al.*, 2019). La fagocitosis está modulada por la proteína motora miosina IB que entrecruza los filamentos de actina para reestructurar el citoesqueleto amebiano según sea necesario (Marion *et al.*, 2004). El citoesqueleto de *E. histolytica* participa en procesos vitales como la división, el enquistamiento, la motilidad, la fagocitosis de las células humanas y la resistencia del parásito a la respuesta inmune del huésped; cabe mencionar que las moléculas de actina son capaces de realizar diversas funciones en el citoesqueleto de *E. histolytica* a través de diversas proteínas de unión de actina (Manich *et al.*, 2018).

Este parásito presenta múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria y se aprovecha del huésped para lograr su crecimiento, división y posterior enquistamiento (Di Cristanziano *et al.*, 2021), habilidades que le permiten perpetuarse y así continuar con la infección. Para iniciar la fagocitosis y regular los reordenamientos de actina, participa una familia de proteínas de unión a calcio (CaBP) exclusiva de *Entamoeba* (Bhattacharya *et al.*, 2011). A pesar de no contar con dominios de unión a actina o lípidos, la mayoría de las proteínas CaBP interactúan funcionalmente con actina y lípidos, llevando a cabo la activación diferencial que influye en el mecanismo de fagocitosis. Existen varias proteínas de unión a calcio que son cruciales para la fagocitosis, como el caso de la proteína 1 transportadora de calcio (EhCaBP1) que al unirse con F-actina mantiene la fase fluida de la fagocitosis y que junto con EhC2PK forman parte de una vía para el inicio de la fagocitosis (Somlata *et al.*, 2011). Otra proteína de unión al calcio, EhCaBP3, interactúa directamente con la actina para regular el cierre de las copas fagocíticas, ya que la fagocitosis se ralentiza cuando se inhibe la expresión de EhCaBP3 (Aslam *et al.*, 2012). No obstante, otra proteína de unión a calcio, EhCaBP5, interactúa con la miosina 1B de una manera calcio-independiente y puede representar una cadena ligera de miosina (Kumar *et al.*, 2014). Finalmente, se observó la participación de un complejo formado por la EhADH112 y la EhCP112 (EhCPADH112), ya que mediante trofozoítos incubados con un anticuerpo (LC3), una proteína asociada a microtúbulos crucial en la autofagia (Betanzos *et al.*, 2013).

1.6 Genoma de *E. histolytica*

La información del genoma permite una mejor comprensión de los procesos de virulencia y, en consecuencia, ayudará a mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la infección por *E. histolytica*. Para ello, la secuenciación del genoma permite conocer sus regiones codificantes y las regiones relacionadas con su estructura. El genoma de *E. histolytica* fue anotado y publicado por primera vez en 2005 (Loftus *et al.*, 2005). Dicha predicción arrojó un resultado de 9,938 genes codificantes de proteína en un genoma de 24 Mbp. Sin embargo, el nuevo reensamblaje del genoma (2010) determinó que tiene un tamaño de 20 Mbp, con un contenido de 8,201 genes predichos (con un tamaño de los genes promedio de 1.2 Kb) (Tabla 2), de los cuales el 60% es idéntico a la anotación inicial y el 40% experimentó cambios estructurales (Lorenzi *et al.*, 2010).

Tabla 2. Características del genoma de *Entamoeba histolytica*.

Tamaño del genoma (Mbp)	20
Contenido de GC (%)	24
% DNA codificante	50.12
Número de genes	8,201
Número de cromosomas	38
Número de proteínas	8,734
Número de exones	10,754
Número de intrones	2.553
Tamaño promedio de los genes (pb)	1,280
Tamaño promedio de las proteínas (aa)	418

Elaborada a partir de Wilson *et al.*, 2019; Kawano-Sugaya, 2020.

El más reciente ensamblaje del genoma de la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* determinó que este está distribuido en 38 cromosomas, aunque debido a que este organismo es poliploide, todavía podría haber variaciones en relación con su número de cromosomas (Fig. 2) (Kawano-Sugaya *et al.*, 2020).

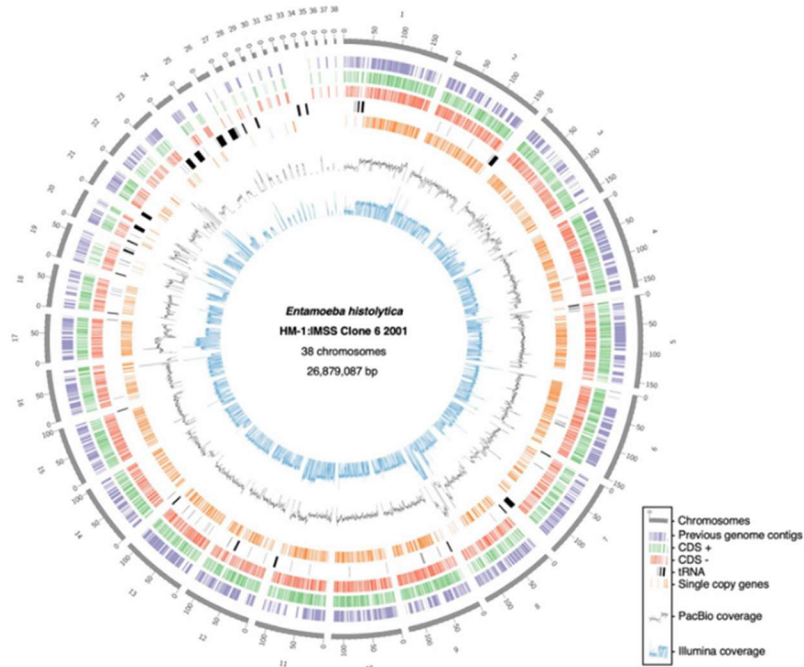


Figura 2. Genoma de *E. histolytica*. El esquema muestra la estructura del genoma de *E. histolytica*, la cantidad de cromosomas y la extensión determinada en pb. De afuera hacia dentro se muestran los andamiajes recién ensamblados, así como la localización de los genes de tRNA (Tomado Kawano-Sugaya *et al.*, 2020).

La transcripción es un mecanismo fundamental para cualquier organismo que involucra la formación de una molécula de RNA a partir del DNA de una célula. Este proceso implica la participación de una gran cantidad de moléculas (factores generales de transcripción, promotores, coactivadores, etc.), las cuales llevan a cabo la expresión de los genes de una manera eficaz, es decir, permiten que la célula pueda expresar de manera específica, sus instrucciones, para que a partir de RNA se traduzcan las proteínas que van a ejecutar la función que se requiera en un momento particular (Greber y Nogales 2019). Los diversos elementos de control de la transcripción hallados en el DNA de *E. histolytica* suelen ser sitios de unión para proteínas reguladoras, que activan o reprimen la expresión de los genes codificantes, como en otros organismos eucariontes. La RNA polimerasa II (RNAPII) se asocia con proteínas denominadas factores generales de transcripción (GTF), que le permiten colocarse de forma correcta sobre la región promotora (Alberts *et al.*, 2015). Por otro lado, gracias a la secuenciación del genoma, se han identificado los genes que codifican para factores de transcripción (FT) canónicos que poseen el dominio de unión a DNA, entre ellos MYB, HMGI, MADS, GATA, HSF y STAT (Iyer *et al.*, 2008).

El promotor mínimo de *E. histolytica* está constituido por 3 elementos: la caja TATA [GTATTTAAA(G/C)] localizada generalmente 30 nt río arriba del sitio de inicio de la transcripción; seguido de la secuencia iniciadora (Inr) [AAAAATTCA]; y finalmente una secuencia característica de este parásito, la caja GAAC [AATGCT]. La caja GAAC se ubica de forma variable entre la caja TATA y la secuencia Inr y es capaz de controlar el inicio de la transcripción sin necesidad de la presencia de la caja TATA o de la secuencia Inr (Singh y Rogers, 1998). La RNAPII transcribe genes en *E. histolytica* como ocurre en otros organismos (Clark *et al.*, 2007). La expresión de FTs a su vez modula la expresión de genes a través de su unión a dominios o secuencias específicas en el DNA. Los factores de transcripción Myb son de los más abundantes en *E. histolytica* y se han observado en diferentes análisis transcriptómicos que modulan su expresión dependiendo de las condiciones de crecimiento (Naiyer *et al.*, 2019) (Figura 3). El reconocimiento de motivos de DNA específicos en regiones reguladoras de genes para activar o reprimir la transcripción ocurre mediante la interacción con FTs.

Dependiendo de las interacciones proteína-proteína y probablemente del contexto particular de la cromatina, un FT puede funcionar como activador de un conjunto de genes y como represor de otros. Una proporción significativa de genes que codifican proteínas está dedicada al control de la expresión génica.

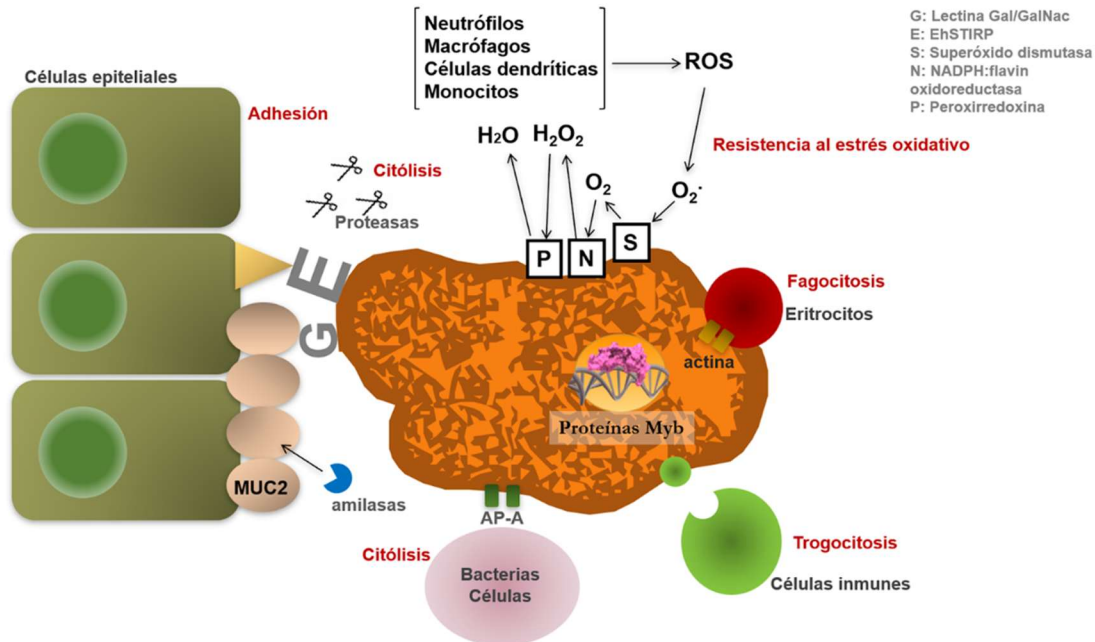


Figura 3. Moléculas relacionadas con virulencia reveladas mediante ensayos transcriptómicos. Las cisteínas proteasas y β -amilasas participan en la invasión de tejidos degradando la mucina y la mucosa intestinal. AIG1 funciona como defensa de bacterias intestinales y los ameboporos participan en la lisis celular. El contacto se facilita gracias a la unión con ligandos de la célula huésped por la lectina Gal/GalNac. Las cinasas transmembranales (TMK) y las GTPasas Ras/Rho participan en la transducción de señales. La glicoproteína MUC2 se expresa específicamente en células caliciformes del intestino delgado y del colon. FT de la familia Myb regulan la expresión de múltiples factores de virulencia implicados en estos procesos (Tomado de Naiyer *et al.*, 2019 y modificado por Azuara-Liceaga, 2025).

1.8 Factores de transcripción

Los FT son proteínas que se unen a regiones específicas en el DNA para regular la expresión de genes diana, por ello es el punto de control más importante en la expresión génica, la cual se encuentra regulada por dos clases de proteínas que interactúan con el DNA (Suter, 2020).

Sin embargo, se denomina FT a todas aquellas proteínas que se involucran en la transcripción o que tienen la capacidad de alterar los niveles de expresión génica. Por tanto, los FTs son proteínas que confieren a la célula la capacidad de expresar genes diferencial y temporalmente, así como regular la expresión constitutiva de genes, y son necesarios para el sostén de todos los tipos celulares (Lambert *et al.*, 2018).

1.9 Dominios de unión al DNA (DBD) de los FT

Los DBD de los FT se clasifican en distintos tipos estructurales que unen a secuencias de DNA específicas. La capacidad de las proteínas de unión a DNA para unirse a secuencias específicas de DNA es el resultado de interacciones no covalentes entre átomos en una hélice α en el dominio de unión al DNA y átomos en los bordes en las bases dentro del surco mayor del DNA (Ogata *et al.*, 1994). Los principios de las interacciones específicas DNA-proteínas se descubrieron en represores bacterianos; muchos de los represores eran proteínas diméricas en las cuales la α -hélice de cada monómero se inserta en el surco mayor del DNA. Esta hélice α se denomina hélice de reconocimiento o α -hélice de lectura de secuencia, ya que la mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en contacto con el DNA se extienden desde esta hélice, es decir, que posee la capacidad de proyectarse en la superficie y poder penetrar en el surco mayor del DNA y lograr realizar múltiples interacciones específicas con átomos en el DNA. De modo similar, el contacto con el DNA se establece por interacciones hidrofóbicas con una segunda hélice α en el sitio N-terminal, denominado motivo hélice-giro-hélice (del inglés *helix-turn-helix*, HTH) (Ogata *et al.*, 1996; Navrátilová *et al.*, 2007). Los motivos estructurales identificados con mayor frecuencia en los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción en eucariontes son los dedos de zinc, C₂H₂, el homeodominio, hélice-giro-hélice, hélice-bucle-hélice básico (bHLH) y la cremallera de leucina. Cabe destacar que todos estos motivos de unión al DNA contienen una o más α -hélices que interactúan con los surcos mayores en su sitio afín con el DNA.

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 FT Myb y proteínas con el DBD-MYB en *E. histolytica*

Los FT MYB se caracterizan por tener un dominio de unión a DNA llamado MYB (DBD-MYB) que regulan la expresión de un subconjunto de genes específicos en diferentes organismos. Además, controlan la conversión de etapas y el destino celular de una amplia gama de sistemas. Por tanto, las proteínas con dominio MYB regulan directamente la expresión génica y participan tanto en la proliferación como en la diferenciación celular (Oh & Reddy 1999). Las proteínas con dominio MYB poseen distintas funciones, como la de participar en el ciclo celular, estrés oxidativo, la regulación del metabolismo primario encargado de provisionar energía, construir estructuras celulares y almacenamiento de información crucial para la producción y la herencia. En el caso del secundario desempeña funciones importantes en la interacción con el medio ambiente, es decir vitales para la sobrevivencia del organismo, así como mantener el control de la biosíntesis de la pared celular, fotosíntesis, ciclo circadiano y regulación de la expresión génica (Dubos *et al.*, 2010; Feller *et al.*, 2011).

Los FT tipo Myb pertenecen a la familia HTH y son proteínas que reconocen y se unen a una secuencia específica de DNA conocida como elemento de reconocimiento Myb (ERM) [(C/T)AAC(T/G)G] a través del DBD-MYB. Este dominio se encuentra conservado en plantas, protozoarios, animales y hongos cerca de la región N-terminal y consta de 50 aa de largo, con una conformación de tres α -hélices cada una (H1-H3) y de esta manera se unen al DNA (Sakura *et al.*, 1989). Cada uno de estos repetidos contiene tres residuos de triptófano espaciados (Saikumar 1990), que confiere la estabilidad de unión a DNA, gracias a su centro hidrofóbico que permite el plegamiento hélice-giro-hélice (Ogata *et al.*, 1996). La mayoría de las proteínas MYB presentan tres secuencias repetidas designadas como R1, R2 y R3. Sin embargo, existen proteínas con solo uno, dos o cuatro segmentos repetidos, lo cual las organiza en diferentes familias: 1R-Myb, 2R-Myb (R2R3-Myb), 3R-Myb y 3R-Myb (Dubos *et al.*, 2010). Los repetidos R2 y R3 son requeridos para la unión a DNA de forma específica, mientras que R1 estabiliza al complejo DNA-proteína a través de interacciones electrostáticas (Ording *et al.*, 1994; Ogata *et al.*, 1996).

El primer gen identificado de la familia MYB fue *v-myb* derivado del virus de mieloblastosis aviar (AMV por su nombre en inglés), el cual ocasiona leucemia aguda en animales y es capaz de transformar a las células hematopoyéticas en cultivo (Lipsick y Wang, 1999). Dicha familia de genes se encuentra ampliamente distribuida en las células eucariontes (unicelulares, mamíferos y plantas), y permite mantener la integridad del genoma, ya sea como factor de transcripción, proteínas de unión a telómeros o inclusive participan en el *splicing* (Dubos *et al.*, 2010). Hasta la fecha se han identificado tres genes relacionados con *v-myb*: *c-myb*, *A-myb* y *B-myb*, presentes en organismos eucariotas como vertebrados, insectos y hongos (mohos mucilaginosos) (Weston, 1998).

Estos genes codifican para una proteína que presenta un dominio DBD conservado de tres repetidos en el extremo amino y un dominio de activación en la sección hidrofílica (parte central) presente en A-Myb y c-Myb, pero no en B-Myb. Por otro lado, el extremo carboxilo terminal podría representar un dominio regulador negativo (Thompson y Ramsay, 1995). A-Myb se expresa en células germinales y epiteliales mamarias de ratones fecundados, linfocitos B y sistema nervioso central durante su desarrollo (Arriata y Aguirre, 2013). B-Myb se encuentra implicado en el control de la proliferación celular, principalmente en la transición de G1/S del ciclo celular (Bergholtz *et al.*, 2001). Finalmente, los oncogenes virales *v-myb* y *c-myb* han sido identificados en procesos que repercuten en el crecimiento y diferenciación de distintos tipos celulares (Lipsick & Wang 1999; Kranz *et al.*, 2000).

En *E. histolytica*, el DBD-MYB es el dominio regulador de la transcripción más común. Al parecer, existieron enormes expansiones específicas de linaje en este parásito, dando lugar a una gran duplicación de genes. En el genoma de este parásito se identificaron, por medio de un análisis filogenético, 32 genes que codifican para proteínas con dominio DBD-MYB, las cuales fueron agrupadas en 3 distintos grupos monofiléticos: Familia I: pertenece al grupo 2R-Myb y se denominó EhMybR2R3; Familia II: pertenece al grupo 1R-Myb y está relacionada con las proteínas TRF; y la Familia III: también formada por proteínas Myb de un repetido con un dominio Myb SHAKQYF. (Meneses *et al.*, 2010)

La Familia I, conformada por 14 proteínas numeradas secuencialmente (EhMyb1 a EhMyb14), posee una longitud promedio de 160 aa; la arquitectura de su dominio R2R3 se asemeja a las proteínas Myb de plantas.

Por otro lado, las proteínas de la Familia II poseen un solo repetido R3, relacionado con la protección de los extremos terminales de los cromosomas. La familia III EhMybSHAQKYF, al igual que la familia II, posee un solo repetido R3, con la única diferencia de que la región correspondiente al triptófano conservado de la tercera α -hélice es reemplazada por el motivo $^S/_T$ HAQK $^Y/_F$ F. Las proteínas restantes no se clasificaron con ninguna de las familias, aunque una de ellas posee un dominio R2R3, el cual se denominó EhCDC5-like, debido a su similitud con la familia (CELL DIVISION CYCLE 5-LIKE PROTEIN) y finalmente las últimas 2 familias presentan solo un repetido de R3 (Meneses *et al*, 2010).

El FT EhMyb-dr o EhMybS9 pertenece a la familia SHAKQYF y es una de las proteínas mejor caracterizadas, ya que se demostró que controla la diferenciación de trofozoíto a quiste, regulando la expresión de genes específicos de cada estadio. Por medio de ensayos de RNAseq se han identificado 117 genes sobreexpresados y 88 reprimidos por la sobreexpresión de EhMyb-S9 (Ehrenkauf *et al.*, 2009).

2.2 Análisis transcriptómicos en *E. histolytica*

Los análisis transcriptómicos son una herramienta innovadora que nos permite identificar secuencias promotoras y caracterizar diferentes RNA pequeños, los cuales se encargan de regular el silenciamiento génico en *E. histolytica* (Zhang *et al.*, 2015). Cabe destacar que los análisis por RNAseq también permiten la identificación en todo el genoma de sitios de inicio de la transcripción y sitios de poliadenilación, entre otros (Doolittle 2018). Recientemente, se ha identificado un nuevo tipo de RNA antisentido natural (NAT), el cual es RNA no codificante transcrito a partir de una cadena opuesta de un gen, precisamente en el codón de terminación en *E. histolytica*. Al comparar los perfiles transcriptómicos de los genes a los que se dirigen los NAT en *E. histolytica*, se identificaron procesos biológicos importantes comunes a las especies amebianas que infectan el intestino humano, siendo las actividades del metabolismo lipídico las funciones enriquecidas más importantes (Mornico *et al.*, 2020).

En un estudio realizado por Feng y colaboradores en 2020, mediante secuenciación de una sola célula (single-cell RNA seq), se identificó que los trofozoítos incubados con células CHO regulan positivamente genes de cinasas transmembrana (TMK), sugiriendo que

probablemente influyen en la percepción ambiental y la transmisión de señales. Estas proteínas pueden desempeñar funciones importantes en la transmisión de señales en condiciones de deficiencia de cisteína y a su vez regular el metabolismo celular de los trofozoítos, con cierta regularidad, ya que, en ensayos con deficiencia de cisteína, observaron que los trofozoítos reducen su expresión de AIG1, debido a que la deficiencia de nutrientes reduce la virulencia de *E. histolytica* (Feng *et al.*, 2020).

Diferentes análisis transcriptómicos señalan que *E. histolytica* modifica la expresión de los genes que codifican para proteínas Myb en respuesta a distintas condiciones, tales como la interacción con células epiteliales y de colon, durante la formación de los abscesos hepáticos, depleción de suero, entre otras, sugiriendo que se lleva a cabo una regulación transcripcional de dichos procesos (Ehrenkauf *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2016; Naiyer *et al.*, 2019; Gilchrist *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2016).

En un trabajo del 2019, Naiyer y colaboradores determinaron los patrones de expresión génica mediante la identificación de genes con expresión alta y motivos promotores involucrados para su expresión en 3 condiciones diferentes: 1) trofozoítos cultivados en condiciones normales de laboratorio, 2) trofozoítos sometidos a estrés por falta de suero y 3) trofozoítos después de la reposición de suero, y clasificaron los genes con alta y baja expresión, en especial con los genes asociados con la virulencia del parásito. Esto permitió hallar nuevas secuencias conservadas río arriba y abajo del codón de inicio de la transcripción de genes. Interesantemente, algunos de estos motivos podrían ser blancos de unión para proteínas Myb y de esta manera regular la expresión de genes implicados en virulencia.

2.3 El factor de transcripción EhMyb10

EhMyb10 consiste en una proteína que pertenece a la familia de proteínas con DBD-MYB de dos repetidos EhMybR2R3 y es codificada por el gen *ehmyb10* (Número de acceso EHI_129790). A diferencia de otros factores de transcripción Myb presentes en el genoma de *E. histolytica*, *ehmyb10* es uno de los genes que más se expresa, además, presenta una similitud de estructura terciaria con el DBD de c-Myb (Meneses *et al.*, 2010) (Figura 4).

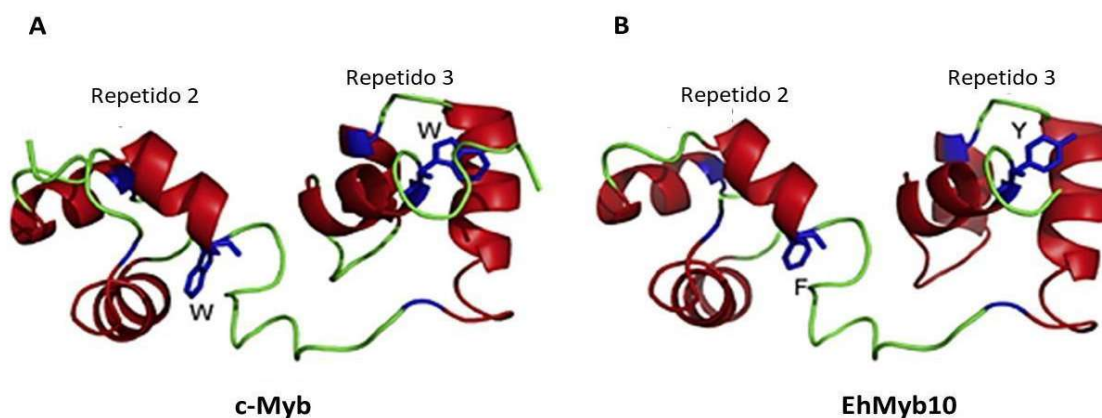


Figura 4. Estructura tridimensional del DBD de c-Myb y EhMyb10. Ambas estructuras presentan la estructura HTH **A)** estructura tridimensional de c-Myb. **B)** Estructura tridimensional de EhMyb10. “W” representa a los residuos de triptófano y “F” y “Y”, residuos de fenilalanina y tirosina respectivamente (tomado de Meneses *et al.*, 2010).

Cabe señalar que la similitud estructural de los DBD de EhMyb10 y c-Myb sugiere que EhMyb10 puede reconocer al ERM canónico. Esto se comprobó experimentalmente por medio de ensayos de EMSA utilizando una sonda de ERM y la proteína recombinante EhMyb10 (Meneses *et al.*, 2010). Al realizar un análisis *in silico* de la región promotora (-500 nt río arriba del ATG) de los 8,201 genes de *E. histolytica*, Saldivar-Anaya (2022) identificó 812 genes que tienen el elemento ERM y 591 genes que se expresan en las mismas condiciones que EhMyb10.

De estos, 162 genes modificaron su comportamiento en condiciones de colonización intestinal, donde se demostró por RNAseq que *ehmyb10* aumenta su expresión al primer día de interacción con enterocitos de epitelio del colon de ratón (Gilchrist *et al.*, 2006). Algunos de estos genes propuestos como blancos de EhMyb10 codifican para proteínas de unión al citoesqueleto, chaperonas, proteínas de unión a ATP, y proteínas involucradas en transcripción, entre otras (tesis de Saldivar-Anaya, 2022).

Finalmente, Castillo-Mercado evaluó el papel de EhMyb10 en conjunto con un factor de *splicing* sobre la regulación cotranscripcional de la expresión génica. Para ello se obtuvo el transcriptoma de trofozoítos transfectados de manera transitoria con un plásmido para sobreexpresar a EhMyb10 (pEhEx-*ehmyb10*). Por medio de RNAseq se identificaron 65 genes que modificaron su expresión al sobreexpresar a estas proteínas.

Por ejemplo, entre los genes que aumentan su expresión al sobreexpresar EhMyb10, algunos codifican para proteínas que participan en la regulación transcripcional, como proteínas asociadas a TBP, factor de transcripción bZIP, regulador transcripcional cudA, proteínas de ensamblaje de nucleosomas, proteínas de unión a nucleosoma 1, topoisomerasas putativas, Set/Ash2 histonas metiltransferasas y una metionina adenosil transferasa (MAT). También se modificó la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad citolítica como amoebaporo A, proteasas y metaloproteasas, entre otras (tesis de Castillo-Mercado,2023) (Tabla 3).

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en los trofozoítos transfectados con el plásmido pEhEx-*ehmyb10*

Gene ID	Fold Change	p-value	Anotación
Genes sobreexpresados en EhMyb10			
EHI_195110	12.8	1.32E-03	S-adenosylmethionine synthetase, putative
EHI_006770	7.3	2.21E-05	hypothetical protein, phosphopantetheine adenylyltransferase**
EHI_123020	7.2	2.01E-05	hypothetical protein, protein phosphatase domain-containing protein **
EHI_018630	7.1	6.58E-05	hypothetical protein, ER membrane protein, BIG1 family (predicted) **
EHI_178640	6.7	1.80E-04	Yos1-like domain-containing protein
EHI_083380	6	2.26E-03	hypothetical protein, protein SOF1, putative **
EHI_109930	4	2.46E-03	hypothetical protein, Proteasome assembly chaperone 4; **
EHI_159450	3.7	6.82E-03	hypothetical protein, METALLOPROTEASE; HYDROLASE**
EHI_103400	3.3	2.77E-05	hypothetical protein, Tetraspanin family protein**

EHI_117270	3.1	3.69E-04	fumarate hydratase class I, anaerobic, putative
Genes reprimidos en EhMyb10			
EHI_098470	-14.5	3.36E-05	ribosomal protein L18, putative
EHI_035060	-9.5	4.94E-10	fumarate hydratase class I, anaerobic, putative
EHI_155900	-9.2	9.89E-09	hypothetical protein, Adapter-related protein complex 3 (AP-3) subunit **
EHI_049990	-8.4	1.00E-07	chaperone protein DNAJ
EHI_004430	-8.3	1.26E-07	hypothetical protein, Myb-like domain-containing protein **
EHI_089770	-7.6	2.73E-06	hypothetical protein, Adapter-related protein complex 3 (AP-3) subunit **
EHI_183200	-7.2	1.90E-05	hypothetical protein, C-Myc-binding protein; conserved hypothetical protein**
EHI_179850	-6.3	7.23E-04	hypothetical protein, Pre-mRNA-splicing factor CWC25 homolog; **
EHI_083140	-6.3	6.39E-06	hypothetical protein, cortexillin II, putative **
EHI_033240	-6.2	8.19E-04	Riboflavin kinase / FAD synthetase

**Anotación realizada con base en los grupos Ortologos (OrthoMCL DB) y HHpred <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>

Es por ello que en este trabajo nos propusimos analizar el efecto EhMyb10 sobre las propiedades de virulencia de *E. histolytica*, lo que nos permitirá entender la regulación de las proteínas implicadas en el daño tisular y celular que el parásito ocasiona al huésped, utilizando como modelo, trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresan EhMyb10.

3. JUSTIFICACIÓN

EhMyb10 es uno de los factores de transcripción de la familia EhMybR2R3 que más se expresa en trofozoítos en condiciones basales y se ha demostrado que aumenta su expresión en condiciones de virulencia como la colonización intestinal. Esto sugiere que EhMyb10 podría estar implicado en la regulación de la expresión génica de factores de virulencia de *E. histolytica*. Para corroborar la participación de este FT en la regulación de la virulencia de *E. histolytica*, es importante evaluar las propiedades de virulencia cuando existe sobreexpresión de EhMyb10.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del factor de transcripción EhMyb10 modifica el transcriptoma y la virulencia de *E. histolytica*

5. OBJETIVOS

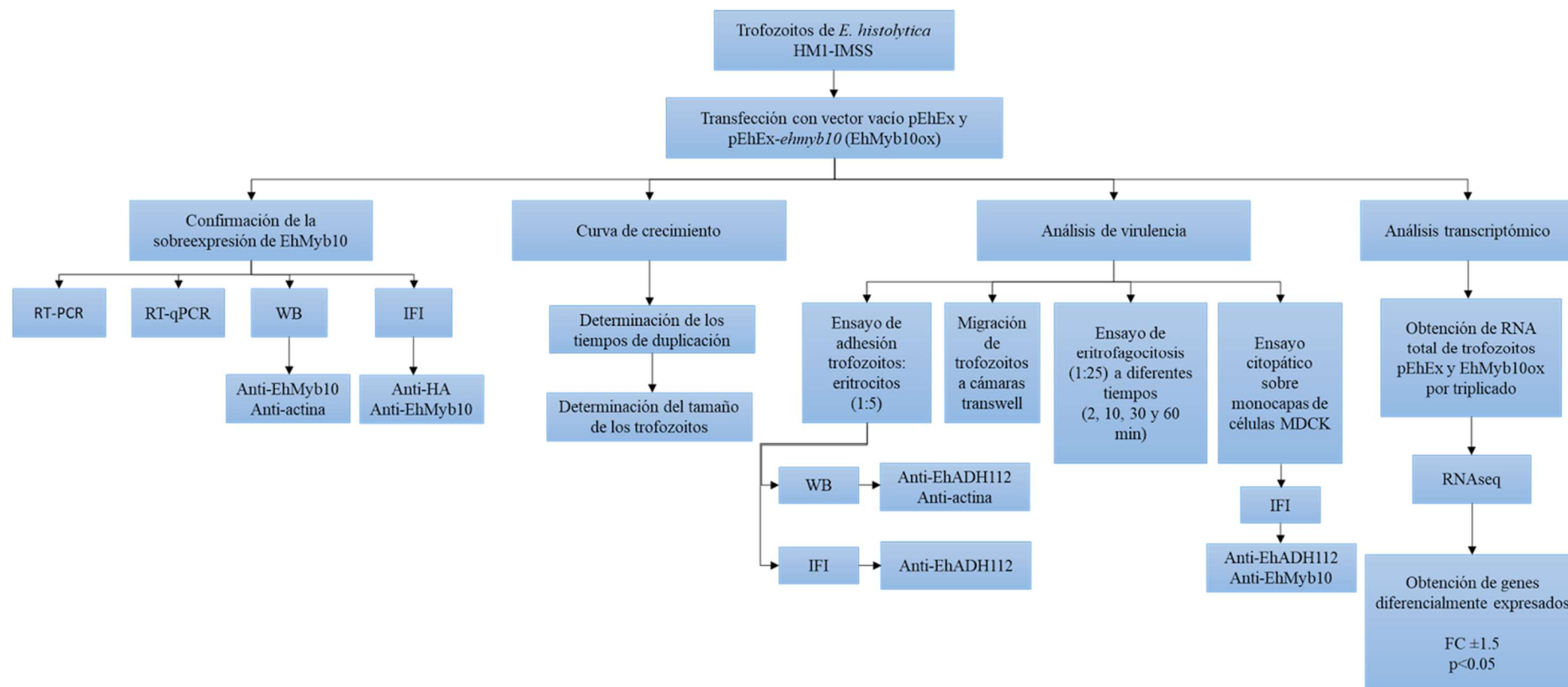
5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 sobre la virulencia y el transcriptoma de *Entamoeba histolytica*

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener trofozoítos de *E. histolytica* que sobreexpresen la proteína EhMyb10
2. Analizar el fenotipo de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10
3. Analizar el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 sobre el transcriptoma de *E. histolytica*

6. EXTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis *in silico*

La secuencia de EhMyb10 (EHI_129790) se obtuvo de la base de datos AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app>) y se analizó la estructura tridimensional en el programa Alpha Fold (2.0). Para determinar las proteínas que interactúan con EhMyb10, se realizó una interacción *in silico* en el programa STRING (12.0) (<https://string-db.org/>) (interaction score = 0.150) y se determinó la función de las proteínas que se unen a EhMyb10 por medio de GO (Gene Ontology).

7.2 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1-IMSS se cultivaron a 37°C en tubos con medio TYI-S33 suplementado con Diamond Vitamin Tween® 80 Solution 40x (1x) con suero bovino (BioWest) al 16%, y Penicilina-Estreptomicina (20 U/mL, 20 µg/mL, respectivamente) (Sigma-Aldrich) (Diamond *et al.*, 1978). En todos los experimentos se utilizaron trofozoítos en la fase de crecimiento logarítmica y se cosecharon a 1800 rpm durante 5 minutos a 4°C.

7.3 Transfección de trofozoítos de *E. histolytica* de la construcción pEhEx-ehmyb10

1x10⁶ trofozoítos de la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* se transfectaron en un tubo de 6 mL con una mezcla de plásmido (5µg de plásmido pEhEx (control) o pEhEx-*ehmyb10* (para sobreexpresar a EhMyb10 con una etiqueta de hemaglutinina (HA)), 150 µL de medio TYI-S-33 sin suero y 5 µL de Polyfect (Qiagen) (Saito-Nakano *et al.*, 2004). Para ello, los trofozoítos se colocaron con la mezcla de transfección por 10 min de forma horizontal, luego se complementaron con 5 mL de medio completo y se incubaron por 3 h a 37°C. Después, los trofozoítos se transfirieron a tubos de 12 mL para luego iniciar el proceso de selección con antibiótico G-418 (un análogo de neomicina, Life Technologies) a una concentración inicial de 2 µg/mL hasta tenerlos a una presión de selección de 50 µg/mL.

7.4 Extracción y cuantificación de DNA genómico

El DNA genómico de los trofozoítos se extrajo empleando el kit Wizard Genomic DNA (Promega). Para ello, 4×10^6 trofozoítos se centrifugaron a 1,800 rpm por 5 min. La pastilla resultante se resuspendió en 600 μ L de solución de lisis de núcleos (NLS) hasta homogeneizar la muestra. Después, se agregaron 3 μ L de RNasa, se mezcló por inversión de 2-5 veces y se incubó por 30 min a 37°C y por 5 min a TA (temperatura ambiente). Posteriormente se añadieron 200 μ L de solución de precipitación de proteínas (PPS) y la mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante, se transfirió a un tubo estéril de 1.5 mL y se agregaron 600 μ L de isopropanol, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó con 600 μ L de etanol al 70% y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. Finalmente, la pastilla seca se resuspendió en 100 μ L de agua inyectable y se cuantificó mediante espectrometría a 260 nm (Thermo Scientific, NanodropLite), se diluyó a 40 ng/ μ L y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

7.5 Extracción y cuantificación de RNA total

Para la extracción de RNA total de los trofozoítos transfectados, 4×10^6 células se colectaron mediante centrifugación a 1,800 rpm por 5 min y a la pastilla se le adicionó 1 mL de TRIzol (ThermoFisher). Después de homogeneizar la muestra, se incubó por 5 min a TA, y posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo. La mezcla se agitó con vortex por 30 segundos y se incubó por 5 min a TA. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C; la fase acuosa se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 0.5 mL de isopropanol, seguido de una agitación por inversión de 2 a 3 veces suavemente para incubar la muestra por 10 min a TA para centrifugar a 11,000 rpm por 20 min a 4°C. La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 75%, centrifugando cada ocasión a 10,000 rpm por 5 min. La pastilla se secó y se resuspendió en 150 μ L de agua inyectable. La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1% y por Qubit RNA IQ Assay (ThermoFisher). La concentración del RNA se determinó con el kit Qubit RNA BR (Broad Range) (ThermoFisher). Finalmente, se hicieron alícuotas de 5 μ g de RNA y se almacenaron a -70°C, hasta su uso.

7.6 Tratamiento con DNasa y síntesis de cDNA

Para el tratamiento con DNasa se utilizó 1 μ L de DNasa I libre de RNasa (Promega) por cada μ g de RNA total en amortiguador 10x, diluyendo el RNA a una concentración de 200 ng/ μ L. Las muestras se incubaron a 37°C por 90 min y la reacción se detuvo agregando 1 μ L de solución *Stop* por cada μ g de RNA tratado (EGTA 20 mM pH 8.0) e incubando por 10 min a 65°C. La muestra se almacenó a -20°C hasta su uso. La síntesis de cDNA se realizó con el kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para ello, a 1 μ g de RNA tratado se le adicionaron 1 μ L de oligo DT (Promega) y se incubó a 70°C por 5 min y a 4°C por 5 min. Posteriormente se añadió la siguiente mezcla: 4 μ L de amortiguador 5x, 2.4 μ L de MgCl₂ (3 mM), 1 μ L de dNTPs, 0.5 μ L de inhibidor RNAsin, 1 μ L de transcriptasa reversa y se llevó a un volumen final de 20 μ L con H₂O inyectable. Esta mezcla se incubó a 25°C por 5 min (alineamiento), después a 42°C por 60 min (extensión) y finalmente a 70°C por 15 min, para la desactivación de la transcriptasa reversa. El cDNA se diluyó en 20 μ L de H₂O inyectable para dejarlo a una concentración de 25ng/ μ L y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.7 Análisis de la expresión de *ehmyb10* por RT-PCR (semi-cuantitativa y cuantitativa)

Para evaluar la sobreexpresión de *ehmyb10* por RT-PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos específicos: EHI_129790 (*ehmyb10*) (Sentido (S) 5'-AGACCATGGAGTTCAGAAGAAGATG-3' y Antisentido (AS) 5'-ACAGCACGAGCAGTTCTTCCCA-3') y EHI_020280 (*40S s2*) ((S) 5'-GAGATCACAACGGTCATGCT 3' y (AS) 5'-CTGACACGAACTGAACCACA -3') como control interno. Para la RT-PCR semicuantitativa se utilizaron 2 μ l del cDNA. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12 μ L que contiene: Buffer 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTP's y DNA polimerasa, y se utilizaron las condiciones del termociclador descritas en la (Figura 5A). Para la RT-qPCR se utilizaron 50 ng del RNA tratado con DNasa de acuerdo a las recomendaciones para el kit QuantiFast SYBR (Qiagen). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L que contiene: Reactivo QuantiFast 2x (12.5 μ L), oligonucleótidos sentido 10 μ M (2.5 μ L), oligonucleótidos antisentido 10 μ M (2.5 μ L) y QuantiFast enzima RT (0.25 μ L).

Como controles se utilizaron: 1) RNA tratado con DNAsa sin enzima RT, 2) DNA genómico y 3) mezcla de reacción con primers sin DNA molde. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y se amplificaron los genes con las condiciones que se muestran en la (Figura 5B). Una vez finalizado el ciclo, la RT-PCR semicuantitativa se analizó en geles de agarosa al 2% teñidos con RedGel 1x (Biotium) y para la RT-qPCR se obtuvo el valor de Ct de los grupos de trofozoítos pEhEx o Eh Myb10ox y se calculó el $\Delta\Delta C_t$ para determinar las diferencias de expresión entre los distintos grupos de transfección.

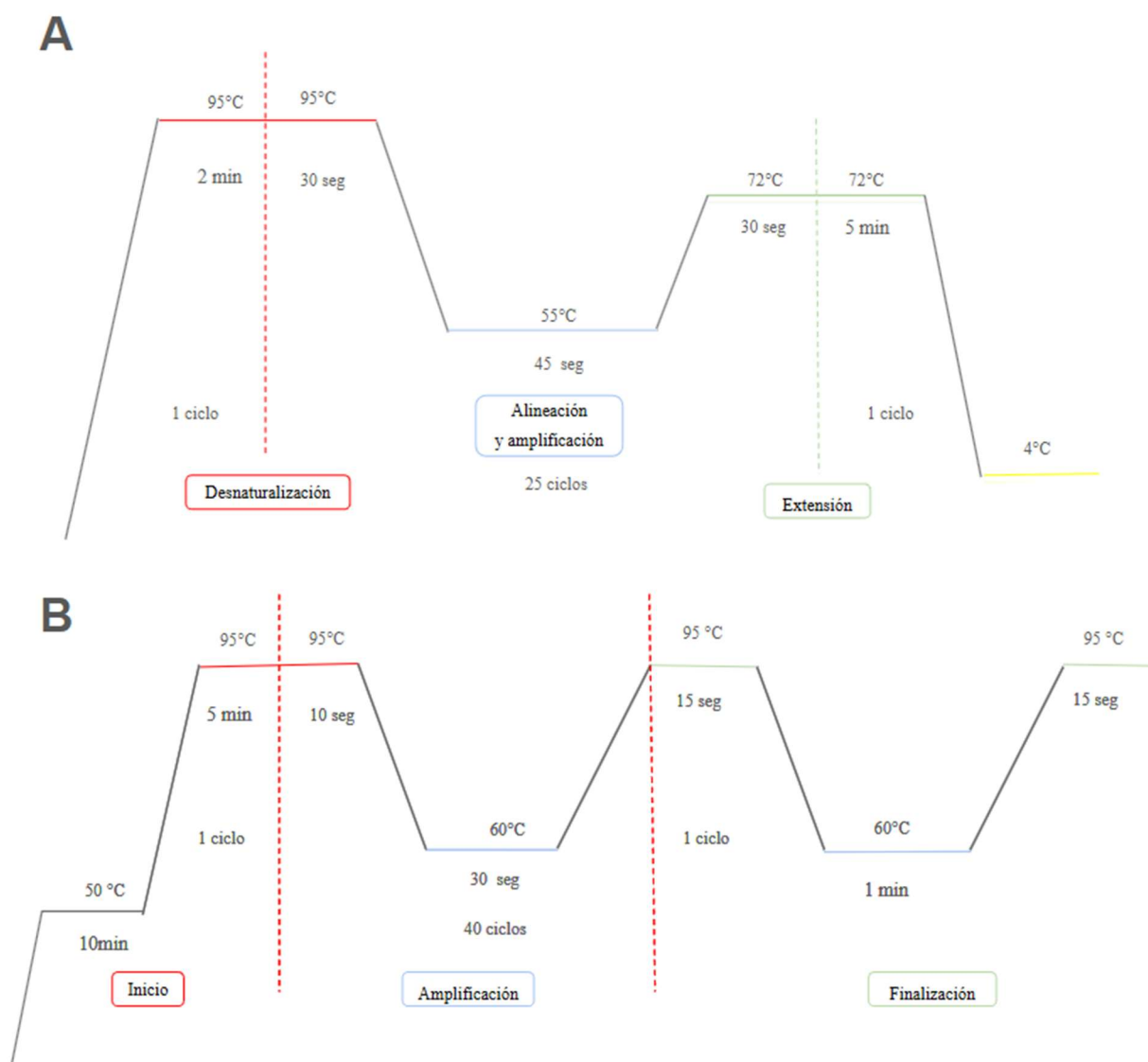


Figura 5. Condiciones de amplificación del gen *ehmyb10*. Temperaturas y tiempos utilizados para los ensayos de A) RT-PCR y B) RT-qPCR.

7.8 Extracción de proteínas totales de trofozoítos transfectados

Para determinar la sobreexpresión de EhMyb10, se extrajeron proteínas totales de trofozoítos de los diferentes grupos. Para ello, los trofozoítos crecieron en fase logarítmica, se cosecharon y se resuspendieron en 500 μ L de amortiguador RIPA (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, Triton x-100 1.2 %, NaCl 150 mM. Doc 0.5 %, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y SDS 0.1%) más inhibidores (PMSF 0.5 mM, E-64 20 mM y Complete 1x) por cada 2×10^6 trofozoítos. Posteriormente, esta mezcla se sonicó 3x a 30% de intensidad y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min para pasar el sobrenadante a tubos nuevos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie (SDS-PAGE), cargando 20 μ L de cada condición que corresponde a extractos de ~80,000 trofozoítos.

7.9 Análisis de la expresión de proteínas mediante SDS-PAGE y Western Blot

Para analizar la integridad de las proteínas, se utilizó la electroforesis desnaturalizante en una dimensión en geles de poliacrilamida al 12% sometidos a 120 V. Se empleó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ (BIO-RAD) para determinar los pesos moleculares de las proteínas. Los geles se tiñeron con Coomassie® Brilliant Blue G 250 (BIO-RAD), y se capturaron con el fotodocumentador Chemi-Doc XRS (BIO-RAD). Para el análisis de WB, los geles se sumergieron en buffer de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina y 20% metanol) y se realizó un “sándwich” de la siguiente manera: papel Whatman-membrana de nitrocelulosa-gel de acrilamida-papel Whatman. El sándwich se colocó en una cámara de transferencia húmeda (BIO-RAD) del lado del cátodo durante 20 min a 20 V y por 1 h a 100 V. Una vez concluida la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau al 0.1% (Sigma) para visualizar las proteínas, y se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1%. Las membranas se bloquearon con leche Svelty (Nestlé) al 5% en PBS-Tween 20 al 0.1% a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, para la inmunodetección, las membranas se incubaron con los anticuerpos Anti-EhMyb10 (conejo), Anti-Adh112 (conejo) (donado por la Dra. Esther Orozco, CINVESTAV-IPN), Anti-Actina (ratón) (donado por el Dr. Manolo Hernández, CINVESTAV-IPN) a una dilución 1:1000, 1:2000 y 1:100 respectivamente.

Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1%, y se incubaron con un anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP 1:5000 y se revelaron por quimioluminiscencia (Chemidoc, BIO-RAD).

7.10 Obtención de los anticuerpos anti-EhMyb10

En el grupo de la Dra. Elisa Azuara se produjeron anticuerpos anti-EhMyb10 utilizando el péptido SEKVKKQRKAGI acoplado a KLH (Figura 6), a través del cual se inmunizó un conejo cada 2 semanas con 1.0 mg del péptido, para obtener a la semana 10 de inmunización el sangrado final (4to sangrado). El suero se probó por ensayos de WB contra extractos totales de *E. histolytica*.

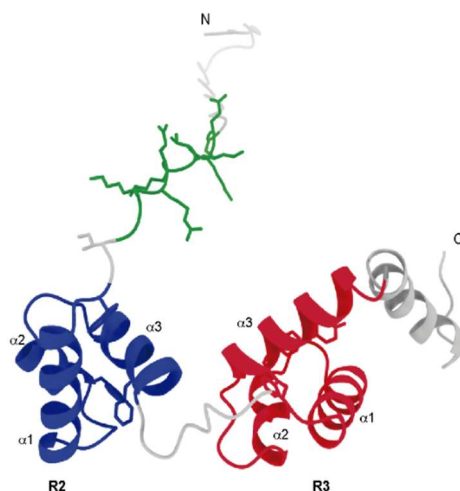


Figura 6. Péptido utilizado para la producción de anticuerpos anti-EhMyb10. Estructura terciaria de la proteína EhMyb10 donde se muestran en azul y rojo los repetidos R2 y R3 respectivamente, en verde se muestra la localización del péptido SEKVKKQRKAGI expuesto en la estructura de la proteína. La estructura tridimensional se obtuvo de AlphaFold3 y se visualizó con ChimeraX.

7.11 Análisis de localización por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Trofozoítos de los diferentes grupos se colocaron sobre cubreobjetos estériles en placas de cultivo de 6 pozos, donde se colocaron cubreobjetos esterilizados con etanol. Posteriormente, se añadieron $\sim 2 \times 10^5$ trofozoítos por pozo resuspendidos en 500 μ L de medio TYI-S-33 completo. La adhesión de los trofozoítos se logró mediante la incubación de la placa a 37°C durante 30 min. Pasado el tiempo, se fijaron con etanol absoluto frío a -20°C, por 30 min (~ 1 mL por pozo). Concluido el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 filtrado y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 1%.

Los anticuerpos primarios utilizados se incubaron a 4°C toda la noche, utilizando el anti-HA (1:100, ratón) (Invitrogen), anti-ADH112 (1:200, conejo) y/o anti-EhMyb10 (1:100, conejo). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM), seguido de la incubación del anticuerpo secundario correspondiente anti-conejo FITC (1:100) (SIGMA-Aldrich), anti-ratón Alexa 647 (1:50) (Invitrogen). Finalmente, se lavaron tres veces con PBS pH 7.4, se montaron en portaobjetos con Vectashield con DAPI y se visualizaron tres campos aleatorios en un microscopio confocal Zeiss (LS700) empleando el programa ZEN Light Edition.

7.12 Curva de crecimiento y determinación del tamaño celular

Para el análisis de las curvas de crecimiento, 2x10⁴ trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS de los diferentes grupos se sembraron en placas de 24 pozos en 2 mL de medio TYI-S33 completo, posteriormente, en la parte superior del pozo se añadieron 700 µL de aceite mineral para disminuir la tensión de oxígeno. La proliferación del parásito se evaluó mediante recuento directo con microscopía óptica en cámaras de Neubauer cada 24 h por triplicado. Asimismo, se determinó la medida de los trofozoítos por medio del programa ImageJ y se calculó el tiempo de duplicación mediante la fórmula:

$$\text{Tiempo de duplicación} = (0.6931 / \text{exponente base } e) * 24$$

El valor del exponente base *e* se obtuvo por medio del programa Excel, donde se obtuvo la fórmula de la línea de tendencia en la fase exponencial de crecimiento de cada grupo.

Para la determinación del tamaño de las amibas utilizamos las imágenes observadas a través de un microscopio óptico invertido (300x), en una cámara de Neubauer, tomando como referencia 0.25 mm como el valor de la longitud (Figura 7). A través del programa ImageJ se determinó el número de píxeles que corresponden a esa longitud y se realizó una conversión del número de píxeles que corresponde al diámetro de los trofozoítos (n=30).

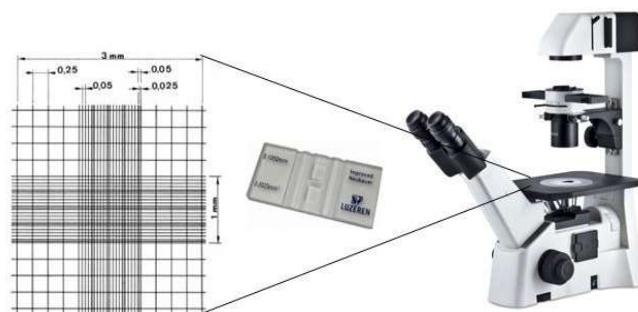


Figura 7. Cámara de Neubauer. Se muestran las medidas de la rejilla empleada para la determinación del tamaño del trofozoíto.

7.13 Análisis de virulencia de los diferentes grupos de *Entamoeba histolytica*

7.13.1 Ensayos de adhesión

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 sobre la adhesión de *E. histolytica* se puso a interactuar 2.5×10^5 trofozoítos de la condición pEhEx o EhMyb10 ox con eritrocitos humanos a una relación 1:5. Para ello, los eritrocitos se obtuvieron de 5 mL de sangre por medio de 3 lavados con solución fisiológica, centrifugando a 3,500 rpm por 5 min para colectarlos. Posteriormente, 10 μ L de los eritrocitos lavados se diluyeron en 1 mL de solución fisiológica y se contaron en 5 de los cuadrantes centrales de la cámara de Neubauer para calcular la cantidad usando la siguiente fórmula:

$$no \text{ de eritrocitos} = (cuenta \text{ de eritrocitos}/5) \times 10,000 \times volumen \text{ total} \times 100$$

La interacción se realizó en 900 μ L de medio TYI sin suero por 2 min a 4°C. Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados con 10 mL de PBS 1X pH 6.8 frío, para detener el proceso de adhesión y lavar las células no adheridas. Posteriormente, a la pastilla se le añadieron 250 μ L de glutaraldehído al 2.5 % y se incubó por 30 min a 37° C en baño maría. Posteriormente, las muestras se lavaron con 5 mL de PBS 1X y se centrifugaron por 7 min a 1,800 rpm. Finalmente, los eritrocitos se contrastaron con 10 mg de diaminiobencidina resuspendida en 5 mL de 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (0.05M pH 9.7) con 500 μ L de H₂O₂ al 30% por 30 min, seguidos de un lavado con PBS pH 6.8. Una vez contrastados, se contaron los eritrocitos adheridos a 100 trofozoítos de cada condición por triplicado y se realizaron pruebas estadísticas t-student en el programa Graph Pad Prism 10.0.

7.13.2. Ensayos de eritrofagocitosis

Para los ensayos de eritrofagocitosis, se puso a interactuar 2.5×10^5 trofozoítos de la condición pEhEx o EhMyb10ox con eritrocitos a una relación 1:25, como se describió anteriormente (protocolo de adhesión). La interacción se realizó en 900 μ L de medio TYI sin suero por 2, 10, 30 y 60 min a 37 °C. Al término de la incubación, se realizaron 4 lavados con 1 mL de PBS 1X pH 6.8 frío y H₂O inyectable alternados para lisar los eritrocitos no fagocitados. Posteriormente, los trofozoítos se fijaron con 250 μ L de glutaraldehído al 2.5 % y se incubó por 30 min a 37°C en baño maría. Posteriormente, las muestras se lavaron con 5 mL de PBS 1X y se centrifugaron por 7 min a 1,800 rpm. Finalmente, los eritrocitos se contrastaron con 10 mg de diaminobencidina resuspendida en 5 mL de 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (0.05M pH 9.7) con 500 μ L de H₂O₂ por 30 min, seguidos de un lavado con PBS pH 6.8.

Una vez contrastados, se contaron los eritrocitos fagocitados en 100 trofozoítos de cada condición por triplicado y se realizaron pruebas estadísticas t-student en el programa Graph Pad Prism 10.0.

7.13.3 Ensayos citopáticos

Para los ensayos citopáticos se cultivaron células MDCK a confluencia 90% en placas de 48 pozos en medio DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino al 10% e insulina recombinante de acción rápida (0.1 U /mL). Una vez en confluencia, se colocaron 125,000 trofozoítos sobre los pozos en 500 μ L de medio TYI-DMEM 1:1 sin suero y se incubaron a 37°C. El ensayo se revisó a los 15, 30 y 35 min antes de detenerlo, cuando uno de los grupos hubiera degradado aproximadamente la mitad de la monocapa. Para ello, se realizaron lavados exhaustivos con PBS pH 6.8 frío, una vez confirmado al microscopio que no quedaran trofozoítos sobre la monocapa. Esta se fijó con glutaraldehído al 2.5% por 30 min a 37°C. Al término, se lavó 2x con PBS pH 6.8 y se tiñeron las células restantes con cristal violeta al 1% por 10 min a TA. Finalmente, se lavaron las placas 3x con buffer de boratos (ácido bórico 79 mM, tetraborato de sodio 56 mM pH 8.7) y el colorante se diluyó con HCl 0.01 N en buffer de boratos.

El eluido se cuantificó por espectrofotometría a 595 nm, los valores se normalizaron con respecto a la concentración de la tinción de MDCK sin trofozoítos para determinar el porcentaje de destrucción de la monocapa usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de destrucción} = 100 - \text{absorbancia} \times 100 / \text{promedio absorbancia MDCK}$$

El ensayo se realizó por duplicado en 8 réplicas y se determinó la significancia estadística por medio de una t-student empleando el programa Graph Pad Prism 10.0.

7.13.4. Ensayos de migración

Para evaluar la migración, se incubaron trofozoítos de los grupos pEhEx o EhMyb10ox en medio TYI-S33 sin suero por 3 h a 37°C. Posteriormente, se colocaron 1.5×10^4 trofozoítos en la parte superior de una cámara Transwell con un poro de 8 μm , en 300 μL de medio TYI-S33 sin suero de los diferentes grupos. En la cámara inferior se colocaron 700 μL de suero fetal bovino como atrayente y se incubaron a 37°C por 3 h. Transcurrido el tiempo, la parte superior se retiró y se contaron los trofozoítos que migraron a la parte inferior del pozo. La prueba de migración se realizó por triplicado en dos ensayos independientes y se determinó la significancia estadística en el programa GraphPad Prism 10.0.

7.14. Construcción y secuenciación de bibliotecas y obtención de los transcriptomas de trofozoítos pEhEx o EhMyb10ox

El RNA de los trofozoítos transfectados de los diferentes grupos, se extrajo y se analizó por fluorometría por Bioanalyzer 2100 para verificar la integridad de las muestras y posteriormente construir una biblioteca empleando el kit TruSeq Stranded (Illumina). Esto se realizó en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM (UUSMB-IBT UNAM). La secuencia se realizó en un equipo de secuenciación NextSeq 500/550 (Illumina) por medio de 150 ciclos para una secuencia de 2 x 75 ciclos, analizando 10×10^6 lecturas pareadas. La calidad de los datos de secuenciación masiva se analizó con el software FastQC. Posteriormente, se hizo un mapeo contra el genoma de referencia (ubicado en la base de datos AmoebaDB) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_000208925.27).

La cuantificación de la expresión de los transcritos y el análisis de expresión diferencial se realizaron mediante RSEM y por medio de DESeq2, respectivamente, comparando cada muestra contra el control. Los ensayos se realizaron por triplicado.

8. RESULTADOS.

8.1 Determinación *in silico* de la estructura tridimensional de EhMyb10.

Para el análisis de la estructura tridimensional de la proteína EhMyb10, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la base de datos AmoebaDB (EHI_129790) (Figura 8A) y se analizó a través del programa AlphaFold. Esta proteína está conformada por 152 residuos y pertenece a la familia 2R-Myb. La estructura tridimensional de EhMyb10 es tipo HTH (Figura 8B) en la cual los repetidos R2 y R3 se encuentran en la parte central de la proteína, con una organización HTH, la cual se predice con un alto grado de confianza (Figura 8C). Sin embargo, esta proteína presenta regiones intrínsecamente desordenadas en sus extremos amino y carboxilo terminal y, de manera interesante, una región que tiene una α -hélice.

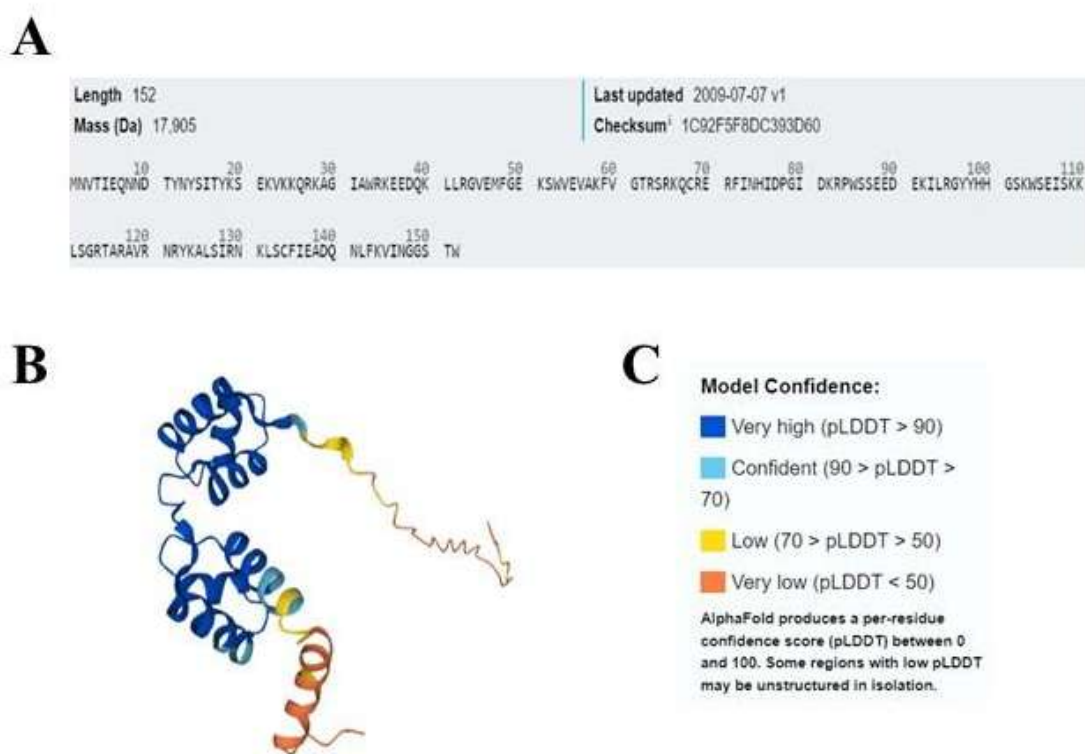


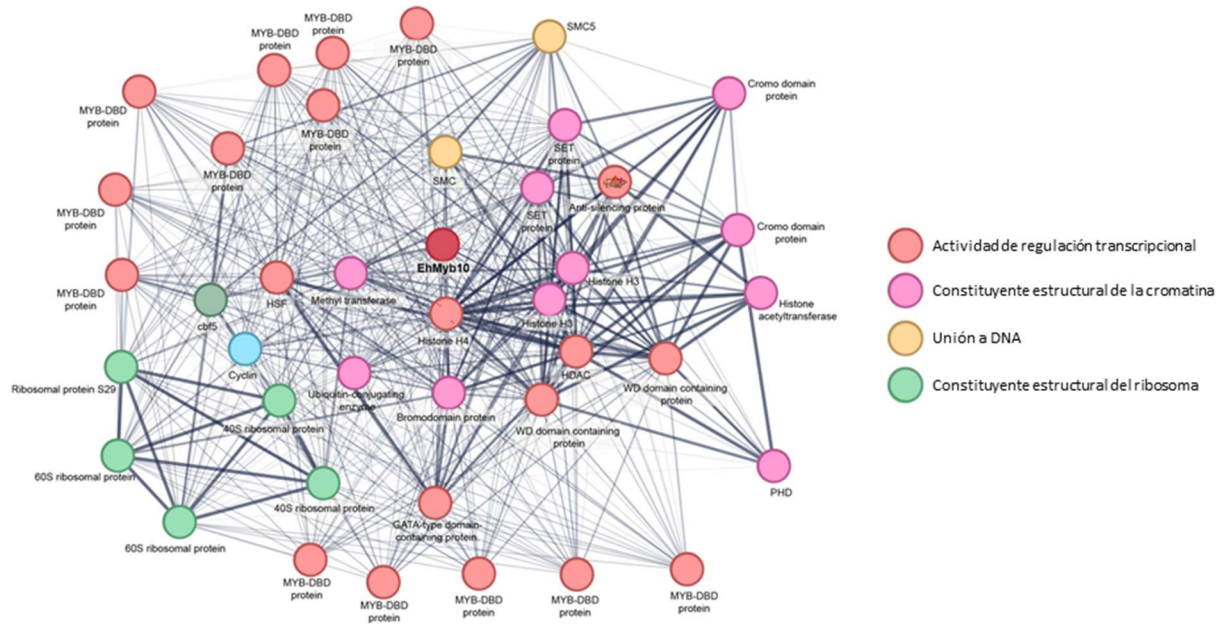
Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína EhMyb10. A) Secuencia de aminoácidos y peso molecular de EhMyb10. B) Modelo cristalográfico teórico de la estructura terciaria de la proteína EhMyb10 obtenida por *UniProt*. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/C4M5R0/>. C) Grado de confianza de la estructura tridimensional de acuerdo con los residuos que constituyen la proteína.

8.2 Interacción proteína-proteína de EhMyb10

Los factores de transcripción se caracterizan por su capacidad de unirse con el DNA para regular la expresión de sus genes blanco; sin embargo, también se requiere de la interacción con proteínas para mediar la transcripción, por ejemplo, con proteínas de la maquinaria transcripcional como la RNAPII, proteínas que regulan la conformación de la cromatina, así como de proteínas que participan en la regulación post-transcripcional. Para determinar las proteínas que interaccionan con EhMyb10, se realizó una predicción *in silico* mediante la base de datos STRING (Tabla 4). En este ensayo se observó que EhMyb10 las posibles interacciones de 38 proteínas involucradas en diversas funciones como, la regulación transcripcional, modificación de la estructura de la cromatina (como la histona H3), con otros FT como GATA y otras proteínas Myb con proteínas de estructuras nucleares, así como con los constituyentes estructurales de los ribosomas encargados de la traducción, por mencionar algunas (Figura 9A)

Al analizar la función molecular por ontología (GO) de las proteínas que interactúan con EhMyb10 (Figura 9B), observamos que los procesos de regulación transcripcional están enriquecidos, ya que se identificaron proteínas de unión a RNAPII y moléculas implicadas en la regulación transcripcional. Ejemplos de estas proteínas son los FT MYB-DB que regulan un conjunto de genes específicos de *E. histolytica* y las proteínas WD, con dominio GATA entre otras, las cuales en eucariontes juegan un papel fundamental en la expresión génica (Arriata *et al.*, 2013; Loftus *et al.*, 2005; Romano y Miccio 2020). Otra de las funciones moleculares no menos importantes que se identificaron fue la de proteínas constituyentes de la cromatina, donde se identificaron histonas como la H3 y la H4.

A



B

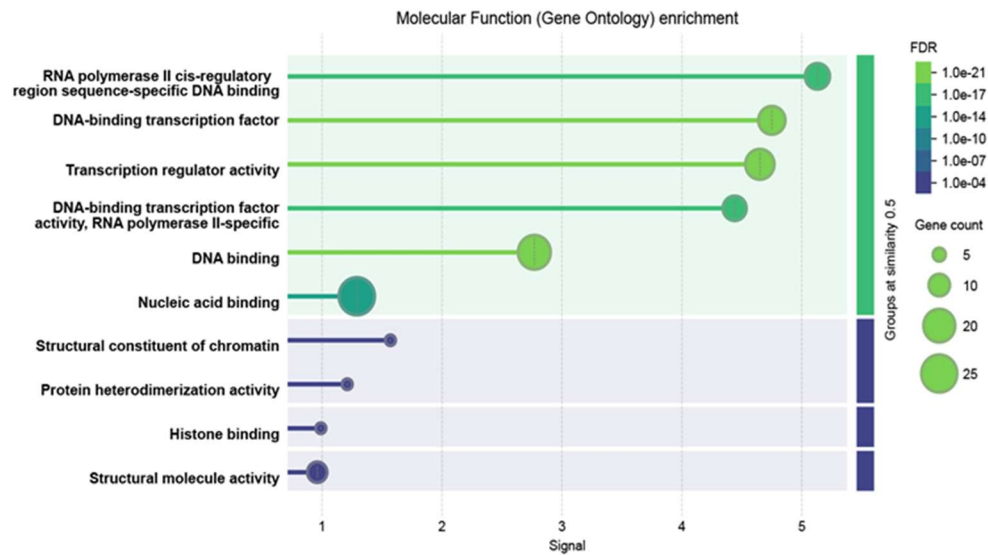


Figura 9. Interactoma *in silico* del factor de transcripción EhMyb10 de *E. histolytica*. A) Ensayo de interacción de EhMyb10 con proteínas de *E. histolytica* a través de la plataforma STRING. **B)** Clasificación por GO de la función molecular de las proteínas que interactúan con EhMyb10.

Tabla 4. Descripción de las proteínas que se asocian a EhMyb10 identificadas en el interactoma.

Proteína	Función	Referencia
cbf5	Subunidad catalítica de partículas de ribonucleoproteínas (RNP)	Kawano-Sugaya <i>et al.</i> , 2020
Bromodominio	Reconocimiento de residuos de lisina acetilados en la región amino terminal de histonas.	Lorenzi <i>et al.</i> , 2007
WD	Participa en crecimiento, ciclo celular, desarrollo y virulencia.	Loftus <i>et al.</i> , 2005
Heat shock	Proteínas de choque térmico.	Ortner <i>et al.</i> , 1992
SMC5	Participan en el mantenimiento estructural del cromosoma 5.	Tang <i>et al.</i> , 2019
Histona 3	Proteína compuesta de un dominio globular principal y una cola en la región amino terminal larga, encargada de mantener y regular la estructura de la cromatina.	Krishnan <i>et al.</i> , 2011
GATA	Factor de transcripción, encargados de coordinar 1 o más iones de zinc, para estabilizar interacción con el RNA, DNA y proteínas.	Romano y Miccio, 2020
MYB-DB	Estos FT se encuentran implicados en procesos fundamentales de diferenciación y proliferación celular, así como en la regulación del metabolismo.	Arriata <i>et al.</i> , 2013
Subunidades ribosomales 40s y 60s	Conforman una maquinaria molecular crucial durante la traducción de mRNAs	Villanueva <i>et al.</i> , 2024

8.3 Sobreexpresión de *ehmyb10* en trofozoítos transfectados de *E. histolytica*

Para comprender el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 y determinar su función en los procesos celulares de *E. histolytica*, se transfectaron trofozoítos con un plásmido que contiene el gen que codifica para esta proteína. Los trofozoítos se seleccionaron con el análogo de neomicina, G-418 hasta una concentración de 50 µg/mL.

De estas células se extrajo RNA por medio de Trizol (Figura 10A) y para determinar el aumento del transcrito de *ehmyb10* empleamos ensayos semicuantitativos (RT-PCR) y cuantitativos (RT-qPCR). Cuando analizamos la expresión del gen por medio de RT-PCR, se observó un amplicón de 110 pb correspondiente a *ehmyb10* el cual tiene mayor intensidad con respecto a la condición pEhEx (Figura 10B). Como control de carga, se amplificó el gen *40S s2* el cual se observan bandas de igual abundancia. También se amplificó el gen de resistencia a neomicina y se corroboró que los cultivos celulares estaban transfectados y en condiciones de estabilidad (Figura 10B), confirmando la existencia de la sobreexpresión del transcrito del gen *ehmyb10* en las células transfectadas. (Figura 10C). Para corroborar este resultado se hizo un ensayo de RT-qPCR en donde observamos un aumento de expresión de *ehmyb10* ~2.5 veces más en comparación con el vector vacío como control (pEhEx).

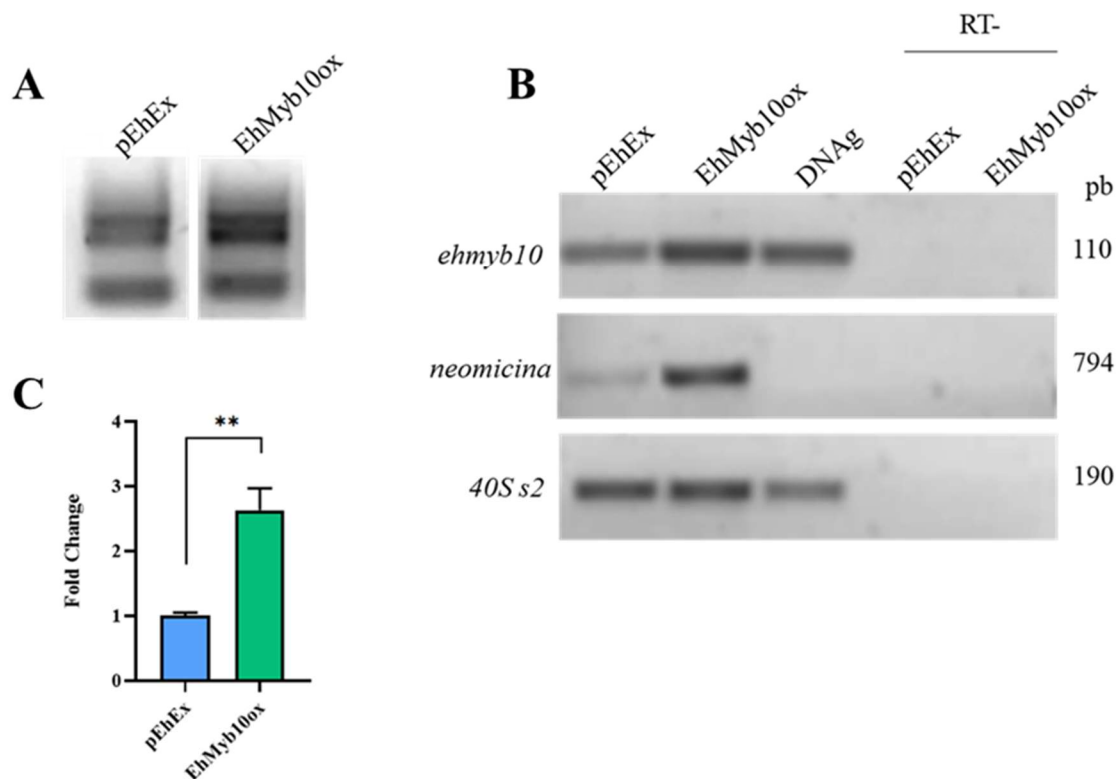


Figura 10. Análisis de la sobreexpresión del gen *ehmyb10* en trofozoítos transfectados (50 µg/µL). **A)** Extracción de RNA total de trofozoítos transfectados con el vector vacío (pEhEx) y con la construcción pEhEx-*ehmyb10* (EhMyb10ox) **B)** Ensayo de RT-PCR semicuantitativo donde se muestra el amplificado de *ehmyb10*, el gen de resistencia a neomicina como control de transfección y el control de carga *40S s2*. **C)** Ensayo de RT-qPCR utilizando 50 ng de RNA obtenido en A y normalizado con respecto al control ribosomal.

8.4 Sobreexpresión y localización de la proteína EhMyb10 en trofozoítos transfectados EhMyb10ox.

Una vez confirmada la sobreexpresión del gen *ehmyb10* evaluamos los niveles de expresión de la proteína en los trofozoítos transfectados. Al realizar la extracción de proteínas totales, empleando el buffer RIPA, observamos un patrón complejo de proteínas de alto y bajo peso molecular en un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, además de que la carga de los extractos en cada uno de los grupos ensayados fue homogénea al igual que la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (NTC) (Figura 11 A y B). En el ensayo de WB, el anti-EhMyb10 detectó bandas de diferentes pesos moleculares en ambos grupos (pEhEx o EhMyb10ox). De manera interesante, el reconocimiento es más intenso para las bandas de 25 y 40 kDa en la condición de EhMyb10ox, sugiriendo la sobreexpresión de esta proteína. En este ensayo se utilizó actina como control de carga (Figura 11 C). Los diferentes pesos moleculares de EhMyb10 podrían corresponder a la forma monomérica y posiblemente a un complejo o multímero de EhMyb10, ya que en presencia de condiciones altamente desnaturalizantes como la presencia de urea, el anticuerpo reconoció solamente una banda de 25 kDa (Cuellar 2025, artículo en preparación).

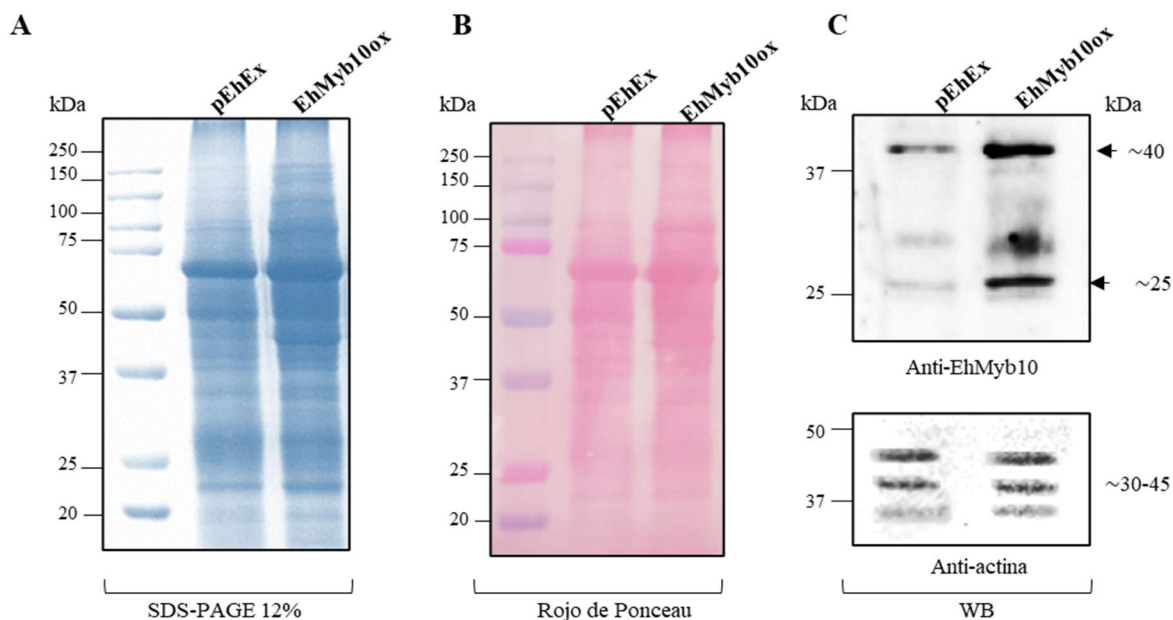


Figura 11. Inmunodetección de la proteína EhMyb10. Extracción de proteínas mediante el método de RIPA, de trofozoítos transfectados establemente a (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), con el plásmido pEhEx (control) y la construcción pEhEx-*ehmyb10* (EhMyb10ox) separados en un gel SDS-PAGE al 12% y **A)** Gel teñido con Azul de Coomassie y **B)** Membrana teñida con rojo de Ponceau. **C)** Inmunodetección de EhMyb10 (anti-EhMyb10) y Actina (anti-actina).

Por otro lado, Aguirre-Casimiro (2023) determinó *in silico* las posibles modificaciones postraduccionales que podrían afectar a EhMyb10 como glicosilaciones, ubiquitinación, fosforilaciones o sumoilaciones, las cuales podrían afectar su peso molecular. Cabe mencionar que, debido a que anti-EhMyb10 está generado contra un péptido específico de EhMyb10 (SEKVKKQRKAGI), se podría inferir que solo reconoce a la proteína EhMyb10 en ambos grupos (pEhEx o EhMyb10ox) pero revela una evidente sobreexpresión de la proteína de interés en la condición de EhMyb10ox (Figura 11C).

Posteriormente, determinamos la localización de EhMyb10 en los trofozoítos transfectados mediante un ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-HA y anti-EhMyb10 para reconocer a la proteína sobreexpresada fusionada a la etiqueta HA y la proteína EhMyb10, respectivamente, ya que al ser un FT se esperaba una mayor presencia en el núcleo celular. Por medio de microscopía confocal observamos una mayor intensidad de señal tanto en el citoplasma como en los núcleos de los trofozoítos al utilizar el anticuerpo que reconoce la etiqueta HA, corroborando la localización nuclear de esta proteína (Figura 12A). Este resultado sugiere que hay una sobreexpresión de EhMyb10 y que podría estar ocurriendo la síntesis de la proteína sobreexpresada en el citoplasma del trofozoíto.

Por otro lado, al utilizar el anticuerpo anti-EhMyb10, observamos una mayor intensidad en los núcleos de los trofozoítos transfectados con EhMyb10ox en comparación con pEhEx (Figura 12 B). Así mismo, se determinó la intensidad de la fluorescencia nuclear para cada una de las microscopías y observamos que con el anticuerpo anti-HA hay una mayor intensidad de la fluorescencia en el núcleo de los trofozoítos en EhMyb10ox con respecto a pEhEx (Figura 12C). Para el anti-EhMyb10 observamos un incremento en la fluorescencia nuclear con respecto a pEhEx; sin embargo, este aumento no fue significativo, probablemente porque la señal observada con este anticuerpo corresponde tanto a la forma endógena como a la sobreexpresada que también se observa en los núcleos de la condición pEhEx (Figura 12D).

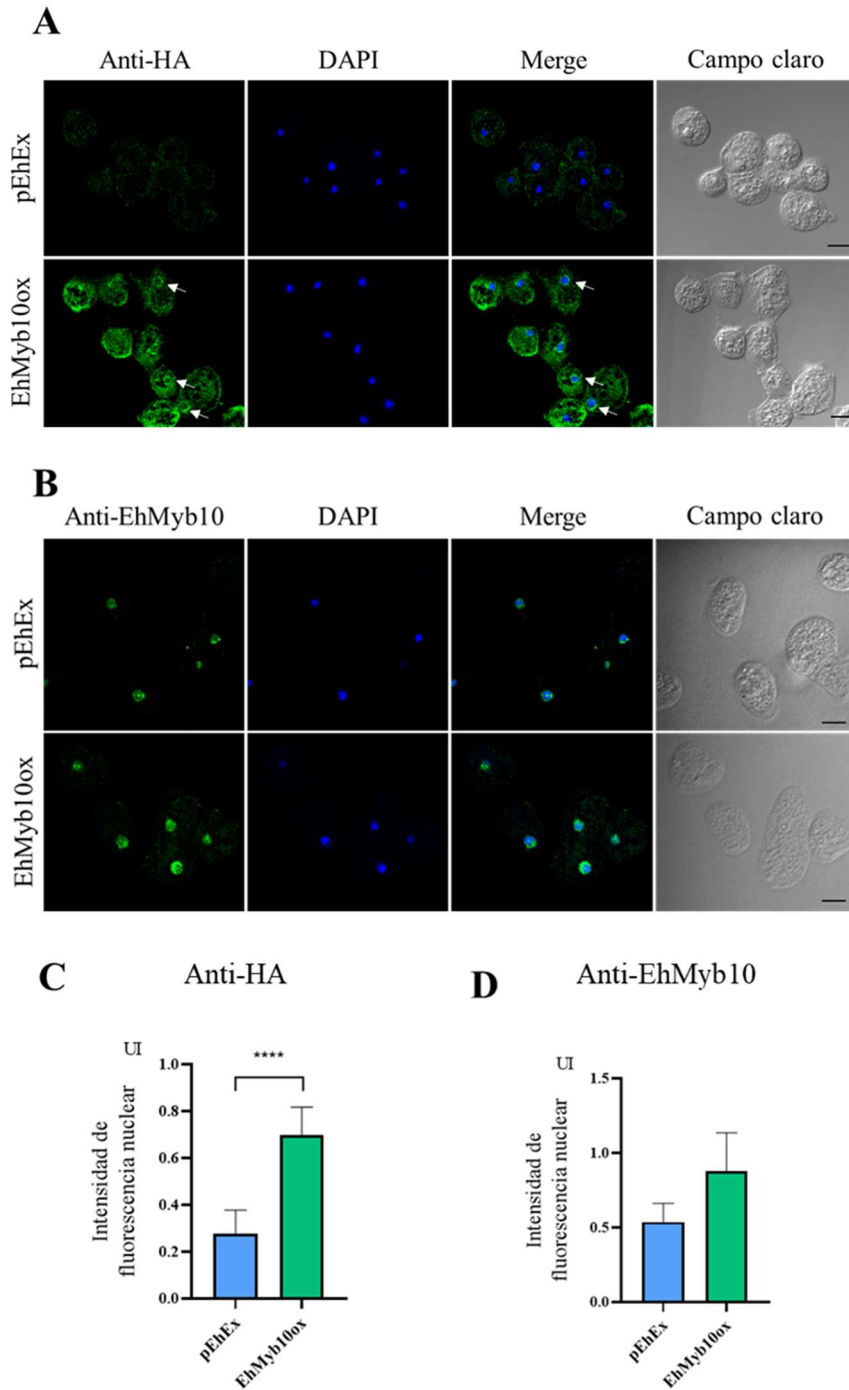


Figura 12. Localización subcelular de EhMyb10 en trofozoítos transfectados. A y B) Trofozoítos transfectados y fijados en laminillas con etanol al 100% y procesados para inmunofluorescencia, los cuales fueron incubados con los anticuerpos anti-HA (1:1000) y anti-EhMyb10 (1:1000) respectivamente. Se utilizó un anticuerpo acoplado a FITC y los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra negra indica 20 μ m. Las flechas señalan las regiones de localización nuclear. C y D) Gráficas de la intensidad de fluorescencia nuclear obtenidas en A y B) respectivamente con el programa Image J, **** ($p < 0.0001$).

8.5 Análisis del crecimiento y determinación del tiempo de duplicación de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10

Para determinar si la sobreexpresión de EhMyb10 afecta la proliferación de los trofozoítos transfectados, se analizó la tasa de crecimiento cada 24 hrs y durante las 144 hrs siguientes de los trofozoítos de *E. histolytica* no transfectados, y transfectados con pEhEx o con EhMyb10ox. El análisis de la proliferación de los trofozoítos transfectados se realizó en condiciones anaeróbicas, utilizando aceite mineral para simular las condiciones *in vivo*, ya que el cultivo de *E. histolytica* requiere de condiciones microaerófilas para su proliferación (Pires Santos *et al.*, 2012). Por medio de imágenes obtenidas en un microscopio óptico invertido (300x), en el tiempo cero, observamos una siembra homogénea de los parásitos de los tres grupos de estudio (Figura 13).

En el grupo no transfectado se observó un crecimiento rápido a partir de las 24 h de los trofozoítos no transfectados, manteniendo un mayor crecimiento exponencial comparado mediante una curva de crecimiento en comparación con los trofozoítos transfectados con pEhEx o EhMyb10ox. Sin embargo, luego de transcurridas 96 h del ensayo, se observó muerte celular en el grupo de trofozoítos no transfectados por el excesivo crecimiento del parásito y la carencia de nutrientes. En el grupo de trofozoítos transfectados con pEhEx, el crecimiento aumentó a partir de las 48 h y hasta las 120 h. A las 144 h observamos a las células en condición de estrés y la presencia de *detritus* indicativo de muerte celular. En el caso del grupo transfectado con EhMyb10ox, el crecimiento fue más lento, ya que observamos una mayor proliferación transcurridas las 96 h, y se mantuvo en la fase estacionaria hasta las 120 h. En este grupo a las 144 h observamos una menor cantidad de trofozoítos, probablemente debido a la falta de nutrientes suficientes en el cultivo; sin embargo, se observó una menor lisis celular que en el grupo de trofozoítos no transfectados y transfectados con pEhEx (Figura 13).

Por otro lado, cada 24 h se analizó la cantidad de trofozoítos por grupo o condición de estudio y observamos que los trofozoítos no transfectados proliferaron más que los otros dos grupos, corroborando lo observado en la Figura 14A. El mayor número de trofozoítos se observó a las 72 h de cultivo (65×10^4).

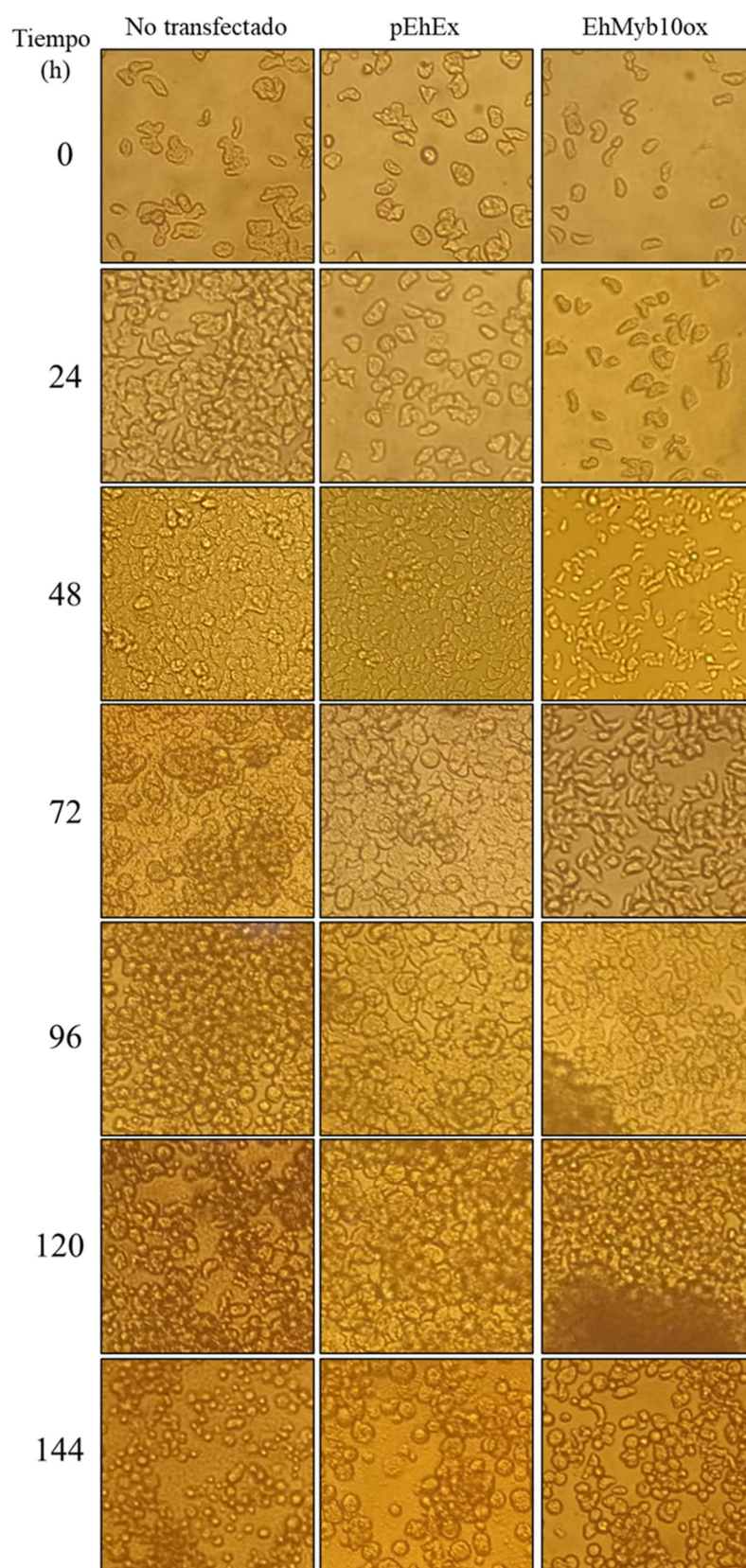
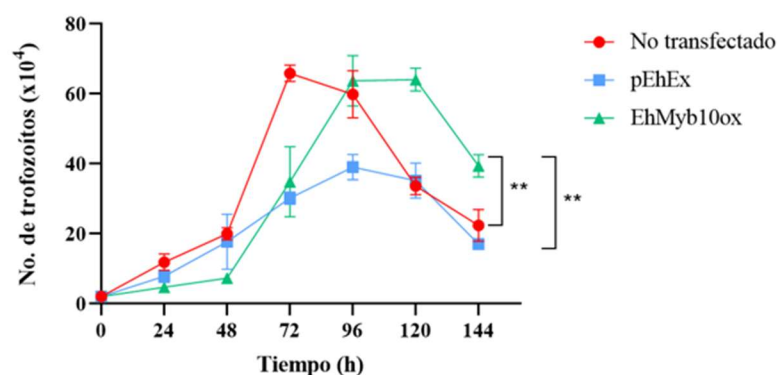


Figura 13. Imágenes por microscopía de luz de los diferentes tiempos de cultivo. Imágenes tomadas cada 24 h de trofozoítos cultivados en placas de 24 pozos de los grupos no transfectados, pEhEx o EhMyb10ox (300x).

Para el caso de pEhEx o EhMyb10ox, no fue sino hasta las 96 h donde se observa una mayor cantidad de trofozoítos (39×10^4 y 64×10^4 respectivamente). Al realizar el análisis estadístico (t de múltiples vías, $p < 0.05$), observamos que hay una diferencia significativa entre el crecimiento de EhMyb10ox en comparación con los grupos de trofozoítos no transfectados o pEhEx que nos indica que los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10ox presentan una mayor proliferación (Figura 14 A).

A



B

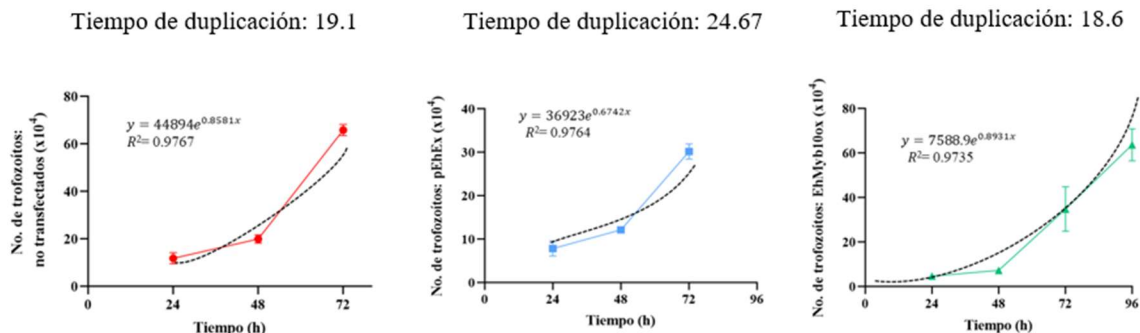


Figura 14. Gráficas de la curva de crecimiento de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10. A) Gráfica del número de trofozoítos de los diferentes grupos cada 24 h (** $p < 0.05$). B) Gráficas de dispersión para el cálculo del tiempo de duplicación de los trofozoítos de los diferentes grupos con base en la fórmula de la tendencia exponencial (línea punteada).

Finalmente, calculamos el tiempo de duplicación y observamos la duplicación de los trofozoítos transfectados con EhMyb10ox se duplica cada 18.6 h, observando una línea de tendencia exponencial más prolongada con respecto a los trofozoítos no transfectados y pEhEx, que se duplican cada 19.1 y 22.8 h respectivamente; sin embargo, observamos una fase estacionaria más prolongada en los cultivos EhMyb10ox durante 48 h (Figura 14 B).

8.6 Tamaño de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10.

Cuando realizamos el conteo para la curva de crecimiento, observamos que los tamaños de los trofozoítos variaban en el grupo EhMyb10ox; por ello calculamos el diámetro de las células utilizando como referencia las medidas de los cuadrantes de la cámara Neubauer. Al analizar los trofozoítos, observamos que los trofozoítos transfectados con EhMyb10ox presentaban un menor diámetro (22.36 μm) con respecto a los trofozoítos no transfectados y transfectados con pEhEx que presentaron un valor de 28.86 μm y 33.32 μm respectivamente ($p < 0.0001$) (Figura 15).

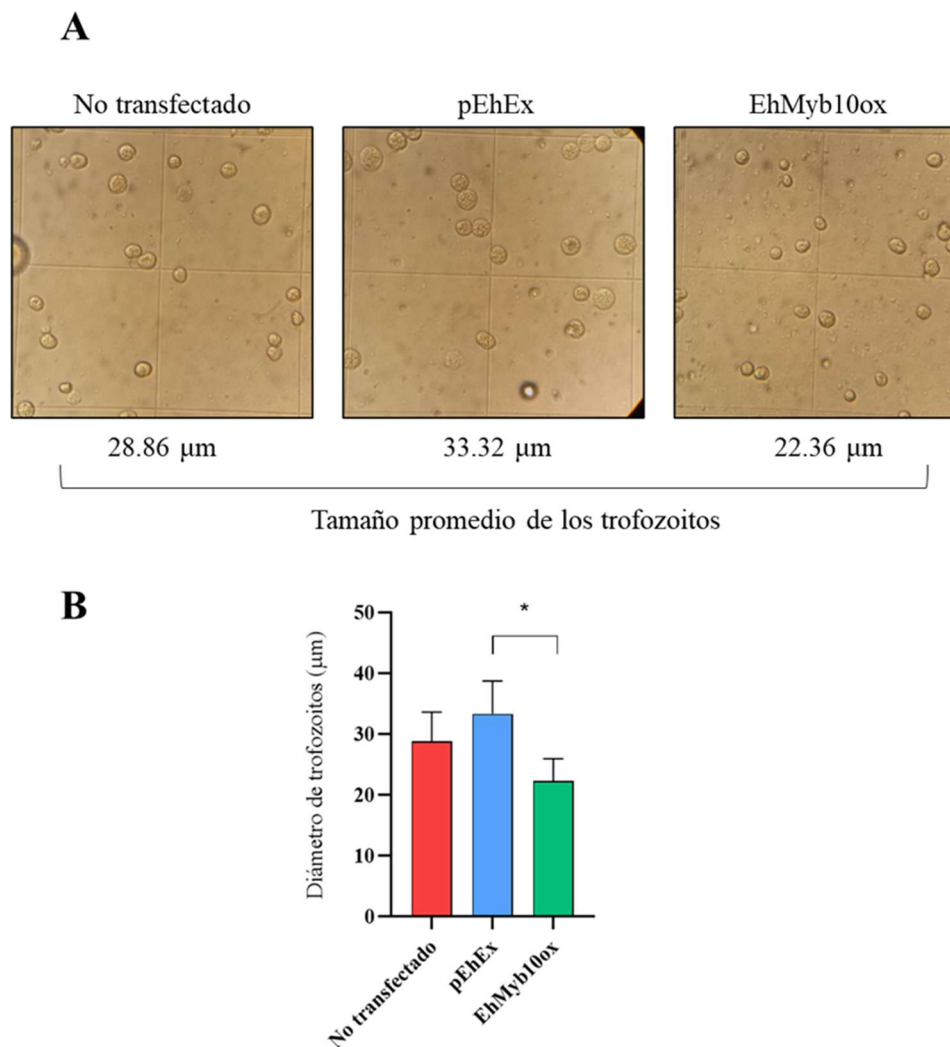


Figura 15. Tamaño de los trofozoítos que sobreexpresan o no EhMyb10. A) Imágenes de los diferentes grupos de trofozoítos tomadas por microscopía de luz (300x). **B)** Gráfica del promedio de los tamaños de los trofozoítos de los diferentes grupos (* $p < 0.0001$). (n=50 de cada grupo).

Estos resultados resultan interesantes, ya que observamos que los trofozoítos EhMyb10ox presentan una mayor duplicación y un menor tamaño, lo que podría afectar la capacidad de virulencia de este protozorio. Es por ello que decidimos analizar algunas de las principales propiedades de virulencia de este parásito, como adhesión, eritrofagocitosis, citopatogenicidad y migración.

8.7 Adhesión de trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10

La adhesión es el primer mecanismo de interacción con el huésped, gracias a que en general los parásitos protozoos utilizan sus proteínas de membrana para la interacción con los receptores epiteliales del huésped (Di Genova *et al.*, 2016). Por ello se evaluó la capacidad de adherencia de los trofozoítos pEhEx y EhMyb10ox a eritrocitos humanos. En estos ensayos observamos que los trofozoítos de la condición pEhEx presentaban una menor cantidad de eritrocitos adheridos en comparación con nuestra condición que sobreexpresa a EhMyb10, en la cual observamos un cúmulo de eritrocitos adheridos a un solo trofozoito (Figura 16A).

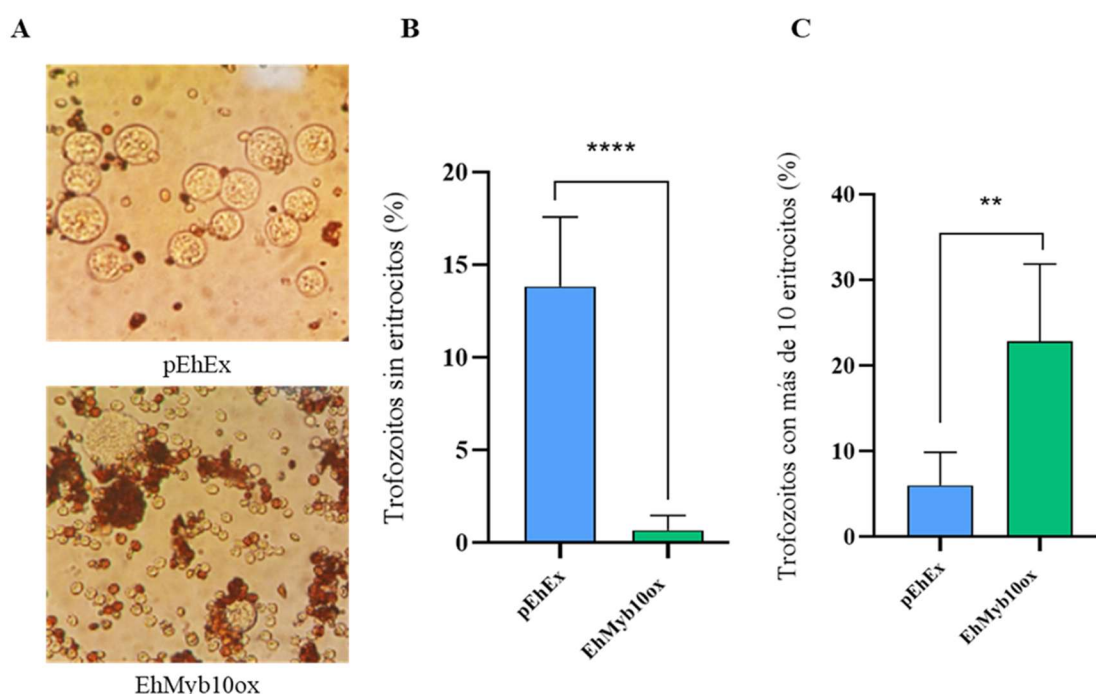


Figura 16. Ensayos de adhesión de eritrocitos a trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10. A) Trofozoítos incubados con eritrocitos por 2 min en hielo (1:5) y teñidos con diaminobencidina observados por microscopía óptica (300x) B) Porcentaje de trofozoítos sin eritrocitos (****, $p < 0.0001$) y C) Porcentaje de trofozoítos con más de 10 eritrocitos adheridos (**, $p < 0.05$). (n=300).

Así mismo, el porcentaje de trofozoítos sin eritrocitos adheridos es mayor para pEhEx (13.83%) con respecto a la condición EhMyb10ox, donde solo el 0.66% de los trofozoítos analizados no presentaban eritrocitos adheridos (Figura 16 B). Aunado a esto, observamos que en la condición EhMyb10ox, el 22.83% de los trofozoítos presentaban más de 10 eritrocitos adheridos, mientras que para pEhEx tan sólo el 6% de los casos adhirieron más de 10 eritrocitos (Figura 16 C).

8.8 Migración de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10

La migración celular es un proceso biológico crucial para diversas funciones fisiológicas que involucran la reorganización del citoesqueleto y que está relacionada con la patogenicidad del parásito. Debido a ello, determinamos la capacidad de migración de trofozoítos que sobreexpresan a la proteína EhMyb10. En estos ensayos observamos que un mayor número de trofozoítos del grupo EhMyb10ox migran a la parte inferior de la cámara transwell en comparación con la condición pEhEx (Figura 17).

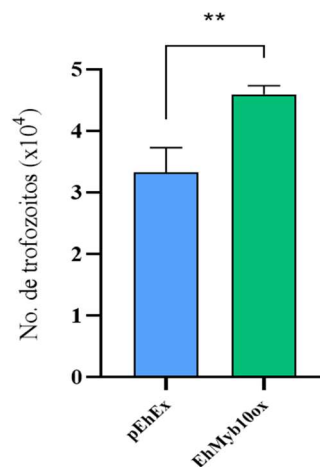


Figura 17. Migración celular de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10. Gráfico del número de trofozoítos que migraron a la parte basal de cámaras transwell (8 μ m) después de 3 h de incubación con suero como atrayente (por triplicado biológico) ($p < 0.05$).

8.9 Eritrofagocitosis

Una vez internalizado en el intestino grueso, el parásito microaerófilo *E. histolytica* fagocita, células del huésped como leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, entre otras. Por ello, la fagocitosis desempeña un papel esencial en el crecimiento, constituyendo uno de los determinantes claves de su virulencia (Guillen 1993).

En este contexto, también realizamos ensayos de eritrofagocitosis a diferentes intervalos de tiempo y observamos que, transcurridos los 10 min de interacción, la condición EhMyb10ox mostró una mayor capacidad de fagocitar eritrocitos en comparación con el control pEhEx, corroborando lo observado en el ensayo de adhesión donde, transcurridos los 2 min, EhMyb10ox presentaba un cúmulo de eritrocitos adheridos, es decir, que la condición que sobreexpresa EhMyb10ox presenta un comportamiento más virulento (Figura 18A y B). Aunque en todos los tiempos analizados se observa una tendencia mayor en la cantidad de eritrocitos fagocitados en la condición EhMyb10ox, solamente se observó una diferencia significativa a los 10 min del ensayo. Esto probablemente se deba a que el efecto ocurre durante la interacción inicial del trofozoíto con los eritrocitos.

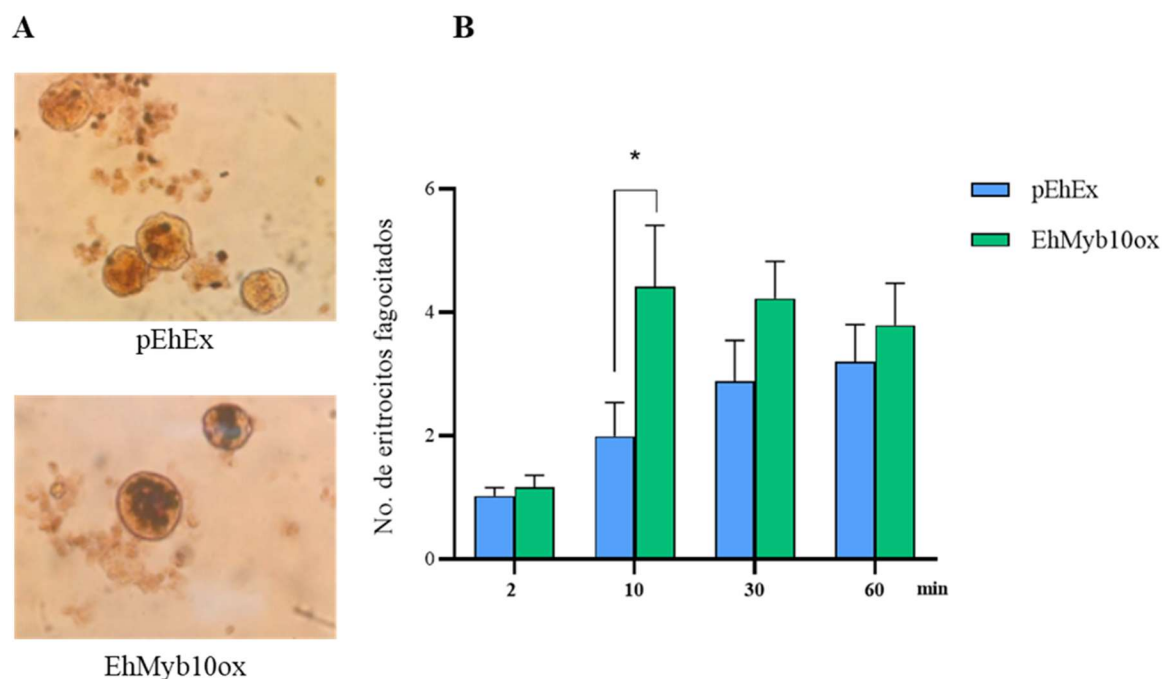


Figura 18. Eritrofagocitosis en los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10 **A)** Imágenes de trofozoítos con 10 min de eritrofagocitosis en cada condición (300x). **B)** Gráfica del número de los eritrocitos fagocitados en diferentes intervalos de tiempo (2, 10, 30 y 60 min) a una relación 1:25 determinados por conteo de 100 trofozoítos por triplicado (*, $p < 0.05$). (n=300).

8.10 Trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 y el daño citopático de células epiteliales

Otra de las propiedades de virulencia característica de *E. histolytica* es generar daño a las células del hospedero para invadir la mucosa intestinal y ocasionar colitis amebiana.

A esta propiedad se le denomina citopatogenicidad y es llevada a cabo por la expresión de múltiples proteínas proteolíticas como amebaporos o proteasas (Stanley *et al*, 2003) Para determinar la capacidad citopática de los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 sobre una monocapa de células epiteliales MDCK, Se llebo acabo la interacción durante 30 min, de los trofozoítos transfectados de los grupos de estudio pEhEx o Ehmyb10ox y las células MDCK. Una vez concluido el ensayo se analizó el daño celular mediante la tinción de la monocapa residual con azul de metileno. En estos ensayos observamos que los trofozoítos pEhEx dañaron la monocapa un 16.59% mientras que la condición que sobreexpresa EhMyb10 degradó más del 64.69 % de la monocapa, siendo significativamente mayor que pEhEx, lo que indica que el cultivo EhMyb10ox tiene una mayor actividad citopática (Figura 19A y B).

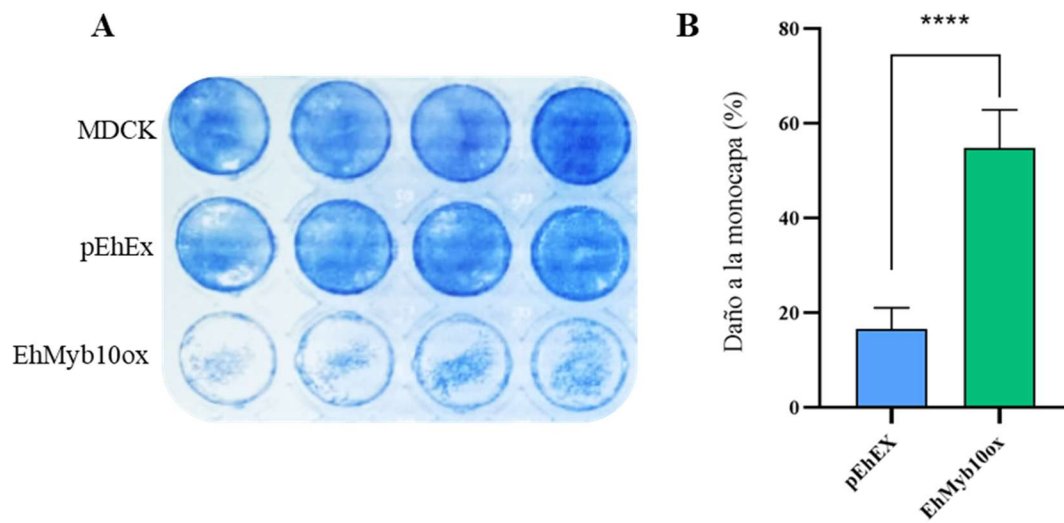


Figura 19. Efecto citopático sobre células epiteliales de trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10. A) Las monocapas de MDCK crecieron a confluencia y se incubaron con (150,000) trofozoítos transfectados establemente con los vectores pEhEx o pEhEx-*ehmyb10*. B) La destrucción de las células se evaluó mediante tinción de azul de metileno de la monocapa restante. El colorante eluido se cuantificó mediante la absorbancia a 595 nm (****, $p < 0.0001$) (Los ensayos se realizaron por octuplicado).

En conjunto, nuestros resultados indican que los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 presentan un fenotipo más virulento, ya que se dividen más rápidamente, tienen una mayor movilidad, mayor capacidad de adhesión, fagocitan más eritrocitos a tiempos cortos (10 min) y presentan una mayor citopatogenicidad. Debido a estos resultados, decidimos analizar el nivel de expresión de EhADH112 en los trofozoítos de la condición EhMyb10ox. EhADH112 es una proteína caracterizada como una molécula de superficie

de *E. histolytica* que participa en algunas propiedades de virulencia como adhesión, eritrofagocitosis, entre otras (Zanatta *et al.*, 2024).

En este trabajo observamos por medio de ensayos de WB que hay una mayor abundancia de la proteína en EhMyb10ox en comparación con nuestro control pEhEx, utilizando actina como control de carga, ya que un anticuerpo anti-EhADH112 inmunodetectó 3 bandas con distintos pesos moleculares (~45, ~60 y ~112 kDa respectivamente), presentes con mayor intensidad en la condición EhMyb10ox (Figura 20 A). Una vez corroborada la inmunodetección, determinamos la localización de EhADH112 mediante ensayos de inmunofluorescencia y observamos una mayor intensidad de fluorescencia tanto en el núcleo como en el citoplasma, aunque principalmente en la membrana del trofozoíto en nuestra condición sobreexpresada EhMyb10ox (Figura 20 B).

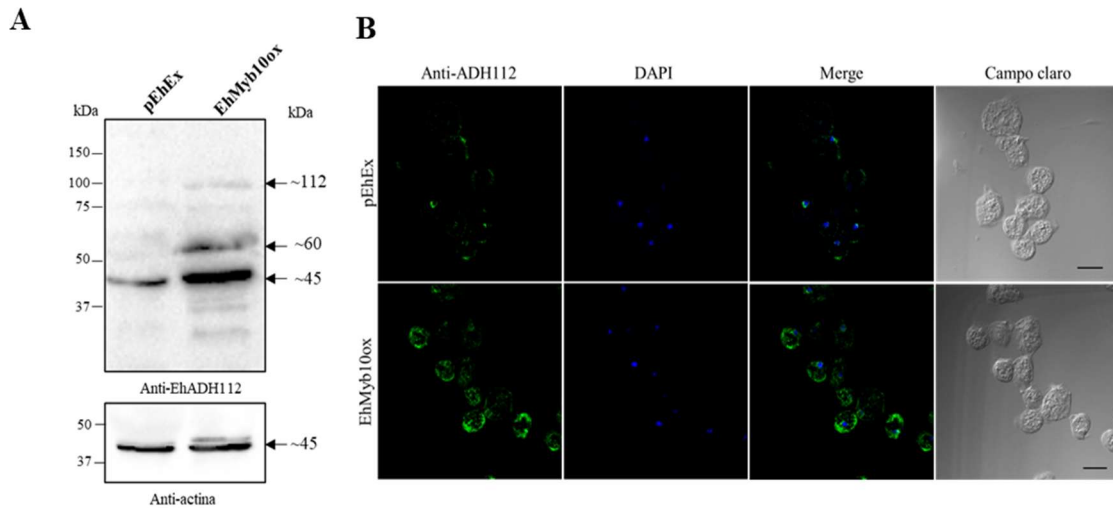


Figura 20. Sobreexpresión de la proteína EhADH112 en la condición EhMyb10ox. A) Extractos totales de proteínas de los diferentes grupos de trozoitos EhMyb10ox o pEhEx se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-EhADH112 y como control de carga anti-actina B) Trofozoítos transfectados con EhMyb10ox o pEhEx, fijados en laminillas con etanol al 100% y procesados para inmunofluorescencia, los cuales fueron incubados con el anticuerpo anti-EhADH112 (1:1000). Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a FITC y los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra negra indica 20 μm.

Una vez que determinamos que la proteína EhADH112 se sobreexpresa en la condición EhMyb10ox por medio de inmunodetección. Se analizó su localización celular mediante un ensayo de inmunofluorescencia para corroborar el aumento en su expresión empleando los anticuerpos, anti-ADH112 y anti-HA, que reconocen a EhMyb10 sobreexpresado. (Figura 21). En la condición pEhEx observamos una escasa fluorescencia con el anticuerpo anti-HA, ya que en esta condición no se sobreexpresa en EhMyb10; sin

embargo, se observó una tinción en la membrana de los trofozoítos de la proteína EhADH112 tal y como se ha reportado (de la Cruz *et al.*, 1990) y de manera interesante en los núcleos de los trofozoítos (Figura 21A).

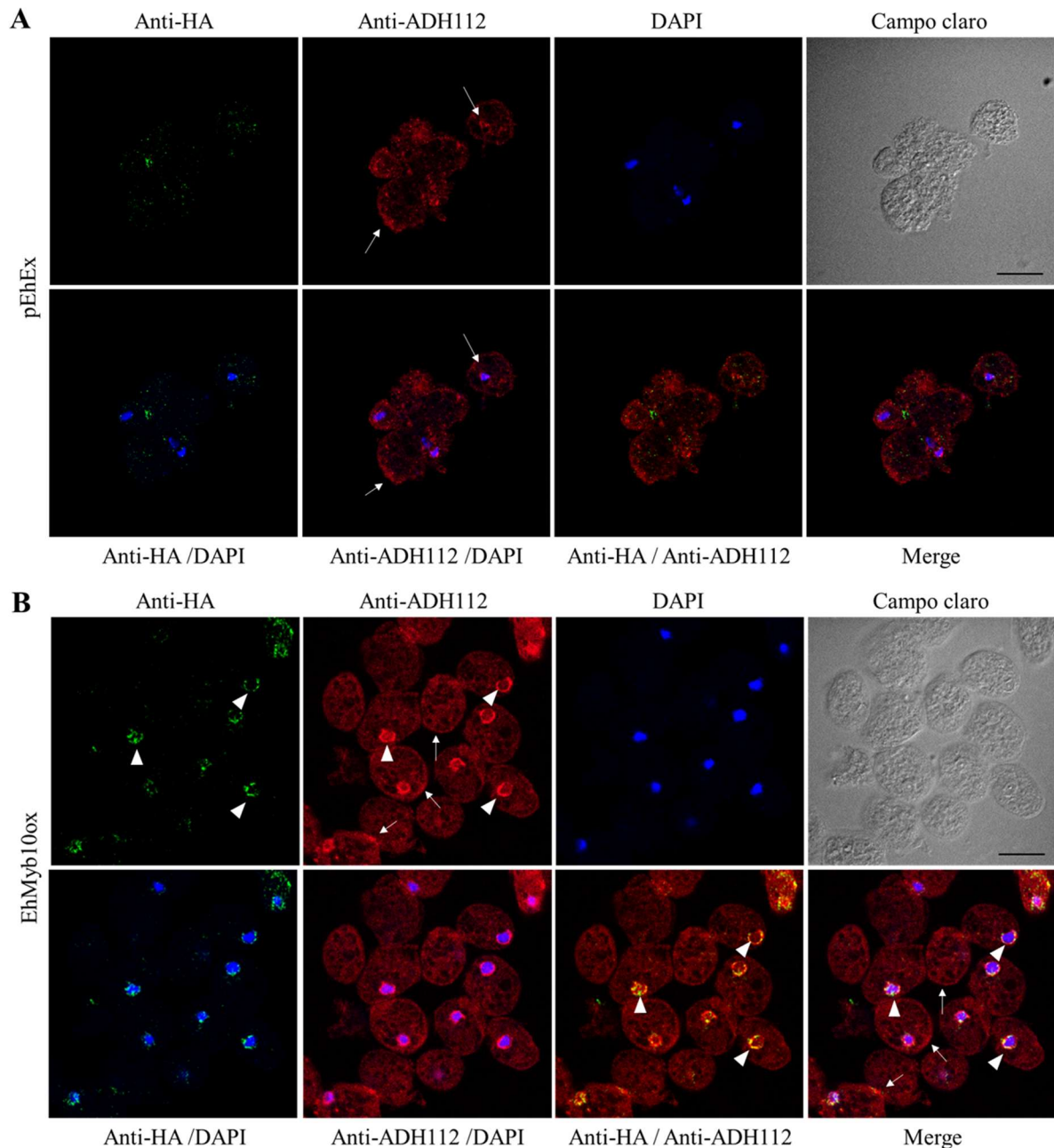


Figura 21. EhADH112 aumenta su expresión y se localiza en el núcleo en los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10. A y B) Trofozoítos transfectados de los grupos pEhEx o EhMyb10ox respectivamente fijados en laminillas con etanol al 100% y procesados para inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-HA (1:1000) y anti-EhADH112. Se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a FITC y los núcleos se tiñeron con DAPI. Las flechas indican la localización de adhesinas en la membrana y las cabezas de flecha indican la localización de adhesinas en la membrana y las cabezas de flecha indican la colocalización de EhADH112 y EhMyb10ox. La barra negra indica 20 μ m.

En la condición EhMyb10ox la tinción de los núcleos en relación a la proteína EhMyb10 es intensa, como se había descrito anteriormente en la figura (12A) (detectada con el anticuerpo anti-HA) y, en el caso de la proteína EhADH112 se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia en la membrana, citoplasma y núcleo (Figura 21B), lo cual coincide con el aumento observado cuando inmunodetectamos a esta proteína. De manera interesante, se observó una colocación de las proteínas EhMyb10 y EhADH112. Estos resultados muestran que el incremento de la proteína EhADH112 en la condición EhMyb10ox podría indicar que el FT EhMyb10 podría regular la expresión del gen *ehadh112*. y además la presencia de EhADH112 en el núcleo podría indicar una nueva función nuclear la cual no ha sido explorada hasta ahora.

8.11 Análisis del transcriptoma de los trofozoítos EhMyb10ox

Finalmente, en este trabajo se realizaron ensayos de RNAseq para determinar los genes que se expresan diferencialmente en la condición EhMyb10ox. Para ello, se obtuvo RNA de los trofozoítos transfectados de los grupos pEhEx o EhMyb10ox por triplicado y este se envió a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, UNAM. Al realizar un análisis por MSD observamos que las muestras pEhEx vs EhMyb10ox presentaban una mayor disimilitud que entre el mismo grupo; esto indicó que existe una evidente diferencia en el comportamiento de los cultivos pEhEx y EhMyb10ox (Figura 22). Dentro de estos análisis por RNAseq, se obtuvieron 6,656 secuencias que corresponden al 81% de los genes reportados para *E. histolytica*. Algunos de estos genes se reprimen o sobreexpresan de manera significativa en la condición EhMyb10ox, sugiriendo que podrían ser genes blancos de este factor de transcripción (Figura 23). Al determinar la cantidad de genes que cambian su expresión de manera significativa (Fold change de ± 1.5 y $p < 0.05$), observamos la sobreexpresión de 64 genes y la represión de 47 genes en la condición EhMyb10ox. Además, observamos que el nivel de sobreexpresión es considerablemente mayor que las diferencias en cuanto a la represión, ya que el mayor nivel de sobreexpresión presentó un valor de 7.76 (EHI_119770), mientras que el máximo valor de represión correspondió a -4.8 (EHI_121820). Entre los genes sobreexpresados observamos principalmente algunos que codifican para proteínas de superficie AIG (tabla 5) y algunas proteínas relacionadas con enquistamiento como proteínas Jacob que conforman la pared del quiste.

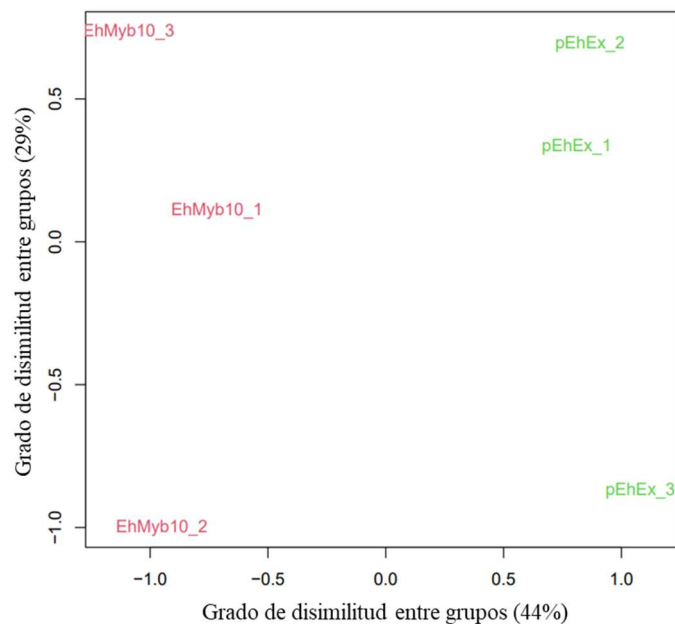


Figura 22. Visualización de disimilitud entre los diferentes grupos analizados mediante el gráfico MDSplot. Comparación del grado de disimilitud de poblaciones distribuidas en dos grupos (pEhEx o EhMyb10ox).

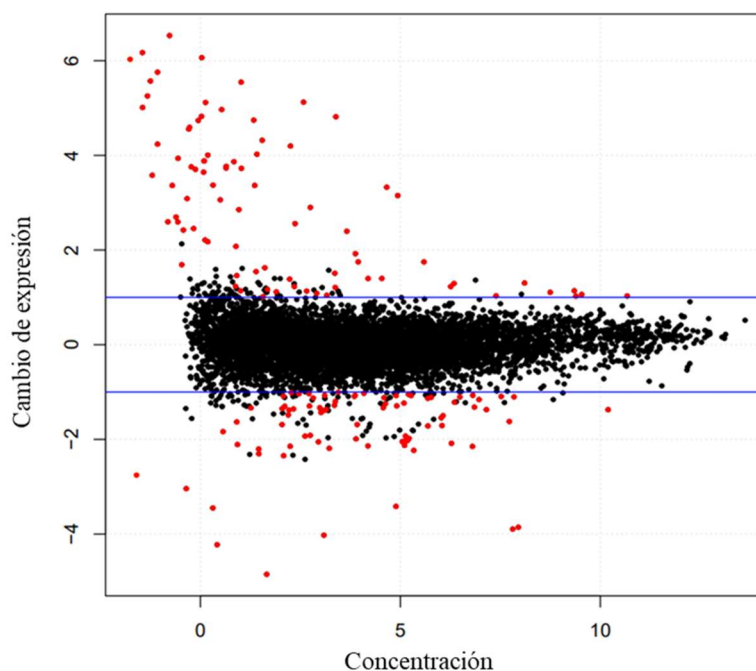


Figura. 23. Volcano plot de los genes expresados diferencialmente en los grupos EhMyb10ox vs pEhEx. Los puntos en rojo corresponden a los genes que modifican su expresión de manera significativa en la condición EhMyb10ox.

Tabla 5. Genes que modifican su expresión en la condición EhMyb10ox obtenidos por RNAseq.

	Gene ID	Fold change	Valor p	Descripción/función
Sobreexpresados	EHI_119770	7.76	1.16 e-04	Proteína de unión a DNA
	EHI_078530	6.47	1.20 e-07	ARNt sintetasa
	EHI_130550	6.19	2.64 e-03	Proteína hipotética
	EHI_176590	6.04	1.46 e-14	Proteína de la familia AIG1, putativa
	EHI_196790	5.78	6.21 e-05	Proteína hipotética
	EHI_176580	5.54	9.64 e-26	Proteína de la familia AIG1, putativa
Reprimidos	EHI_041780	5.52	3.88 e-01	Proteína hipotética
	EHI_121820	-4.81	2.95 e-24	Ribonucleoproteína nuclear pequeña U5 de 40 kDa
	EHI_050900	-4.23	3.90 e-11	Transportador de aminoácidos 1 del sistema N, putativo
	EHI_171750	-4.01	1.37 e-16	Cisteína Sintasa 2, putative
	EHI_179700	-3.92	1.44 e-04	Peptidasa, putativa
	EHI_024230	-3.89	5.76 e-17	Cisteína Sintasa A, putativa
	EHI_160930	-3.85	3.71 e-16	Cisteína Sintasa A, putativa
	EHI_136950	-3.44	7.71 e-05	Proteína de la Familia AIG1, putativa

Por otro lado, entre los genes reprimidos, encontramos aproximadamente 14 genes de 47 que codifican para proteínas involucradas en choque térmico, así como algunas proteínas cisteína sintasas que están involucradas en la vía de síntesis de L-cisteína (tabla 5) que es esencial en varios procesos biológicos de este parásito, ya que se ha observado que la L-cisteína también es utilizada para la síntesis de compuestos con grupo tiol que disminuyen los niveles de ROS intracelular (Jeelani *et al.*, 2014).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo, nos propusimos evaluar el papel que desempeña el factor de transcripción EhMyb10 en trofozoítos de *E. histolytica*. Por ello, primeramente predijimos, mediante un análisis *in silico*, las proteínas que interactúan con EhMyb10. Este análisis mostró que este FT podría tener una fuerte conectividad con proteínas involucradas en la regulación transcripcional, la unión a DNA y elementos estructurales de la cromatina y en la regulación de los ribosomas. Entre las proteínas con las que se predice interacción se encuentran las proteínas con dominio WD. Este dominio funciona como un sitio de anclaje para otras proteínas y de esta manera participa en procesos tan variados como la regulación de la transcripción mediando la unión de desacetilasas de histonas, el tráfico vesicular, la fagocitosis, incluso promoviendo el ensamblaje de componentes del citoesqueleto (Smith, 2013). En dicho análisis también se predijo la unión de EhMyb10 a otros FT, por lo que podría regular genes involucrados en virulencia, así como en el crecimiento, ciclo celular y desarrollo de *E. histolytica*. Finalmente, otras de las proteínas que se predijeron interactúan con EhMyb10 y están implicadas en la biogénesis de ribosomas. A este respecto se ha observado que la biogénesis de los ribosomas ocurre en el nucleolo y se encuentra relacionada con el crecimiento y la división celular (Hernández *et al.*, 2006). Inclusive, cuando se altera la composición de los ribosomas, el crecimiento celular y la proliferación de los FT se ven afectados (Beavan *et al.*, 2025). Asimismo, por medio de ensayos de pull-down, Aguirre Casimiro (2023) identificó entre las proteínas que se unen a rEhMyb10 a proteínas remodeladoras de cromatina, así como proteínas involucradas en la biogénesis de ribosomas, lo que corroboró en parte algunos de los resultados obtenidos en nuestra predicción. Estas interacciones sugieren una integración funcional entre la maquinaria que regula la expresión génica y los componentes estructurales del núcleo, lo que podría reflejar una coordinación espacial y temporal en los procesos de transcripción y traducción en respuesta a señales celulares específicas.

En cuanto a los genes que podrían ser regulados por EhMyb10, Saldivar Anaya en su trabajo de maestría (2022), buscó el ERM en los 8,201 promotores de genes de *E. histolytica* y determinó que 812 genes presentan este elemento y por lo tanto podrían ser regulados por EhMyb10, ya que previamente se demostró que la proteína EhMyb10 recombinante se puede unir de forma específica al ERM (Meneses *et al.*, 2010).

Algunos de estos genes codifican para proteínas implicadas en transducción de señales, transporte vesicular, respuesta a choque térmico y virulencia. Estos resultados nos permiten proponer que EhMyb10 no solo podría participar en la regulación de la expresión génica, sino que también podría desempeñar un papel estructural clave en la organización del núcleo y la coordinación de procesos fundamentales como la transcripción, el remodelado de la cromatina y la función ribosomal.

Debido a estos antecedentes y para determinar si EhMyb10 participa en la regulación de la virulencia de *E. histolytica*, decidimos sobreexpresar a esta proteína utilizando un vector que permite la sobreexpresión constitutiva y abundante en los trofozoítos de *E. histolytica*, del gen blanco bajo el control de la región promotora del gen cisteína sintasa, (Saito-Nakano *et al.*, 2004). Además, este plásmido permite la selección de los trofozoítos transfectados con el antibiótico análogo a neomicina (G-418), ya que contiene el gen que codifica para la Neomicina Fosfotransferasa II bajo el control del promotor de actina. Este vector además contiene una etiqueta de hemaglutinina que se acopla a la proteína sobreexpresada en el extremo amino-terminal, lo que permitirá distinguirla de la proteína endógena por medio de anticuerpos específicos. Este plásmido ya ha sido ampliamente reportado para la sobreexpresión de factores de transcripción y determinar su papel en la regulación transcripcional de genes relacionados con virulencia y enquistamiento en *E. histolytica* (Saito-Nakano *et al.*, 2004). En otros trabajos se ha analizado el efecto de la sobreexpresión de factores de transcripción de *E. histolytica*, por ejemplo, Ehrenkauf y col., (2009) sobreexpresaron a EhMybdr, una proteína Myb de solo un repetido (1R-Myb) que comparte la misma localización y función que EhMyb10. En el perfil de RNAseq de trofozoítos vs quistes, se observó que *ehmybdr* aumenta hasta 5 veces su expresión. Al sobreexpresar a EhMybdr se observó un incremento de hasta 40 veces en los niveles del gen con respecto a su control utilizando una concentración de 24 µg/mL de G-418 (Ehrenkauf *et al.*, 2009). Los perfiles de RNAseq de trofozoítos que sobreexpresan EhMybdr muestran 117 genes sobreexpresados y 88 reprimidos, de los cuales 40 de los 117 sobreexpresados se asocian con el enquistamiento y 30 de 88 reprimidos coinciden con los perfiles involucrados en el enquistamiento, respectivamente.

Así mismo, Abhanyankar y cols. (2008) sobreexpresaron la proteína nuclear EhHMGB1, la cual reconoce secuencias de DNA en regiones enhancers modulando la expresión de

genes (Thomas, 2001). Al sobreexpresar a EhHMGB1 se obtuvieron niveles de hasta 100 veces mayores con respecto a la condición basal conduciendo a la modulación de 33 genes implicados en diversas funciones celulares, de los cuales algunos están directamente implicados en virulencia, por ejemplo, dos de las 5 lectinas de cadena ligera que conforman la lectina Gal/GalNac, así como una cisteína proteasa (EhCPA7) (Abhanyankar *et al.*, 2008). Aunque en estos dos ejemplos los niveles de sobreexpresión son considerablemente altos, en nuestros grupos experimentales observamos un nivel máximo de sobreexpresión de *ehmyb10* ~ 2.5 con respecto a la condición control, utilizando una presión de selección de 50 $\mu\text{g/mL}$ de G-418. Cabe mencionar que Castillo Mercado (Tesis de Maestría, 2024) sobreexpresó el gen *ehmyb10* de manera transitoria y observó un valor semejante de sobreexpresión a las 72 h de transfección (~ 3.0). Estos niveles tan bajos de expresión podrían deberse a que este factor de transcripción podría reprimir a su propio promotor o bien inducir la expresión de genes involucrados en su silenciamiento. Por ello sería interesante realizar un análisis de silenciamiento génico que nos permita indagar más acerca del mecanismo de regulación de EhMyb10 y para determinar si es esencial en *E. histolytica*.

De manera similar, en un trabajo por Kim y col. (2022) se determinó el efecto del FT Myb denominado GIMyb2 de *Giardia lamblia*, un protozoario responsable de la giardiasis intestinal. En estos ensayos se observó que GIMyb2 está involucrado en el proceso de enquistamiento, ya que, al silenciarlo, los trofozoítos pierden la capacidad de enquistarse en comparación con el vector vacío. Al comparar los genes regulados por este FT por RNAseq se observó que al menos 18 genes involucrados en enquistamiento están afectados cuando se silencia a GIMyb2 (Kim *et al.*, 2022). Por otro lado, al sobreexpresar a este FT se obtuvieron valores de 2.7 veces en comparación con la condición control, sin embargo, este incremento es suficiente como para inducir un efecto a nivel celular, ya que los valores de expresión de proteínas involucradas en enquistamiento, reguladas por GIMyb2 aumenta hasta 3.8 veces (Huang *et al.*, 2008).

En cuanto a EhMyb10, inmunodetectamos a la proteína por ensayos de WB en pesos moleculares de ~ 25 y ~ 40 kDa, en mayor intensidad en la condición EhMyb10ox que pEhEx; sin embargo, el peso teórico de la proteína es de 17.9 kDa (21 kDa con la etiqueta de HA). Esto puede deberse a que EhMyb10 presenta sitios susceptibles a fosforilación,

ubiquitinación y sumoilación (14, 7 y 5 respectivamente) (Aguirre-Casimiro 2023). Estas modificaciones podrían ser importantes para regular la función que desempeña este FT en el trofozoíto, ya que se ha determinado que algunas proteínas son modificadas postraduccionalmente para mediar su entrada al núcleo celular (Beltrao *et al*, 2013). Por otro lado, este FT podría formar dímeros o complejos proteicos, lo cual podría explicar el reconocimiento del anticuerpo en bandas de alto peso. Para corroborar esto, se realizó un ensayo empleando geles desnaturalizantes con urea en el que observamos un enriquecimiento de una banda de 25 kDa. En otros organismos se ha determinado que algunas proteínas con dominios Myb pueden asociarse para mediar la unión al ADN (Padmanaban *et al.*, 2024). Al realizar los ensayos de IFI empleando el anticuerpo anti-HA corroboramos que la proteína sobreexpresada se localiza en el núcleo de la célula, lo cual es concordante con su posible función como regulador transcripcional.

Posteriormente, determinamos el efecto funcional de la sobreexpresión de EhMyb10 en los trofozoítos de *E. histolytica*. Para ello, determinamos la tasa de crecimiento de los trofozoítos y la comparamos con las de trofozoítos no transfectados y transfectados con el vector vacío. En estos ensayos observamos una mayor tasa de crecimiento y que además el tiempo de los trofozoítos transfectados con EhMyb10ox es menor que el de los otros grupos. Estos resultados sugieren que el FT EhMyb10 podría regular genes que participan en la proliferación y diferenciación celular, como se ha descrito para c-Myb en *H. sapiens* (Oh y Reddy 1999). De manera interesante, observamos también que los trofozoítos del grupo EhMyb10ox tienen un menor tamaño que los grupos analizados (wt y vacío). Esto pudiese estar relacionado con el probable papel de EhMyb10 en la biogénesis de los ribosomas, ya que se ha observado que una mayor biogénesis de ribosomas podría modificar la tasa de proliferación y el tamaño celular (Beavan *et al.*, 2025).

En este trabajo, además analizamos el efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 sobre las propiedades de virulencia de los cultivos EhMyb10ox. Las propiedades seleccionadas son las que nos permitieron evaluar la capacidad de infligir el daño a las células previamente descritas (Guillén, 2023). Primeramente, evaluamos la capacidad de los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10 (grupo EhMyb10ox) a adherirse a eritrocitos; y observamos que la condición EhMyb10ox presentó una mayor capacidad de adherir eritrocitos ya que

solo el 0.66% de los casos evaluados no presentó eritrocitos adheridos, esto nos sugiere que la expresión de algunas proteínas de superficie pudiera estar modificadas en el grupo EhMyb10ox. Cabe señalar que las moléculas primarias implicadas en el proceso de invasión intestinal son lectinas y el complejo EhCPADH112, un complejo formado por *ehcp112*, que codifica para una cisteína proteasa de (~50 kDa) y *ehadh112*, que codifica para una adhesina de (~75 kDa) (García-Rivera *et al.*, 1990; 1997). En congruencia a estos resultados, los trofozoítos EhMyb10ox expresan una mayor cantidad de la adhesina EhADH112, ya que observamos por inmunofluorescencia que esta proteína estaba localizada en membrana (Fig. 20 B y 21 B), además de citoplasma y probablemente en núcleo. Esta proteína ha sido caracterizada y se ha reportado que participa en múltiples propiedades de virulencia como adhesión, fagocitosis, formación de absceso hepático (Zanatta *et al.*, 2024). Además, esta proteína se asocia a una cisteína proteinasa (EhCP112), lo que le confiere su peso molecular de 112 kDa que contribuye a la función citopática del trofozoíto (García-Rivera *et al.*, 1997) lo que podría explicar que el cultivo EhMyb10ox destruya aproximadamente el 65% de la monocapa en comparación con el 25% provocado por la condición pEhEx (Figura 19), sin embargo, sería importante realizar ensayos de WB para determinar los niveles de expresión de la proteasa EhCP112 en nuestros grupos de trofozoítos.

Por otro lado, en el análisis transcriptómico identificamos al menos 10 proteínas de superficie AIG1 sobreexpresadas en la condición EhMyb10ox. Estas proteínas participan en la formación de protuberancias en la membrana plasmática y se ha visto que están relacionadas con el proceso de adhesión del trofozoíto a la célula blanco, ya que al silenciarlas disminuye la capacidad de adhesión del trofozoíto (Lozano-Mendoza *et al.*, 2023).

Sería interesante realizar análisis proteómicos que nos permitan identificar las proteínas de la membrana plasmática y así mismo determinar cuáles están reguladas por EhMyb10.

Por otro lado, la migración forma parte de los procesos de virulencia de *E. histolytica*, ya que inicia su proceso de invasión tisular mediante la liberación de mediadores proteolíticos y citosólicos para invadir y penetrar la mucosa intestinal. La migración está mediada por la dinámica del citoesqueleto de actina por estímulos o señales que se asemejan a la condición *in vivo* (Aguirre García *et al.*, 2005). En nuestro ensayo, este

estímulo está representado por el suero como molécula quimioatrayente y observamos una evidente mayor capacidad para migrar por los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10, donde aproximadamente el 30% de las amibas migraron a la cámara basal, mientras que en la condición pEhEx solamente el 20% responde al estímulo del suero. Sería interesante complementar estos ensayos con análisis de la capacidad de producción de absceso hepático en hámsters utilizando los cultivos EhMyb10ox.

Analizamos también el proceso de eritrofagocitosis de trofozoítos EhMyb10ox a diferentes tiempos, ya que es esencial en *E. histolytica* para la adquisición de nutrientes. De acuerdo con nuestro ensayo de eritrofagocitosis, corroboramos la capacidad de fagocitar por parte de nuestro grupo EhMyb10ox transcurridos los 10 min, evidenciando un comportamiento más virulento en comparación con pEhEx. Esto puede deberse a que existe una mayor adhesión de los eritrocitos a la superficie de trofozoítos que sobreexpresión EhMyb10, por lo tanto, el proceso de fagocitosis a tiempos tempranos ocurriría de una manera más ágil, ya que al momento de graficar evidenciamos más eritrocitos en este tiempo, mientras que a tiempos largos las diferencias entre los grupos no son estadísticamente significativas. Dichos procesos dan lugar al tráfico vesicular, en el que participan una gran cantidad de moléculas, que le permiten la reorganización del citoesqueleto, el transporte de partículas internalizadas en estructuras conocidas como endosomas tempranos y tardíos que dan lugar a los cuerpos multivesiculares y lisosomas donde las moléculas son finalmente degradadas (Saksena *et al.*, 2007).

Los datos obtenidos en este trabajo evidencian el papel de EhMyb10 en la regulación de la virulencia de este parásito lo cual correlaciona con los estudios transcriptómicos en donde se observa que el gen *ehmyb10* se sobreexpresa en condiciones relacionadas con la colonización intestinal, con la interacción del parásito con las células epiteliales del colon y en trofozoítos que son virulentos (Gilchrist *et al.*, 2009; Hon *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2016). Sería interesante determinar si en el perfil de casos sintomáticos y asintomáticos de la amebiasis, EhMyb10ox es una de las proteínas que se sobreexpresa y está relacionada a cuadros clínicos más graves de amebiasis, los resultados de este trabajo nos permitieron determinar que EhMyb10 es un FT relevante para la virulencia de *E. histolytica* ya que su sobreexpresión potencia las propiedades de patogenicidad.

Finalmente, en este trabajo se realizó un análisis transcriptómico de los trofozoítos que sobreexpresan el factor de transcripción EhMyb10 mediante secuenciación de RNA (RNA-seq). A partir de este análisis, se identificaron 101 genes diferencialmente expresados, 64 con sobreexpresión y 47 reprimidos, lo que representa aproximadamente el 1.2% de los genes codificantes del genoma de *Entamoeba histolytica* (estimado en ~8,200 genes). De manera similar, estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de EhMybdr afecta la expresión de alrededor del 2.4% del transcriptoma. Estos resultados podrían contribuir a explicar la abundancia de genes de la familia Myb en *E. histolytica*, sugiriendo que distintos miembros podrían estar involucrados en la regulación específica de conjuntos de genes asociados a diversas funciones celulares.

10. CONCLUSIONES

- El FT EhMyb10 se sobreexpresó en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y se localizó en núcleo y citoplasma.
- Los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10 aumentaron su tasa de crecimiento y modificaron su tamaño.
- Los trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 presentaron un aumento en las propiedades de virulencia analizadas: adhesión, migración, eritrofagocitosis y citopatogenicidad.
- La adhesina EhADH112 aumentó su expresión en los trofozoítos que sobreexpresan a EhMyb10, localizándose en membrana e interesantemente en núcleo.
- La sobreexpresión de EhMyb10 modificó la expresión de 101 genes (64 sobreexpresados y 47 reprimidos), entre los genes sobreexpresados se encuentra proteínas AIGs que están relacionadas con la virulencia de *E. histolytica*.
- Estos resultados muestran que el factor de transcripción EhMyb10 podría estar involucrado en la regulación de la virulencia de este parásito.

11. REFERENCIAS

1. Abhyankar, M. M., Hochreiter, A. E., Hershey, J., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O., Sobral, B. W., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr, & Gilchrist, C. A. (2008). Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryotic cell*, 7(9), 1565–1572. Alavi K. A. (2007). Amebiasis. *Clinics in colon and rectal surgery*, 20(1), 33–37.
2. Ali, I.K. (2015) Intestinal amebae. *Clin. Lab. Med.*, 35, 393–422.
3. Arratia, Jenny, & Aguirre, Jesús. (2013). Myb-type transcription factors, a family of regulators of cellular differentiation conserved in eukaryotic organisms. *TIP. Journal specialized in chemical-biological sciences*, 16(2), 98-108.
4. Arturo Aguilar-Rojas, Jean-Christophe Olivo-Marin, Nancy Guillen, (2016) The motility of *Entamoeba histolytica*: finding ways to understand intestinal amoebiasis, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 34, Pages 24-30, ISSN 1369-5274.
5. Aslam S, Bhattacharya S, Bhattacharya A. (2012) The Calmodulin-like calcium binding protein EhCaBP3 of *Entamoeba histolytica* regulates phagocytosis and is involved in actin dynamics. *PLoS Pathog*;8(12): e1003055.
6. Aucott JN, Scarpa A, Salata RA. (1991) Characterization of calcium channel forming activity of *Entamoeba histolytica* in model biological membranes. *Lab Invest*.;65: 518–524.
7. Betanzos A, Javier-Reyna R, García-Rivera G, Bañuelos C, González-Mariscal L, Schnoor M, Orozco E. The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One*. 2013 jun 7;8(6): e65100. doi: 10.1371/journal.pone.0065100. PMID: 23762290; PMCID: PMC3676397.
8. Beavan, A. J. S., Thuburn, V., Fatkhullin, B., Cunningham, J., Hopes, T. S., Dimascio, E., Chan, T., Zhao, N., Norris, K., Chau, C., Vasconcelos, E. J. R., Wood, A., Whitehouse, A., Actis, P., Davies, B., Fontana, J., O'Connell, M. J. Bissig, C.; Gruenberg, J. (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol*. 2014, 24, 19–25.
9. Bruchhaus, I.; Jacobs, T.; Leippe, M.; Tannich, E. (1996) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Differences in Numbers and Expression of Cysteine Proteinase Genes. *Mol. Microbiol.*, 22, 255–263.
10. Castillo Mercado, C (2024) Efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción EhMyb10 y el factor de splicing EhCDC5-like sobre el transcriptoma de *Entamoeba histolytica*. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de la Ciudad de México] Repositorio Institucional.
11. Chacín-Bonilla, L. (2013). Amebiasis: clinical, therapeutic and diagnostic aspects of the infection. *Revista Médica de Chile*, 141(5), 609-615.

12. Clark, C. G., Alsmark, U. C., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., eber, 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., Hall, N. (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in parasitology*, 65, 51–190.
13. Cornick S, Moreau F, Chadee K. (2016). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 evokes mucin exocytosis from colonic goblet cells via $\alpha\beta 3$ integrin. *PLoS Pathog* 12: e1005579.
14. Cuellar, P., Hernández-Nava, E., García-Rivera, G., Chávez-Munguía, B., Schnoor, M., Betanzos, A., & Orozco, E. (2017). *Entamoeba histolytica* EhCP112 Dislocates and Degrades Claudin-1 and Claudin-2 at Tight Junctions of the Intestinal Epithelium. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 372.
15. De Salud, S. (s. f.). (2025) *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información.* gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-387843>
16. Di Cristanziano V, Farowski F, Berrilli F, et al., (2021) Analysis of human gut microbiota composition associated to the presence of commensal and pathogen microorganisms in Côte d’Ivoire. *Microorganisms*. Aug 18;9(8):1763.
17. Di Genova, BM; Tonelli, RR (2016) Infection strategies of pathogenic intestinal parasites and host cell responses. *Front. Microbiol*, 7.
18. Doolittle WF. (2018) We simply cannot go on being so vague about ‘function’. *Genome Biol*; 19:223.
19. Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 15(10), 573–581.
20. Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology*, 11(6), 898-910.
20. Eichinger D. (2001). Encystation in parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology*, 4(4),421–426. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00229-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00229-0)
21. Espinosa-Cantellano ME, Martínez-Palomo AM. (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev*; 13:318-31.
22. Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., & Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal*, 66(1), 94-116.

23. Fonte-Galindo L. (2000) Amebiasis: current approaches to its diagnosis, treatment and control. Havana: Editorial Elfos Scientae.
24. Forsberg, H., Hammar, M., Andreasson, C., Moliner, A., & Ljungdahl, P. O. (2001). The null mutation suppressors *ssy1* and *ptr3* define novel amino acid sensor-independent genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158,973-988.
25. García-Rivera G, Arroyo R, Mena R, Luna J, Orozco E. (1997) Involvement of the 112 kDa adhesin in *Entamoeba histolytica* phagocytosis. No:166-7. PMID: 9033056.
26. Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., ... & Petri Jr, W. A. (2006). Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(2), 163-176
27. Greber, B. J., & Nogales, E. (2019). The Structures of Eukaryotic Transcription Pre-initiation Complexes and Their Functional Implications. En *Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry* (pp. 143-192).
28. Guillén N. (2023) Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence*. Dec;14(1):2158656. doi: 10.1080/21505594.2022.2158656. PMID: 36519347; PMCID: PMC9815260.
29. Gunther, J.; Shafir, S.; Bristow, B.; Sorvillo, F. (2007) Short report: Amebiasis-related mortality among United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011, 85, 1038–1040.
30. Hernández Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L. (2019) Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. January; 23 (1): 397-401.
31. Hon CC, Weber C, Sismeiro O, Proux C, Koutero M, Deloger M, Das S, Agrahari M, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, Bhattacharya A, Guillen N. (2013) Quantification of stochastic noise of splicing and polyadenylation in *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res*. Feb 1;41(3):1936-52. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23258700; PMCID: PMC3561952.
32. Huang, Y. C., Su, L. H., Lee, G. A., Chiu, P. W., Cho, C. C., Wu, J. Y., & Sun, C. H. (2008). Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, 283(45), 31021–31029.
33. Iyer LM, Anantharaman V, Wolf MY, Aravind L. (2008) Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol* Jan;38(1):1-31. Epub 2007 Sep 15. PMID: 17949725.
34. Jeelani, G., Sato, D., Soga, T., Watanabe, H., & Nozaki, T. (2014). Mass spectrometric analysis of L-cysteine metabolism: physiological role and fate of L-cysteine in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *mBio*, 5(6), e01995.

35. 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(1).
36. Kim, J., Park, E. A., Shin, M. Y., & Park, S. J. (2022). Identification of target genes regulated by encystation-induced transcription factor Myb2 using knockout mutagenesis in *Giardia lamblia*. *Parasites & vectors*, 15(1), 360.
37. Kranz, HD, Scholz, K. y Weisshaar, B. (2000) Los genes similares al oncogén *c-MYB* que codifican tres repeticiones MYB se encuentran en todos los linajes de plantas principales. *Planta J.* 21, 231 – 235.
38. Krishnan S, Horowitz S, Trievel RC. (2011) Structure and function of histone H3 lysine 9 methyltransferases and demethylases. *Chembiochem.* Jan 24;12(2):254-63. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21243713.
39. Kumar S, Aslam S, Mazumder M, Dahiya P, Murmu A, Manjasetty BA, Zaidi R, Bhattacharya A, Gourinath S. (2014) Crystal structure of the calcium-binding protein-5 of *Entamoeba histolytica* and its involvement in the initiation of phagocytosis of human erythrocytes.
40. Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T. (2018). The human transcription factors. *Cell*, 172(4), 650-665.
41. Lipsick J. S. & Wang D.M. (1999). Transformation by v-Myb. *Oncogene*, 18(19), 3047-3055.
42. Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, *et al.*, (2005) El genoma del parásito protista *Entamoeba histolytica*. *Naturaleza.*; 433: 865–868
43. Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR, Brinkac LM, Amedeo P, Hall N, Caler EV. (2010) New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis.* Jun 15;4(6): e716.
44. Lozano-Mendoza J, Ramírez-Montiel F, Rangel-Serrano Á, Páramo-Pérez I, Mendoza-Macías CL, Saavedra-Salazar F, Franco B, Vargas-Maya N, Jeelani G, Saito-Nakano Y, Anaya-Velázquez F, Nozaki T, Padilla-Vaca F. (2023) Attenuation of In Vitro and In Vivo Virulence Is Associated with Repression of Gene Expression of AIG1 Gene in *Entamoeba histolytica*. *Pathogens.* Mar 21;12(3):489. PMID: 36986411; PMCID: PMC10051847.
45. Manich M, Hernandez-Cuevas N, Ospina-Villa JD, *et al.*, (2018) Morphodynamics of the actin-rich cytoskeleton in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol.*; 8:179.
46. Marie C, Petri WA Jr. (2014) Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu*

47. Marion S, Wilhelm C, Voigt H, Bacri J-C & Guillén N. (2004) Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. *J Cell Sci*; 117: 3271–3279.
48. Martínez-Palomo, A., & Espinosa-Cantellano, M. (1998). Amoebiasis: new understanding and new goals. *Parasitology today (Personal ed.)*, 14(1), 1–3.
49. Meneses, E., Cárdenas, H., Zárate, S., Briebe, L. G., Orozco, E., López-Camarillo, C., & Azuara-Liceaga, E. (2010). The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene*, 455(1-2), 32–42.
50. Mornico D., Hon C.-C., Koutero M., Weber C., Coppee J.-Y., Dillies M.-A., Guillen N. (2020) Genomic determinants for the initiation and length of natural antisense transcripts in *Entamoeba histolytica*.
51. Naiyer, S., Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2019). Advances in *Entamoeba histolytica* Biology Through Transcriptomic Analysis. *Frontiers in microbiology*, 10, 1921.
52. Navrátilová, J., Horváth, V., Kozubík, A., Lojek, A., Lipsick, J., & Šmarda, J. (2007). p53 arrests growth and induces differentiation of v-Myb-transformed monoblasts. *Differentiation*, 75(7), 592-604.
53. Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S., & Sarai, A. (1996). The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nature structural biology*, 3(2), 178–187.
54. Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., & Nishimura, Y. (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, 79(4), 639-648.
55. Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H. *et al.*, (1995) Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. *Nat Struct Mol Biol* 2, 309–320.
56. Oh, I. H., & Reddy, E. P. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, 18(19), 3017–3033.
57. Ording, E., Kvåvik, W., Bostad, A., & Gabrielsen, O. S. (1994). Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein. *European journal of biochemistry*, 222(1), 113–120.
58. Organización Mundial de la Salud. (1997). Amebiasis. Semanalmente. *Epidemiol. Rec.* 72 :97–99

59. Ortnr S, Plaimauer B, Binder M, Wiedermann G, Scheiner O, Duchêne M. (1992) Humoral immune response against a 70-kilodalton heat shock protein of *Entamoeba histolytica* in a group of patients with invasive amoebiasis. *Mol Biochem Parasitol.* Sep;54(2):175-83.
60. Petri WA, Haque R, Mann BJ. (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.
61. Priyadarshi, R.N.; Kumar, R.; Anand, U. (2022) Amebic liver abscess: Clinico-radiological findings and interventional management. *World J. Radiol*, 14, 272–285.
62. Rodríguez MA, Orozco E, Arroyo R. (1994) Proteins of *Entamoeba histolytica* trophozoites involved in the adhesion to target cells. *Arch Med Res.* Summer;25(2):205-10. PMID: 7919814.
63. Rojas, L.; Moran, P.; Valadez, A.; Gomez, A.; Gonzalez, E.; Hernandez, E.; Partida, O.; Nieves, M.; Gudino, M.; Magana, U.; *et al.*, (2016) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in Mexican school children: Genotyping and phylogenetic relationship. *BMC Infect.*
64. Romano O, Miccio A. (2020) GATA factor transcriptional activity: Insights from genome-wide binding profiles. *IUBMB Life.* Jan;72(1):10-26. doi: 10.1002/iub.2169. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31574210.
65. Roy, M.; Rawat, A.; Kaushik, S.; Jyoti, A.; Srivastava, V.K. (2022) Endogenous Cysteine Protease Inhibitors in Upmost Pathogenic Parasitic Protozoa. *Microbiol. Res.*, 261, 127061.
66. Saikumar, P., Murali, R., & Reddy, E. P. (1990). Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21),8452–8456
67. Saito-Nakano, J.M., Gilchrist, C, A., Mann, B.J., & Nokazi, T. (2004) Rab5-associated vacuoles play a unique role phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49497-49507
68. Saldivar Anaya, M (2022) Efecto del factor de transcripción EhMyb10 sobre genes de *Entamoeba histolytica* involucrados en la interacción con células epiteliales [Tesis de Maestría, CINVESTAV] Repositorio Institucional
69. Sanchez-Guillen Mdel, C.; Perez-Fuentes, R.; Salgado-Rosas, H.; Ruiz-Arguelles, A.; Ackers, J.; Shire, A.; Talamas-Rohana, P. (2002) Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 66, 731–737.

70. Shirley, D. T., Farr, L., Watanabe, K., & Moonah, S. (2018). A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open forum infectious diseases*, 5(7), ofy161.
71. Shirley, D. T., Watanabe, K., & Moonah, S. (2019). Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(11), e0007744.
72. 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. *Journal Of Biological Chemistry/The Journal Of Biological Chemistry*, 273(34), 21663-21668.
73. Singh RS, Walia AK, Kanwar JR, Kennedy JF. (2016). Amoebiasis vaccine development: a snapshot on *E. histolytica* with emphasis on perspectives of Gal/GalNAc lectin. *Int J Biol Macromol* 91:258–268.
74. Smith TF. Diversity of WD-repeat Proteins. (2013.) In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience.
75. Somlata, Bhattacharya S, Bhattacharya A. (2011) A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nat Commun.*;2:230.
76. Stanley S. L., Jr (2003). Amoebiasis. *Lancet* (London, England), 361 (9362), 1025-1034.
77. Stensvold, C.R.; Lebbad, M.; Victory, E.L.; Verweij, J.J.; Tannich, E.; Alfellani, M.; Legarraga, P.; Clark, C.G. (2011). Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba*: Consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protist*, 162, 525–541.
78. Suter DM. (2020). Transcription Factors and DNA Play Hide and Seek. *Trends Cell Biol.* Jun;30(6):491-500.
79. Tang H, Finn RD, Thomas PD. (2019). TreeGraft: phylogenetic tree-based annotation of proteins with Gene Ontology terms and other annotations. *Bioinformatics.* Feb 1;35(3):518-520. PMID: 30032202; PMCID: PMC6361231.
80. Thomas, J. O. (2001). HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 29:395–401.
81. Thomson, E., & Aspden, J. L. (2025). Specialized ribosomes: integrating new insights and current challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 380(1921), 20230377.
82. Thompson MA, Ramsay RG (1995). Myb: an old oncoprotein with new roles. *Bioessays*, 17:341-350.

83. Tripathi, A., Jain, M., Chandra, M., Parveen, S., Yadav, R., Collins, B. M., Maiti, S., & Datta, S. (2020). EhC2B, a C2 domain-containing protein, promotes erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* via actin nucleation. *PLoS pathogens*, 16(5), e1008489.
84. Vito, P., Pellegrini, L., Guet, C. and D'Adamio, L. (1999). Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the ALG-2 gene linked to apoptosis in a Ca^{2+} -dependent reaction. *Journal of Chemical Biology*. 274,1533-1540.
85. Weber C, Koutero M, Dillies MA, Varet H, Lopez-Camarillo C, Coppée JY, Hon CC, Guillén N. (2016). Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. *Sci Rep*. Oct 21; 6:35852. PMID: 27767091; PMCID: PMC5073345.
86. Weir, C. B., & Le, J. K. (2023). Metronidazole. In StatPearls. StatPearls Publishing.
87. Weston, K. (1998). *Proteínas Myb en vida, muerte y diferenciación*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(1), 76–81.
88. Wilson, I. W., Weedall, G. D., & Hall, N. (2012). Host–Parasite interactions in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: ¿what have we learned from their genomes? *Parasite Immunology*, 34(2-3), 90-99.
89. Wilson, I. W., Weedall, G. D., Lorenzi, H., Howcroft, T., Hon, C., Deloger, M., Guillén, N., Paterson, S., Clark, C. G., & Hall, N. (2019). Genetic Diversity and Gene Family Expansions in Members of the Genus *Entamoeba*. *Genome Biology And Evolution*, 11(3), 688-705.
90. Zanatta, D., Betanzos, A., Azuara-Liceaga, E., Montaña, S., & Orozco, E. (2024). *Entamoeba histolytica*: EhADH, an Alix Protein, Participates in Several Virulence Events through Its Different Domains. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(14), 7609
91. Zhang H., Ehrenkaufer GM, Manna D., Hall N., Singh U. (2015) High-throughput sequencing of the *Entamoeba* 27-nt small RNA population reveals a role in permanent gene silencing but no effect on regulation of gene expression changes during stage conversion, oxidative stress or heat shock stress.

Huésped-Parásito



EhMyb10 de *Entamoeba histolytica* regula la expresión de genes relacionados con virulencia y correlaciona con un incremento en las propiedades de virulencia

PHP-09

Santos-Barrera Jose Luis¹, Castillo-Mercado Claudia², Cuellar-Silva Patricia², Betanzos Abigail³, Castañeda-Ortiz Elizabeth J², Rodríguez Mario A³, Valdés Jesús⁴, Azuara-Liceaga Elisa^{1,2}

¹Licenciatura en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, UACM, Plantel del Valle, CDMX, México.

²Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, UACM, Plantel del Valle, CDMX, México.

³Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, CDMX, México.

⁴Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, CDMX, México.

La amibiasis es una enfermedad transmitida por la ingestión de quistes de *E. histolytica* a través de alimentos contaminados y provoca hasta 100,000 muertes anuales. Los trofozoitos, invasivos y móviles, se adhieren al intestino, causando diarrea y colitis. Análisis transcriptómicos muestran que *E. histolytica* modula la expresión de genes en condiciones como la formación de abscesos hepáticos o interacción con tejido colónico. Las proteínas Myb son factores de transcripción (FT) muy abundantes en *E. histolytica*. Se unen al DNA a través del dominio Myb (DBD-MYB) que puede tener de 1 a 4 repetidos (1R a 4R). EhMyb10 es un FT 2R que reconoce al elemento de respuesta a Myb (MRE) TAACGG y que aumenta su expresión en condiciones de virulencia, por ejemplo, durante la interacción con tejido de colon y por ello podría estar involucrado en la expresión de genes implicados en virulencia. Por lo tanto, sobreexpresamos transitoriamente a EhMyb10 en trofozoitos de *E. histolytica* y confirmamos su sobreexpresión por medio de qRT-PCR, WB e inmunofluorescencia

(IFI). Los ensayos de IFI muestran una distribución nuclear consistente con su papel como FT. Por análisis de transcriptómica observamos la expresión diferencial de 179 genes: 33 sobreexpresados y 146 inhibidos. Uno de los genes más expresados fue s-adenosil metionina sintetasa, que participa en la metilación de histonas y eventos transcripcionales. Confirmamos su sobreexpresión por ensayos de RT-PCR en trofozoitos estables. También analizamos propiedades de virulencia como migración, fagocitosis y citopatogenicidad y observamos que, en comparación con los trofozoitos control, los que sobreexpresan a EhMyb10 tienen un comportamiento más virulento. Finalmente, este trabajo nos permite determinar la importancia de los FT en la regulación de la virulencia de *E. histolytica* y nos permitirá identificar moléculas clave involucradas en la amibiasis.

CONAHCYT (CF-2019-194163)

UACM CCYT-CON-14 2024

E-mail: elisa.azuara@uacm.edu.mx

158





**Sociedad Mexicana de
Parasitología, A.C.**



Universidad Veracruzana

Otorga la presente CONSTANCIA A:

Santos-Barrera Jose Luis

CO-AUTORES

**Castillo-Mercado Claudia, Cuellar-Silva
Patricia, Betanzos Abigail, Castañeda-
Ortiz Elizabeth., Rodríguez Mario A, Valdés
Jesús, Azuara-Liceaga Elisa**

Por la presentación del Trabajo en
la modalidad Poster

**EhMyb10 de *Entamoeba histolytica* regula la
expresión de genes relacionados con
virulencia y correlaciona con un incremento
en las propiedades de virulencia**

Dentro del marco XXIII Congreso Nacional de Parasitología:
CONAPAR-2024 "Una sola salud".
Del 28-30 de agosto de 2024.
Orizaba, Ver., México


Dra. Gloria León-Ávila
Comité Académico SMP


Dra. Aracely López Monteon
Comité Científico Local


Dr. Angel Ramos Ligonio
Presidente SMP



EhMyb10 de *Entamoeba histolytica* regula la expresión de genes relacionados con virulencia y correlaciona con un incremento en las propiedades de virulencia

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Santos-Barrera Jose Luis¹, Castillo-Mercado Claudia², Cuellar-Silva Patricia², Betanzos Abigail³, Castañeda-Ortiz Elizabeth J.², Rodríguez Mario A.³, Valdés Jesús⁴, Azuara-Liceaga Elisa^{1,2}

E-mail: luis.santos.barrera@estudiante.uacm.edu.mx

¹ Licenciatura en Ciencias Genómicas, ² Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, UACM, Plantel del Valle, ³ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV, ⁴ Departamento de Bioquímica, CINVESTAV.

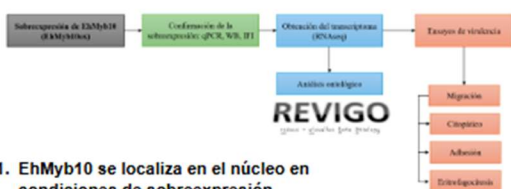
Resumen

La amebiasis es una enfermedad transmitida por la ingesta de quistes de *E. histolytica* a través de alimentos contaminados. Análisis transcriptómicos muestran que *E. histolytica* modula su expresión génica en condiciones como la interacción con tejido colónico y durante la formación de absceso hepático. Las proteínas Myb son factores de transcripción (FT) muy abundantes en este parásito. EhMyb10 es un FT que aumenta su expresión durante la interacción con tejido de colon y por ello podría estar involucrado en la expresión de genes implicados en virulencia. Por lo tanto, sobreexpresamos a EhMyb10 en trofozoitos de *E. histolytica* y analizamos su nivel de expresión y su localización. Observamos que EhMyb10 presenta una distribución nuclear y por análisis de transcriptómica observamos la expresión diferencial de 193 genes: 118 sobreexpresados y 75 inhibidos. También analizamos propiedades de virulencia como migración, fagocitosis y citopatoicidad y en comparación con los trofozoitos control, los que sobreexpresan a EhMyb10 tienen un comportamiento más virulento.

Introducción

Las proteínas Myb regulan directamente la expresión génica y participan tanto en la proliferación como durante condiciones de estrés. Los factores de transcripción (FT) Myb pertenecen a la familia HTH (hélice-giro-hélice) y reconocen y se unen a una secuencia específica de DNA conocida como elemento de reconocimiento Myb [(C/T)AAC(T/G)G] (ERM). EhMyb10 es una proteína de *E. histolytica*, agente causal de la amebiasis, conformada por 152 a.a que aumenta su expresión en condiciones de virulencia, por ejemplo, durante la interacción con tejido de colon. Para determinar la función que desempeña EhMyb10 en virulencia, sobreexpresamos a este factor en *E. histolytica* y analizamos su transcriptoma y propiedades de virulencia. Este trabajo nos permite determinar la importancia de los FT en la regulación de la virulencia de *E. histolytica* y nos permitirá identificar moléculas clave involucradas en la amebiasis.

Diseño experimental



1. EhMyb10 se localiza en el núcleo en condiciones de sobreexpresión

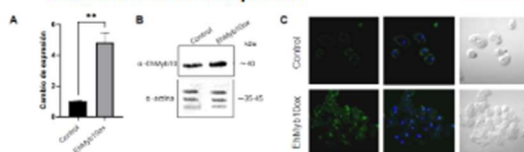


Figura 1. Sobreexpresión EhMyb10ox en trofozoitos de *E. histolytica*. A. qPCR, B. WB y C. IFI de trofozoitos que sobreexpresan EhMyb10ox comparados con la condición control.

2. La sobreexpresión de EhMyb10 modifica la expresión de 193 genes

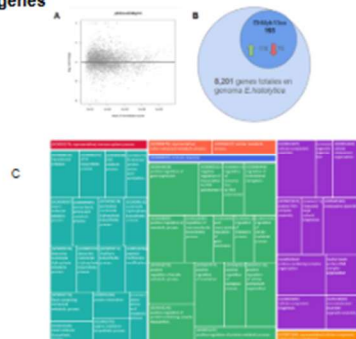


Figura 2. Análisis del transcriptoma EhMyb10ox. A. Gráfica de dispersión de EhMyb10ox con respecto a el control. B. Diagrama de Venn mostrando los genes diferencialmente sobreexpresados. C. Análisis ontológico de la función biológica que desempeñan los genes diferencialmente expresados en trofozoitos EhMyb10ox (REVIGO).

Referencias

Meneses, E. et al., (2010). The R2R3 Myb protein family in *Entamoeba histolytica*. *Gene*, 455(1-2), 32-42.
Naiyer, S., et al., (2019). Advances in *Entamoeba histolytica* Biology Through Transcriptomic Analysis. *Frontiers in microbiology*, 10, 1921.
Gilchrist, C. et al., (2006). Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica*

Objetivo General

Analizar cambios en la expresión de genes relacionados con la virulencia del parásito en trofozoitos que sobreexpresan al FT EhMyb10

Objetivos Particulares

1. Sobreexpresar al FT EhMyb10 en trofozoitos de *E. histolytica* (EhMyb10ox).
2. Determinar los genes que se expresan diferencialmente en la condición EhMyb10ox y analizar su función mediante GO (ontología de genes).
3. Analizar las propiedades de virulencia de los trofozoitos EhMyb10ox.

3. S-adenosil-metionina sintetasa (sam) es un gen blanco de EhMyb10

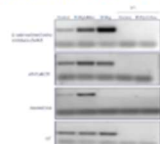


Figura 3. Comprobación de la sobreexpresión de uno de los genes obtenidos en los ensayos de RNAseq. Ensayo de RT-PCR con oligos específicos para el gen *sam* utilizando cDNA de las condiciones control y EhMyb10ox. Los tamaños señalan el tamaño del amplicón en pb.

4. Trofozoitos que sobreexpresan a EhMyb10 presentan una mayor virulencia

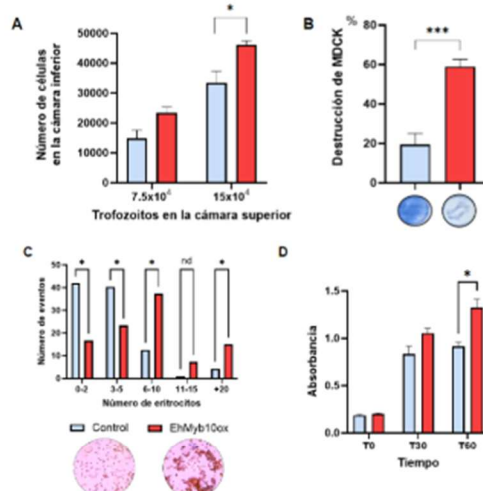


Figura 4. Comparación de las propiedades de virulencia de trofozoitos control contra EhMyb10ox. A. Ensayo de Migración celular. B. Ensayo Citopático. C. Ensayos de adhesión y D. Ensayo de Entrofagocitosis.

Conclusión

En este trabajo se demuestra que EhMyb10 es un FT de *E. histolytica* que participa en la virulencia del parásito y juega un papel fundamental en la regulación de genes implicados con la virulencia de este parásito. Además observamos que el gen *sam* es un probable blanco de EhMyb10.

Agradecimientos

Este trabajo está financiado por CONAHCYT (CF-2019-194163) y C-SP muestra su agradecimiento a CONAHCYT Estancias Posdoctorales por México (CVU 333090). Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por el apoyo constante. Diseño de Poster Alfredo Barberi.

VEN Y CUELGA TU POSTER



La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
y el El Posgrado en Ciencias Genómicas

otorgan la presente

CONSTANCIA

a:

José Luis Santos Barrera

Por su participación en el evento “Ven y cuelga tu poster”
con el trabajo:

**EhMyb10 de *Entamoeba histolytica* regula la expresión
de genes relacionados con virulencia y correlaciona
con un incremento en las propiedades de virulencia.**

Celebrado el 21 de noviembre de 2024 en el patio central del
Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM, plantel del valle.


Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Coordinadora Académica
UACM


Mtra. Erika Lorena Álvarez Ramírez
Coordinadora del
Colegio de Ciencia y Tecnología
UACM


Dra. Elisa Azuara Lieceaga
Profesora-Investigadora del PCG
Coordinadora del PMCG, UACM

La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
y el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE



otorgan la presente

CONSTANCIA

a :

SANTOS BARRERA JOSÉ LUIS

Por su participación en el Simposio Internacional
Genómica: de lo molecular a lo traslacional.

24 y 25 de Septiembre del 2024


Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez
Coordinadora del Simposio UACM


Mtro. César Enrique Fuentes Hernández
Coordinador Académico UACM


Dr. Armando Raúl Esparza Ávila
Subdirector de Enseñanza e Investigación


Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada
Jefa de División de Medicina Genómica



UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
NADA HUMANO ME ES AJENO



La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
y la Sociedad Mexicana de Virología
otorgan la presente

Constancia a

José Luis Santos Barrera

por su asistencia a la

Jornada Académica

**Virus, Antivirales y Vacunas de
Importancia para la Salud Pública**

realizada en el plantel Del Valle
el 9 de noviembre de 2024.

Nada humano me es ajeno


**Dra. María Elizabeth
Álvarez Sánchez**
Coordinadora
Académica-UACM


**Mtra. Ericka Lorena
Álvarez Ramírez**
Coordinadora del Colegio
de Ciencia y Tecnología-UACM


**Dra. Martha
Yocupicio Monroy**
Coordinadora de la
Jornada Académica


**Dra. Sofía Lizeth
Alcaraz Estrada**
Sociedad Mexicana
de Virología