



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis del interactoma de EhMyb10: Evidencias de su
papel como factor pionero en el parásito *Entamoeba
histolytica***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

DANNA PAOLA IXYALIT AGUIRRE CASIMIRO

**DIRECTORA
Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga**



**CODIRECTORA
Dra. Patricia Areli Cuellar Silva**

Ciudad de México, Julio, 2026.

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: Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Secretario: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Vocal: Dra. Lilia López Canovas

Plantel de adscripción

PLANTEL DEL VALLE, UACM

Directora

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Codirectora

Dra. Patricia Areli Cuellar Silva

ASESORES

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

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

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 colaboración con la Dra. Patricia Cuellar Silva. Este trabajo contó con el apoyo de los proyectos UACM-CCYT-2025-CON-05 y CBF-2025-I-3795 proporcionado por el Colegio de Ciencia y Tecnología de la UACM y la SECIHTI, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y al Posgrado en Ciencias Genómicas por haberme acompañado en una etapa fundamental de mi formación académica, permitiéndome concluir mis estudios de Licenciatura en 2023 y continuar con mis estudios de Maestría entre los semestres 2024-I y 2026-I. La formación recibida y las oportunidades brindadas han contribuido de manera significativa a mi desarrollo profesional y personal.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (becario No. CVU:1341151), cuyo apoyo fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis asesores por el tiempo, la disposición y las valiosas aportaciones que realizaron a lo largo de este proyecto. Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, por sus comentarios y sugerencias, que contribuyeron al análisis crítico de los resultados, así como por su apoyo con recursos experimentales que fueron de gran utilidad para esta investigación. A la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz, por sus observaciones y recomendaciones, que contribuyeron al fortalecimiento de este trabajo. A la Dra. Abigail Betanzos Fernández, por sus valiosos comentarios y aportaciones, que enriquecieron el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis lectores de tesis, la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz, la Dra. Lilia López Canovas y el Dr. Máximo Berto Martínez Benítez, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus valiosas observaciones y recomendaciones, las cuales contribuyeron a mejorar y enriquecer esta investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco profundamente a la Dra. Elisa por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por la confianza que depositó en mí desde el inicio de mi formación en investigación. Su apoyo, paciencia y guía fueron fundamentales durante el desarrollo de este proyecto y a lo largo de mis estudios de maestría. Gracias a sus enseñanzas aprendí a analizar los problemas científicos de manera más crítica y a enfrentar los retos de la investigación con mayor confianza. Asimismo, le agradezco por motivarme constantemente a seguir creciendo académicamente, por brindarme oportunidades que enriquecieron mi formación, como mi participación en mi primer congreso científico, y por acompañarme en una etapa tan importante de mi trayectoria. Su entusiasmo por la investigación despertó en mí un profundo interés por el estudio de *Entamoeba histolytica* y me permitió desarrollar un gran aprecio por este proyecto. Más allá de su contribución académica, agradezco su confianza y apoyo, que fueron fundamentales para ayudarme a alcanzar una de mis metas más importantes.

Agradezco a la Dra. Patricia por su apoyo constante durante mi estancia en el Laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas. Su disposición para compartir sus conocimientos y experiencia tuvo un impacto profundo en mi formación. Gracias a su enseñanza aprendí a pensar de manera más crítica en el diseño experimental, a trabajar con mayor autonomía y a desarrollar la confianza necesaria para atreverme a explorar nuevas ideas en el laboratorio. Asimismo, le agradezco profundamente que, aun después de concluir su estancia posdoctoral y dejar el laboratorio, continuará brindándome su apoyo y orientación siempre que lo necesité. Su compromiso, disposición y acompañamiento, incluso a la distancia, fueron de gran valor durante esta etapa y contribuyeron significativamente a la culminación de este proyecto. También agradezco el tiempo que dedicó a nuestras conversaciones, de las cuales aprendí mucho, así como los momentos de convivencia y risas compartidas que hicieron de esta experiencia una etapa especialmente significativa.

Agradezco a mi grupo de trabajo del laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas, a la Dra. Elizabeth J. Castañeda Ortiz y a mis compañeros Karen Herrera Tellez, Dulce y Aldahir ¡Gracias por hacer de mi tiempo en el laboratorio una experiencia excepcional!. Por último, agradezco a Karen Melissa Martínez González y Enrique Oropeza Martínez por su amistad, apoyo y compañía durante la maestría. Gracias por acompañarme a lo largo de esta etapa, por los buenos momentos compartidos, por su apoyo incondicional y por hacer de esta experiencia una etapa más agradable y significativa. Guardo con mucho cariño los recuerdos y aprendizajes que compartimos durante estos años

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, a mis padres Bertha Casimiro Filio y Francisco Aguirre Hernández, quienes con su amor, esfuerzo y apoyo incondicional han sido el pilar fundamental de mi vida. Gracias por creer en mí incluso en los momentos en que yo misma dudaba, por acompañarme en cada paso de mi formación académica y por brindarme siempre las herramientas, el cariño y la fortaleza necesarios para alcanzar mis metas. Este logro también les pertenece a ustedes, porque nada de esto habría sido posible sin su sacrificio, confianza y amor.

A mis hermanos Junny Annette Aguirre Casimiro, y Julio César Aguirre Casimiro, por motivarme constantemente a seguir adelante, por creer en mis capacidades y por hacerme sentir orgullosa de lo que he logrado. Su confianza en mí ha sido una fuente de inspiración para continuar esforzándome y perseguir mis sueños.

A mi madrina María de Jesús Juárez Rojas, por su cariño, apoyo y presencia constante a lo largo de mi vida. Gracias por impulsarme siempre a continuar mis estudios, por confiar en mí y por acompañarme con generosidad y afecto en cada etapa de mi formación.

ÍNDICE

Resumen.....	15
Abstract.....	16
1. Introducción (antecedentes generales).....	17
1.1 Regulación transcripcional.....	17
1.2 Regulación a nivel del núcleo.....	18
1.3 Regulación a nivel de la cromatina: modificaciones postraduccionales de histonas.....	20
1.3.1 Metiltransferasas.....	26
1.3.2 Metionina adenosiltransferasa (MAT).....	28
1.4 Regulación a nivel de secuencia: Factores de transcripción pioneros.....	31
2. <i>Entamoeba histolytica</i> (antecedentes particulares).....	37
2.1 Ciclo de vida.....	37
2.2 Genoma.....	39
2.3 Regulación transcripcional.....	40
2.4 Regulación a nivel del núcleo.....	43
2.5 Regulación a nivel de la cromatina.....	44
2.5.1 Marcas epigenéticas en <i>E. histolytica</i>	46
2.5.2 Proteínas metiltransferasas y MAT en <i>E. histolytica</i>	48
2.6 Regulación a nivel de secuencia: Factores de transcripción Myb en <i>E. histolytica</i>	52
2.7 EhMyb10.....	53
3. Justificación.....	62
4. Hipótesis.....	62
5. Objetivo general.....	62
6. Objetivos particulares.....	62
7. Estrategia experimental.....	63
8. Metodología.....	64
8.1 Cultivo de trofozoitos y sobreexpresión de EhMyb10.....	64
8.2 Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y RT-PCR cuantitativa	

y semicuantitativa.....	64
8.3 Fraccionamiento subcelular.....	66
8.4 Inmunoprecipitación (IP).....	66
8.4.1 Tinción con plata.....	67
8.5 Espectrometría de masas.....	68
8.5.1 Análisis <i>in silico</i> de las proteínas identificadas.....	68
8.6 Western Blot.....	69
8.7 Inmunofluorescencia.....	69
8.8 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	70
8.8.1 Marcas y dilución de anticuerpos utilizados para WB, IF y MET.....	70
8.9 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	71
8.9.1 Obtención de la cromatina de trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox.....	71
8.9.2 Purificación del <i>Input</i>	72
8.9.3 Fragmentación del DNA de espermatozoos de salmón y bloqueo de la proteína G.....	73
8.9.4 Inmunoprecipitación (ChIP).....	73
8.9.5 Precipitación del DNA.....	74
9. Resultados.....	75
9.1 Sobreexpresión del FT EhMyb10 en trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	75
9.2 Identificación y análisis ontológico de las proteínas que interactúan con EhMyb10.....	77
9.3 Los trofozoitos que sobreexpresan a EhMyb10 aumentan la expresión de proteínas relacionadas con la metilación.....	81
9.4 Colocalización de EhMyb10 con proteínas involucradas en procesos de metilación.....	82
9.5 Colocalización de EhMyb10 con marcas de enhancers y promotores activos en trofozoitos EhMyb10ox.....	83
9.6 Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional en trofozoitos EhMyb10ox.....	85
9.7 Validación de la interacción de EhMyb10 con EhPKMT2.....	88

9.8 Inmunodetección de EhMyb10 y proteínas asociadas a procesos de metilación en inmunoprecipitados de histona H3.....	89
9.9 Análisis del reclutamiento de EhMyb10 al promotor del gen <i>ehmat1a</i> de <i>E. histolytica</i>	91
10. Discusión.....	94
11. Conclusiones.....	103
12. Perspectivas.....	104
13. Referencias bibliográficas.....	105
14. Anexos.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de regulación transcripcional.....	17
Figura 2. Organización tridimensional de los territorios cromosómicos y dominios de cromatina en el núcleo celular.....	19
Figura 3. Modificaciones de las histonas y su efecto en la cromatina.....	23
Figura 4. PTMs de histonas y su relación con la regulación transcripcional.....	25
Figura 5. Principales proteínas <i>writers</i> , <i>erasers</i> y <i>readers</i> asociadas a la metilación de residuos de lisina en las histonas H3 y H4.....	26
Figura 6. Proceso de metilación y desmetilación de lisinas.....	27
Figura 7. Participación de MATII α en la regulación epigenética mediante su interacción con MafK y metiltransferasas.....	30
Figura 8. Mecanismo de acción de los FT pioneros en la apertura de la cromatina.....	34
Figura 9. Actividad pionera de c-Myb en la apertura de la cromatina.....	36
Figura 10. FOXA1 recluta a MLL3 para establecer marcas epigenéticas en enhancers.....	37
Figura 11. Ciclo y estadios de vida de <i>E. histolytica</i>	38
Figura 12. Mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la cromatina y la expresión génica en <i>E. histolytica</i>	45
Figura 13. Marcas epigenéticas identificadas en <i>E. histolytica</i>	47
Figura 14. Metiltransferasas de lisina en <i>E. histolytica</i>	49
Figura 15. Localización subcelular de EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 en trofozoitos de	

<i>E. histolytica</i>	50
Figura 16. Estructura tridimensional de EhMAT2A-I de <i>E. histolytica</i>	51
Figura 17. Proteínas EhMyb de <i>E. histolytica</i>	53
Figura 18. Estructura tridimensional y modificaciones postraduccionales de EhMyb10.....	55
Figura 19. Caracterización estructural y funcional del dominio MYB R2R3 de EhMyb10 en <i>E. histolytica</i>	56
Figura 20. Efecto de la sobreexpresión transitoria de EhMyb10 en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	58
Figura 21. Genes regulados positivamente por la sobreexpresión transitoria de EhMyb10 en <i>E. histolytica</i>	59
Figura 22. Modelo molecular de las interacciones proteicas de EhMyb10.....	60
Figura 23. Vectores de expresión utilizados para la sobreexpresión de EhMyb10 en <i>E. histolytica</i>	64
Figura 24. Condiciones de RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa.....	65
Figura 25. Condiciones para la amplificación del gen <i>ehmat1a</i>	72
Figura 26. Análisis de la sobreexpresión de trofozoitos EhMyb10ox.....	75
Figura 27. Localización subcelular de EhMyb10 en trofozoitos EhMyb10ox.....	76
Figura 28. Inmunoprecipitación de proteínas asociadas a EhMyb10 en trofozoitos EhMyb10ox.....	77
Figura 29. Análisis ontológico de las proteínas identificadas por IMS-DIA-MS.....	80
Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 en la abundancia proteica de EhMAT1A, EhPKMT2 y en el patrón de dimetilación de lisinas.....	81
Figura 31. Colocalización de EhMyb10 con EhHKMT2 en el núcleo de trofozoitos EhMyb10ox.....	82
Figura 32. Colocalización de EhMyb10 con EhMAT1A en el núcleo de trofozoitos EhMyb10ox.....	83
Figura 33. Colocalización de EhMyb10 con las marcas H3K4me1 y H3K27ac asociadas a enhancers y promotores activos en trofozoitos EhMyb10ox.....	84
Figura 34. Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional en trofozoitos EhMyb10ox.....	86

Figura 35. Localización nuclear de laminina B1.....	87
Figura 36. Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional.....	87
Figura 37. Validación de la interacción de EhMyb10 y EhPKMT2.....	88
Figura 38. Detección de H3, EhMyb10 y EhPKMT2 en fracciones inmunoprecipitadas con histona H3.....	90
Figura 39. Validación de oligonucleótidos para el análisis del promotor de <i>ehmat1a</i>	91
Figura 40. Análisis del reclutamiento de EhMyb10 al promotor de <i>ehmat1a</i>	92
Figura 41. Modelo de la función reguladora de EhMyb10 en <i>E. histolytica</i>	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las proteínas MAT.....	29
Tabla 2. Proteínas identificadas por espectrometría de masas.....	78

ABREVIATURAS

ATAC-seq	Ensayo de transposasa accesible a la cromatina con secuenciación, del inglés <i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin with Sequencing</i>
BSA	Albúmina sérica bovina, del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	DNA complementario, del inglés <i>Complementary DNA</i>
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina, del inglés <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de cromatina con secuenciación, del inglés <i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
CBP	Proteína de unión a CREB, del inglés <i>CREB-Binding Protein</i>
DBD	Dominio de unión al DNA, del inglés <i>DNA-Binding Domain</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, del inglés <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DTT	Ditiotreitol, del inglés <i>Dithiothreitol</i>
ERM	Elemento de reconocimiento a Myb
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética, del inglés <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético, del inglés <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
FT	Factor de transcripción, del inglés <i>Transcription Factor</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, del inglés <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> , del inglés <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FRET	Transferencia de energía por resonancia de Förster, del inglés <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
GST	Glutación S-transferasa, del inglés <i>Glutathione S-Transferase</i>
HA	Hemaglutinina, del inglés <i>Hemagglutinin</i>
HAT	Acetiltransferasa de histonas, del inglés <i>Histone Acetyltransferase</i>

H3K27ac	Acetilación de la lisina 27 de la histona H3, del inglés <i>Histone H3 lysine 27 acetylation</i>
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3, del inglés <i>Histone H3 lysine 27 trimethylation</i>
H3K4me1	Monometilación de la lisina 4 de la histona H3, del inglés <i>Histone H3 lysine 4 monomethylation</i>
H4K12ac	Acetilación de la lisina 12 de la histona H4, del inglés <i>Histone H4 lysine 12 acetylation</i>
HDAC	Desacetilasa de histonas, del inglés <i>Histone Deacetylase</i>
HKMT	Metiltransferasa de lisinas de histonas, del inglés <i>Histone Lysine Methyltransferase</i>
HMT	Metiltransferasa de histonas, del inglés <i>Histone Methyltransferase</i>
HRP	Peroxidasa de rábano picante, del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i>
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación
IDR	Regiones intrínsecamente desordenadas, del inglés <i>Intrinsically Disordered Regions</i>
IMS-DIA-MS	Espectrometría de masas con ionización por movilidad iónica y adquisición de datos independiente, del inglés <i>Ion Mobility Spectrometry-Data Independent Acquisition-Mass Spectrometry</i>
kDa	Kilodalton, unidad de masa molecular
kb	Kilobases, del inglés <i>Kilobases</i>
MAT	Metionina adenosiltransferasa, del inglés <i>Methionine Adenosyltransferase</i>
MET	Microscopía electrónica de transmisión
Myb	Factor de transcripción Myb, del inglés <i>Myeloblastosis</i>
ORF	Marco de lectura abierto, del inglés <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases, del inglés <i>Base Pairs</i>

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKMT	Metiltransferasa de lisinas de proteínas, del inglés <i>Protein Lysine Methyltransferase</i>
PTM	Modificación postraducciona, del inglés <i>Post-Translational Modification</i>
PBS	Buffer fosfato salino, del inglés <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación, del inglés <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PRMT	Metiltransferasa de arginina de proteínas, del inglés <i>Protein Arginine Methyltransferase</i>
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés <i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-seq	Secuenciación de RNA, del inglés <i>RNA Sequencing</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa, del inglés <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa, del inglés <i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAM	S-adenosilmetionina, del inglés <i>S-Adenosyl Methionine</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TA	Temperatura ambiente
tRNA	RNA de transferencia, del inglés <i>Transfer RNA</i>
TBP	Proteína de unión a la caja TATA, del inglés <i>TATA-Binding Protein</i>
UTR	Región no traducida, del inglés <i>Untranslated Region</i>
WB	Western blot

Resumen

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amebiasis, una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo. Su capacidad de adaptación, colonización e invasión tisular depende de mecanismos de regulación transcripcional que involucran factores de transcripción (FT) y proteínas modificadoras de cromatina, algunos de los cuales han sido caracterizados. En este trabajo se analizó al FT EhMyb10, miembro de la familia EhMybR2R3, cuyo dominio de unión al DNA (DBD) presenta similitud estructural con el del FT pionero c-Myb humano. Los factores pioneros se caracterizan por su capacidad de unirse a cromatina compacta y promover estados transcripcionalmente activos mediante el reclutamiento de proteínas remodeladoras y modificadoras de histonas. Para evaluar el posible papel de EhMyb10 como FT pionero, se generaron trofozoítos que sobreexpresan de manera estable a esta proteína fusionada a una etiqueta HA (EhMyb10ox). La sobreexpresión fue confirmada mediante RT-qPCR y Western blot, observándose una localización predominantemente nuclear por inmunofluorescencia. Ensayos de inmunoprecipitación seguidos de espectrometría de masas identificaron 32 proteínas candidatas a interactuar con EhMyb10, incluyendo proteínas relacionadas con vías de señalización celular, como proteínas Ras/cinasas y la lectina Gal/GalNAc, lo que sugiere que EhMyb10 podría participar también en procesos de señalización asociados con adaptación y virulencia del parásito. Además, la sobreexpresión de EhMyb10 incrementó la abundancia de EhMAT1A y de la metiltransferasa EhPKMT2, así como el patrón global de proteínas dimetiladas en lisina. Mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión se observó que EhMyb10 colocaliza con EhMAT1A, EhPKMT2 y con marcas epigenéticas asociadas a enhancers activos (H3K4me1 y H3K27ac), así como con marcas relacionadas con activación (H4K12ac) y represión transcripcional (H3K27me3). La interacción entre EhMyb10 y EhPKMT2 fue validada mediante ensayos de pull-down empleando EhMyb10 recombinante. Finalmente, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina los cuales mostraron el reclutamiento de EhMyb10 a la región promotora distal del gen *ehmat1a* en la condición control. La ausencia de enriquecimiento en la condición de sobreexpresión sugiere que la cromatina en este locus podría encontrarse previamente en un estado más accesible debido a la actividad de EhMyb10. En conjunto, estos hallazgos sugieren que EhMyb10 podría presentar características funcionales compatibles con un FT pionero y una participación en la regulación epigenética, transcripcional y de vías de señalización en *E. histolytica*.

Abstract

Entamoeba histolytica is the causative agent of amoebiasis, a disease affecting millions of people worldwide. Its ability to adapt, colonize, and invade host tissues depends on transcriptional regulatory mechanisms involving transcription factors (TFs) and chromatin-modifying proteins, which remain poorly characterized in this organism. In this work, the TF EhMyb10, a member of the EhMybR2R3 family, was analyzed. Its DNA-binding domain (DBD) displays high structural similarity to that of the human canonical pioneer TF c-Myb. Pioneer factors are characterized by their ability to bind compact chromatin and promote transcriptionally active states through the recruitment of chromatin-remodeling and histone-modifying proteins. To evaluate the potential role of EhMyb10 as a pioneer factor, trophozoites stably overexpressing HA-tagged EhMyb10 (EhMyb10ox) were generated. Overexpression was confirmed by RT-qPCR and Western blot analyses, and immunofluorescence assays revealed a predominantly nuclear localization. Immunoprecipitation assays followed by mass spectrometry identified 32 candidate proteins potentially interacting with EhMyb10, including proteins associated with cellular signaling pathways, such as Ras proteins/kinases and the Gal/GalNAc lectin, suggesting that EhMyb10 may also participate in signaling processes related to parasite adaptation and virulence. Furthermore, EhMyb10 overexpression increased the abundance of EhMAT1A and the methyltransferase EhPKMT2, as well as the global pattern of lysine-dimethylated proteins. Immunofluorescence and transmission electron microscopy analyses showed that EhMyb10 colocalizes with EhMAT1A, EhPKMT2, and epigenetic marks associated with active enhancers (H3K4me1 and H3K27ac), as well as marks related to transcriptional activation (H4K12ac) and transcriptional repression (H3K27me3). The interaction between EhMyb10 and EhPKMT2 was validated by pull-down assays using recombinant protein. Finally, chromatin immunoprecipitation assays revealed the recruitment of EhMyb10 to the distal promoter region of the *ehmat1a* gene under control conditions. The absence of enrichment in the overexpression condition suggests that chromatin at this locus may already be in a more accessible state due to prior EhMyb10 activity. Collectively, these findings suggest that EhMyb10 exhibits functional features compatible with a pioneer TF and its possible involvement in epigenetic, transcriptional, and signaling pathway regulation in *E. histolytica*.

1. Introducción (antecedentes generales)

1.1 Regulación transcripcional

La expresión génica es un proceso complejo y dinámico que implica la regulación de muchos eventos, desde el inicio de la transcripción hasta la modificación postraduccional (PTM) de proteínas. En este contexto, la regulación transcripcional constituye uno de los principales niveles de control de la expresión génica. La transcripción es un proceso fundamental que ocurre en el núcleo celular, en el cual una secuencia de DNA específica se transcribe en una molécula de mRNA que puede ser posteriormente traducida en una proteína para desempeñar funciones específicas en la célula. Este proceso está altamente regulado, copia selectivamente solo ciertas partes del genoma y puede producir desde una hasta cientos y miles de copias de una sección, en respuesta a señales extracelulares y a los requerimientos fisiológicos celulares, como el et al., crecimiento, estrés, diferenciación, etcétera (Watson *et al.*, 2016; Lopez, 2023). La regulación transcripcional se define como el conjunto de mecanismos moleculares mediante los cuales una célula determina, el momento, el nivel y los genes que deben expresarse permitiendo así un control preciso de la expresión génica. Este conjunto de mecanismos puede actuar a nivel nuclear, de cromatina y de la secuencia de DNA (**Figura 1**). Los cuales incluyen la organización espacial del DNA dentro del núcleo, la remodelación de la cromatina a través de las PTMs de los nucleosomas, así como las interacciones entre factores de transcripción, co-reguladores y proteínas asociadas a la maquinaria transcripcional y a regiones promotoras y secuencias reguladoras, como los enhancers, para activar o reprimir la expresión de genes específicos (Watson *et al.*, 2016; Lopez, 2023).

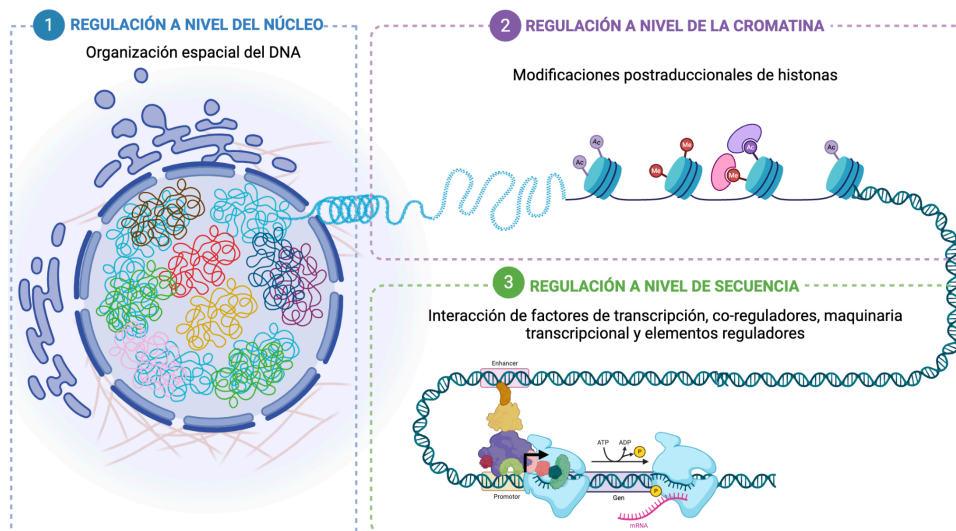


Figura 1. Niveles de regulación transcripcional. Esquema representativo de los distintos niveles de regulación transcripcional en células eucariotas. Imagen basada en Van *et al.*, 2003, y elaborada en BioRender.

1.2 Regulación a nivel del núcleo

Durante la fase de mitosis del ciclo celular, el material genético de la célula se organiza en estructuras altamente condensadas y visibles denominadas cromosomas que permiten la segregación equitativa del DNA hacia las células hijas. Sin embargo, la organización cromosómica no ocurre únicamente durante esta etapa. Durante la interfase, aunque los cromosomas no son visibles como estructuras compactas, el genoma mantiene una organización tridimensional altamente ordenada dentro del núcleo. Esta organización desempeña un papel fundamental en diversos procesos celulares, incluyendo la regulación de la expresión génica, la replicación del DNA y el mantenimiento de la estabilidad genómica (Wang, 2021; Su *et al.*, 2020). La organización de la cromatina en niveles superiores y la arquitectura nuclear, influyen en la formación de distintos epigenomas y en la diferenciación de células con funciones específicas (Su *et al.*, 2020).

Los territorios cromosómicos (CTs, por sus siglas en inglés *chromosome territories*) constituyen una característica importante de la arquitectura nuclear. Los territorios cromosómicos son regiones definidas e irregulares dentro del núcleo, con un tamaño aproximado de 1 a 2 μm , y están formados por subdominios más pequeños, como los compartimentos A y B, que corresponden a la eucromatina y la heterocromatina, respectivamente; los dominios asociados a la lámina (LADs), los dominios topológicamente asociados (TADs) y los bucles de cromatina (loops) (**Figura 2A-B**). La formación y estabilización de bucles de cromatina y de estas interacciones espaciales dependen de proteínas estructurales como CTCF y los complejos de cohesina (Hansen *et al.*, 2018; Cremer *et al.*, 2001; Tecalco *et al.*, 2021). Dentro de cada territorio cromosómico, los LADs, generalmente se relacionan con cromatina compacta y transcripcionalmente inactiva. Asimismo, la cromatina forma TADs, regiones con alta frecuencia de interacciones locales entre secuencias distales del DNA. Los TADs pueden organizarse en compartimento A, caracterizado por eucromatina menos condensada y genes transcripcionalmente activos, o en compartimento B, asociado con heterocromatina y represión génica (Hansen *et al.*, 2018; Cremer *et al.*, 2001; Tecalco *et al.*, 2021).

Los CTs, están presentes en eucariotas superiores, mientras que en organismos como la levadura los cromosomas se encuentran más desplegados y con menor compactación territorial, por lo que esta organización resulta menos evidente. Estos territorios se ubican muy próximos entre sí e incluso pueden superponerse parcialmente en sus bordes. Además, los

cromosomas presentan poca movilidad dentro del núcleo y su posición tiende a conservarse de la célula madre a la célula hija durante la división celular, lo que sugiere que esta organización espacial cumple una función biológica relevante (Cremer *et al.*, 2001).

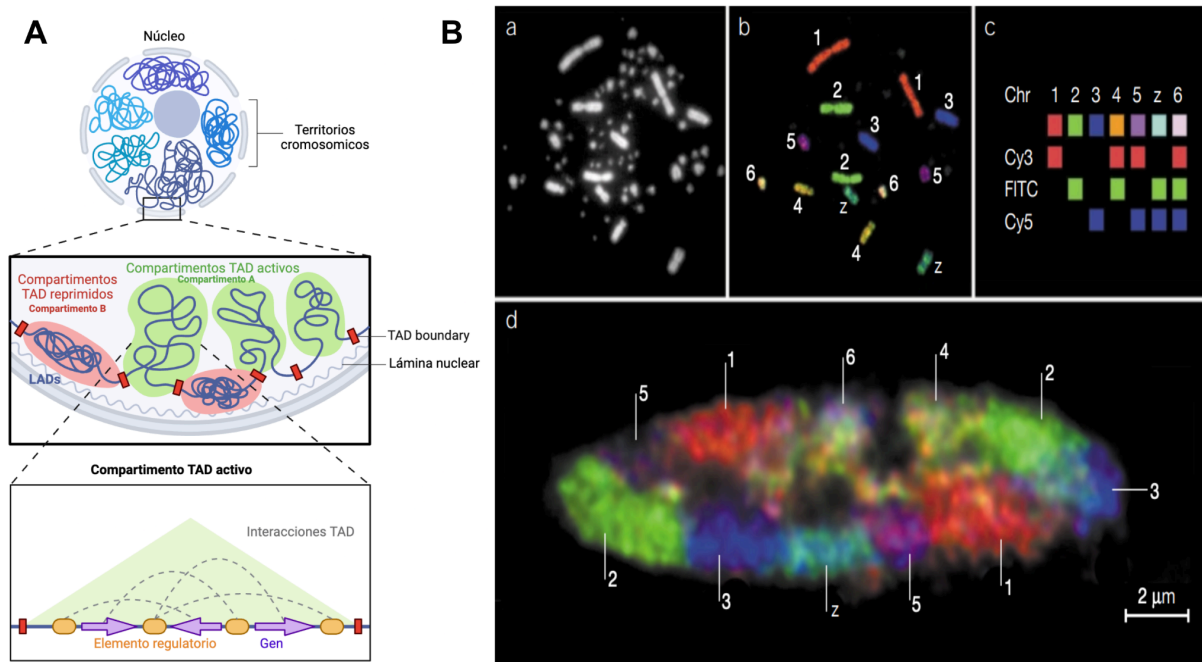


Figura 2. Organización tridimensional de los territorios cromosómicos y dominios de cromatina en el núcleo celular. **A)** Organización de los cromosomas dentro del núcleo en regiones definidas conocidas como territorios cromosómicos. **B)** Organización espacial de los cromosomas dentro del núcleo interfásico de fibroblastos de pollo. **a, b y c)** Mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) multicolor, cada cromosoma es marcado con diferentes fluoróforos permitiendo visualizar territorios cromosómicos definidos y separados entre sí. Imagen realizada en BioRender y modificada de Cremer *et al.*, 2001.

La regulación de la expresión génica a nivel nuclear se explica principalmente por esta organización espacial del genoma, especialmente mediante la interacción entre los CTs, y el compartimento intercromatínico (IC, del inglés *interchromatin compartment*). Cada cromosoma ocupa una región discreta dentro del núcleo, en lugar de distribuirse de forma aleatoria. Estos territorios no son estructuras compactas cerradas, sino que presentan una organización irregular y plegada, semejante a una “esponja”, con canales internos que permiten la entrada del compartimento intercromatínico (Cremer *et al.*, 2001). El modelo central que explica esta organización es el modelo CT–IC, en el cual los CTs contienen la cromatina, mientras que el compartimento intercromatínico alberga factores necesarios para procesos fundamentales como la transcripción, el *splicing*, la replicación y la reparación del DNA. Esto implica que los genes no tienen el mismo acceso a la maquinaria transcripcional, sino que dicho acceso depende de su localización dentro de la arquitectura nuclear. Los genes transcripcionalmente activos suelen localizarse en la superficie de los territorios

cromosómicos o en loops de cromatina que se proyectan hacia el IC, facilitando su contacto con la RNA polimerasa II, factores de transcripción y la maquinaria de procesamiento de mRNA. En este sentido, una mayor exposición al compartimento intercromatínico se traduce en una mayor probabilidad de transcripción (Cremer *et al.*, 2001).

Por el contrario, los genes reprimidos suelen localizarse en el interior de dominios compactos de cromatina, cerca de la heterocromatina centromérica, asociados a la lámina nuclear o en la periferia nuclear. Estas regiones presentan menor accesibilidad para los complejos transcripcionales, favoreciendo el silenciamiento génico. Así, una mayor compactación y aislamiento cromatínico se asocian con represión transcripcional. Un ejemplo de esta organización se observa en los cromosomas 18 y 19 de las células humanas. Aunque ambos presentan tamaños similares, el cromosoma 18, pobre en genes, se localiza preferentemente en la periferia nuclear, mientras que el cromosoma 19, rico en genes, se encuentra en el interior del núcleo, demostrando que la posición nuclear depende más de la densidad génica que del tamaño cromosómico (Cremer *et al.*, 2001). En mamíferos, donde este modelo ha sido más estudiado, se observa una clara separación de los CTs ya que los genes activos se localizan en la periferia de los CTs y los genes reprimidos están asociados a regiones heterocromáticas. Además, durante la diferenciación celular, ciertos genes cambian de posición: algunos salen de regiones heterocromáticas para activarse, mientras que otros se reclutan en compartimentos represivos para silenciarse. Esto indica que la regulación génica también depende de una reorganización tridimensional del genoma, en la que cambian la cromatina local y su posición dentro del núcleo. En resumen, la regulación génica a nivel de núcleo es un fenómeno topológico en el que la arquitectura nuclear desempeña un papel esencial (Cremer *et al.*, 2001).

1.3 Regulación a nivel de la cromatina: modificaciones postraduccionales de histonas

La organización tridimensional del genoma dentro del núcleo constituye un importante nivel de regulación transcripcional; sin embargo, el control de la expresión génica también depende de mecanismos locales asociados a la estructura de la cromatina. La cromatina permite el empaquetamiento y la organización del DNA dentro del núcleo y funciona como una plataforma dinámica que modula la accesibilidad de regiones genómicas específicas para generar estados transcripcionalmente activos o reprimidos (Bannister *et al.*, 2011).

La cromatina está compuesta por DNA asociado a proteínas histonas y no histonas. Las proteínas histonas son responsables del primer nivel de organización cromosómica denominado nucleosoma. Cada nucleosoma consta de una molécula de DNA de 145-147 pb envuelta alrededor de un octámero de histonas que comprende dos copias de cuatro proteínas histonas H2A, H2B, H3 y H4. Los nucleosomas se encuentran unidos entre sí por el DNA conector y la histona H1, formando diferentes órdenes de organización de la cromatina. La mayor parte de la cromatina en la célula se encuentra en forma de filamento de 30 nm, solenoides, fibras de 300 y 700 nm durante la mayoría parte del ciclo celular. Sin embargo, para que la transcripción ocurra, la cromatina debe ser remodelada o modificada para permitir el acceso de la maquinaria transcripcional al DNA (Ramazi *et al.*, 2020).

La remodelación de la cromatina consiste en el desplazamiento, expulsión, reorganización o deslizamiento de los nucleosomas. Este proceso es llevado a cabo por complejos remodeladores dependientes de ATP como SWI/SNF e ISWI, que alteran la disposición de los nucleosomas y, en consecuencia, regulan la expresión génica (Reyes *et al.*, 2021). Por otro lado, la modificación de la cromatina comprende cambios químicos reversibles en las histonas, denominados modificaciones postraduccionales (PTMs). Estas modificaciones ocurren principalmente en las colas amino-terminales de las histonas H3 y H4 que sobresalen del nucleosoma y funcionan como señales epigenéticas asociadas a estados transcripcionalmente activos o represivos, aunque las histonas H2A y H2B también pueden modificarse (Liu *et al.*, 2023; Bannister *et al.*, 2011). La combinación de estas marcas constituye el llamado “código de histonas”, un sistema epigenético que determina si una región genómica está activa o reprimida (Liu *et al.*, 2023; Strahl *et al.*, 2000).

Las modificaciones más comunes de las histonas incluyen la metilación, acetilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación de residuos de lisina (K) o arginina (R) (**Figura 3**) (Liu *et al.*, 2023; Orphanides *et al.*, 2002). Estas modificaciones pueden actuar de forma cooperativa o antagonista; por ejemplo, la metilación y desmetilación de un mismo residuo, así como la acetilación y desacetilación, regulan de manera opuesta la expresión génica. La metilación suele ser más estable y representa una marca epigenética duradera, mientras que la acetilación, ubiquitinación y fosforilación son más dinámicas y permiten una regulación más flexible (Liu *et al.*, 2023).

La acetilación de histonas fue la primera PTM ampliamente estudiada y es una modificación reversible que ocurre principalmente en K. Se asocia generalmente con activación transcripcional porque neutraliza la carga positiva de K, debilitando la interacción

entre histonas y DNA, lo que relaja la cromatina y favorece el acceso de factores de transcripción. Esta modificación es catalizada por las enzimas histona acetiltransferasas (HAT), que utilizan acetil-CoA como donante del grupo acetilo. Entre las principales familias de HAT se encuentran CBP/p300, GCN5 y la familia MYST. Un ejemplo es HBO1 (histone acetyltransferase binding to ORC1), una acetiltransferasa clásica que acetila principalmente H3K9, H3K14 y H4K5, H4K8 y H4K12. El complejo BRPF2-HBO1 favorece especialmente H3K14ac. Por otro lado, la acetilación de H3K27 es catalizada por las histonas acetiltransferasas p300 y CBP, asociadas con activación transcripcional. En contraste, la desacetilación está mediada por proteínas histonas desacetilasas (HDAC o KDAC), de las cuales existen 18 en humanos. Las HDAC promueven la compactación de la cromatina y el silenciamiento génico (**Figura 4**) (Liu *et al.*, 2023).

Por otro lado, la metilación de proteínas es una PTM versátil que puede resultar tanto en la inhibición como en la activación de la expresión génica. La metilación de histonas ocurre principalmente en K y R, especialmente en histonas H3 y H4. Esta modificación es catalizada por histonas metiltransferasas (HMT), que utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo. El efecto biológico de la metilación depende del residuo modificado. Entre las principales modificaciones asociadas con activación génica se encuentran las metilaciones de K4 de la histona H3 (H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3). H3K4me1 se localiza principalmente asociada con enhancers activos o *poised*, mientras que H3K4me2 se asocia con regiones transcripcionalmente permisivas, incluyendo promotores y enhancers. Por su parte, H3K4me3 es una marca característica de promotores activos y sitios de inicio de la transcripción. Entre las modificaciones que participan en la represión de la transcripción se encuentra H3K27me3 que representa una marca de silenciamiento génico y heterocromatina facultativa, mientras que H3K27me2 se ha asociado con estados represivos intermedios (Liu *et al.*, 2023; Lanouette *et al.*, 2014; Jenuwein *et al.*, 2001). Por otro lado, las metilaciones en residuos R como H3R17me2a, H3R26me2a y H4R3me2a, se relacionan con cromatina activa y promoción de la transcripción. En contraste, otras marcas participan en el establecimiento de estados represivos de la cromatina como H4R3me2s y H3R8me2s (**Figura 4**) (Liu *et al.*, 2023).

La fosforilación y la ubiquitinación son otras modificaciones postraduccionales de las histonas que participan en la regulación de la cromatina y de la expresión génica. La fosforilación consiste en la adición de grupos fosfatos en histonas, principalmente en residuos de serina (S), treonina (T) y tirosina (Y) y, aunque también se pueden reconocer K con grupo

hidroxilo (**Figura 4**). Esta modificación disminuye la afinidad entre histonas y DNA, activando la transcripción de manera reversible, regulada por quinasas y fosfatasas. La fosforilación suele actuar como una plataforma de señalización que desencadena eventos en cascada y establece la interacción con otras PTMs. Esta modificación está implicada en la división celular, la condensación cromosómica, la respuesta a daño en el DNA y la reparación. Por ejemplo, la fosforilación de los residuos de aminoácidos S10 y S28 de la histona H3, se ha asociado con su acetilación, activando la transcripción. La fosforilación de H3S10 está estrechamente acoplada a la acetilación de los residuos K9 y K14 en la histona H3 (H3K9ac y K14ac), ambas marcas de activación transcripcional. La fosforilación del residuo S28 de H3 también desempeña un papel en combinación con H3K27ac en la activación de la transcripción. La fosforilación de H3S28 asociada con los promotores de genes puede desplazar los complejos represores de la cromatina Polycomb e inducir la desmetilación y acetilación del residuo K27 de H3 adyacente en estos *loci*, activando así la transcripción (Rossetto *et al.*, 2012; Karakatsanis *et al.*, 2024)

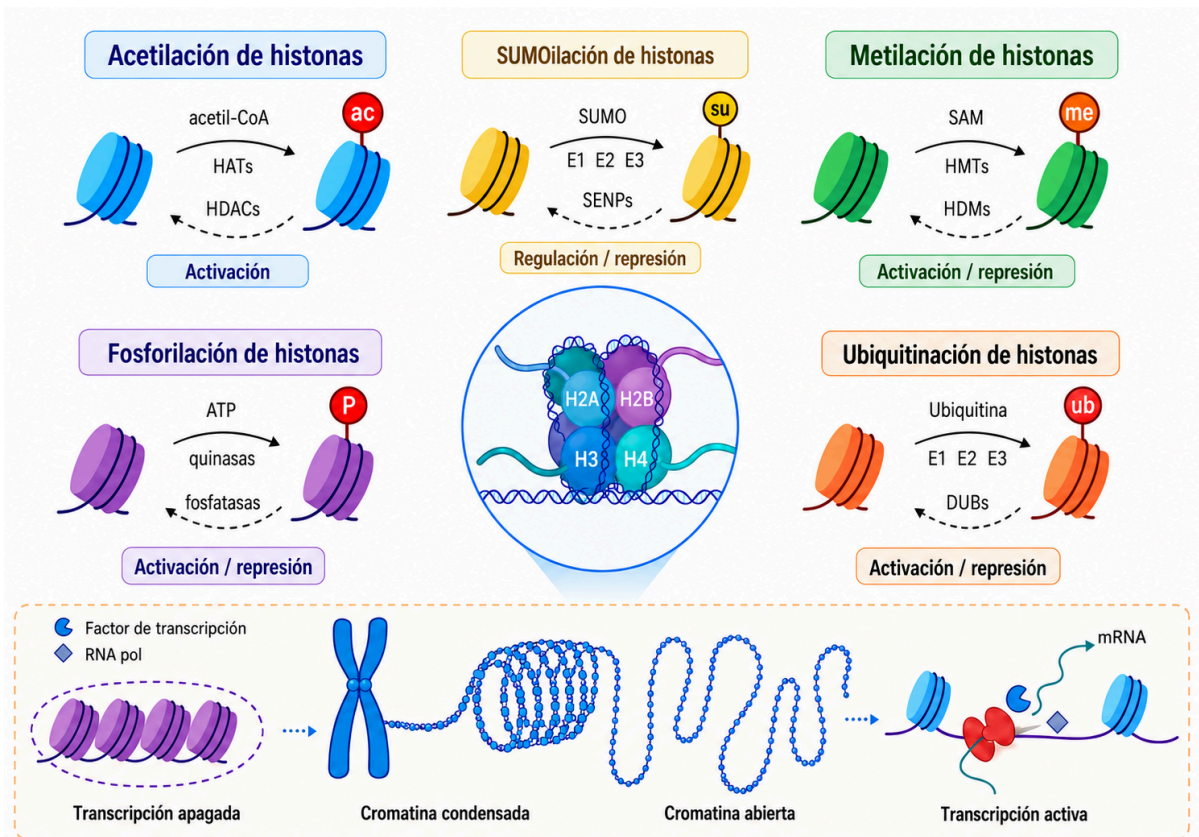


Figura 3. Modificaciones de las histonas y su efecto en la cromatina. Imagen que muestra las principales modificaciones de las histonas como acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación para modular la estructura de la cromatina. Imagen modificada de Lu *et al.*, 2025.

Por otro lado, la ubiquitinación de histonas consiste en la adición de ubiquitina sobre K, principalmente en H2A y H2B, para la regulación transcripcional y reparación del DNA. Esta modificación requiere la acción secuencial de enzimas E1 (activadora), E2 (conjugadora) y E3 (ligasa), y puede revertirse por enzimas desubiquitinantes (Oss-Ronen *et al.*, 2022). En H2A, la monoubiquitinación en el residuo K119, está relacionada con la represión transcripcional debido a que los nucleosomas marcados con H2AK119ub conducen a la deposición de H3K27me3, lo cual promueve la compactación de la cromatina (Oss-Ronen *et al.*, 2022). En H2B, el principal sitio es H2BK120ub en mamíferos (H2BK123ub en levadura) y está relacionado con transcripción activa y reparación de daño en el DNA. H2Bub favorece la metilación de H3K4, H3K79 y otras marcas relacionadas con reparación de DSB (Liu *et al.*, 2023). En conjunto, todas estas PTMs no actúan de forma aislada, sino como una red compleja que regula la estructura de la cromatina para la activación o silenciamiento génico en procesos como la reparación del DNA, la diferenciación celular y la mitosis, entre otros **(Figura 4)** (Liu *et al.*, 2023).

Por último, la sumoilación es una modificación dinámica y reversible que consiste en la conjugación covalente de la proteína SUMO (del inglés *Small Ubiquitin-like MOdifier*) a residuos K de proteínas, mediante una cascada enzimática análoga a la de la ubiquitinación (Hendriks *et al.*, 2016) **(Figura 4)**. Esta modificación es revertida por proteasas específicas como Ulp1 y Ulp2 en *Saccharomyces cerevisiae* (Hickey *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2021). La sumoilación de histonas se ha asociado inicialmente con represión génica. Por ejemplo, en células humanas la sumoilación de H4K12 recluta a HDAC1 y HP1, que elimina marcas de acetilación activadoras y compacta la cromatina hacia un estado silenciado, respectivamente (Shiio *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2021). En levadura se observó algo similar: la sumoilación de H2B y H4 compite con la acetilación y la ubiquitilación de histonas, bloqueando marcas que promueven la transcripción (Nathan *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2021). Asimismo, la sumoilación de H3K18, se asocia con represión transcripcional y la compactación de cromatina, aunque los mecanismos moleculares específicos de H3K18-SUMO no han sido tan detallados como los de H4K12-SUMO (Shiio *et al.*, 2003; Hendriks *et al.*, 2014). Igualmente, se han observado en H2A y H2B, señales débiles de sumoilación que se asocian con represión transcripcional o compactación de cromatina. En levadura, la sumoilación de H2B en los residuos K6, K7, K16, K17 y en H4 en los residuos K5, K8, K12, K16, K20 se ha relacionado con una regulación transcripcional dual (Nathan *et al.*, 2006). Por otro lado, la sumoilación de H1 fue reportada en un análisis proteómico de proteínas nucleolares (Matafora *et al.*, 2009). Dado que H1 participa

en la compactación de cromatina de orden superior, su sumoilación podría modular esta función, aunque su mecanismo no ha sido descrito en profundidad (Ryu *et al.*, 2021). Sin embargo, la función de la sumoilación no puede definirse simplemente como negativa (Ryu *et al.*, 2021). En levadura se ha demostrado que la poli-sumoilación de H2B y H4 bloquea temporalmente el reclutamiento de la quinasa Ctk1, necesaria para fosforilar el extremo carboxilo-terminal (CTD) de RNAPII y permitir la elongación. Cuando Ulp2 elimina estas cadenas de SUMO en el momento adecuado, Ctk1 puede actuar y la transcripción avanza por lo que la sumoilación funciona como un regulador temporal (Ryu *et al.*, 2019). Asimismo, la sumoilación de histonas, junto con H3K4me2, recluta el complejo deacetilasa SET3C al interior de los genes durante la elongación. SET3C deacetila las histonas en estas regiones, impidiendo que promotores internos crípticos generen transcritos de RNA no codificante espurios como un mecanismo de control de calidad de la transcripción (Ryu *et al.*, 2020). Por lo tanto, la sumoilación de histonas funciona como señal regulatoria de precisión cuyo resultado depende del contexto y de su interacción dinámica con otras modificaciones ya sea reprimir genes, facilitar la elongación, mantener la fidelidad transcripcional o dirigir la localización de variantes de histonas. (Ryu *et al.*, 2021).

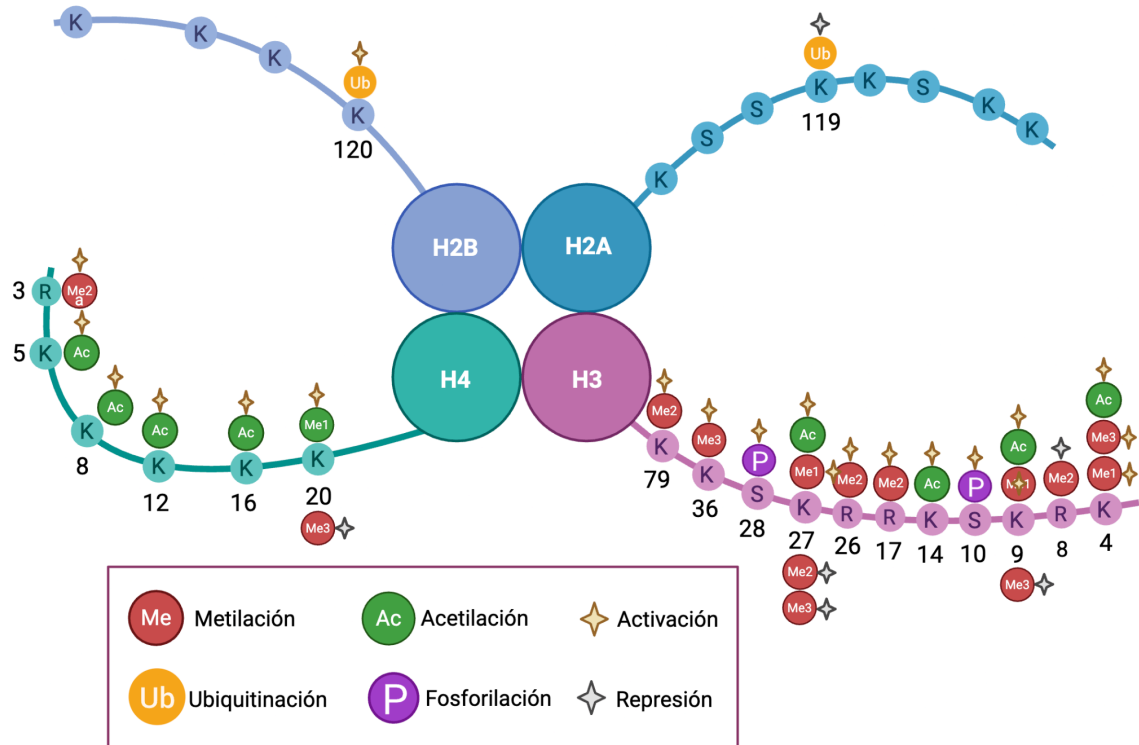


Figura 4. PTMs de histonas y su relación con la regulación transcripcional. Se ilustran diversas modificaciones postraduccionales en histonas, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, indicando su asociación con activación o represión transcripcional del DNA. Imagen creada con BioRender.

1.3.1 Metiltransferasas

Las metiltransferasas de histonas (HMT) actúan como enzimas tipo “*writers*”, que catalizan la adición de grupos metilo sobre residuos específicos de histonas y otras proteínas y desempeñan un papel fundamental en la regulación epigenética a nivel de la cromatina. Se caracterizan por su versatilidad funcional, debido a que pueden generar mono-, di- o tri metilaciones y pueden asociarse tanto con la activación como con la represión transcripcional (**Figura 5**) (Hyun *et al.*, 2017).

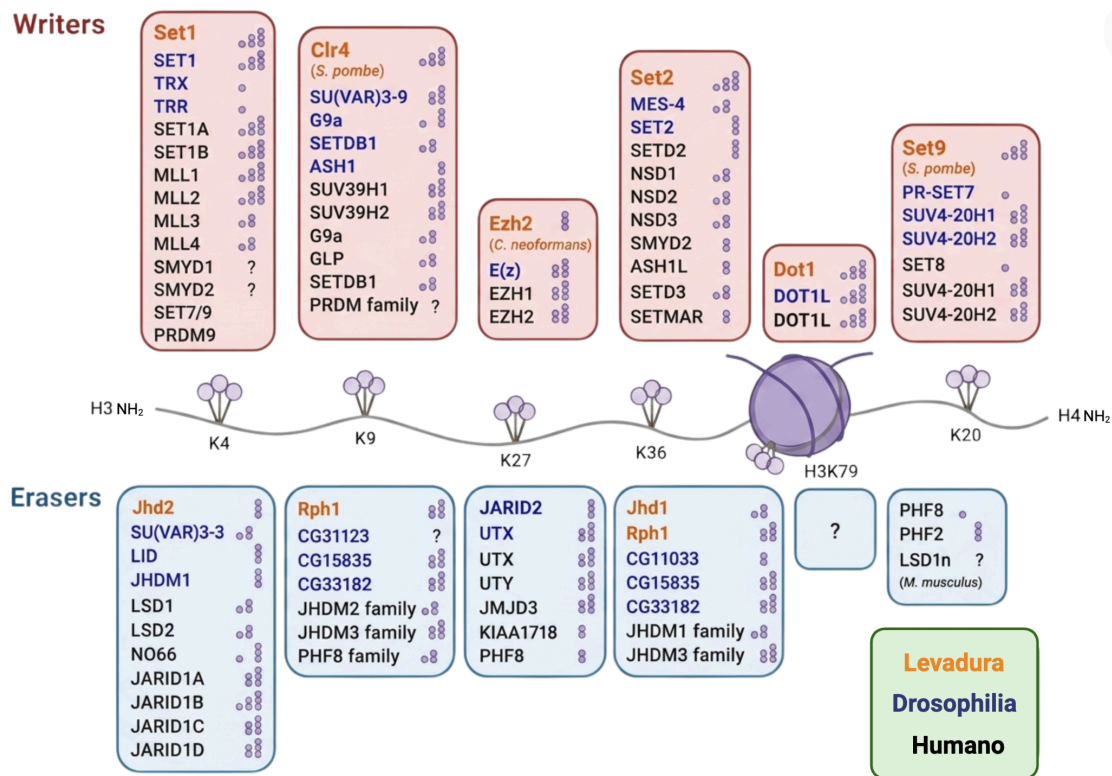


Figura 5. Principales proteínas *writers*, *erasers* y *readers* asociadas a la metilación de residuos de lisina en las histonas H3 y H4. Se muestran los principales sitios de metilación en histonas H3 y H4, así como las enzimas responsables de adicionar o remover estas marcas epigenéticas según su especificidad por el estado de metilación. Los círculos indican el grado de metilación: círculo simple, monometilación (me1); círculo doble, dimetilación (me2); círculo triple, trimetilación (me3). Imagen modificada de Hyun *et al.*, 2017.

Cuando una histona es metilada, el efecto biológico es ejercido principalmente a través de proteínas efectoras o “*readers*”, que reconocen estas modificaciones. Estas proteínas contienen dominios de unión a metil-lisina, entre los que destacan los dominios PHD, chromo, Tudor, PWWP, WD40, BAH, ADD, MBT, repetición de anquirina y zn-CW. Además, estos dominios pueden distinguir los residuos metilados en función de su estado de metilación y del contexto de aminoácidos circundantes (Hyun *et al.*, 2017). Dentro de la regulación epigenética, las más importantes son las proteínas metiltransferasas de lisina y arginina

(PKMT y PRMT, respectivamente), ya que participan directamente en el control de la expresión génica. Ambas familias de HMT utilizan un cofactor común de molécula pequeña S-adenosil-L-metionina (SAM), como donante universal de metilo para modificar los residuos K y R (Copeland *et al.*, 2009).

Las PKMTs pertenecen en su mayoría a la familia con dominio SET (Su(var)3–9, Enhancer of Zeste, and Trithorax). Este dominio permite reconocer la histona y transferir el grupo metilo desde SAM hacia la lisina blanco. Entre las PKMTs más importantes se encuentran SUV39H1/2, G9a, SETDB1, SMYD3 y EZH2, mientras que DOT1L es una excepción importante sin dominio SET (Hyun *et al.*, 2017). Estas metiltransferasas presentan especificidad tanto por el residuo de histona como por el grado de metilación que establecen (**Figura 6**). Por ejemplo, las metilaciones de H3K4 (H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3), generalmente asociadas con la activación transcripcional, son catalizadas principalmente por metiltransferasas de la familia SET1/MLL (KMT2). En contraste, las marcas represivas H3K27me2 y H3K27me3 son establecidas principalmente por EZH1 y EZH2, subunidades catalíticas del complejo represivo Polycomb PRC2 (Hyun *et al.*, 2017). Por otro lado, la eliminación de estas marcas está mediada por histonas desmetilasas (HDM), principalmente de las familias JMJC y LSD, siendo LSD1 (KDM1A) la primera desmetilasa descrita que funcionan como “erasers”, debido a que eliminan estas marcas de metilación, contribuyendo así a la regulación dinámica de la cromatina y de la expresión génica (Hyun *et al.*, 2017).

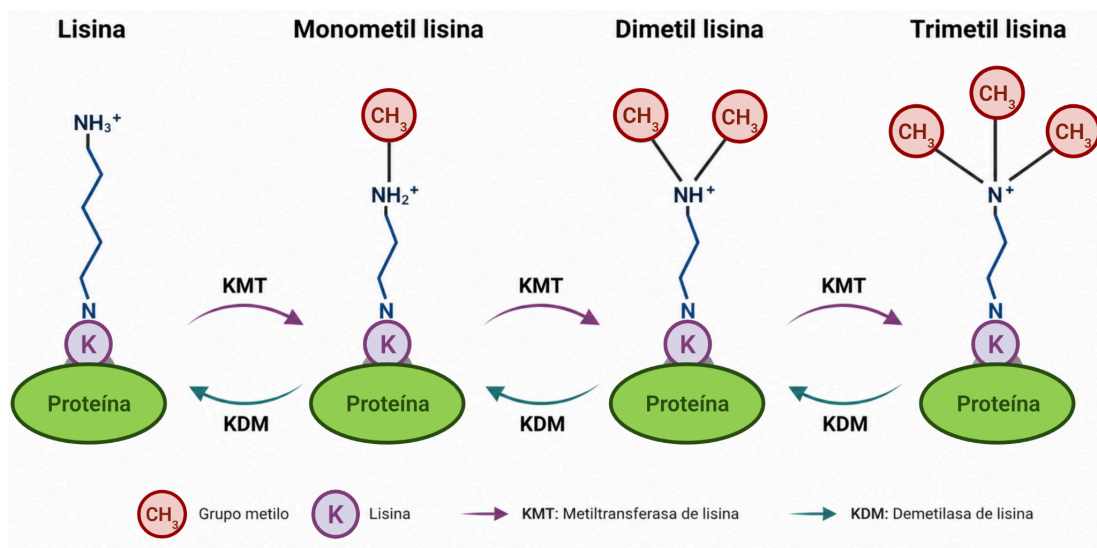


Figura 6. Proceso de metilación y desmetilación de lisinas. Imagen que muestra el proceso de metilación de lisina que puede aceptar hasta tres grupos metilo, dando lugar a mono-, di- o trimetil lisina. Las metiltransferasas de lisina (KMTs) catalizan la adición de grupos metilo a los sustratos, mientras que las desmetilasas de lisina (KDMs) eliminan los grupos metilo. Imagen modificada de Han *et al.*, 2019

Por otro lado, las PRMT (del inglés *protein arginine methyltransferases*) constituyen una familia de nueve enzimas en mamíferos (PRMT1–9) encargadas de modificar residuos R en histonas y otras proteínas nucleares. A diferencia de las PKMT, estas enzimas no poseen el dominio SET y se clasifican según el tipo de dimetilación que generan. Las PRMT catalizan la monometilación (MMA), y dos tipos de dimetilación: asimétrica (aDMA) y simétrica (sDMA) sobre residuos específicos de arginina en las histonas H3 y H4. En la dimetilación asimétrica, ambos grupos metilo se adicionan al mismo nitrógeno terminal del grupo guanidino de la arginina, mientras que en la dimetilación simétrica cada nitrógeno terminal recibe un grupo metilo. Por ejemplo, PRMT1, PRMT3, PRMT4, PRMT6 y PRMT8 generan dimetilación asimétrica, mientras que PRMT5 y PRMT7 producen dimetilación simétrica. Estas diferencias estructurales influyen en el reconocimiento de las marcas por parte de proteínas efectoras y en sus funciones biológicas (Bedford *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2023).

Las metilaciones de arginina también participan en la regulación transcripcional, la remodelación de la cromatina y la señalización celular. Dependiendo del contexto y del residuo modificado, estas marcas pueden asociarse tanto con activación como con represión génica. Por ejemplo, H3R17me2a y H3R26me2a, catalizadas principalmente por PRMT4/CARM1, así como H4R3me2a, establecida por PRMT1, se relacionan con estados de cromatina activa y promoción de la transcripción. En contraste, marcas como H4R3me2s y H3R8me2s, generadas principalmente por PRMT5, se asocian con silenciamiento transcripcional y formación de cromatina represiva (Bedford *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2023). En conjunto, tanto PKMT como PRMT son fundamentales para establecer marcas epigenéticas estables en la cromatina, ya que regulan la accesibilidad del DNA y el reclutamiento de complejos transcripcionales.

1.3.2 Metionina adenosiltransferasa (MAT)

Las proteínas metionina adenosiltransferasas (MAT), son enzimas esenciales para la biosíntesis de S-adenosil metionina (SAM ó AdoMet) a partir de ATP y metionina, el principal donante de grupos metilo para la metilación de ácidos nucleicos, fosfolípidos, histonas, aminos biógenos y proteínas, siendo el segundo cofactor enzimático más utilizado en la célula (Ramani *et al.*, 2017; Kotb *et al.*, 1993; Niland *et al.*, 2021; Rodríguez *et al.*, 2007). En mamíferos se han identificado tres genes distintos, MAT1A, MAT2A y MAT2B, que codifican las proteínas MAT α 1, MAT α 2 y MAT β , respectivamente, las cuales actúan como subunidades catalíticas o reguladoras de las isoenzimas MAT (**Tabla 1**). La subunidad MAT α 1 se expresa

principalmente en el hígado, especialmente en hepatocitos, y en células acinares pancreáticas. Por otro lado, MAT α 2 (395 aminoácidos) y MAT β (334 aminoácidos) se expresan en tejidos extrahepáticos, así como en células estrelladas hepáticas y células de Kupffer. La interacción entre MAT α 2 y MAT β da lugar a la isoenzima MATII (Ramani *et al.*, 2017).

Por otro lado, la expresión de los genes MAT1A, MAT2A y MAT2B está regulada por distintos factores de transcripción y mecanismos epigenéticos. En el caso de MAT1A, su promotor contiene sitios de unión para factores como HNF, C/EBP, AP-1, STAT, c-Myc y v-Myb, los cuales participan en su regulación, especialmente en el hígado. La expresión de MAT1A se favorece por hipometilación e hiperacetilación de citosina, mientras que la hipermetilación de su promotor reduce su transcripción (Ramani *et al.*, 2017). Mientras que MAT2A es regulado positivamente por factores como Sp1, E2F y c-Myb, además de NF- κ B, AP-1 e HIF-1 α en condiciones de regeneración hepática, cáncer o hipoxia. Por ejemplo, se ha visto que en el promotor de MAT2A hay sitios de consenso para los factores de transcripción c-Myb y Sp1, exclusivamente en células de carcinoma hepatocelular (HCC), pero no en hígado normal. Asimismo, se observó una mayor unión de ambos factores al promotor de MAT2A, activando directamente su transcripción. En particular, c-Myb actúa como un regulador positivo clave de MAT2A, promoviendo su sobreexpresión en HCC y contribuyendo al fenotipo proliferativo de las células cancerosas (Ramani *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2001).

Tabla 1. Características de las proteínas MAT

Gen MAT	Subunidad MAT codificada	Complejo enzimático	Estructura oligomérica	Localización celular	Reguladores transcripcionales	Modificaciones postraduccionales
MAT1A	MAT α 1 (catalítica)	MATI, MATIII	MATI homotetramérica: (α 1) $_4$, MATIII homodimérica: (α 1) $_2$	Citoplasma y núcleo (hepatocitos)	C/EBP	Nitrosilación Fosforilación
MAT2A	MAT α 2 (catalítica)	MATII	Heterooligomérica (α 2) $_2$ (β) $_1$ ó (α 2) $_4$ (β) $_2$	Citoplasma y núcleo (tejidos extrahepático)	Sp1, c-Myb , E2F, TNF- α , HIF-1 α , PPAR γ , PPAR β	Sumoilación Fosforilación Acetilación
MAT2B	MAT β (reguladora)				TNF- α , Sirtuin 1	Fosforilación

Modificado de Ramani *et al.*, 2017.

Además de la regulación transcripcional, la función de las proteínas MAT también está controlada por diversas modificaciones postraduccionales que influyen en su actividad y estabilidad. En MAT α 1, procesos como la nitrosilación y la oxidación disminuyen su actividad

enzimática e incluso pueden inactivarla, mientras que la fosforilación contribuye a mantener su función adecuada. En MAT α 2 y MAT β , la fosforilación aumenta la estabilidad y favorece la su función celular. De manera similar, la sumoilación de MAT α 2 promueve su estabilidad y fortalece sus interacciones proteicas. En contraste, la acetilación de MAT α 2 produce un efecto opuesto, al favorecer su desestabilización y reducir su permanencia celular. En conjunto, estas modificaciones regulan de forma positiva o negativa la función de las enzimas MAT según el contexto celular (Ramani *et al.*, 2017).

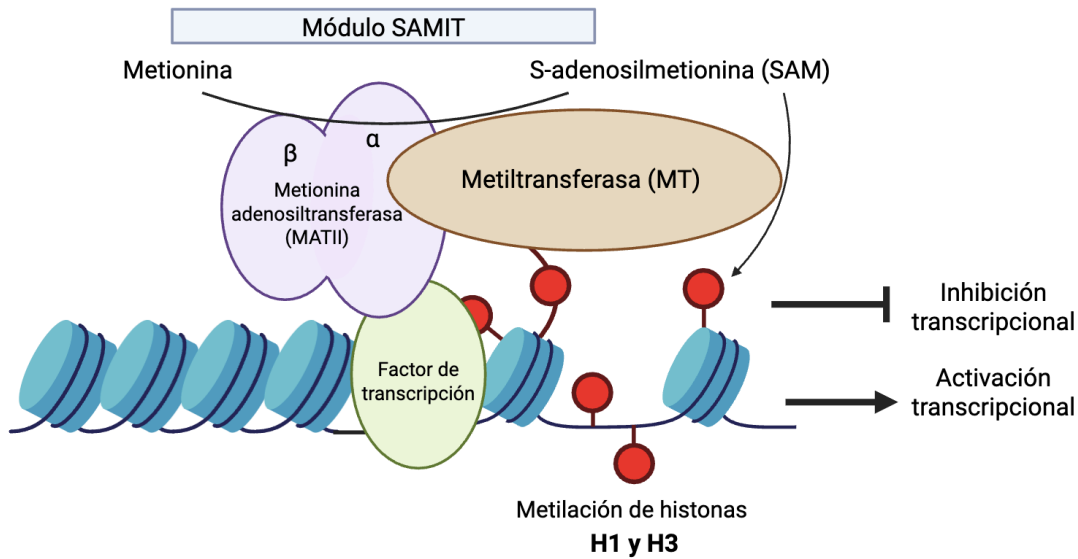


Figura 7. Participación de MATII α en la regulación epigenética mediante su interacción con MafK y metiltransferasas. Se muestra la interacción de MATII α con el FT MafK y con metiltransferasas, formando un módulo funcional que regula la expresión génica. MATII α es reclutada a elementos MARE, donde actúa como correpresor al proporcionar S-adenosilmetionina (SAM) localmente, contribuyendo a la represión transcripcional. Imagen modificada de Katoh *et al.*, 2011, Kera *et al.*, 2013 y Igarashi *et al.*, 2013.

La localización subcelular de las proteínas MAT constituye otro factor importante que influye en su función. Inicialmente, las enzimas MAT se consideraban proteínas exclusivamente citosólicas, y se pensaba que SAM producida en el citoplasma era transportada al núcleo para llevar a cabo reacciones de metilación de DNA e histonas. Sin embargo, estudios posteriores demostraron la presencia de isoenzimas MAT activas dentro del núcleo, particularmente de MATI/III (MAT α 1), tanto en hepatocitos como en otros tejidos de mamíferos. Esta localización nuclear, donde incluso se detectaron formas tetraméricas y monoméricas con actividad catalítica, sugiere una producción local de SAM necesaria para procesos epigenéticos específicos. Además, la acumulación nuclear de MAT α 1 se correlacionó con el aumento de la trimetilación de H3K27 (H3K27me3), una marca epigenética asociada

con la represión génica. De manera similar, las subunidades MAT α 2 y MAT β de la isoenzima MATII también se han identificado en el citoplasma y en el núcleo, indicando que su función puede depender de su localización subcelular y de su participación en distintos complejos regulatorios dentro del ambiente nuclear (Ramani *et al.*, 2017).

Sin embargo, la función de MAT en el núcleo es en gran medida desconocida. De manera interesante, se ha demostrado que las proteínas MAT también pueden interactuar con factores de transcripción para regular la expresión génica. Por ejemplo, el análisis del interactoma del FT MafK reveló su interacción con MATII α , formando una red de interacción con proteínas asociadas a la cromatina, incluyendo complejos remodeladores como Swi/Snf y NuRD. Además, MATII α es reclutada al elemento de reconocimiento Maf (MARE) presente en el gen de la hemo oxigenasa-1 (HO-1), donde actúa como correpresor transcripcional junto con MafK. En este contexto, MATII α proporciona SAM localmente y, junto con MATII β , forma un módulo funcional denominado SAMIT, el cual favorece el suministro de grupos metilo necesarios para la represión transcripcional. Este SAM puede ser utilizado en modificaciones epigenéticas como la metilación de histonas, incluyendo H1 y H3, particularmente en marcas como H3K4me2 y H3K9me2, asociadas con la regulación de la cromatina. Esta función depende tanto de su interacción con reguladores de cromatina como de su capacidad para suministrar SAM a las metiltransferasas. De esta manera, MATII funciona como un puente entre el metabolismo de SAM y la regulación epigenética de la expresión génica (**Figura 7**) (Katoh *et al.*, 2011; Kera *et al.*, 2013).

1.4 Regulación a nivel de secuencia: Factores de transcripción pioneros

Una vez establecida la accesibilidad cromatínica, la regulación transcripcional depende de interacciones específicas entre factores reguladores y secuencias particulares del DNA. A nivel de secuencia, elementos cis-regulatorios como promotores y enhancers funcionan como plataformas de unión para factores de transcripción y complejos co-reguladores que controlan el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y la expresión de genes específicos (Klemm *et al.*, 2019; Ong *et al.*, 2011). Este proceso es esencial para el control preciso de la expresión génica, ya que el inicio de la transcripción es el punto de control más importante y está regulado por dos clases de proteínas: **1) factores generales de transcripción**, como la RNA pol II, proteínas accesorias y enzimas que intervienen en las modificaciones de las histonas y

la metilación del DNA; y **2) factores específicos de los genes**, también llamados "factores de transcripción" (FT) (Suter, 2020).

Los FT, están regulados por una amplia gama de vías de señalización celular que determinan su activación. Una vez activados los FT, deben reclutar a proteínas co-reguladoras para la descompactación local de la cromatina y permitir el acceso de la RNA pol II y la maquinaria de general de transcripción a la región promotora, regulando así la expresión génica (Orphanides *et al.*, 2002). Los FT reconocen secuencias específicas en el DNA mediante la formación de interacciones no covalentes entre residuos de aminoácidos y los grupos funcionales de las bases nitrogenadas del DNA, lo cual contribuye a la especificidad de unión FT-DNA. Los FT se clasifican de acuerdo a su modo de acción como: migrantes, que requieren la participación de cofactores; colonizadores, que requieren la descompactación de la cromatina; y pioneros, son los primeros en unirse al DNA ya que pueden reconocer sus secuencias aún y cuando están en las estructuras nucleosomales, debido a que tienen la capacidad bioquímica intrínseca de escanear motivos de secuencias parciales de DNA que están expuestas en la superficie de un nucleosoma y modifican la estructura de la cromatina de su sitio objetivo, permitiendo el acceso a otros FT y remodeladores de la cromatina (Fuglerud *et al.*, 2017; Fuglerud *et al.*, 2018; Zaret *et al.*, 2020; Slattery *et al.*, 2014).

Los FT pioneros se consideran reguladores maestros debido a su capacidad de cambiar las redes reguladoras de genes y la identidad celular, por lo tanto, cumplen una función clave en la diferenciación celular y en el desarrollo de órganos y tejidos (Slattery *et al.*, 2014). Recientemente, se han identificado algunos factores pioneros. Sin embargo, con excepción de FoxA1 (considerado el FT pionero prototipo) no se conoce completamente cómo funcionan estos FT pioneros a nivel molecular. Por ejemplo, FoxA1, tiene un dominio “*forkhead*” que le permite interactuar con los nucleosomas y modular la accesibilidad de la cromatina. No obstante, esta función se limita a FoxA1 (Fuglerud *et al.*, 2017; Fuglerud *et al.*, 2018).

Por otro lado, los FT pioneros se unen comúnmente a potenciadores (enhancers), que son elementos distales que aumentan la transcripción de un gen al interactuar, donde la accesibilidad a la cromatina varía según el tipo de célula. Los factores pioneros suelen interactuar con modificadores de la cromatina y facilitan la acetilación de histonas (por ejemplo, la H3K27ac) en los potenciadores. La acetilación de histonas en potenciadores permite la relajación de la estructura de cromatina resultante de la eliminación de la carga positiva de las histonas, la unión de proteínas con bromodominios y la comunicación potenciador-promotor mediante bucles de cromatina (Fuglerud *et al.*, 2017; Fuglerud *et al.*,

2018). Algunos ejemplos de factores de FT pioneros incluyen Paired box 7 (PAX7) y el factor de células T (TCF1), los cuales pueden dirigirse a regiones de cromatina asociadas con marcas represivas como H3K27me3 y H3K9me3, induciendo posteriormente la activación de las secuencias de DNA subyacentes. Sin embargo, no todos los estados de heterocromatina parecen ser igualmente permisivos para la acción de estos FT. Por ejemplo, PAX7 puede activar potenciadores asociados con regiones marcadas por H3K9me2, pero no con regiones más compactas enriquecidas en H3K9me3, lo que sugiere que ciertos estados de cromatina requieren mecanismos adicionales de descompactación para permitir la unión y acción de los factores pioneros. A pesar de ello, los mecanismos moleculares mediante los cuales estos FT interactúan con regiones heterocromáticas permanecen poco comprendidos (**Figura 8**) (Barral *et al.*, 2024; Mayran *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha observado que las PTMs desempeñan un papel importante en la función de los FT pioneros, ya que pueden modular sus actividades de escaneo, unión al DNA y apertura local de la cromatina. Por ejemplo, la acetilación de PAX7 modula su unión a la cromatina y, en consecuencia, el perfil de expresión génica, mientras que su metilación es necesaria para su asociación con cromosomas mitóticos. En este sentido, la identificación de PTMs en factores pioneros, así como de las enzimas responsables de dichas modificaciones y sus efectos funcionales, representa un aspecto clave para futuras investigaciones (**Figura 8**) (Barral *et al.*, 2024; Mayran *et al.*, 2018; Sincennes *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2015).

Otro ejemplo es el FT c-Myb (acrónimo virus de la mieloblastosis aviar) de *Homo sapiens* es el FT canónico de la familia Myb. Este FT posee tres dominios clave: un dominio de unión al DNA de tipo MYB (DBD-MYB) en la región N-terminal, un dominio de transactivación central (tAD) y un dominio regulador C-terminal (CRD). Este FT regula la expresión génica en varios tipos celulares y participa en procesos que abarcan desde el control del ciclo celular hasta la diferenciación. c-Myb se encuentra altamente expresado y desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación celular de progenitores mieloides y linfoides. Por ejemplo, c-Myb actúa en conjunto con p300/CBP para activar potenciadores que definen la identidad celular durante la hematopoyesis, lo que a su vez puede activar de forma aberrante la expresión de oncogenes durante el desarrollo de la leucemia (Fuglerud *et al.*, 2017; Fuglerud *et al.*, 2018).

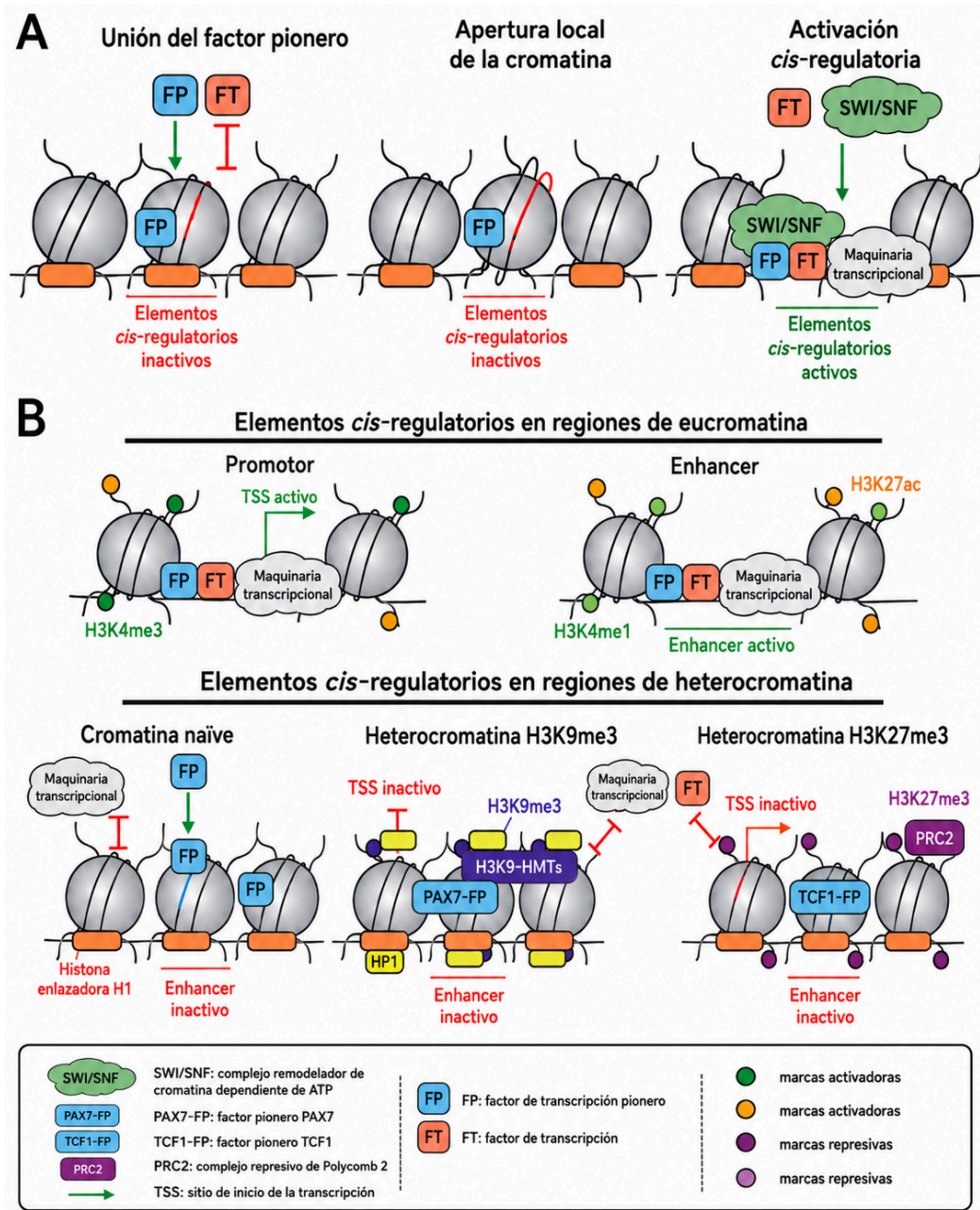


Figura 8. Mecanismo de acción de los FT pioneros en la apertura de la cromatina. A) Los factores pioneros se unen a regiones de cromatina cerrada, inducen accesibilidad local del DNA y promueven la reorganización de la cromatina, facilitando la activación génica mediante el reclutamiento de complejos modificadores de histonas, la RNA polimerasa y otros reguladores. B) Comparación del estado de elementos *cis*-regulatorios en eucromatina y cromatina silenciosa, donde los factores pioneros, a diferencia de los factores de transcripción convencionales, pueden unirse a regiones de cromatina compacta. Imagen modificada de Barral *et al.*, 2024.

c-Myb se considera un FT pionero debido a su capacidad de reconocer su secuencia de consenso en la cromatina cerrada, posiblemente marcada por H3K4me1 (monometilación de la lisina 4 de la histona H3), e influir en la conformación del DNA. Para ello, c-Myb se une primero a la cromatina cerrada y recluta a través de su dominio tAD a los coactivadores con actividad de acetiltransferasa de histonas p300/CBP que acetilan el residuo 27 de lisina de la

histona H3 (H3K27ac). El dominio KIX de los coactivadores CBP y p300 sirve como sitio de acoplamiento para la formación de heterodímeros entre el coactivador y FT específicos (Lemma *et al.*, 2021; Fuglerud *et al.*, 2018). Posteriormente, p300/CBP acetila los residuos de lisina conservados de las histonas, lo que neutraliza las cargas positivas de las histonas para relajar la cromatina y hace que c-Myb se desprenda de los nucleosomas. Una vez abierta la cromatina, c-Myb vuelve a unirse al DNA libre de nucleosomas de su sitio de reconocimiento. Por ejemplo, en uno de los genes diana del FT pionero c-Myb, es *mim-1*, en su promotor se recluta p300/CBP ocasionando la acetilación de histonas lo cual es esencial para su activación transcripcional. Esto sugiere que, para que c-Myb funcione plenamente como FT pionero, deben permanecer intactas las interacciones tanto con H3 como con p300/CBP (Fuglerud *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la unión de c-Myb a las histonas es deficiente cuando estas presentan modificaciones postraduccionales. En particular, c-Myb no puede unirse a el extremo amino-terminal de H3 cuando tiene estas PTMs: citrulinación H3R26, acetilación H3K27 y fosforilación H3S28. Principalmente, la H3K27ac provoca la disociación de c-Myb de la cromatina tras la activación de sus genes diana. Por lo tanto, la acetilación de las histonas regula la unión del FT pionero a la cromatina. Asimismo, se ha demostrado que el residuo D152 del repetido 3 del DBD-MYB de c-Myb es muy importante para su interacción con el DNA, ya que al sustituirlo por una valina (D152V), c-Myb se une al DNA con menor eficiencia (**Figura 9**) (Fuglerud *et al.*, 2018).

Otro ejemplo de FT pionero es FOXA1, el cual se une a enhancers enriquecidos en mono-metilación de H3K4 (H3K4me1). El análisis del interactoma de este FT mediante ensayos de RIME, reveló que FOXA1 se asocia con histonas y proteínas remodeladoras de la cromatina, particularmente con las histonas H2A/B y la histona-lisina metiltransferasa MLL3 (**Figura 10A**). Inicialmente, se consideraba que MLL3 participaba principalmente en la deposición de H3K4me3 en regiones promotoras; sin embargo, posteriormente se demostró que también contribuye al establecimiento de la marca H3K4me1, una marca asociada con enhancers. Mediante análisis de ChIP-seq en células de cáncer de mama, se observó que una gran proporción de los sitios de unión de MLL3 colocaliza con FOXA1 y presenta enriquecimiento principalmente de H3K4me1, mientras que un menor porcentaje también muestra H3K4me3, relacionada con regiones promotoras activas (Jozwik *et al.*, 2016).

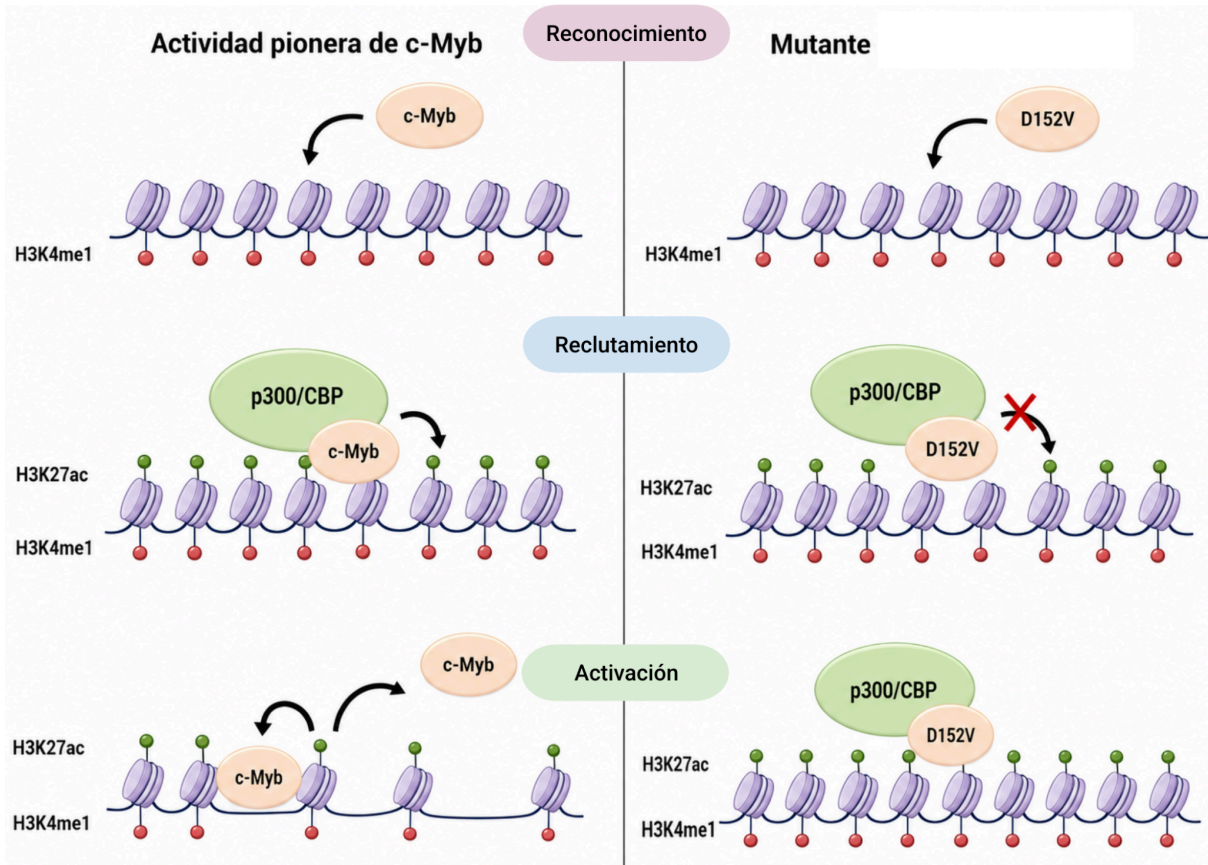


Figura 9. Actividad pionera de c-Myb en la apertura de la cromatina. La figura muestra que c-Myb puede reconocer cromatina cerrada asociada con la marca H3K4me1 y reclutar a p300/CBP, lo que favorece la acetilación de histonas en H3K27ac. Esta modificación reduce la compactación nucleosomal, aumenta la accesibilidad de la cromatina, permite la activación del gen blanco y favorece que c-Myb se desprenda después de iniciar la apertura cromatina. El mutante D152V conserva cierta capacidad de unirse a la cromatina y asociarse con p300/CBP, pero no promueve eficientemente la acetilación H3K27ac. Como consecuencia, la cromatina permanece cerrada y el gen blanco se mantiene en estado silenciado. Tomado y modificado de Fuglerud *et al.*, 2018

Además, se observó que las regiones unidas por MLL3 exhiben una fuerte señal de FOXA1 y H3K4me1, sugiriendo una cooperación funcional entre ambas proteínas en elementos reguladores activos o preparados (**Figura 10B-C**). Asimismo, la disminución de FOXA1 redujo la unión de MLL3 a la cromatina, indicando que FOXA1 participa en el reclutamiento o estabilización de MLL3 en estas regiones regulatorias. Estos hallazgos demostraron que FOXA1 no solo reconoce enhancers previamente marcados, sino que también participa activamente en el establecimiento del paisaje epigenético asociado con la activación transcripcional (Jozwik *et al.*, 2016). En conjunto, estas interacciones facilitan el establecimiento de configuraciones cromáticas asociadas con actividad transcripcional.

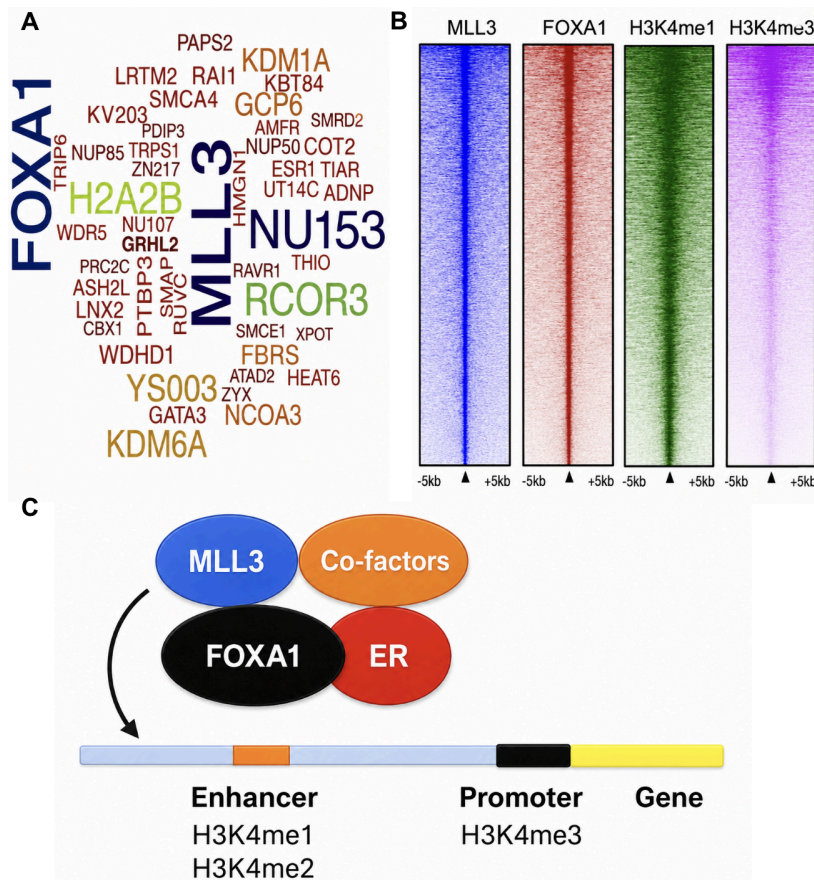


Figura 10. FOXA1 recluta a MLL3 para establecer marcas epigenéticas en enhancers. **A)** Interactoma FOXA1 en células de cáncer de mama MCF-7. Los datos se representan como una nube de palabras, donde el tamaño de los nombres de las proteínas representa la fuerza y la confianza de las interacciones. **B)** Mapa de calor de las regiones unidas conjuntamente MLL3-FOXA1 que muestran la intensidad de la señal de unión para FOXA1, MLL3, H3K4me1 y H3K4me3. **C)** Mecanismo de la función de MLL3 y FOXA1. FOXA1 recluta a la enzima MLL3 la cual puede agregar grupos metilo al residuo de lisina 4 de la histona 3. Imagen modificada de Jozwik *et al.*, 2016.

2. *Entamoeba histolytica* (antecedentes particulares)

2.1 Ciclo de vida

El parásito *E. histolytica*, es el agente causante de la amebiasis humana, una enfermedad enteropática que afecta a millones de personas en todo el mundo. Aunque, las infecciones asintomáticas son las más comunes, los síntomas de amebiasis invasiva se desarrollan en aproximadamente el 10% de las personas infectadas (Guillén, 2023). El ciclo de vida de este parásito comienza con la ingesta de alimentos contaminados con quistes o vía fecal-oral. Los quistes son la forma infectiva y resistente del parásito. El quiste, permite que la ameba sobreviva fuera del hospedero, así como resistir a las distintas condiciones ambientales mientras halla a su próximo hospedero. Los quistes tienen forma esférica y miden entre 10 y 12 μm . La pared del quiste tiene entre 120 a 150 nm de espesor y está formada principalmente

de quitina, el cual es un polímero de carbohidratos formado por unidades de N-acetilcolina-D glucosamina. En el citoplasma del quiste se encuentran de 1 a 4 núcleos que dependen de la madurez del quiste (Olivos *et al.*, 2011). Una vez dentro del hospedero, los jugos gástricos desintegran la pared del quiste liberando la forma vegetativa del parásito (trofozoito) (Olivos *et al.*, 2011).

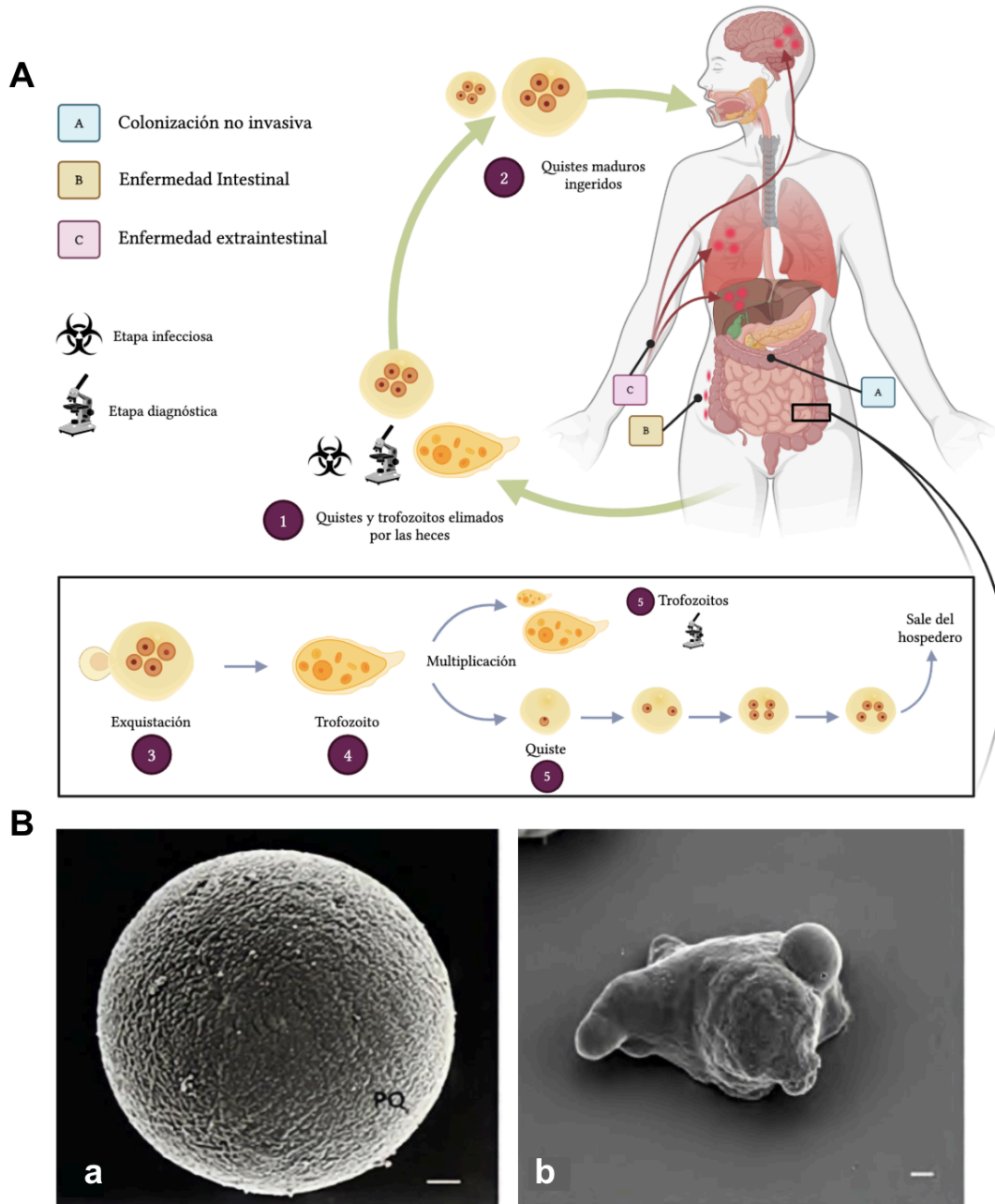


Figura 11. Ciclo y estadios de vida de *E. histolytica*. A) Representación esquemática del ciclo de vida de *E. histolytica*, incluyendo la ingestión de quistes maduros, el proceso de excistación en el intestino delgado, la liberación de trofozoitos y su colonización en el intestino grueso, así como la formación y eliminación de nuevos quistes al ambiente. B) Principales estadios morfológicos del parásito. **Ba)** Quiste, correspondiente a la forma infecciosa y resistente responsable de la transmisión fecal-oral. **Bb)** Trofozoito, forma vegetativa e invasiva asociada con colonización tisular y patogenicidad. Imagen modificada de CDC *Public Health Image Library*, 2019 y Chávez *et al.*, 2013.

El trofozoito, es la forma infectiva del parásito. Su tamaño oscila entre 20 y 40 μm y se caracteriza por un núcleo esférico de 4 a 7 μm de diámetro. La membrana plasmática del trofozoito tiene un grosor de 10 nanómetros y está compuesta por lípidos específicos que permiten que la amiba se mueva y se dirija a las células blanco o a otros sitios específicos dentro del hospedero (Chávez *et al.*, 2013). En la membrana se forma el casquete membranal, que le permite a la amiba evadir la respuesta inmunitaria del hospedero y desprenderse de moléculas dañinas. La plasticidad de la membrana, junto con la reorganización del citoesqueleto y la fluidez del citoplasma, le permite cambiar constantemente su forma y desplazarse. El trofozoito forma estructuras llamadas pseudópodos, mediante las cuales captura los alimentos líquidos por pinocitosis y sólidos por fagocitosis (Olivos *et al.*, 2011). El trofozoito viaja hasta el intestino grueso, se adhiere a la mucosa donde se alimenta de bacterias y se divide por fisión binaria. Finalmente, el trofozoito viajará hacia el colon, donde comenzará su proceso de enquistamiento para finalmente ser excretado con las heces y reiniciar su ciclo de vida en otro hospedero (**Figura 11**) (Guillén, 2023; Chávez *et al.*, 2013).

2.2 Genoma

El genoma de *E. histolytica* fue uno de los primeros genomas protistas secuenciados (Clark *et al.*, 2007). En el año 2005 Loftus y colaboradores, completaron la primera secuenciación del genoma de *E. histolytica*. Posteriormente, en 2010, se realizó un nuevo análisis y re-anotación del genoma, revelando que el tamaño del genoma de *E. histolytica* era notablemente más pequeño en comparación con el análisis inicial, abarcando un tamaño de 20 Mb distribuido en 1,486 scaffolds. Además, se estimó que este organismo albergaba 8,201 genes que codifican para proteínas, teniendo el gen más grande un tamaño de 15,210 pb y el más pequeño de 147 pb. Asimismo, se estima que alrededor de 2,000 genes contienen intrones y el promedio de intrones/gen es de 1.28. De manera interesante, el 60% de estos genes se mantuvieron idénticos a la anotación previa, mientras que el 40% presentó cambios estructurales notables. También se observó que el 60% de los genes experimentaron cambios en su clasificación funcional al compararlos con secuencias más recientes y nuevos datos experimentales. Además, solo se asignaron funciones putativas a 3,788 proteínas, lo que equivale al 46% del proteoma predicho de *E. histolytica*. Dentro de estas proteínas, se identificaron 897 familias compuestas por cinco o más miembros, de las cuales 58 familias no mostraron homología con proteínas conocidas. Esto sugiere la posible especificidad de estas

familias para la especie *Entamoeba*. Sin embargo, para ambas anotaciones no se logró una cobertura completa debido a que este parásito presenta aneuploidía y una gran cantidad de regiones repetidas (Lorenzi *et al.*, 2010). La aneuploidía del genoma de *E. histolytica*; a veces más grande que tetraploide, contiene una o más copias adicionales de cromosomas truncados más cortos. Esto se debe a que la citocinesis en *E. histolytica* no está acoplada con la división nuclear, por lo tanto, la división celular puede ser asimétrica, dando lugar a células hijas con cero, uno o varios núcleos (Guillén, 2023).

2.3 Regulación transcripcional

La regulación transcripcional en *E. histolytica* presenta características particulares que la diferencian de otros organismos eucariotas. Los elementos promotores centrales de los genes codificadores de proteínas de *E. histolytica* incluyen una secuencia similar a TATA (GTATTAAAG/C) en la posición -30, un elemento nuevo denominado GAAC (GAACT) cuya ubicación varía entre TATA y el sitio de inicio de la transcripción, y un elemento iniciador putativo (Inr) (AAAAATTCA) situado sobre el sitio de inicio de la transcripción (Singh *et al.*, 1997). Las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' son inusualmente cortas; las 5' UTR pueden medir entre 5 y 21 nucleótidos, mientras que las 3' UTR generalmente no superan los 34 nucleótidos (de Dios *et al.*, 2005; Bruchhaus *et al.*, 1993).

Asimismo, en la región promotora se identificó un motivo conservado similar a una caja TATA, con la secuencia TATTTAAA, localizado aproximadamente 30 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Este motivo parece funcionar como un elemento regulador importante, ya que ensayos de EMSA demostraron que puede unirse específicamente a proteínas nucleares, lo que sugiere que actúa como sitio de unión para factores de transcripción. En el caso del gen de la lectina de 170 kDa, se encontró una variante de este motivo (TAATTTAAA) repetida cuatro veces, lo que sugiere una posible función como elemento *cis*-regulador específico de este gen (Bruchhaus *et al.*, 1993). También se observó que el inicio de la transcripción ocurre de forma consistente sobre los motivos conservados ATTCA o ATCA, localizados muy cerca del codón de inicio ATG. Debido a que en *E. histolytica* no existe evidencia de *trans-splicing*, como ocurre en kinetoplástidos, estos motivos podrían funcionar como una especie de secuencia líder necesaria para el correcto inicio de la transcripción (Bruchhaus *et al.*, 1993).

Otro aspecto importante es el modo de transcripción. Aunque varios genes aparecen

muy próximos entre sí y orientados en la misma dirección, el análisis de *nuclear run-on* demostró que al menos el gen de la lectina de 170 kDa se transcribe de forma monocistrónica, similar a la mayoría de los eucariotas, y no policistrónica como en kinetoplástidos. Esto indica que, aunque existe una organización genómica compacta, cada gen mantiene su propia regulación transcripcional (Bruchhaus *et al.*, 1993).

Por otro lado, en *E. histolytica* se han descrito diversos factores de transcripción que regulan la expresión génica de este parásito. Algunas de estas proteínas fueron identificadas mediante el análisis funcional de promotores, mientras que otras se reconocieron por su homología con factores presentes en otros eucariotas, incluidos metazoos como *Homo sapiens* y amebozoos como *Dictyostelium discoideum*. Entre los factores mejor caracterizados se encuentra URE3-BP, una proteína que reconoce el motivo URE3, cuya secuencia central corresponde a TATTCTATT. Este elemento regulador fue descrito inicialmente en promotores de genes asociados con virulencia, como el gen de la lectina Gal/GalNAc y el gen de ferredoxina. Posteriormente, URE3-BP fue identificado mediante un sistema de híbrido en levadura y se demostró su unión específica al DNA mediante EMSA, ensayos con proteínas recombinantes y análisis de ocupación de promotores. Además, estudios transcriptómicos y funcionales mostraron que URE3-BP regula genes relacionados con virulencia, motilidad y remodelación de la superficie celular, por lo que se considera uno de los factores transcripcionales más importantes descritos en *E. histolytica* (Purdy *et al.*, 1996; Gilchrist *et al.*, 1998, Gilchrist *et al.*, 2001, Gilchrist *et al.*, 2003, Gilchrist *et al.*, 2008, Gilchrist *et al.*, 2010).

Otro caso importante corresponde a EhEBP1 y EhEBP2, dos proteínas de unión específica al elemento URE4 del promotor de *hgl5*, gen que codifica una subunidad de la lectina Gal/GalNAc. Estas proteínas fueron identificadas a partir de extractos nucleares mediante purificación por afinidad a DNA y ensayos EMSA. Los análisis con proteínas recombinantes demostraron que EhEBP1 y EhEBP2 se unen específicamente a oligonucleótidos que contienen el motivo URE4, que incluye repeticiones ricas en adenina como AAAAATGAA. Debido a esto, se les considera proteínas reguladoras asociadas al control de genes de virulencia en *E. histolytica* (Schaenman *et al.*, 2001).

También se ha descrito una proteína tipo p53 en *E. histolytica*, denominada Ehp53. Esta proteína fue reconocida por anticuerpos contra p53 de mamíferos y se demostró que puede unirse, mediante EMSA, a una secuencia consenso similar a la reconocida por p53. Sin embargo, es más preciso señalar que estos resultados sugieren una posible función reguladora

relacionada con respuestas celulares, ya que la caracterización funcional de sus genes blanco en *E. histolytica* no está tan desarrollada como en otros factores transcripcionales (Mendoza *et al.*, 2003).

Por otra parte, EhHMGB1 corresponde a una proteína tipo high-mobility group box. A diferencia de los factores que reconocen motivos específicos de DNA, EhHMGB1 actúa principalmente como una proteína arquitectónica de cromatina. Su caracterización mostró localización nuclear, capacidad de doblar DNA *in vitro* y capacidad para favorecer la unión de p53 a su secuencia blanco en ensayos *in vitro*. Además, la sobreexpresión de EhHMGB1 modificó la expresión de un conjunto de transcritos, lo que sugiere que puede participar en la organización local de la cromatina y en la regulación indirecta de la expresión génica (Abhyankar *et al.*, 2008).

Asimismo, se han identificado proteínas tipo C/EBP asociadas con la regulación del gen *EhPgpl*, un gen relacionado con resistencia a múltiples fármacos. En el promotor de *EhPgpl* se describieron dos sitios tipo CCAAT/enhancer-binding protein que funcionan como elementos cis-activadores. Estos sitios fueron analizados mediante mutagénesis, transfección, ensayos de unión DNA-proteína y purificación por afinidad, lo que permitió proponer que proteínas tipo C/EBP participan en la activación transcripcional de *EhPgpl* (Marchat *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha caracterizado a EhTBP, la proteína de unión a caja TATA de *E. histolytica*, como parte de la maquinaria basal de transcripción. EhTBP reconoce la secuencia TATTTAAA, considerada una variante canónica de caja TATA en este parásito, y también puede unirse a otras variantes TATA presentes en promotores amebianos. Además, se ha descrito un factor relacionado con TBP (TBP-related factor 1), que también pertenece a la familia de factores basales de transcripción. En conjunto, estos factores podrían participar en el ensamblaje y modulación de la maquinaria basal de transcripción en *E. histolytica* (Luna-Arias *et al.*, 1999; de Dios-Bravo *et al.*, 2005; Castañón-Sánchez *et al.*, 2010).

Por último, se han identificado FT de la familia Myb, dentro de la cual destaca EhMyb-dr y EhMyb10. EhMyb-dr, que reconoce secuencias ricas en citosinas como CCCCCC, y fue estudiado mediante microarreglos, MEME, MAST, EMSA y ChIP. Este FT participa en la regulación coordinada de genes y en procesos de diferenciación trofozoito a quiste (Ehrenkaufer *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2009). Por otro lado, EhMyb10 reconoce el motivo consenso TAACGG, típico de proteínas MYB. Su identificación se realizó por búsqueda genómica y EMSA, mostrando unión específica *in vitro* (Meneses *et al.*, 2010). En conjunto, estos hallazgos muestran que *E. histolytica* posee una red compleja de regulación

transcripcional basada en factores específicos de unión a DNA, proteínas estructurales de cromatina y reguladores tipo Myb, que controlan procesos como virulencia, diferenciación, respuesta al estrés y expresión génica constitutiva (Singh *et al.*, 2010; Meneses *et al.*, 2010).

2.4 Regulación a nivel del núcleo

El genoma de *E. histolytica* está organizado en una cromatina similar a la de otros eucariotas, formada por nucleosomas funcionales de aproximadamente 10 nm de diámetro y asociada con modificaciones epigenéticas activadoras y represivas. Aunque aún no se ha demostrado formalmente la existencia de territorios cromosómicos como en mamíferos, sí existe una regulación espacial y epigenética del genoma que probablemente influye de forma importante en la expresión génica, diferenciación y virulencia del parásito. Sin embargo, a diferencia de organismos superiores, en *E. histolytica* no se observa una heterocromatina constitutiva tan claramente organizada en grandes dominios pericentroméricos o perinucleares bien definidos. Su genoma parece ser más dinámico y menos compartimentalizado (Torres *et al.*, 1991; Lozano *et al.*, 2016; Borbolla *et al.*, 2016; Cremer *et al.*, 2001; Huguenin *et al.*, 2010).

La eucromatina corresponde a regiones de cromatina más relajadas y accesibles, asociadas con genes transcripcionalmente activos. En *E. histolytica*, varios estudios han mostrado que los genes que se están expresando se localizan en regiones sensibles a nucleasas como DNasa I o micrococcal nuclease (MNase), lo que indica una estructura más abierta de la cromatina. Además, estas regiones suelen presentar modificaciones de histonas asociadas con activación transcripcional. Por otro lado, la heterocromatina corresponde a regiones más compactas y menos accesibles, relacionadas con silenciamiento génico. En *Entamoeba* se ha observado que ciertos genes reprimidos presentan menor accesibilidad cromatínica y están asociados con marcas represivas como H3K27me2, una dimetilación clásica relacionada con represión transcripcional. También se ha sugerido que regiones repetitivas, genes ribosomales no activos y algunas zonas subteloméricas podrían comportarse como dominios heterocromáticos (Torres *et al.*, 1991; Borbolla *et al.*, 2016; Rendón *et al.*, 2018; Loftus *et al.*, 2005).

En resumen, en *E. histolytica* el genoma está organizado en cromatina con nucleosomas funcionales, modificaciones epigenéticas activadoras y represoras, y una arquitectura nuclear especializada. Aunque aún no se ha demostrado formalmente la existencia

de territorios cromosómicos como en mamíferos, sí existe una regulación espacial y epigenética del genoma que probablemente influye de forma importante en la expresión génica, diferenciación y virulencia del parásito (Torres *et al.*, 1991; Borbolla *et al.*, 2016; Rendón *et al.*, 2018; Loftus *et al.*, 2005; Huguenin *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2016).

2.5 Regulación a nivel de la cromatina

Aunque la organización y regulación de la cromatina han sido ampliamente caracterizadas en otros eucariotas, en *E. histolytica* los mecanismos epigenéticos asociados con el control transcripcional aún son poco conocidos. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el genoma de *E. histolytica* está organizado en cromatina, cuya unidad fundamental es el nucleosoma. El genoma de este parásito codifica para las histonas H2A, H2B, H3 y H4, lo que sugiere que el DNA se enrolla alrededor de octámeros de histonas de forma similar a otros eucariotas. Sin embargo, el DNA linker entre nucleosomas presenta una longitud irregular, a diferencia de los ~40 pb más uniformes observados en metazoos, lo que sugiere una organización de cromatina más flexible, diferencias en la compactación y organización de la cromatina (Lozano *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha observado que las histonas de *E. histolytica* presentan diferencias en su secuencia aminoacídica respecto a las histonas de metazoos; sin embargo, conservan regiones ricas en residuos básicos de lisina y arginina que pueden ser objetivos potenciales para modificaciones postraduccionales como la acetilación y la metilación, a través de la acción de las acetiltransferasas de histonas (HAT) o las metiltransferasas de lisina o arginina (HKMT o PRMT), respectivamente (Lozano *et al.*, 2016). Por ejemplo, el extremo N-terminal de la histona H3 de *E. histolytica* es significativamente diferente de las de los eucariotas superiores, pero aún contiene la mayoría de los residuos putativos que suelen ser objeto de PTM, con la excepción del noveno residuo, donde hay una arginina en lugar de una lisina (Huguenin *et al.*, 2010; Fodinger *et al.*, 1993). Por otro lado, la histona H4 comparte aproximadamente un 71 % de identidad de secuencia con la histona H4 de mamíferos. Las principales diferencias se localizan en el extremo amino terminal (NH₂-terminal), donde presenta tres inserciones ausentes en las histonas H4 de otros eucariotas. Una de estas inserciones se encuentra al inicio de la región amino terminal, otra entre los aminoácidos 10 y 11, y una tercera después del aminoácido 14. Esta última inserción resulta particularmente relevante debido a la presencia de tres residuos adicionales de lisina, los cuales podrían constituir sitios potenciales para modificaciones postraduccionales, como

acetilación o metilación, relacionadas con la regulación de la cromatina y la expresión génica (Lozano *et al.*, 2016; Binder *et al.*, 1995).

Mediante análisis *in silico*, se han identificado algunas proteínas involucradas en la regulación epigenética de *E. histolytica*, tales como acetiltransferasas, desacetilasas, metiltransferasas de DNA, metiltransferasas de histonas de lisina y arginina, y el complejo remodelador de la cromatina SWI2/SNF2 ATPasas (Ramakrishnan *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2005; Borbolla *et al.*, 2015; Borbolla *et al.*, 2016; Lyer *et al.*, 2008). En el caso de las proteínas involucradas en la acetilación de histonas, estas pertenecen a las familias GNAT y MYST, de las cuales la acetiltransferasa EhMYST se ha demostrado presenta actividad HAT con histonas del timo de ternera y mostró una preferencia por la histona H4, similar a la proteína MYST de levadura, Esa1 (Lozano *et al.*, 2016; Ramakrishnan *et al.*, 2004). Por otro lado, se detectó actividad de histona desacetilasa (HDAC) en extractos nucleares de *E. histolytica*, lo que sugiere la presencia de enzimas desacetilasas funcionales en el parásito. Adicionalmente, se ha identificado un homólogo amebiano de HDAC1 denominado ehHDAC. Sin embargo, aunque estos resultados apoyan la existencia de mecanismos de desacetilación de histonas en *E. histolytica*, el estudio no evaluó directamente la actividad catalítica específica de ehHDAC (Lozano *et al.*, 2016; Ramakrishnan *et al.*, 2004).

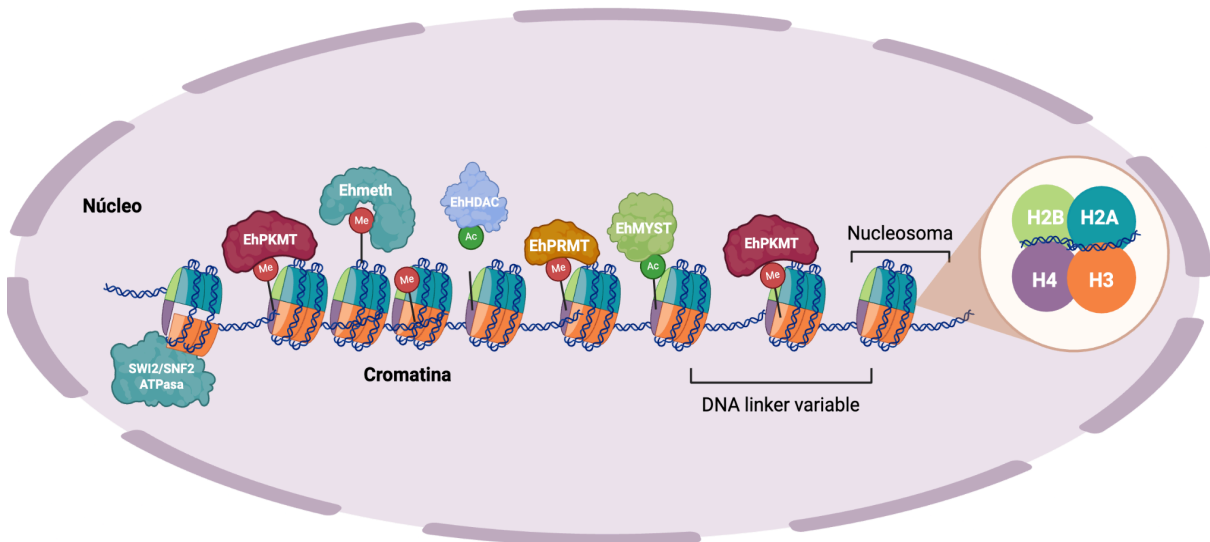


Figura 12. Mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la cromatina y la expresión génica en *E. histolytica*. La figura muestra una representación esquemática de los principales mecanismos epigenéticos descritos en *E. histolytica* involucrados en la regulación de la estructura cromatínica y la expresión génica. El DNA del parásito se organiza en nucleosomas formados por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, separados por regiones de DNA linker de longitud variable. Se ilustran diferentes modificaciones postraduccionales de histonas y DNA. Asimismo, se representan algunas proteínas epigenéticas identificadas en el parásito. Imagen elaborada en BioRender.

También se determinó que el genoma codifica para diferentes metiltransferasas de lisina y arginina entre las cuales ya algunas se ha determinado experimentalmente que catalizan la adición de grupos metilo en los residuos de lisina y arginina de las histonas y que se relacionan con regulación de algunas funciones celulares relacionadas con la virulencia y supervivencia celular, la metilación de proteínas involucradas en la fagocitosis (**Figura 12**) (Borbolla *et al.*, 2015; Borbolla *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2021; Lozano *et al.*, 2016; Ramakrishnan *et al.*, 2004). En conjunto, la evidencia disponible sugiere que *E. histolytica* posee mecanismos epigenéticos potencialmente involucrados en la regulación de la cromatina y la expresión génica, aunque la función específica de muchos de estos componentes aún permanece poco comprendida.

2.5.1 Marcas epigenéticas en *E. histolytica*

Las marcas epigenéticas en parásitos regulan la expresión de sus genes sin alterar la secuencia de DNA. Estas modificaciones son fundamentales para su supervivencia, adaptación al huésped, evasión inmunológica y diferenciación en su ciclo biológico. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica en el parásito *E. histolytica* durante la invasión del huésped o su enquistamiento son poco conocidos (Lozano *et al.*, 2016). Existen evidencias que sugieren que mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y la modificación de las histonas, están involucradas en la regulación de la expresión génica en este parásito (Lozano *et al.*, 2016).

Hasta la fecha, las únicas marcas epigenéticas que se han analizado experimentalmente en este parásito, se encuentran principalmente en los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4. En la histona H3 se ha estudiado la di y tri metilación del residuo de lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2/3), que están asociados a cambios en la activación transcripcional, mientras que la desmetilación de la lisina 4 de la histona H3 y la di metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me2) esta está fuertemente asociada con la represión transcripcional (Borbolla *et al.*, 2016; Lozano *et al.*, 2016; Foda *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que en el extremo N-terminal de la histona H4 está acetilada en los residuos de lisina K5, K8, K12 y K16 y mono-di metilada en el residuo de arginina R3, todas asociadas con la activación transcripcional (Lozano *et al.*, 2016). Asimismo, se ha analizado la metilación de la histona H4 en este parásito. La dimetilación del residuo de lisina 20 (H4K20me2) en eucariotas superiores, se encuentra ampliamente distribuida en el núcleo y se ha relacionado con la reparación del DNA ya que se ha

encontrado enriquecida en sitios de daño al DNA (Paquin *et al.*, 2018). En contraste, la trimetilación de la misma (H3K20me3), se encuentra enriquecida en la heterocromatina y relaciona con el silenciamiento génico de elementos repetitivos como son las secuencias teloméricas en el genoma de mamíferos (Ren *et al.*, 2021). En *E. histolytica*, ambas marcas se han observado en el núcleo, lo que indica que podrían desempeñar un papel en la expresión génica de este parásito. Sin embargo, hasta ahora se desconoce el papel funcional de la di- y trimetilación de H4K20 en la epigenética de *E. histolytica* (Figura 13) (Lozano *et al.*, 2016; Rendón *et al.*, 2018).

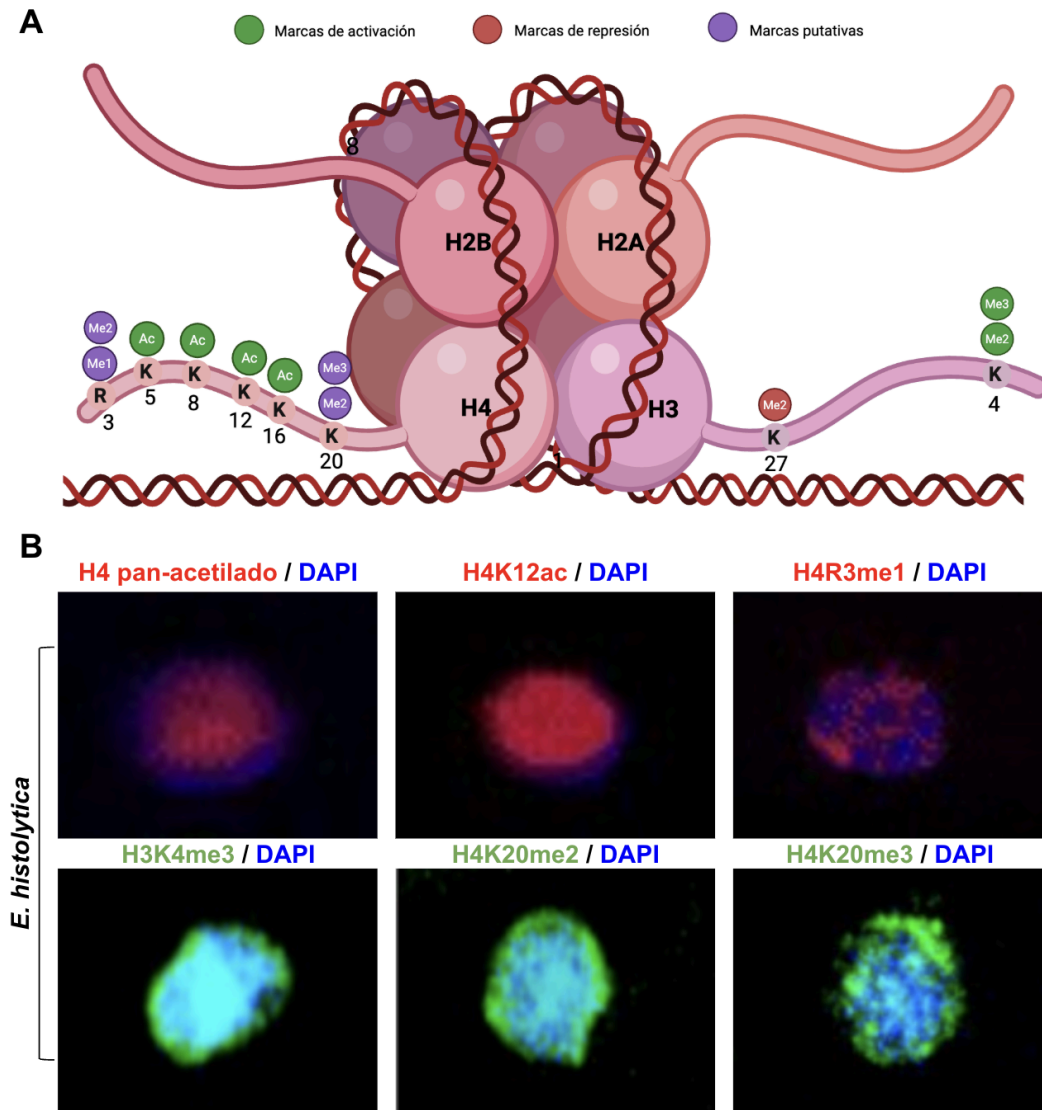


Figura 13. Marcas epigenéticas identificadas en *E. histolytica*. A) Se muestran las principales modificaciones epigenéticas identificadas experimentalmente en *E. histolytica*, clasificadas de acuerdo con su asociación reportada con activación transcripcional, represión génica o función putativa dentro de la regulación de la expresión génica. B) Localización nuclear de marcas epigenéticas asociadas con activación y represión génica en trofozoitos de *E. histolytica* mediante ensayos de inmunofluorescencia (Borbolla *et al.*, 2016; Lozano *et al.*, 2016). Imagen elaborada en BioRender.

2.5.2 Proteínas metiltransferasas y MAT en *E. histolytica*

En *E. histolytica* se identificaron cuatro metiltransferasas de lisina de histonas (EhPKMTs), denominadas EhHKMT1-4, las cuales contienen dominios SET conservados característicos de proteínas metiltransferasas. Los análisis filogenéticos mostraron que EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT3 presentan similitud con las metiltransferasas humanas SMYD3 y SUV420H2, asociadas con la metilación de H3K4, H4K5 y H4K20. En contraste, EhHKMT4 fue la proteína más divergente y presentó un dominio TPR relacionado con interacciones proteína-proteína, además de mostrar similitud con la proteína humana HsPRDM1. La conservación de residuos equivalentes a H3K4, H4K5 y H4K20 en las histonas amebianas sugirió que estas modificaciones también podrían ocurrir en *E. histolytica* (**Figura 14**).

Estudios de inmunofluorescencia e inmunoelectromicroscopía mostraron que EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 se localizan tanto en núcleo como en el citoplasma. Dentro del núcleo, EhHKMT1 se detectó asociada con eucromatina, mientras que EhHKMT2 se localiza cerca de la cromatina condensada y EhHKMT4 directamente en regiones de cromatina condensada, sugiriendo posibles funciones tanto en activación como en represión transcripcional (**Figura 15**) (Borbolla *et al.*, 2016).

Además, ensayos enzimáticos con proteínas recombinantes demostraron que las cuatro proteínas poseen actividad histona metiltransferasa. EhHKMT1 cataliza la formación de H4K20me₂, EhHKMT2 se asoció con H3K4me₃ y EhHKMT4 con H4K20me₃, mientras que no se detectó una marca específica para EhHKMT3. Además, EhHKMT2 y EhHKMT4 se localizaron alrededor de eritrocitos fagocitados y co-inmunoprecipitaron con EhADH, una proteína involucrada en fagocitosis, sugiriendo que estas enzimas también podrían participar en la metilación de proteínas no histónicas relacionadas con procesos de virulencia y tráfico vesicular (Borbolla *et al.*, 2016).

Por otro lado, también se han identificado cinco metiltransferasas de arginina putativas (PRMTs): una con similitud a PRMT5 y cuatro con similitud limitada a PRMT1. De estas últimas, tres fueron denominadas EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c, ya que presentan relación filogenética y estructural con PRMT1 humana. También se describió una proteína más atípica, llamada EhPRMT-A, debido a su baja homología con otras PRMT conocidas. Experimentalmente, se ha demostrado que *E. histolytica* expresa proteínas relacionadas con PRMT1, detectadas tanto en el citoplasma como en el núcleo mediante anticuerpos contra

PRMT1 humana. Además, una de estas proteínas, EhPRMT1a recombinante, mostró capacidad de formar oligómeros y presentó actividad metiltransferasa sobre proteínas nucleares del parásito y sobre histona H4 comercial. También se demostró la presencia de una marca epigenética equivalente a H4R3me2, probablemente correspondiente a EhH4R8me2, ya que un anticuerpo contra H4R3me2 reconoció una proteína nuclear de aproximadamente 18 kDa y la señal se localizó en el núcleo de los trofozoítos. En conjunto, estos datos sugieren que las PRMTs de *E. histolytica*, especialmente EhPRMT1a, podrían participar en la regulación epigenética del parásito mediante la metilación de argininas en histonas. Sin embargo, aún falta demostrar con precisión cuál PRMT modifica EhH4R8 dentro de la célula y cómo esta modificación regula directamente la expresión génica (Borbolla *et al.*, 2015).

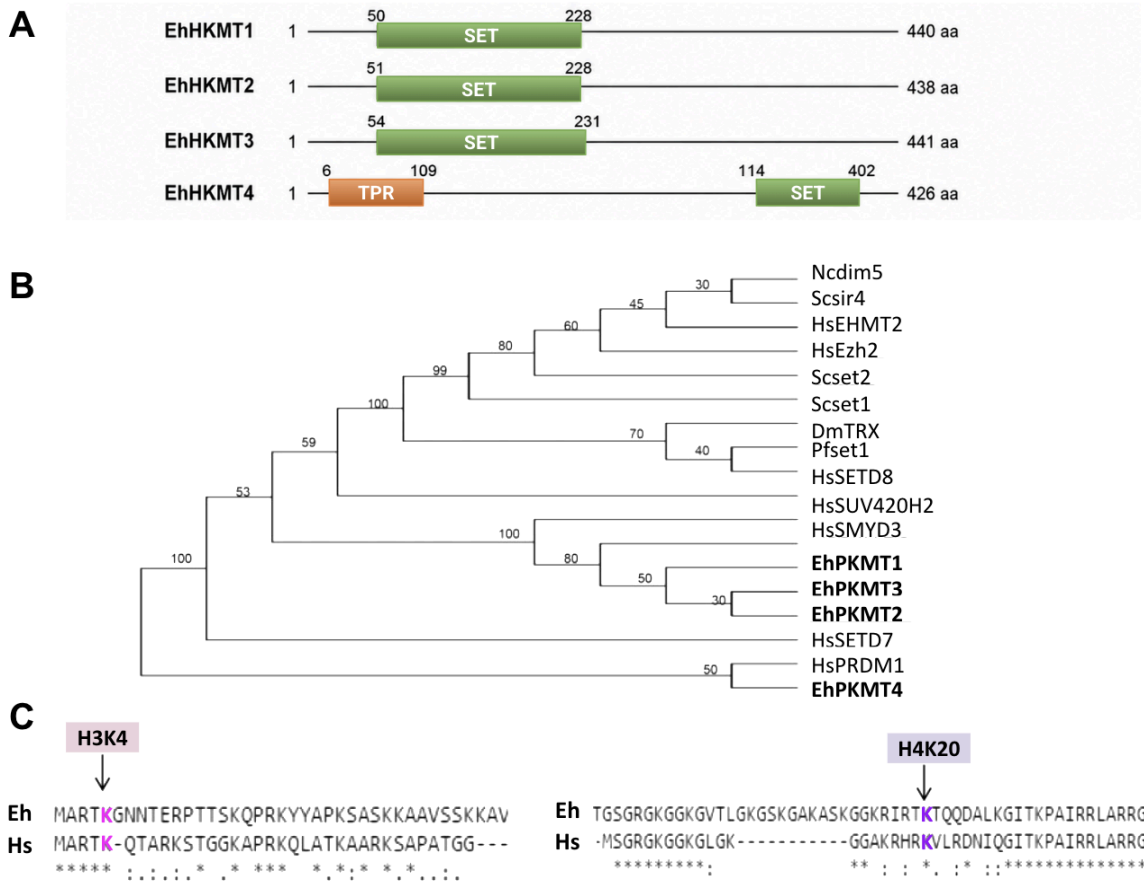


Figura 14. Metiltransferasas de lisina en *E. histolytica*. **A)** Se muestran los dominios SET de cada proteína EhHKMT y TPR de EhHKMT4. Los números indican residuos de aminoácidos. **B)** Comparación filogenética de EhHKMT con otros HKMT. **C)** Alineación de los extremos N-terminal de H3 y H4. Secuencias de los extremos N de *E. histolytica* (Eh) H3 (izquierda) y H4 (derecha) se alinearon con los fragmentos correspondientes de histonas humanas (Hs). Las flechas indican los residuos de lisina que son metilados por las enzimas humanas SMYD3 y SUV420H2. Imagen modificada de Borbolla *et al.*, 2016.

Por otra parte, también se han identificado en *E. histolytica* tres proteínas metionina adenosiltransferasa (MAT), codificadas por los genes EhMAT1A, EhMAT2A-I y EhMAT2A-II, las cuales participan en la biosíntesis de S-adenosilmetionina (SAM). Sin embargo, hasta el momento estas proteínas han sido poco estudiadas en el parásito y su posible participación en mecanismos epigenéticos permanece prácticamente desconocida. Una de las primeras evidencias relacionadas con estas enzimas corresponde a EhMAT1A, identificada como blanco de S-nitrosilación bajo condiciones de estrés nitrosativo, sugiriendo que su actividad podría ser regulada mediante modificaciones postraduccionales inducidas por estrés celular (Trebicz *et al.*, 2017).

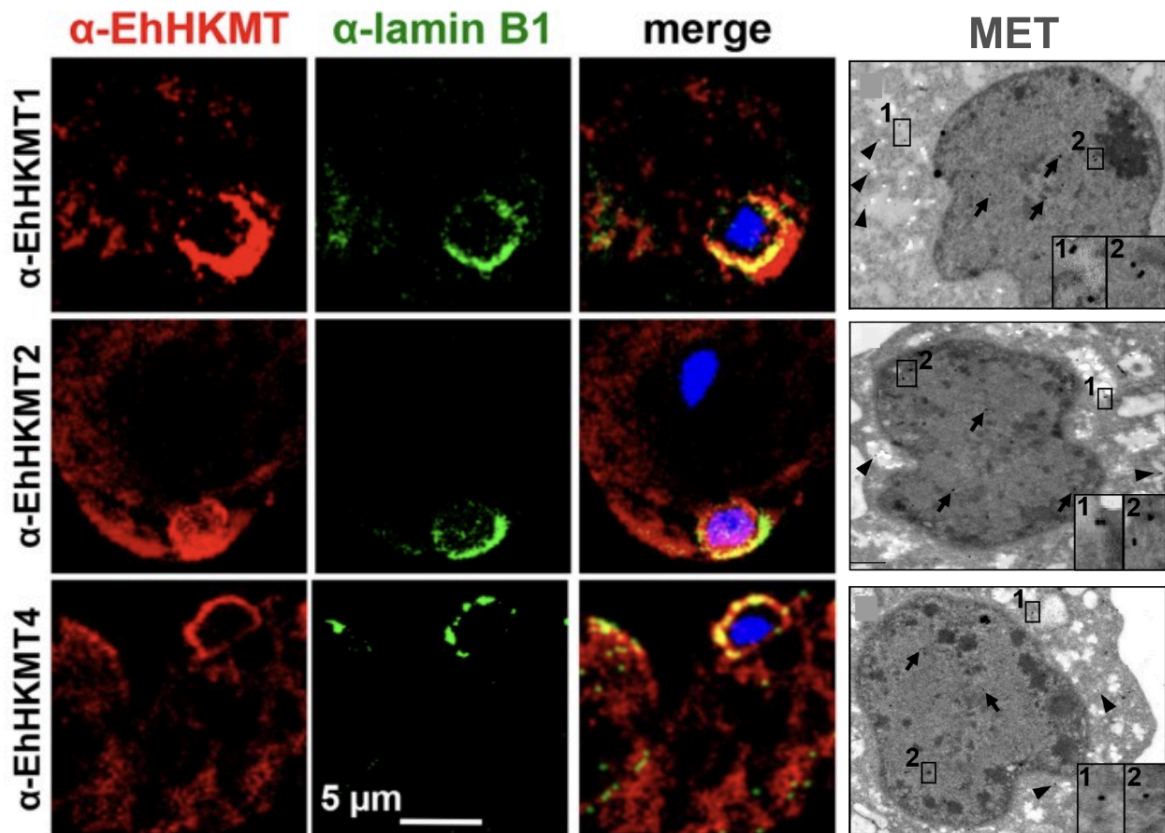


Figura 15. Localización subcelular de EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4 en trofozoitos de *E. histolytica*. Localización de EhHKMT de *E. histolytica* analizados mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión (MET). Las flechas mostraron la detección de EhHKMT en el núcleo. Las puntas de flecha mostraron la detección de EhHKMT en el citoplasma. Los cuadrados 1 y 2 mostraron la magnificación de algunas señales positivas detectadas en el citoplasma y el núcleo respectivamente. Imagen modificada de Borbolla *et al.*, 2016.

Por otro lado, la proteína codificada por EhMAT2A-I corresponde a la estructura cristalográfica depositada como PDB ID: 3SO4, obtenida mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 3.18 Å (**Figura 16**). El análisis estructural mostró que la proteína se organiza como un homotetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas, una

característica estructural altamente conservada en las MAT eucarióticas. Cada monómero presenta aproximadamente 415 aminoácidos y contiene los dominios estructurales característicos requeridos para la síntesis de SAM a partir de metionina y ATP. Además, la estructura evidenció una alta conservación evolutiva y la presencia de regiones estructurales asociadas con la unión de sustratos y la actividad catalítica. Aunque no se realizaron análisis funcionales detallados, esta estructura constituye la principal evidencia experimental disponible para una MAT de *E. histolytica* y sugiere que podría desempeñar un papel importante en la homeostasis de SAM y, potencialmente, en procesos celulares dependientes de metilación (Merritt *et al.*, 2011).

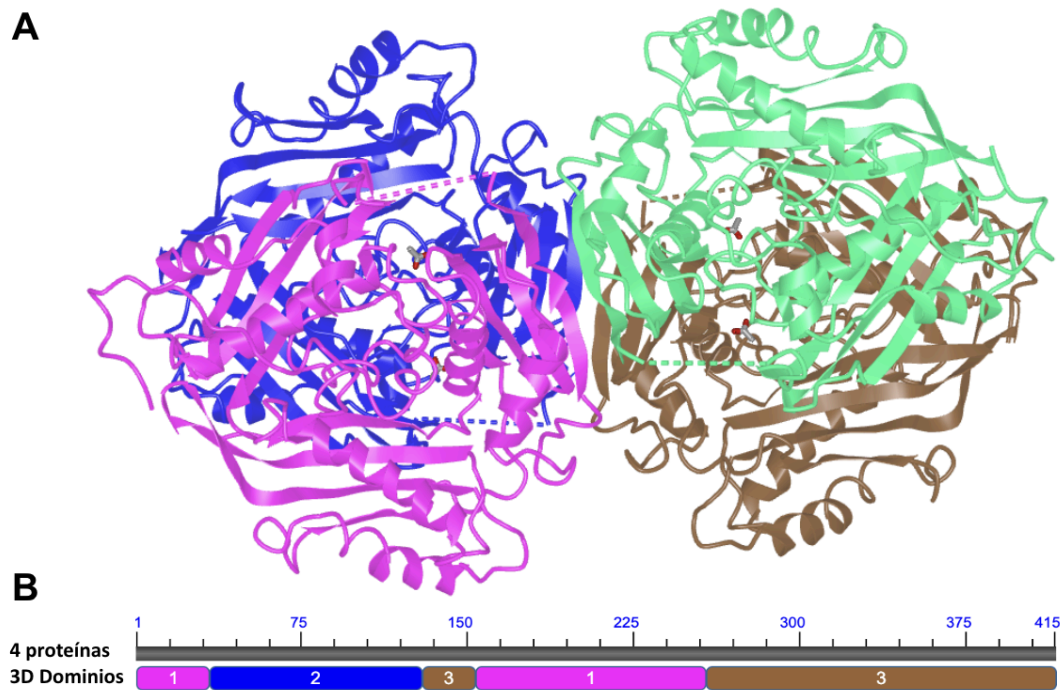


Figura 16. Estructura tridimensional de EhMAT2A-I de *E. histolytica*. A) Estructura cristalográfica de EhMAT2A-I (PDB ID: 3SO4), obtenida por cristalografía de rayos X a 3.18 Å. B) EhMAT2A-I presenta tres dominios funcionales. Imagen modificada de Merritt *et al.*, 2011.

Finalmente, estudios transcriptómicos realizados bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro identificaron que las tres proteínas MAT responden a cambios en la concentración de hierro; sin embargo, EhMAT2A-II fue la proteína más analizada debido a que presentó un patrón de expresión más consistente. Los autores observaron que su expresión aumentaba en condiciones de bajo hierro y disminuye durante deficiencia severa, recuperándose nuevamente tras la suplementación con hemoglobina. Estos resultados sugieren que la biosíntesis de SAM podría estar regulada en respuesta al estado metabólico y a la disponibilidad de hierro en el parásito (Hernández *et al.*, 2014).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que las proteínas SAMS podrían participar en la integración de señales metabólicas y de estrés con procesos regulatorios mediados por metilación, aunque su función específica en la regulación epigenética de *E. histolytica* aún requiere ser investigada.

2.6 Regulación a nivel de secuencia: Factores de transcripción Myb en *E. histolytica*

La secuenciación del genoma de *E. histolytica* ha revelado la presencia de genes que codifican para FT que contienen un DBD de tipo MYB, HMG1, MADS, GATA, HSF y STAT. Sin embargo, se destaca la abundancia del dominio MYB en el genoma de *E. histolytica* (Meneses *et al.*, 2010). Mediante análisis *in silico* se identificaron 34 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para 32 proteínas con DBD-MYB homólogos al FT c-Myb humano (**Figura 17**). Estas proteínas se agrupan en tres grupos monofiléticos pertenecientes a tres familias: La familia I denominada EhMybR2R3, la familia II denominada de unión a telómeros y la familia III o EhMybSHAQKYF (Meneses *et al.*, 2010). La familia I EhMybR2R3 está conformada por 14 proteínas numeradas secuencialmente (EhMyb1 a EhMyb14). Estas proteínas conservan los repetidos R2 y R3 en su DBD-MYB. El repetido R3 es el responsable de reconocer su secuencia consenso (C/TAAGTGG), denominada elemento de reconocimiento a MYB o ERM para poder unirse al DNA, mientras que el repetido R2 mantiene y refuerza la estabilidad de la unión DNA-Proteína. Por otro lado, la familia II consta de 5 proteínas que contienen un solo repetido R3 y se relacionan con la protección de los extremos terminales de los cromosomas. La familia III EhMybSHAQKYF contiene 9 proteínas similares a las proteínas Myb SHAQKYF presentes en plantas, algas y *D. discoideum* (Meneses *et al.*, 2010).

Por otro lado, se observó que los genes que codifican para proteínas con DBD-MYB se expresan de forma diferencial en condiciones basales de cultivo, lo que sugiere que pueden ser importantes reguladores transcripcionales de los genes implicados en la virulencia, el enquistamiento y la respuesta al estrés (Cardenas *et al.*, 2021). Por ejemplo, se ha observado que la proteína EhMyb-dr, perteneciente a la familia EhMybSHAQKYF, muestra una expresión baja en el estadio de trofozoito y aumenta su expresión durante el enquistamiento (Ehrenkauf *et al.*, 2009). Asimismo, la sobreexpresión de EhMyb-dr indujo la expresión de un subconjunto de genes específicos de quistes, lo que sugiere que es probable que se requieran otros reguladores transcripcionales, junto con factores de remodelación de la

cromatina como las HATs, para que ocurra la conversión de trofozoito a quiste (Ehrenkaufer *et al.*, 2009).

Por lo tanto, el estudio de los factores de transcripción Myb es fundamental para comprender los mecanismos relacionados con la patogenicidad, la virulencia y el enquistamiento de *E. histolytica*, así como para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas contra esta infección parasitaria.

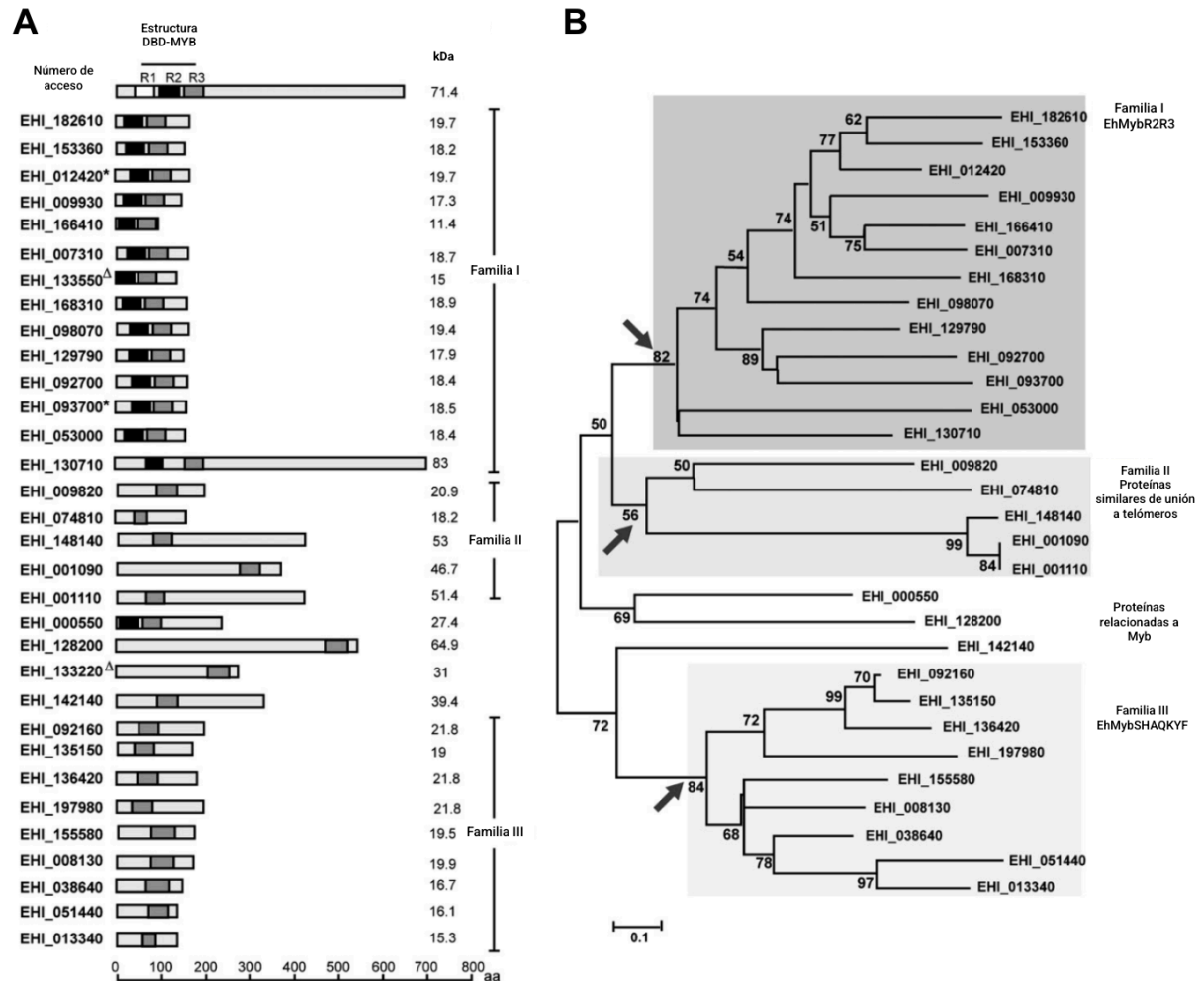


Figura 17. Proteínas EhMyb de *E. histolytica*. A) Diagrama de la proteína c-Myb y las proteínas que contienen el DBD-MYB de *E. histolytica*. Organización del dominio DBD-MYB: R1, blanco; R2, negro sólido; y R3, gris. *Indica proteínas codificadas por genes duplicados, y Δ indica proteínas codificadas por genes truncos. B) Árbol filogenético de las proteínas que contienen el dominio DBD-MYB de *E. histolytica* (no incluye las proteínas de genes duplicados o truncos). Los cuadros grises claros muestran las familias específicas de *E. histolytica*. Imagen modificada de Meneses *et al.*, 2010.

2.7 EhMyb10

EhMyb10 es un FT perteneciente a la familia MYB tipo R2R3 en *E. histolytica*. El gen *ehmyb10* codifica una proteína de 153 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 17.9 kDa. Análisis bioinformáticos han identificado en EhMyb10 múltiples sitios

potencialmente susceptibles a modificaciones postraduccionales, incluyendo metilación, ubiquitinación, SUMOilación y fosforilación. Estas modificaciones podrían influir en distintos aspectos funcionales de la proteína, como su interacción con otras proteínas y componentes de la maquinaria transcripcional, su afinidad de unión al DNA, así como su estabilidad y localización subcelular. Asimismo, EhMyb10 presenta dos secuencias de localización nuclear, lo que sugiere que puede ser transportada activamente al núcleo para ejercer su función reguladora como FT (**Figura 18**) (Tesis de Licenciatura de Aguirre, 2023).

Además, EhMyb10 presenta regiones intrínsecamente desordenadas (IDR, del inglés *Intrinsically Disordered Regions*) en los extremos amino terminal (1–32 aa) y carboxilo terminal (142–152 aa), las cuales corresponden a secuencias que carecen de una estructura tridimensional estable. Estudios recientes han demostrado que las IDR presentes en factores de transcripción desempeñan funciones multifuncionales debido a su alta flexibilidad conformacional, lo que les permite actuar como plataformas dinámicas de interacción con otras proteínas y componentes reguladores. Asimismo, estas regiones pueden participar en la modulación de la arquitectura de la cromatina y contribuir a la especificidad de unión del FT a sus secuencias blanco en el DNA (Tesis de Licenciatura de Aguirre, 2023; Xiao *et al.*, 2025; Jonas *et al.*, 2025; Már *et al.*, 2023).

Por otro lado, se observó que las regiones intrínsecamente desordenadas de EhMyb10 contienen múltiples sitios potencialmente susceptibles a modificaciones postraduccionales, como ubiquitinación SUMOilación y, principalmente, fosforilación. En factores de transcripción, las IDR suelen estar enriquecidas en sitios de PTMs, las cuales desempeñan un papel importante en la regulación de diversas funciones biológicas. Por ejemplo, la fosforilación introduce grupos fosfatos con carga negativa que pueden modificar las propiedades electrostáticas y conformacionales de las IDR, alterando la afinidad de interacción con proteínas asociadas o con el DNA. Asimismo, la presencia de múltiples sitios de fosforilación cercanos a dominios de unión al DNA puede favorecer cambios conformacionales que modulan la especificidad y el reconocimiento de secuencias blanco. Estas observaciones sugieren que las IDR de EhMyb10 podrían participar activamente en la regulación dinámica de su actividad transcripcional y de sus interacciones moleculares (Tesis de Licenciatura de Aguirre, 2023; Xiao *et al.*, 2025).

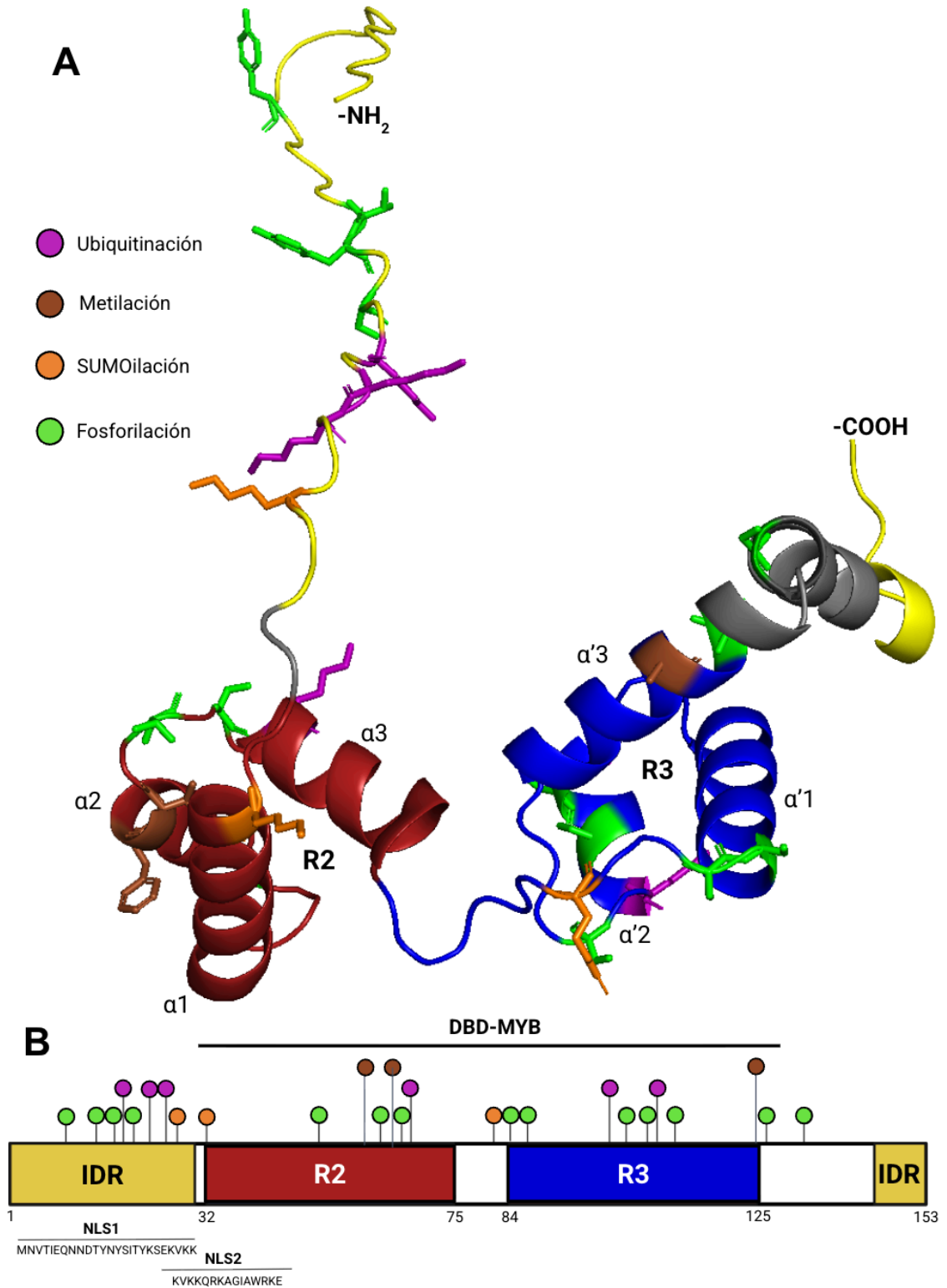


Figura 18. Estructura tridimensional y modificaciones postraduccionales de EhMyb10. A) Estructura tridimensional de EhMyb10 obtenida por ALPHA-FOLD y modificada en PyMOL. Los repetidos R2 y R3 que se muestran en color azul conformados por tres α -hélices (α 1, α 2 y α 3) cada uno. Se muestran los residuos en diferentes colores donde se predicen las PTMs. B) Representación esquemática de EhMyb10 donde se indican en amarillo las regiones desordenadas (IDR), los sitios de ubiquitinación, metilación, SUMOilación y fosforilación. Las cajas en verde y azul indican los repetidos R2 y R3 respectivamente.

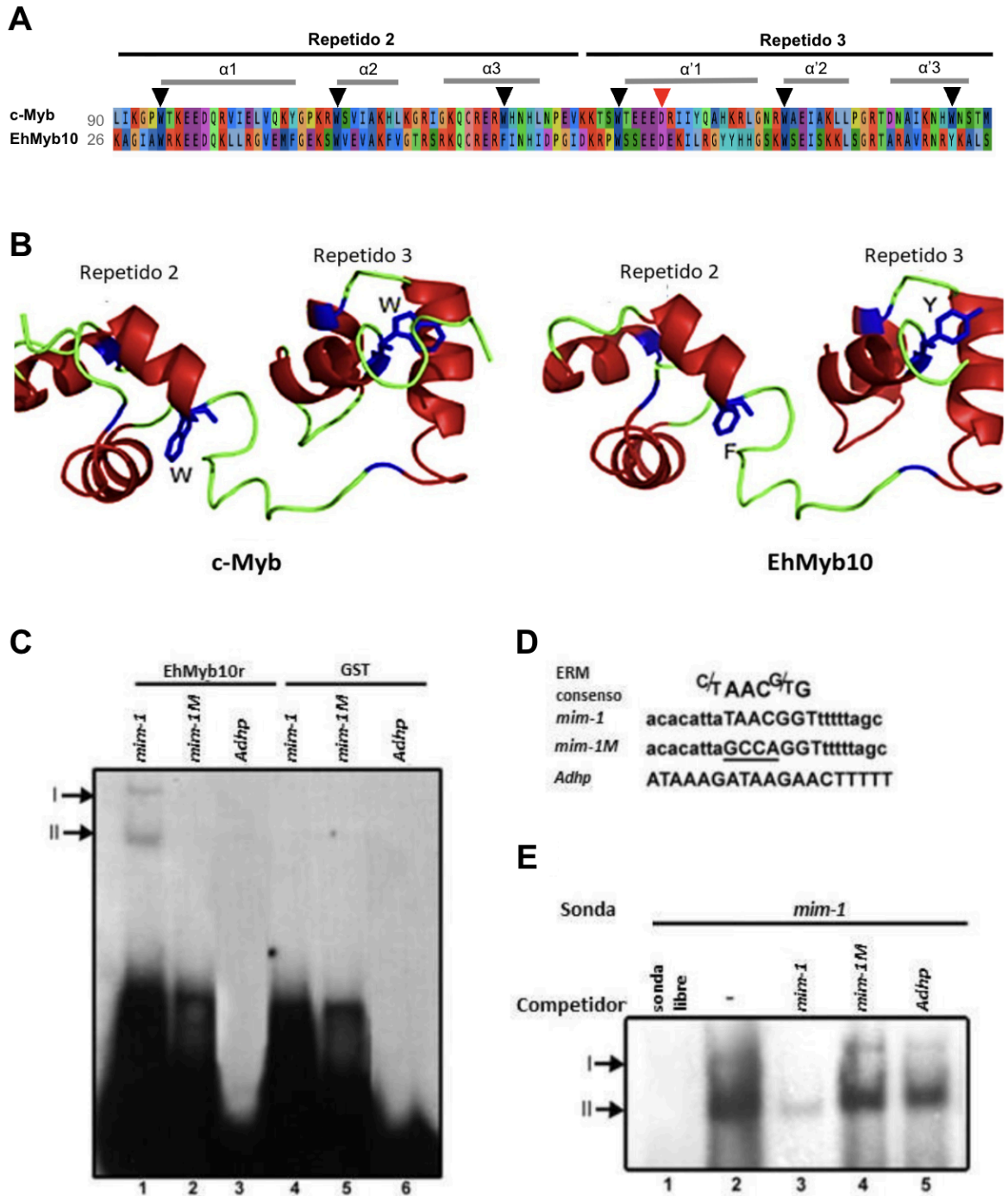


Figura 19. Caracterización estructural y funcional del dominio MYB R2R3 de EhMyb10 en *E. histolytica*. **A)** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los repetidos R2 y R3 de las proteínas c-Myb y EhMyb10. Las líneas negras indican las posiciones de cada repetido R2 y R3. Las líneas grises ilustran las α -hélices predichas de c-Myb. Las puntas de flecha indican la posición de los residuos de triptófano conservados y la punta de flecha roja indica el residuo de ácido aspártico (D152) conservado. **B)** Estructura tridimensional del DBD-MYB R2R3 de c-MYB y EhMyb10. “W” representa a los residuos de triptófano y “F” y “Y”, residuos de los fenilalanina y tirosina respectivamente. **C)** Ensayo EMSA de la proteína EhMyb10r. **D)** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos EMSA. **E)** Ensayos de competencia. Los complejos de DNA-proteína I y II se indican mediante flechas. Imagen adaptada de Meneses *et al.*, 2010.

Además, se ha demostrado que el DBD-MYB R2R3 entre c-Myb y EhMyb10 se encuentra altamente conservado en ambos repetidos. Cada repetido está conformado por tres α -hélices características de los factores de transcripción MYB, donde la tercera hélice participa directamente en el reconocimiento y unión al DNA. Asimismo, se observó la conservación de los residuos de triptófano característicos del dominio MYB, los cuales son importantes para mantener la estabilidad estructural del dominio mediante interacciones hidrofóbicas que favorecen el correcto plegamiento de las α -hélices. De igual manera, se identificó la conservación del residuo de ácido aspártico equivalente a D152 de c-Myb, previamente descrito como importante para su función de c-Myb como FT pionero, ya que contribuye a incrementar la afinidad de unión al DNA (**Figura 19A**). Además, la comparación de la estructura terciaria del DBD-MYB de c-Myb y EhMyb10 mostró una notable similitud estructural, ya que EhMyb10 conserva la conformación hélice-giro-hélice característica de los repetidos R2 y R3 observada en c-Myb (**Figura 19B**) (Meneses *et al.*, 2010).

De manera consistente con estas observaciones, mediante ensayos de disminución de la movilidad electroforética (EMSA) se demostró que EhMyb10 es capaz de unirse específicamente al elemento de reconocimiento MYB (ERM) presente en el promotor del gen *mim-1*, un gen diana clásico de c-Myb, formando complejos DNA-proteína específicos (**Figura 19C-E**) (Meneses *et al.*, 2010). Por lo tanto, EhMyb10 podría formar parte de mecanismos conservados de regulación transcripcional en *E. histolytica*. La presencia de características estructurales típicas de los factores MYB y su capacidad de reconocimiento específico de DNA apoyan la posibilidad de que esta proteína participa en el control de la expresión génica y tenga un papel importante como posible regulador transcripcional en procesos biológicos importantes en este parásito.

Por otro lado, análisis de RNA-seq y microarreglos han mostrado que la expresión de *ehmyb10* se incrementa en trofozoitos obtenidos en el día 1 de la colonización intestinal en un modelo murino y en cepas virulentas cultivadas en explantes de colon, 2,87 y 1.7 veces, respectivamente (Gilchrist, *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2016). Estos hallazgos sugieren que EhMyb10 podría participar en la regulación de genes asociados con la virulencia y la colonización intestinal, contribuyendo a la adaptación de la ameba al ambiente intestinal y al establecimiento de un fenotipo virulento (Gilchrist, *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2016).

Además, se han realizaron ensayos de transfección transitoria en trofozoitos de *E. histolytica* para sobreexpresar el FT EhMyb10 (EhMyb10ox). A partir de estos ensayos, se llevaron a cabo análisis de inmunofluorescencia, en los cuales se observó que la señal de

EhMyb10 se localiza principalmente en el núcleo (**Figura 20A**) (Tesis de Maestría de Saldivar, 2022).

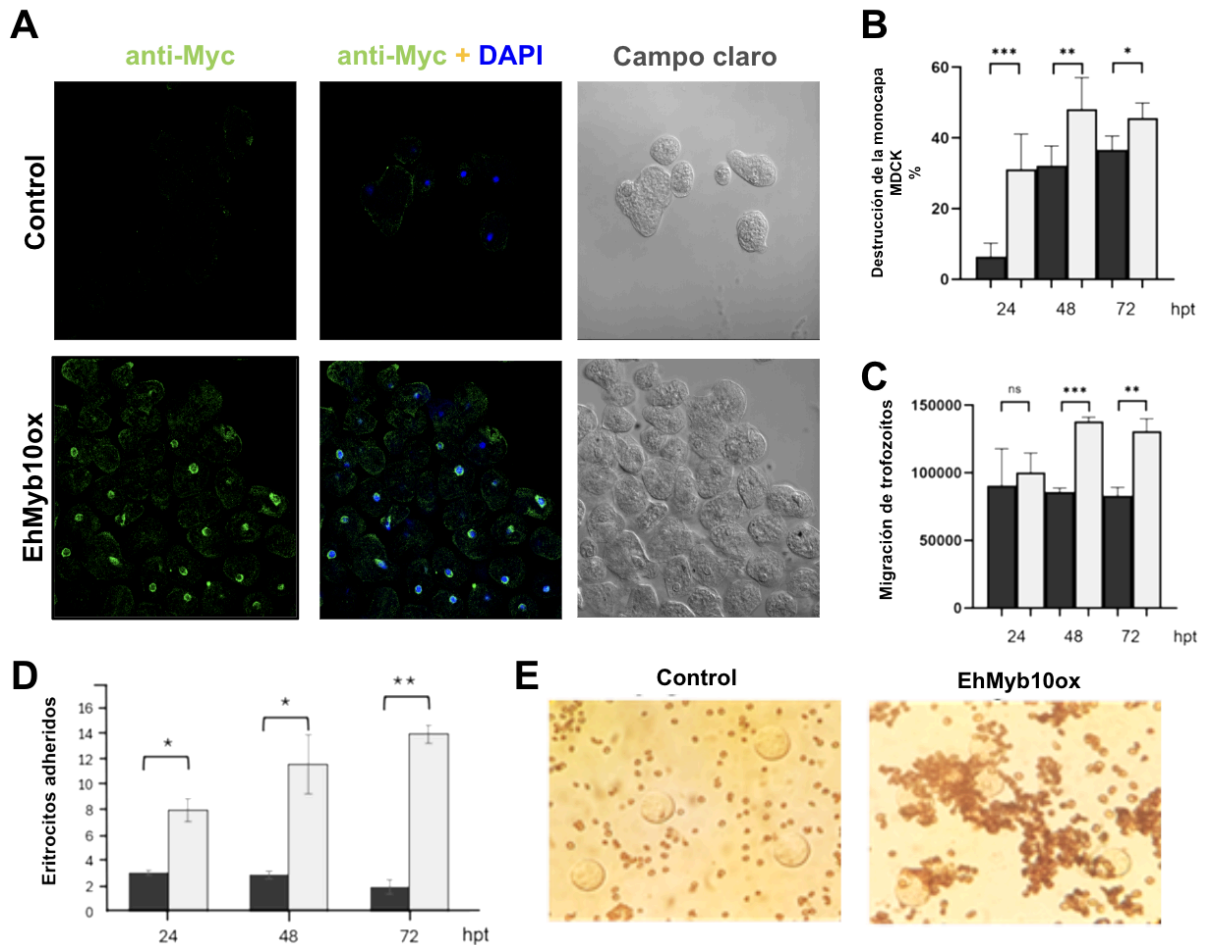


Figura 20. Efecto de la sobreexpresión transitoria de EhMyb10 en trofozoítos de *E. histolytica*. **A)** Inmunofluorescencia de EhMyb10 con localización predominantemente nuclear. **B)** Ensayo citopático en monocapas de células MDCK. **C)** Ensayo de migración de trofozoítos. **D)** Ensayo de adhesión a eritrocitos. **E)** Imágenes representativas de trofozoítos control y EhMyb10ox durante el ensayo de adhesión, mostrando un mayor número de eritrocitos adheridos en los trofozoítos EhMyb10ox. Los ensayos fueron analizados a las 24, 48 y 72 horas postransfección (hpt). Imagen modificada de las tesis de Maestría de Saldivar, 2022 y la tesis de Licenciatura de Santos, 2025.

Adicionalmente, se han realizado análisis funcionales utilizando trofozoítos EhMyb10ox. Los ensayos de destrucción de monocapa de células MDCK, migración y adhesión a eritrocitos mostraron que los trofozoítos EhMyb10ox presentan una mayor capacidad citopática, migran más rápidamente y se adhieren a un mayor número de eritrocitos en comparación con los controles. En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EhMyb10 potencia mecanismos asociados con la virulencia de este parásito (**Figura 20B-E**) (Tesis de Licenciatura de Santos, 2025).

Por otro lado, el análisis transcriptómico de estos trofozoítos reveló cambios en la expresión de 179 genes. Los genes diferencialmente expresados se relacionaron

principalmente con procesos de respuesta al estrés, fagocitosis, adhesión/migración, actividad citolítica y, en mayor proporción, con regulación transcripcional. Dentro de esta última categoría destaca el gen *ehmat1a*, uno de los genes con mayor sobreexpresión, el cual codifica para la enzima S-adenosilmetionina sintetasa (EhMAT1A). Esta enzima cataliza la síntesis de S-adenosilmetionina utilizando ATP y L-metionina como sustratos (Igarashi *et al.*, 2013; Tesis de Maestría de Castillo, 2024). La S-adenosilmetionina participa en reacciones de transmetilación y es esencial en procesos de metilación de histonas y proteínas no histonas, incluidos factores de transcripción (**Figura 21**) (Tesis de Maestría de Castillo, 2024).

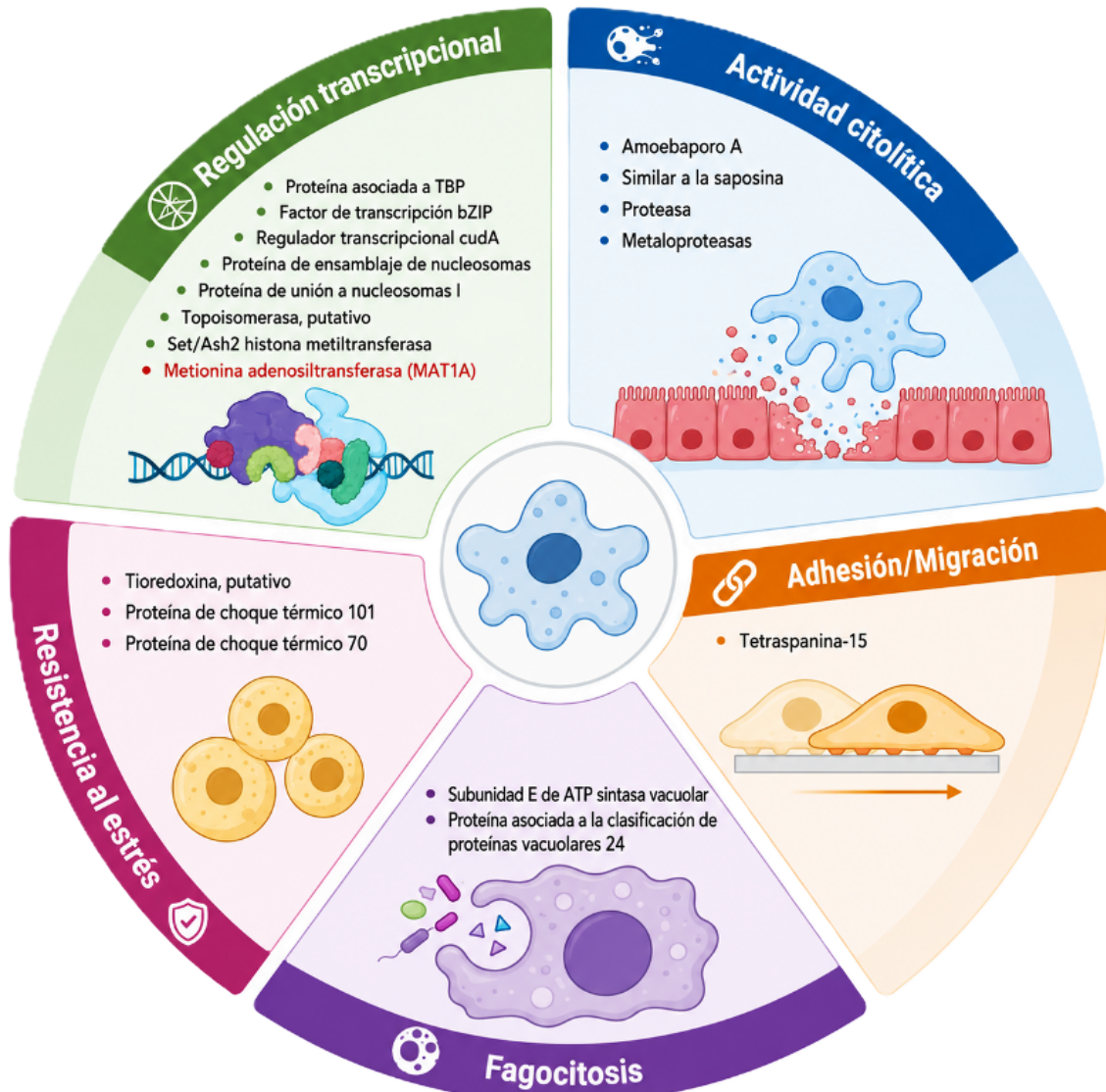


Figura 21. Genes regulados positivamente por la sobreexpresión transitoria de EhMyb10 en *E. histolytica*. El análisis transcriptómico mostró cambios en la expresión de 179 genes relacionados principalmente con respuesta al estrés, fagocitosis, adhesión/migración, actividad citolítica y regulación transcripcional. Imagen realizada en BioRender a partir de datos de la tesis de Maestría de Castillo, 2024.

Además de *ehmat1a*, también se reportaron cambios en la expresión de genes que codifican para metiltransferasas, proteínas de unión a nucleosomas y proteínas de ensamblaje de nucleosomas. Esto sugiere que EhMyb10 podría participar tanto en la regulación de genes asociados con la virulencia como en procesos relacionados con la organización y remodelación de la cromatina (Tesis de Maestría de Castillo, 2024).

Por otro lado, mediante ensayos de Pull-Down utilizando a EhMyb10 recombinante acoplada a GST (EhMyb10r) y análisis de espectrometría de masas, se determinó que EhMyb10 interactúa con proteínas remodeladoras de la cromatina. Entre ellas, se identificó una histona metiltransferasas de lisina (HKMT) ya reportada en *E. histolytica* denominada EhKMT2 (número de acceso EHI_069080) (**Figura 22**) (Tesis de Licenciatura de Aguirre, 2023; Borbolla *et al.*, 2016; Munguía *et al.*, 2023). De forma interesante, EhKMT2 se localiza principalmente en el núcleo, cerca de la cromatina condensada, lo cual sugiere que EhKMT2 podría estar involucrada en la activación de la transcripción. Asimismo, se ha determinado que el dominio SET de EhKMT2 es más parecido al de SMYD3 que a otras PKMTs de humano, por lo que podría catalizar la metilación de H3K4, que se ha relacionado con la activación transcripcional del gen *amebapore-a* en *E. histolytica* (Borbolla *et al.*, 2016).

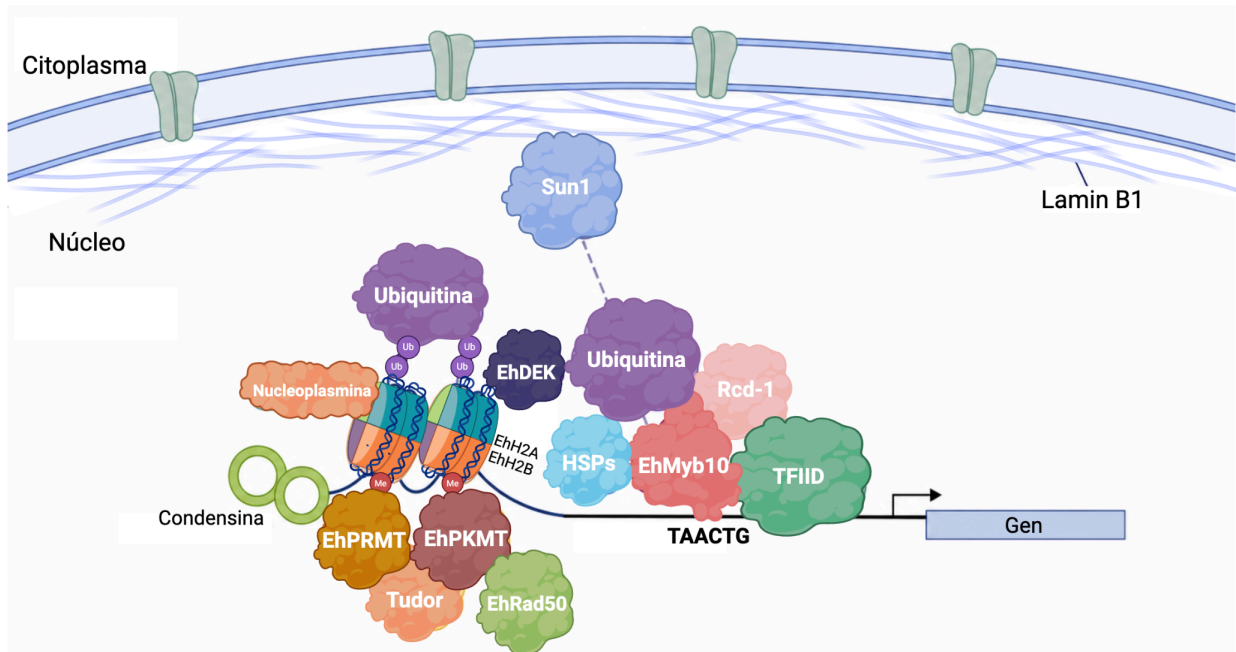


Figura 22. Modelo molecular de las interacciones proteicas de EhMyb10. EhMyb10 establece interacciones con proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina, como SMYD, EhH2A y EhH2B, así como con proteínas relacionadas con modificaciones postraduccionales, como la ubiquitina. Además, interactúa con componentes involucrados en el proceso de transcripción, incluidos factores generales de transcripción como TFIID.

Además, los resultados de espectrometría de masas revelaron que EhMyb10 interactúa con las histonas H2A, H2B y ubiquitinas (Tesis de Licenciatura de Aguirre, 2023). Cabe destacar que en *E. histolytica* solo hay dos genes de H2A, EHI_126210 y EHI_188730, siendo esta última la que interactúa con EhMyb10r (**Figura 22**). Las histonas H2A tienen variantes y algunas de estas variantes están evolutivamente conservadas en casi todos los organismos, un ejemplo es H2A.Z la cual está asociada a la cromatina activa y está altamente enriquecida en promotores y potenciadores (Bönisch *et al.*, 2012). La deposición de H2A.Z conduce a una menor ocupación del nucleosoma y mayor accesibilidad de la cromatina por lo que actúa como un “facilitador general” que genera acceso a una variedad de complejos proteicos tanto activadores como represivos (Hu, *et al.*, 2013). Por otro lado, los hallazgos obtenidos en el laboratorio también se relacionan con la ubiquitinación de H2B (ubH2B), la cual tiene un efecto directo con la dinámica de los nucleosomas. Curiosamente, ubH2B altera la estabilidad de los nucleosomas, especialmente la fuerza de las interacciones entre el DNA y las histonas. En *Saccharomyces cerevisiae*, la monoubiquitinación de la histona H2B en lisina K123 (K120 en humanos), se ha implicado en el control de la transcripción, la replicación del DNA y la reparación de daños en el DNA. Asimismo, se ha demostrado que ubH2B es necesario para el reensamblaje eficiente de los nucleosomas durante la elongación de la transcripción mediada por Pol II, mejora la estabilidad de los nucleosomas y media tanto la activación como la represión de la transcripción dependiendo de la localización y el contexto de la modificación. (Luo *et al.*, 2023).

Sin embargo, es importante mencionar que al realizar ensayos de pull-down empleando la proteína EhMyb10 recombinante existe un sesgo en la información obtenida, ya que esta proteína carece de modificaciones postraduccionales como acetilación, ubiquitinaciones, fosforilaciones, metilaciones y sumoilaciones que se ha demostrado que son importantes en la regulación de la función de c-Myb (Bies *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2011). Es por ello que en este trabajo nos propusimos por medio de ensayos de inmunoprecipitación utilizando parásitos que sobreexpresan a este FT corroborar su función como FT pionero y determinar su importancia en la regulación génica de *E. histolytica*.

3. Justificación

El estudio de los **FT** es fundamental para entender los mecanismos de regulación de los procesos biológicos de *E. histolytica*. Las proteínas **DBD-MYB** constituyen un grupo clave en la regulación transcripcional de este parásito. Entre estos factores, EhMyb10 destaca no solo por su alta expresión, sino también por su papel potencial en la regulación de la transcripción en condiciones relacionadas con la virulencia.

Ya que se determinó que EhMyb10 interacciona con proteínas modificadoras de la cromatina y su sobreexpresión modifica la expresión de genes, el determinar si desempeña un papel como FT pionero ampliará el conocimiento sobre la biología de *E. histolytica* y podría revelar nuevas dianas terapéuticas al interrumpir procesos críticos en la patogenicidad del parásito, contribuyendo así al desarrollo de nuevas intervenciones contra la amebiasis.

4. Hipótesis

EhMyb10 actúa como un FT pionero en *E. histolytica* al interactuar con proteínas involucradas en la organización de la cromatina y regular la expresión génica.

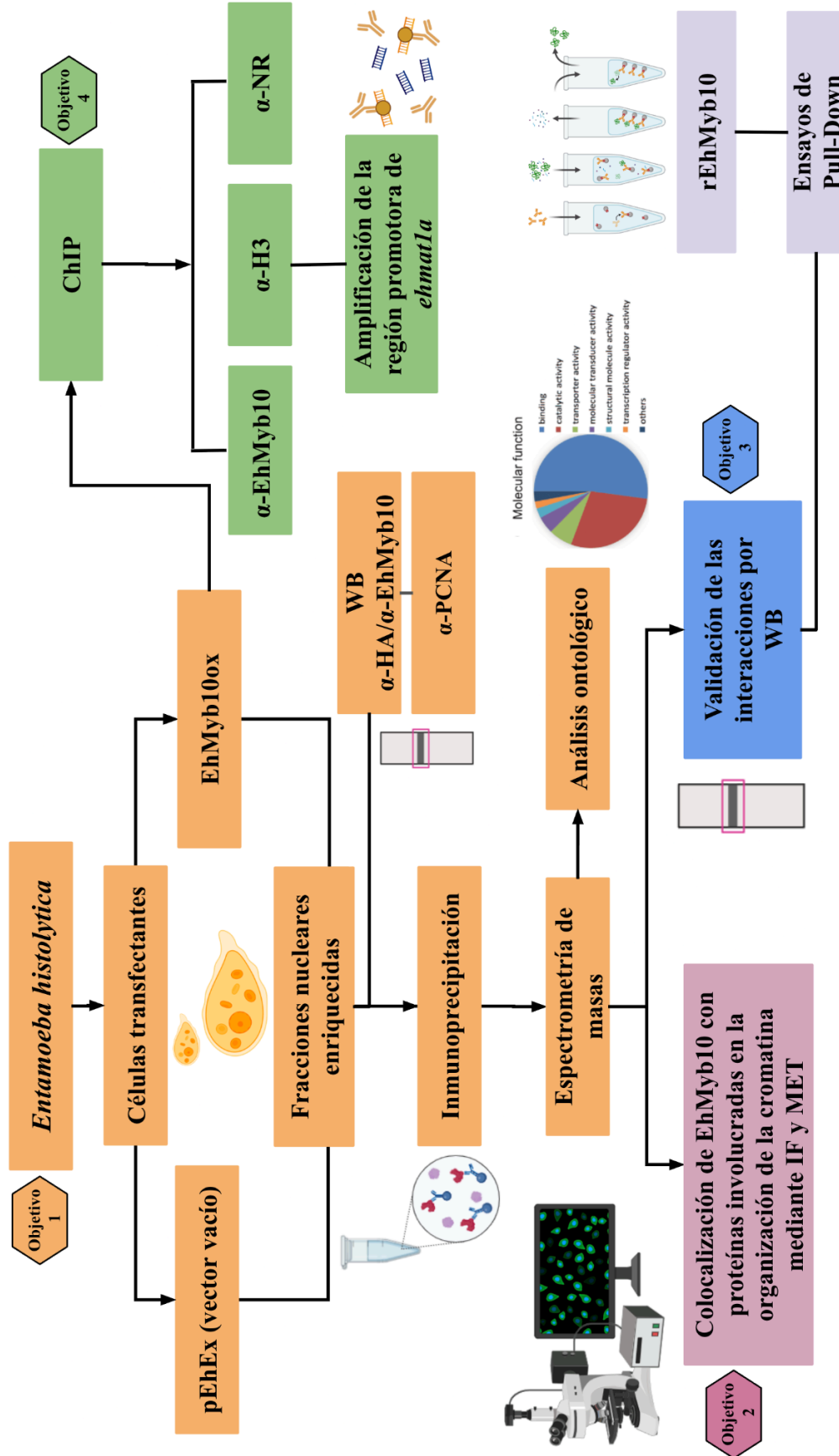
5. Objetivo general

Determinar las interacciones proteína-proteína de EhMyb10 y analizar su papel en la regulación de la expresión génica en *E. histolytica*.

6. Objetivos particulares

1. Identificar proteínas que interaccionan con EhMyb10 en trofozoitos de *E. histolytica* que sobreexpresan este FT.
2. Evaluar la colocalización de EhMyb10 con proteínas involucradas en la organización de la cromatina en trofozoitos de *E. histolytica*.
3. Validar las interacciones proteína-proteína del factor de transcripción EhMyb10.
4. Analizar el reclutamiento de EhMyb10 al promotor del gen *ehmat1a* de trofozoitos de *E. histolytica*.

7. Estrategia experimental



8. Metodología

8.1 Cultivo de trofozoitos y sobreexpresión de EhMyb10

En el laboratorio de la Dra. Elisa Azuara, del posgrado en Ciencias Genómicas, se dispone de trofozoitos de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* que sobreexpresan la proteína EhMyb10 fusionada a una etiqueta de hemaglutinina (HA). Estos trofozoitos han sido transfectados con el vector pEhEx-*ehmyb10*. Como control, se utilizarán trofozoitos transfectados con el vector vacío pEhEx (**Figura 23**). Ambos cultivos se encuentran en condiciones estables y se cultivan con medio TYI-S-33 completo con el antibiótico de selección G-418 a una concentración de 50 µg/mL.

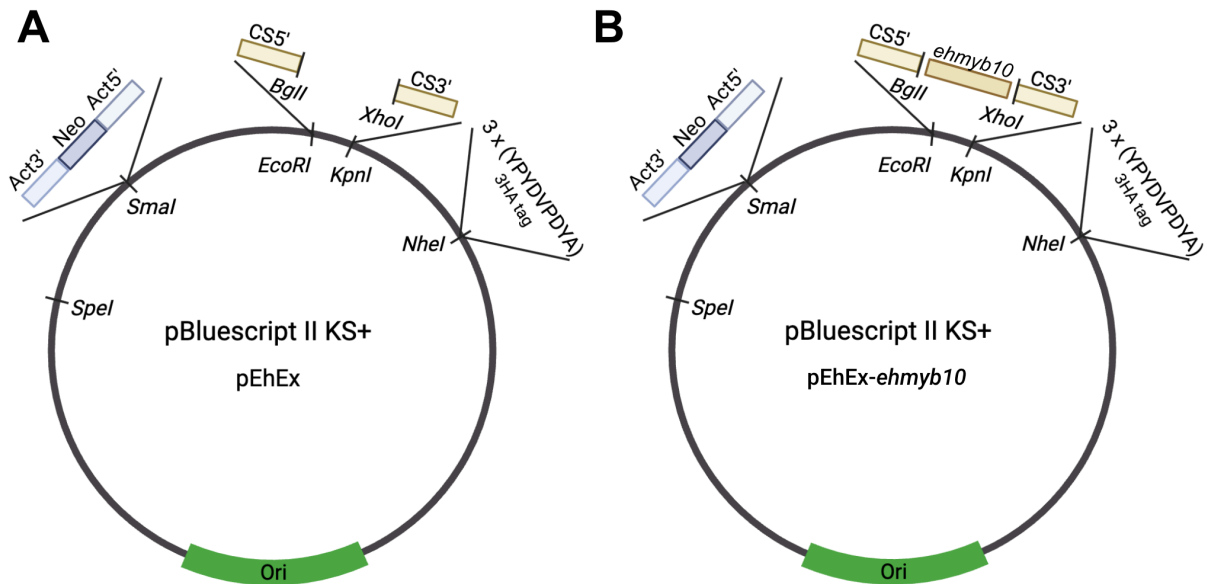


Figura 23. Vectores de expresión utilizados para la sobreexpresión de EhMyb10 en *E. histolytica*. A) Vector vacío utilizado como control. B) Vector recombinante pEhEx-*ehmyb10*, que contiene el gen fusionado a HA. El gen *ehmyb10* se encuentra bajo el control del promotor de cistein sintasa (CS), mientras que el gen de resistencia a neomicina (Neo) está regulado por el promotor de actina, ambos promotores fuertes y constitutivos. Se indican los principales sitios de restricción y el origen de replicación (Ori).

8.2 Aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa

Los trofozoitos en fase logarítmica fueron recolectados y el RNA total se extrajo utilizando TRIzol (Invitrogen). El RNA fue cuantificado con un fluorómetro Qubit 4 (Thermo Fisher) empleando un kit de rango amplio (BR kit). 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 µL del cDNA. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 12 µL que contiene: Buffer 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTP's y DNA polimerasa, y se utilizaron las condiciones del termociclador descritas en la (Figura 24A). 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 µL que contiene: Reactivo QuantiFast 2x (12.5 µL), oligonucleótidos sentido 10 µM (2.5 µL), oligonucleótidos antisentido 10 µM (2.5 µL) y QuantiFast enzima RT (0.25 µL). 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 24B). 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 EhMyb10ox y se calculó el $\Delta\Delta C_t$ para determinar las diferencias de expresión entre los distintos grupos de transfección. Las reacciones de amplificación de RT-PCR y RT-qPCR se realizaron por triplicado.

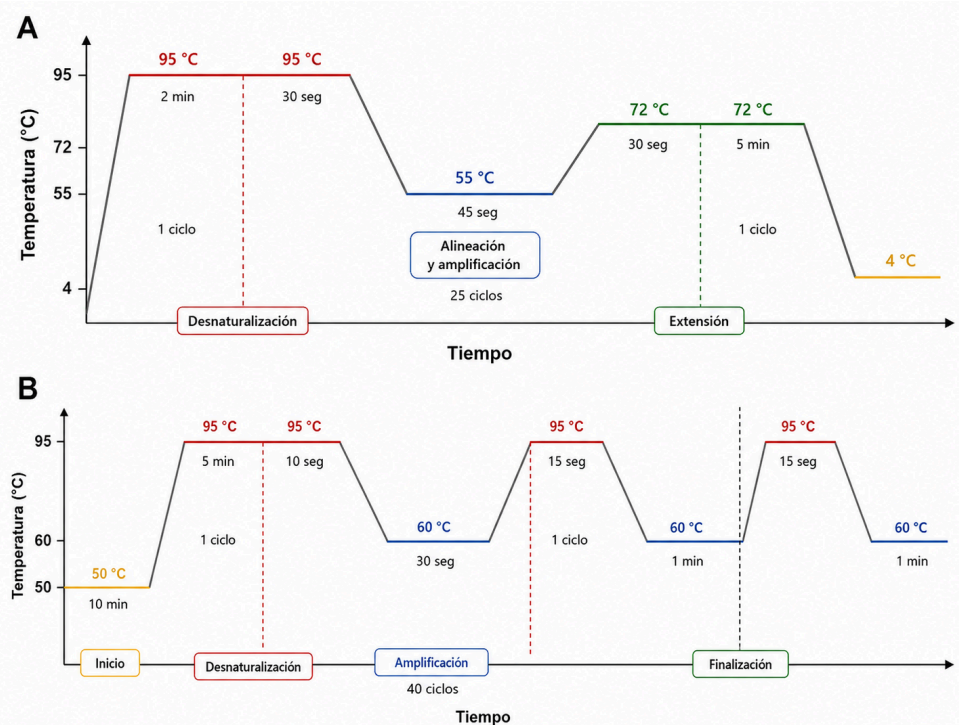


Figura 24. Condiciones de RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa. Temperaturas y tiempos utilizados para los ensayos de A) RT-PCR y B) RT-qPCR.

8.3 Fraccionamiento subcelular

Se resuspendieron trofozoitos (pEhEx y EhMyb10ox) en Buffer A frío [10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, Complete protease inhibitor cocktail (ROCHE) 1x, y 10 mM E-64 (Sigma Aldrich)]. Los trofozoitos se incubaron por 5 min en hielo, se añadió NP-40 al 10% y se mezcló mediante vórtex por 30 seg. Se verificó la eficiencia de la lisis celular mediante observación al microscopio. En caso de observar células intactas o parcialmente lisadas, las muestras se vortexearon nuevamente para favorecer la ruptura celular. Si la lisis continuaba siendo incompleta, se recomendó el uso de un homogeneizador Dounce para mejorar la disgregación mecánica de las células. El lisado se centrifugó por 10 min a 14000 rpm, para separar el sobrenadante (extractos citoplasmáticos) del pellet (núcleos). El pellet se resuspendió en buffer A y se colocó sobre 1 mL de sacarosa 0.34 M (preparado en buffer A). Después se centrifugó por 10 min a 14000 rpm. Para obtener **extractos nucleares solubles** el pellet se resuspendió en 250 μ L de Buffer C [20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, Complete 1x, y 10 μ M E-64], y se agitó vigorosamente a 4 °C por 30 min en un vórtex. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó como fracción nuclear solubles. Para la obtención de **extractos nucleares totales** se omite el paso del buffer C y el pellet se solubiliza en Buffer RIPA [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, Triton x-100 1.2%, DOC 0.5%, SDS 0.1%], lo cual constituye la fracción nuclear soluble e insoluble. Las muestras se cuantifican mediante un ensayo de Lowry compatible con detergente (BIO-RAD), y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

8.4 Inmunoprecipitación (IP)

Para el ensayo de inmunoprecipitación (IP), se realizó un pre-aclarado de las **fracciones nucleares totales** enriquecidas (50 μ g) mediante la adición de 60–80 μ L de perlas de proteína G-sefaraosa (diluidas 1:5) más inhibidores de proteasas [1X Complete, 1 mM PMSF y 10 μ M E64]. Las muestras se incubaron en agitación suave durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y el pellet se resuspendió en 30 μ L de buffer Laemmli 2X, se hirvió y se conservó como fracción de proteínas de unión inespecífica (PUI). A los extractos nucleares pre-aclarados se les añadió de 2 μ L de anticuerpo primario α -HA de ratón, previamente

diluido en 10 μ L en buffer HO [50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1.5 mM $MgCl_2$, 10% glicerol y 1% Triton X-100]. La mezcla se ajustó a un volumen final de 150 μ L con buffer HO suplementado con inhibidores de proteasas y se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación suave constante. Finalizada la incubación, se añadieron 60–80 μ L de proteína G-sepharosa (diluida 1:5) y las muestras se incubaron nuevamente durante 1–2 h a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante, correspondiente a la fracción de proteínas no unidas (PNU), se recuperó, se mezcló con buffer Laemmli 6X y se hirvió. El pellet se lavó tres veces con 200 μ L de buffer HO para eliminar uniones inespecíficas. En cada lavado, las perlas se resuspendieron suavemente en el buffer, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10–20 s a 4 °C y el sobrenadante correspondiente a cada lavado se recuperó, se mezcló con buffer Laemmli 6X y se hirvió. Después del último lavado, se retiró cuidadosamente el exceso de buffer HO y las perlas se resuspendieron en 20–30 μ L de buffer Laemmli 2X. Las muestras se hirvieron durante 5 min, se dejaron enfriar y se almacenaron a –70 °C hasta su uso.

Para los ensayos de IP realizados con el anticuerpo α -H3, se siguió el mismo procedimiento utilizando extractos nucleares solubles; sin embargo, el buffer HO fue sustituido por buffer TNTE 0.1% [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 y 1 mM EDTA] y las muestras se eluyeron con buffer laemmli 2X sin B-mercapto.

Para la preparación de la proteína G-sefarosa, se tomaron 2 mL de la suspensión stock de proteína G-sefarosa (marca) y se ajustaron a un volumen final de 10 mL con buffer TNTE 0.1%. La mezcla se homogeneizó invirtiendo el tubo varias veces. Posteriormente, la resina se lavó tres veces con buffer TNTE 0.1%, centrifugando a 1000 rpm durante 30 s en cada lavado y descartando el sobrenadante. Finalmente, la sefarosa se resuspendió en una dilución 1:5 en TNTE 0.1% y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

8.4.1 Tinción con plata

Las fracciones obtenidas del ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpo α -HA se analizaron mediante SDS-PAGE y posteriormente se visualizaron por tinción con plata. Para ello, los geles se incubaron durante toda la noche en solución fijadora [40% etanol, 5% ácido acético y H_2O] a temperatura ambiente y con agitación suave. Al día siguiente, los geles se lavaron dos veces con solución de lavado [5% etanol en H_2O] durante 20 min por lavado. Posteriormente, se realizaron tres lavados adicionales con dH_2O durante 5 min cada uno. Después, los geles se incubaron durante 2 min con la solución de pretratamiento [0.2 g/L

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en dH_2O] y, al finalizar, se realizaron tres lavados rápidos con dH_2O durante 20 s cada uno. Se añadió la solución de impregnación [2 g/L AgNO_3 , formaldehído al 37% y dH_2O] y los geles se incubaron durante 25 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con dH_2O durante 20 s cada uno. Posteriormente, se agregó la solución de revelado [30 g/L Na_2CO_3 , 4 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, formaldehído al 37% y dH_2O], y los geles se incubaron durante aproximadamente 10 min. Durante este paso, el revelado se monitorea constantemente, ya que el tiempo puede variar dependiendo de la intensidad de las bandas y debe evitarse el oscurecimiento excesivo del gel. Una vez alcanzada la intensidad de tinción deseada, los geles se lavaron dos veces con dH_2O durante 2 min por lavado. Finalmente, se añadió la solución de paro [10% CH_3COOH en dH_2O] durante 10 min. Al terminar la incubación, se retiró la solución de paro y los geles se almacenaron en H_2O . Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante en shaker.

8.5 Espectrometría de masas

Las eluciones obtenidas del ensayo se cargaron en un gel SDS-PAGE y se dejaron correr aproximadamente 0.7-1 cm. Después, el gel se tiñó con Coomassie® Brilliant blue G 250 compatible con espectrometría de masas en un recipiente de vidrio previamente lavado con solución crómica. Todos los reactivos utilizados para preparar los geles de poliacrilamida, la solución de Coomassie y la solución desteñidora, se filtraron y esterilizaron previamente para evitar la contaminación de las muestras. Posteriormente, el gel se envió a la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica LaNSE-Cinvestav para su análisis por espectrometría de masas con ionización por movilidad iónica (IMS) y adquisición de datos independiente (DIA), también conocida como IMS-DIA-MS (Ion Mobility Spectrometry-Data Independent Acquisition-Mass Spectrometry). Esta técnica separa proteínas en fase gaseosa antes de su análisis en el espectrómetro de masas, lo que aumenta la sensibilidad y la resolución. Además, la técnica de adquisición independiente de datos (DIA) proporciona una identificación más completa de proteínas en la muestra en comparación con otras técnicas de adquisición de datos (Krasny *et al.*, 2021).

8.5.1 Análisis *in silico* de las proteínas identificadas

Para los análisis ontológicos de los genes, que codifican para proteínas que interactúan con EhMyb10, se utilizarán los servidores PantherDB (<http://www.pantherdb.org>), AmoebaDB (<https://amoebadb.org/amoeba/app/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

8.6 Western Blot

Para el análisis de los complejos proteicos y validación de las interacciones proteína-proteína con el FT EhMyb10, los complejos inmunoprecipitados se resolvieron en un gel SDS-PAGE. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en buffer de transferencia [48 mM Tris, 39 mM Glicina, 0.04% SDS, y 20% Metanol]. Las membranas se bloquearon con BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*) o leche Svelty (Nestlé) en PBS-Tween 20 al 0.1% durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Las membranas se incubaron con los anticuerpos α -HA, α -EhMyb10, α -PCNA, α -pan-dimetil-lisina, α -MAT1A, α -EhPKMT2 y α -H3, toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 2 h a temperatura ambiente (TA) y cubierto de la luz. Las membranas se visualizaron en el fotodocumentador Chemi-Doc XRS (BIO-RAD).

8.7 Inmunofluorescencia

Para la localización subcelular de EhMyb10 y de proteínas asociadas con la organización de la cromatina, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con trofozoítos pEhEx y EhMyb10ox. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 1800 rpm durante 5 min. Posteriormente, la pastilla celular se resuspendió en 400–600 μ L de medio TYI con suero por cada cubreobjetos. La suspensión de trofozoítos se depositó sobre cubreobjetos circulares de 10 mm de diámetro, previamente colocados en una caja de 6 pozos, procurando mantener la gota sobre la superficie del cubreobjetos mediante tensión superficial. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 15–20 min para favorecer la adhesión de los trofozoítos. Antes de iniciar la fijación, se verificó la morfología celular mediante observación al microscopio. Una vez adheridas las células, los trofozoítos se fijaron con etanol al 70% frío a –20 °C durante 30 min. El etanol se mantuvo lo más frío posible antes de su uso y se añadió lentamente por las paredes del pozo, evitando dirigir el flujo directamente sobre los cubreobjetos, con el fin de reducir el desprendimiento de las amibas adheridas. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X frío filtrado, pH 6.8 [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 1.8 mM KH₂PO₄]. Después, los pozos se cubrieron e incubaron con NH₄Cl 50 mM durante 30 min a 37 °C. Al finalizar la incubación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS 1X pH 6.8 templado. Posteriormente las laminillas se bloquearon con BSA al 1% durante 1 h a 37 °C. Se realizaron 2–3 lavados con PBS 1X pH 6.8. Los cubreobjetos se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios α -HA, α -EhMyb10, α -MAT1A,

α -EhPKMT2, α -H3K27me3, α -H3K4me1, α -H3K12ac, α -H3K27ac y α -B laminin. Al día siguiente, las muestras se lavaron 2–3 veces con PBS 1X pH 6.8 para retirar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido 1:200, durante 2 h a 37 °C, manteniendo las muestras protegidas de la luz. Finalizada la incubación, los cubreobjetos se lavaron nuevamente 2–3 veces con PBS 1X pH 6.8. Para la contratinción nuclear, se añadió 1 mL de solución de DAPI por pozo [0.52 μ L de DAPI en 1 mL de PBS 1X pH 6.8] y se incubó durante 3–5 min a temperatura ambiente, protegido de la luz. Después, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS 1X pH 6.8. Finalmente, las muestras se montaron sobre portaobjetos utilizando Vectashield como medio de montaje y se analizaron mediante microscopía confocal.

8.8 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el análisis por MET, los trofozoítos pEhEx o EhMyb10ox se fijaron con 4% de paraformaldehído y 0.5% de glutaraldehído en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con PBS y se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100%). Posteriormente, las células se incluyeron en mezclas de etanol/resina LR-White en proporciones de 1:1 y 2:1, luego se incluyeron en resina LR-White pura (London Resin Co., Enfield, Reino Unido) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE.UU.) y se polimerizaron a 60 °C durante la noche. Secciones delgadas (60 nm) se montaron sobre rejillas de níquel cubiertas con Formvar, seguidas de una incubación durante la noche con anticuerpos α -HA y α -H3K27me3 y α -H4K12 a 4 °C. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora durante la noche con anticuerpos secundarios marcados con oro (Ted Pella, Inc) contra ratón y conejo (de 15 y 30 nm, respectivamente). Finalmente, las muestras se lavaron con PBS, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 (JEOL, Tokio, Japón) en la Unidad de Microscopía Electrónica del Cinvestav.

8.8.1 Marcas y dilución de anticuerpos utilizados para WB, IF y MET

El anticuerpo α -EhMyb10 corresponde a un antisuero policlonal generado en conejo mediante inmunización con el péptido sintético SEKVKKQRKAGI (aa 19–31) derivado de EhMyb10, diseñado a partir del análisis de regiones inmunogénicas de la proteína y sintetizado por GL Biochem (Shanghai, China). La reactividad del antisuero fue validada mediante ensayos de Western blot. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:300 para WB y

1:100 para IF. Los demás anticuerpos utilizados α -HA (Biolegend 901501, mouse) 1:200 WB, 1:100 IF y 1:40 MET, α -MAT1A (MyBioSource M35127342, rabbit) 1:100 WB y 1:100 IF, α -EhPKMT2 (donado por el Dr. Mario A. Rodríguez, rabbit) 1:1000 WB y 1:100 IF, α -pan-dimetil-lisina (ABclonal technology A5870, rabbit) 1:1000 WB, α -H3 (1:2500; abcam EPR26987, rabbit) 1:2500 WB, α -H3K12ac 1:100 IF y 1:20 MET, α -H3K4me1 (abcam STN-274502, rabbit) 1:100 IF, α -H3K27ac 1:100 IF, α -H3K27me3 (Cell Signalling Technology C36B11, rabbit) 1:100 IF y 1:20 MET, α -B laminin 1:100 IF, α -PCNA 1:3000 WB, α -actina (BS-10196, Sigma, rabbit) 1:1000 WB. Los anticuerpos secundarios marcados con FITC mouse y Alexa 647 rabbit (1:100, Jackson ImmunoResearch) y el anticuerpo secundario α -IgG Fc HRP (abcam ab98467, rabbit) 1:5000 WB.

8.9 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

8.9.1 Obtención de la cromatina de trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox

Para los ensayos de ChIP se utilizaron aproximadamente 20×10^6 trofozoitos por condición experimental. Para ello, se cultivaron trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox. Los cultivos fueron cosechados y centrifugados a 1800 rpm durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, las células se resuspendieron en 40 mL de PBS frío pH 6.8 para realizar el conteo celular. Una vez ajustada la cantidad requerida de trofozoitos, los cultivos se centrifugaron nuevamente a 1800 rpm a 4 °C para obtener la pastilla celular, la cual se resuspendió en 15 mL de medio TYI sin suero con formaldehído al 1% y se dejó incubando durante 20 min a temperatura ambiente en agitación suave. La reacción de entrecruzamiento se detuvo mediante la adición de glicina fresca 0.125 M, incubando durante 10 min a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1800 rpm a 4 °C y se lavaron una vez con 10 mL de PBS frío, seguido de un lavado de 5 mL con amortiguador HETE [10 mM HEPES pH 6.5, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 0.25% Triton X-100] y un lavado adicional con 5 mL de amortiguador HENE [10 mM HEPES pH 6.5, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 200 mM NaCl]. Las células se resuspendieron en amortiguador de lisis [50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA y 1% SDS] suplementado con inhibidores de proteasas [1X Complete (Roche), 1 mM PMSF y 10 μ M E64]. Posteriormente, la cromatina se fragmentó mediante sonicación utilizando 12 ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de reposo a una amplitud del 75%, para obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 300–500 pb. Después, la cromatina se centrifugó a 8500 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar el detritus celular. Posteriormente,

se tomaron 2–3 μL de cada muestra y se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para verificar que los fragmentos de cromatina presentarán el tamaño esperado. En caso de no obtener la fragmentación adecuada, las muestras deben someterse nuevamente a sonicación hasta alcanzar el tamaño deseado. Una vez obtenida la cromatina fragmentada, se reservaron 50 μL para la obtención del *input*, mientras que el resto se almacenó en alícuotas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

8.9.2 Purificación del *Input*

La purificación del *input* se realizó utilizando el kit de Wizard® SV Gel and PCR Clean- Up System de Promega. Para ello, se colocaron 50 μL de cromatina en una columna de purificación y se añadieron 50 μL de *binding buffer* en una proporción 1:1 (vol/vol). Posteriormente, la columna se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después, se realizaron dos lavados consecutivos con 700 μL y 500 μL de *wash buffer*, respectivamente, centrifugando la columna a 13000 rpm durante 1 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre cada lavado. Después del último lavado, se eliminó el sobrenadante residual de la columna. Para la elución del DNA, se añadieron 50 μL de H_2O inyectable previamente calentada a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se incubó durante 1–2 min. Posteriormente, la columna se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para recuperar el DNA purificado. Finalmente, las muestras se analizaron mediante PCR para verificar que el *input* amplifican la región promotora del gen *ehmat1a* antes de realizar la inmunoprecipitación de cromatina. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la (Figura 25).

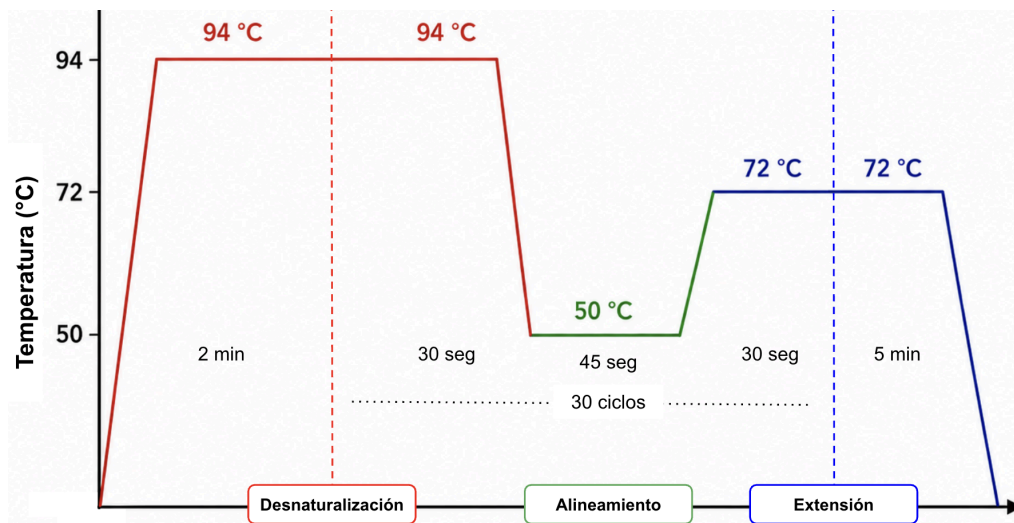


Figura 25. Condiciones para la amplificación del gen *ehmat1a*. Desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min; seguida de 30 ciclos de: desnaturalización a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 seg, alineamiento a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 seg y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 seg; y una extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

8.9.3 Fragmentación del DNA de espermato de salmón y bloqueo de la proteína G

El DNA de espermato de salmón utilizado para el bloqueo de la resina fue previamente fragmentado mediante sonicación empleando 12 ciclos de 30 s de sonicación y 30 s de reposo al 75% de amplitud. Posteriormente, se tomaron 2–3 µL de la muestra y se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para verificar que los fragmentos obtenidos presentaran un tamaño entre 300–500 pb. En caso de no alcanzar el tamaño deseado, la muestra debe someterse nuevamente a sonicación hasta obtener la fragmentación adecuada.

Se tomaron 500 µL del stock de Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow y se lavaron tres veces con buffer de elución I para eliminar el etanol de almacenamiento, recuperando la resina mediante centrifugación a 3000 rpm durante 2 min a 4°C entre cada lavado. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y la resina se resuspendió en 500 µL de buffer de elución I. A continuación, se añadieron 30 µL de DNA de espermato de salmón (10 mg/mL), 15 µL de albúmina sérica bovina (20 mg/mL) y 5–10 µL de tRNA (10 mg/mL), incubando la mezcla en agitación suave a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la proteína G se lavó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 2 min a 4°C, desechando el sobrenadante y repitiendo este proceso dos veces más. Finalmente, la proteína G bloqueada se resuspendió en buffer de elución I en una proporción 1:1 (vol/vol) y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Se recomienda emplear la resina bloqueada el mismo día de su preparación para preservar la eficiencia del bloqueo y reducir el fondo inespecífico.

8.9.4 Inmunoprecipitación (ChIP)

Se tomaron 100 µL de cromatina soluble y se preaclaron con 50 µL de proteína G sefarosa bloqueada más inhibidores de proteasas, incubando durante 3 h a 4 °C en agitación suave. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante correspondiente a la cromatina preaclorada. La cromatina se diluyó en una proporción 1:2 con amortiguador de elución I [20 mM Tris-HCl pH 8.1, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl y 1% Triton X-100] más inhibidores de proteasas. Posteriormente, el volumen total se dividió de acuerdo con el número de anticuerpos a evaluar. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos α -secundario HRP (α -NR), α -H3 y α -EhMyb10, en presencia de inhibidores de proteasas. Al día siguiente, se añadieron 20 µL de proteína G bloqueada a cada muestra y se incubaron durante 3 h a 4 °C en agitación suave. Posteriormente, las perlas se lavaron secuencialmente con 1 mL de los amortiguadores TETS I

[20 mM Tris-HCl pH 8.1, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS y 150 mM NaCl], TETS II [20 mM Tris-HCl pH 8.1, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS y 300 mM NaCl], LiTEN [250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.1, 1% Nonidet P-40, 1% DOC y 1 mM EDTA] y finalmente dos veces con TE [10 mM Tris-HCl pH 8.1 y 1 mM EDTA]. Cada lavado se realizó en hielo, en agitación suave durante 2 min, seguido de centrifugación a 3200 rpm durante 5 min. Posteriormente, las perlas se resuspendieron en 250 μ L de amortiguador de elución II [100 mM NaHCO₃, 1% SDS, Glucógeno 20 μ g/ml] previamente calentado a 37 °C para recuperar los complejos DNA-proteína. Las muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con agitación suave, y posteriormente, se centrifugaron a 3200 rpm durante 5 min. Este procedimiento se realizó dos veces y ambos eluidos se combinaron. Para revertir el *crosslinking*, los sobrenadantes se incubaron con NaCl 0.2 M durante 4 h a 65 °C. Posteriormente, las muestras se trataron con 2 μ L de RNasa A (2.8 mg/mL) a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se añadió 1 μ L de proteinasa K (18.4 mg/mL) y las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. Una vez concluida la incubación, el DNA se extrajo mediante fenol-cloroformo.

8.9.5 Precipitación del DNA

Las muestras obtenidas después de la reversión del *crosslinking* se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Para ello, se añadió un volumen equivalente de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (vol/vol) a cada muestra y se mezcló mediante vórtex. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Después, se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 μ L de glucógeno (20 μ g/mL) para precipitar el DNA. Las muestras se dejaron precipitar durante 1 h a -70 °C o toda la noche a -20 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min a 4 °C para recuperar la pastilla de DNA. El pellet se lavó dos veces con etanol al 70%, centrifugando a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C entre cada lavado. Después del último lavado, se retiró cuidadosamente el exceso de etanol sin tocar la pastilla y se dejó secar en la campana. Una vez seca, la pastilla se resuspendió en 25–30 μ L de H₂O libre de DNAsas y RNAsas. Finalmente, se realizaron ensayos de PCR para analizar el reclutamiento al promotor del gen *ehmat1a* (Figura 25).

9. Resultados

9.1 Sobreexpresión del FT EhMyb10 en trofozoitos de *E. histolytica*

Para identificar proteínas que interactúan con el FT EhMyb10, se transfectaron trofozoitos de *E. histolytica* con los plásmidos pEhEx (vector vacío) y pEhEx-Myb10 para sobreexpresar la proteína EhMyb10 acoplada a una etiqueta de hemaglutinina (HA) (EhMyb10ox). La sobreexpresión se confirmó mediante RT-PCR semicuantitativa y RT-qPCR, observándose un aumento en su expresión de 2.5 veces (**Figura 26 A, B**). Posteriormente, se obtuvieron extractos totales de los trofozoitos de las dos condiciones, los cuales se resolvieron en un gel SDS-PAGE, se tiñó con azul coomassie confirmando la integridad y carga comparable de proteínas en ambas condiciones (**Figura 26C**). Mediante western blot en extractos totales utilizando un anticuerpo α -EhMyb10, que reconoce la proteína endógena, se detectó un aumento en la señal correspondiente a una proteína de 25 kDa en la condición EhMyb10ox respecto al control (**Figura 26D**). Así mismo, en extractos nucleares, el anticuerpo α -HA reconoció una banda de $\approx$ 25 kDa correspondiente a EhMyb10 fusionada al tag de HA, a diferencia de la condición pEhEx donde no se observa reconocimiento. Como control de carga se utilizó el anticuerpo α -PCNA que reconoce la proteína en ambas condiciones en un peso molecular aproximado de 28 kDa.

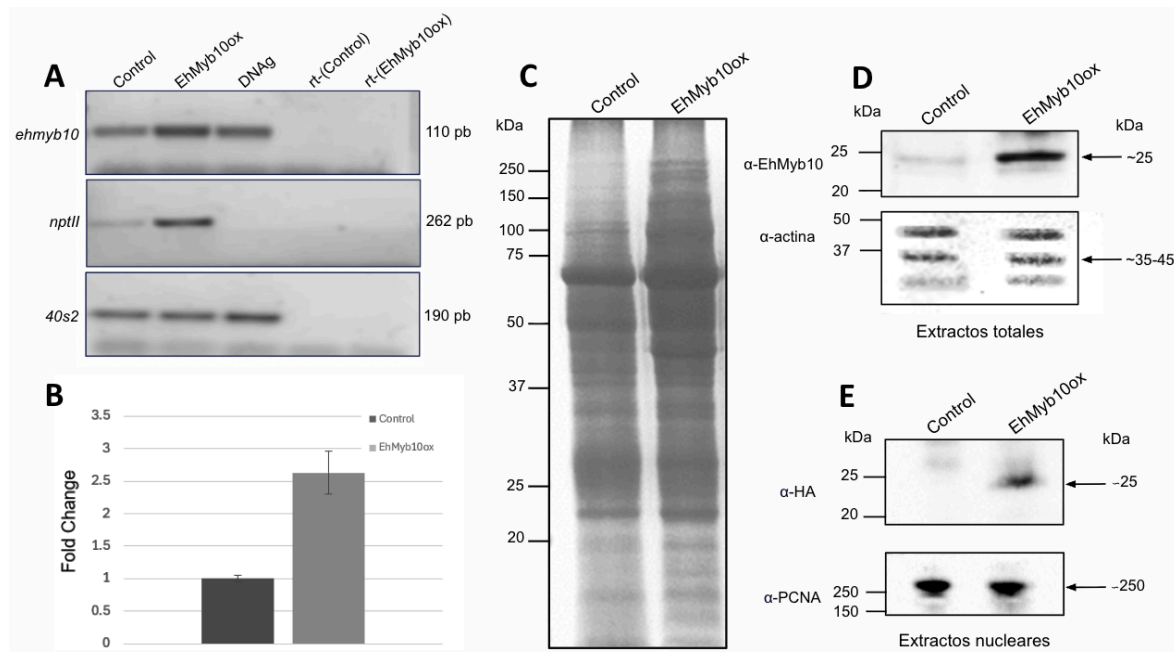


Figura 26. Análisis de la sobreexpresión de trofozoitos EhMyb10ox. A) Análisis de la expresión de EhMyb10 mediante RT-PCR. Se incluyó DNA genómico como control positivo de amplificación y reacciones sin transcriptasa reversa (rt-) para las condiciones pEhEx y EhMyb10ox. El gen *nptII* se utilizó como control de la presencia del plásmido en las células transfectadas, mientras que 40S2 se empleó como gen constitutivo de referencia. B) Cuantificación de la expresión de EhMyb10 por RT-qPCR. C) Gel de Coomassie de extractos

totales de proteínas de pEhEx y EhMyb10ox. **D)** Inmunodetección de EhMyb10 en extractos totales utilizando un anticuerpo α -EhMyb10 (1:1000) y en extractos nucleares de trofozoitos de *E. histolytica* pEhEx y EhMyb10ox utilizando el anticuerpo α -HA (1:2000). Se utilizaron α -actina (1:1000) y α -PCNA (1:3000) como control de carga.

Finalmente, mediante ensayos de inmunofluorescencia se observó que EhMyb10 se localiza predominantemente en el núcleo en la condición EhMyb10ox, empleando anticuerpos α -EhMyb10 y α -HA (**Figura 27**). Estos resultados muestran que EhMyb10 se sobreexpresa y se distribuye principalmente en el núcleo, en concordancia con su función como FT.

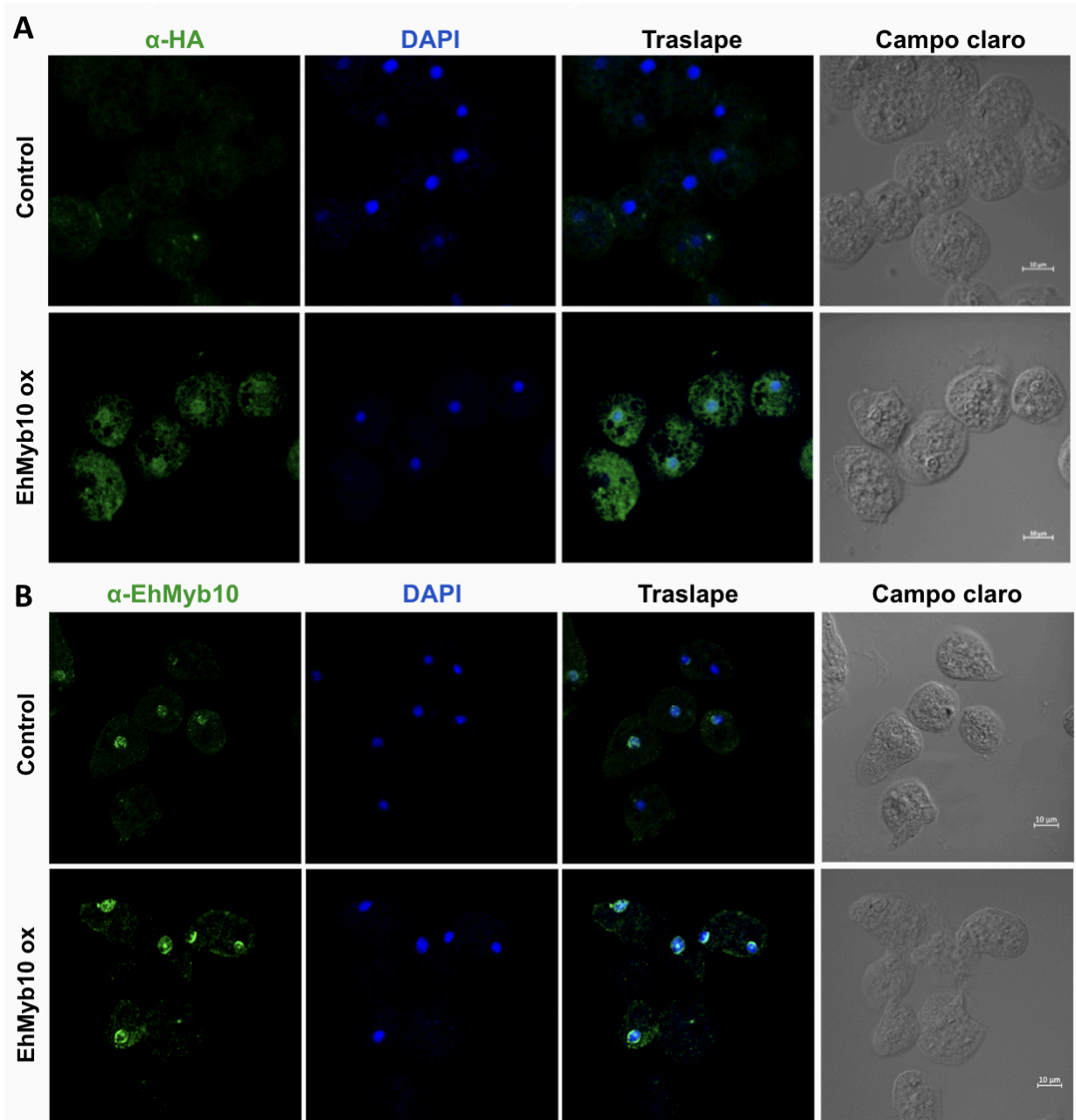


Figura 27. Localización subcelular de EhMyb10 en trofozoitos EhMyb10ox. A) Ensayo de inmunofluorescencia de trofozoitos EhMyb10ox utilizando anticuerpos α -HA y B) α -EhMyb10 (1:100), seguidos de anticuerpos secundarios α -conejo acoplados a FITC. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

9.2 Identificación y análisis ontológico de las proteínas que interactúan con EhMyb10

Para identificar las proteínas que interactúan con EhMyb10, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando extractos nucleares de trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox, empleando el anticuerpo α -HA. Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata. En los eluidos E1 y E2 de la condición EhMyb10ox se observaron bandas diferenciales con respecto a la condición control pEhEx, correspondientes a proteínas inmunoprecipitadas asociadas a EhMyb10 (**Figura 28A-B**). Estas bandas presentaron un rango aproximado de pesos moleculares entre ~17 kDa y ~150 kDa. Asimismo, tanto en la condición control como en EhMyb10ox se detectaron bandas de aproximadamente ~50 kDa y ~25 kDa, correspondientes a las cadenas pesada y ligera de las IgG utilizadas durante la inmunoprecipitación. El ensayo se realizó por triplicado y las proteínas presentes en las muestras fueron posteriormente identificadas mediante espectrometría de masas.

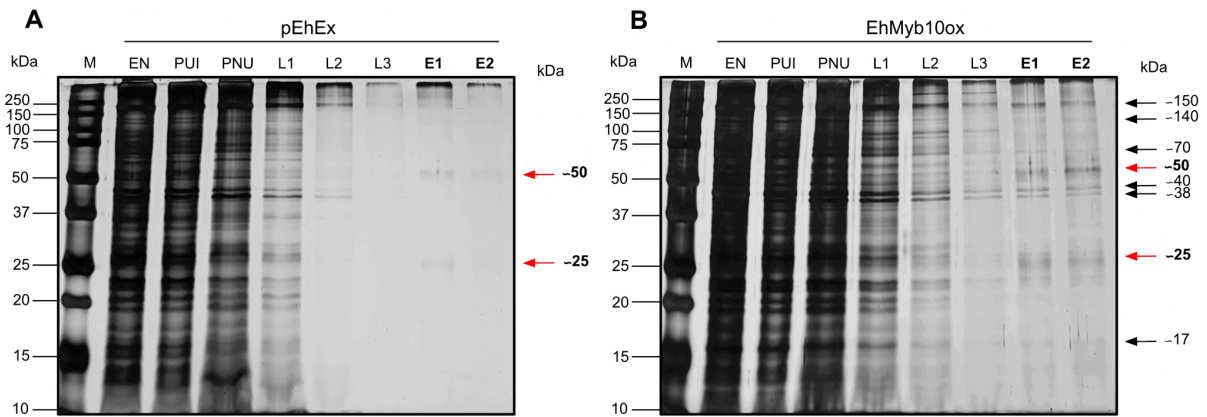


Figura 28. Inmunoprecipitación de proteínas asociadas a EhMyb10 en trofozoitos EhMyb10ox. Extractos nucleares de trofozoitos **A)** pEhEx o **B)** EhMyb10ox se inmunoprecipitaron con un anticuerpo α -HA y las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 12% teñido con plata. M, marcador de peso molecular; EN, extractos nucleares totales; PUI, proteínas unidas específicamente a G Sepharose; PNU, proteínas no unidas, L1, L2, L3, lavados; E1, E2, eluidos 1 y 2. Las flechas negras señalan los pesos moleculares de las proteínas diferenciales y las flechas rojas señalan las cadenas ligeras y pesadas de las IgGs.

El análisis por IMS-DIA-MS identificó 32 proteínas exclusivas de la condición EhMyb10ox, lo que sugiere una posible asociación de estas con el FT EhMyb10 (**Tabla 2**). Posteriormente, las proteínas identificadas se analizaron mediante clasificación ontológica de acuerdo con tres categorías: función molecular, tipo de proteína y vía de señalización (**Figura 29**). De manera general, en las tres categorías se observó que la mayor proporción de proteínas correspondió al grupo sin clasificar, lo que indica que una parte importante de las proteínas posiblemente asociadas a EhMyb10 aún no cuenta con una anotación funcional específica en

las bases de datos utilizadas. Por ello, la descripción se centró en las proteínas que sí presentaron una clasificación asignada.

Tabla 2. Proteínas identificadas por espectrometría de masas

Gen ID	Anotación	Péptidos digeridos/identificados	Cobertura (%)	Secuencia de péptido
EH1_110180	myosin heavy chain	271/68	34.96	DNQSAEEEELNELR
EH1_047800	hypothetical protein	27/7	20.39	FSTEFYGGSK
EH1_012270	Gal/GalNAc lectin heavy subunit	112/10	8.48	IQEIVITEK
EH1_042370	galactose-specific adhesin 170kD subunit, putative	10/105	7.48	IQEIVITEK
EH1_049030	ras-like protein 3 precursor, putative	17/3	11.76	ISDIFTTLIK
EH1_148790	Gal/GalNAc lectin light subunit	24/4	20.37	VIFASDYNJETQK
EH1_183400	galactose-inhibitable lectin 35 kDa subunit precursor, putative	24/2	6.87	VIFASDYNKY
EH1_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	25/2	6.64	VIFASDYNKY
EH1_027800	galactose binding lectin 35 kDa subunit, putative	25/2	6.45	VIFASDYNKY
EH1_154330	hypothetical protein	129/8	7.72	TDTLTDIESTNLENK
EH1_049690	galactose-specific adhesin light subunit, putative	26/3	10.07	VIFASDYNKY
EH1_118840	fibrillarin, putative	28/5	12.13	EEQLLTINR
EH1_117850	hypothetical protein	15/2	5.81	YEEILDVER
EH1_124880	inorganic pyrophosphatase, putative	24/3	21.72	VIGINVNDPLAQTIT SANDIEK
EH1_105670	plastin-2, putative	27/4	16.30	GVTISESNLSTPNK
EH1_169820	SNF7 family protein	18/2	11.27	NMNETINLR
EH1_065330	Gal/GalNAc lectin subunit Igl2	103/13	17.19	GYDQYEQYLNAFK
EH1_023500	calmodulin, putative	22/2	14.38	ELTEALLNIGER
EH1_133900	galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative	114/17	12.45	IQEIVITEK
EH1_140720	myosin heavy chain	196/27	24.77	IDTINR
EH1_160980	hypothetical protein	32/4	15.46	HVGLEDEGNFVDER
EH1_067090	hypothetical protein	18/2	13.21	DDDGNAVTFIK

Gen ID	Anotación	Péptidos digeridos/identificados	Cobertura (%)	Secuencia de péptido
EHI_110180	myosin heavy chain	271/68	34.96	DNQSAEEELNELR
EHI_077500	galactose-specific adhesin 170kD			
	subunit	116/14	10.77	IQEIVITEK
EHI_035690	galactose-inhibitable lectin 35 kda			
	subunit precursor	28/4	14.93	VIFASDYNKY
EHI_058090	Ras family GTPase	19/6	29.35	YGAEFLEVSARK
EHI_197160	sulfate adenylyltransferase putative	50/10	25.77	VTTLSEGEFPIK
EHI_120360	grainin, putative	21/5	22.79	SGTLELTELRL
EHI_050520	hypothetical protein	16/5	34.53	SLDEVCLNTLGCK
EHI_167310	grainin 2	23/4	22.54	SGSLDVNELIK
EHI_118780	WD domain-containing protein	16/4	14.96	QQSNSPVFPLGEPK
	sulfate adenylyltransferase,			
EHI_179080	putative	39/7	16.56	SVVSNAVIER

En la categoría de función molecular, las proteínas clasificadas se agruparon principalmente en funciones de unión (GO:0005488) y actividad catalítica (GO:0003824), ambas con porcentajes cercanos al 20%. En menor proporción se identificaron proteínas asociadas con actividad dependiente de ATP (GO:0140657) y actividad motora citoesquelética (GO:0003774). Esta distribución sugiere que parte de las proteínas inmunoprecipitadas con EhMyb10 podría participar en interacciones moleculares, reacciones enzimáticas y procesos dependientes de energía.

Respecto al tipo de proteína, las proteínas clasificadas corresponden principalmente a proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión de metabolitos (PC00262), proteínas del metabolismo del RNA (PC00031), moduladores de la actividad de unión a proteínas (PC00095) y proteínas de tráfico de membrana (PC00150). La presencia de proteínas relacionadas con metabolismo del RNA y modulación de interacciones proteína-proteína resulta relevante, ya que EhMyb10 es un FT y podría formar parte de complejos nucleares asociados con regulación génica, procesamiento de RNA o remodelación de complejos proteicos. En cuanto a la vía de señalización, las proteínas con anotación funcional se distribuyeron en rutas relacionadas con vías mediadas por las subunidades alfa Gi y Gs de la proteína G heterotrimérica (P00026), vías mediadas por las subunidades alfa Gq y Go de la proteína G heterotrimérica (P00027), regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa (P00016), vía de señalización de inflamación mediada por quimiocinas y citocinas (P00031), asimilación

de sulfato (P02778), vía de señalización del receptor nicotínico de acetilcolina (P00044) y vía de señalización de las integrinas (P00034). Aunque estas categorías se encontraron en proporciones bajas, apuntan a una posible relación de algunas proteínas asociadas a EhMyb10 con procesos de señalización celular, organización del citoesqueleto y respuesta celular. En conjunto, estos resultados indican que, aunque la mayoría de las proteínas identificadas aún no cuenta con una clasificación funcional específica, las proteínas anotadas se relacionan principalmente con unión, actividad catalítica, metabolismo del RNA, citoesqueleto, tráfico de membrana y señalización celular. Esto sugiere que EhMyb10 podría interactuar con un conjunto diverso de proteínas, posiblemente vinculadas no solo con regulación transcripcional, sino también con redes funcionales asociadas al control postranscripcional, organización celular y respuesta a señales intracelulares.

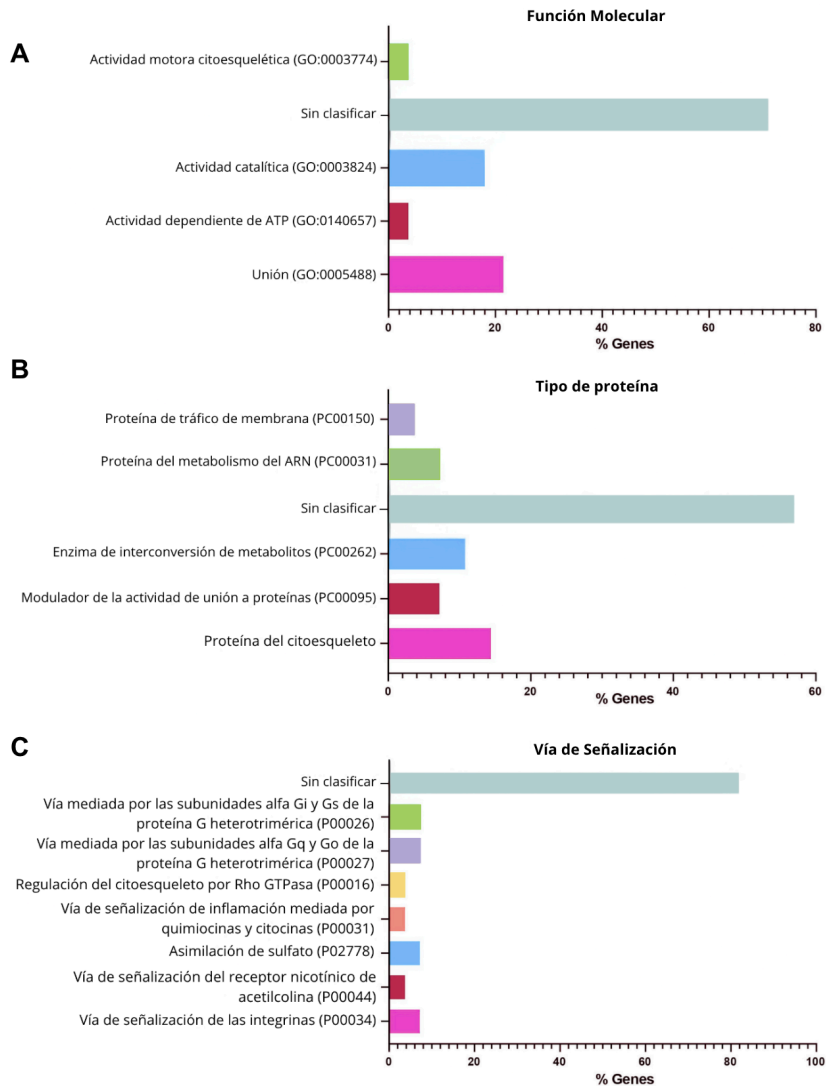


Figura 29. Análisis ontológico de las proteínas identificadas por IMS-DIA-MS. El análisis ontológico se realizó mediante el servidor PANTHER Classification System, clasificando las proteínas de acuerdo con su **A)** función molecular, **B)** tipo de proteína y **C)** vía de señalización.

9.3 Los trofozoitos que sobreexpresan a EhMyb10 aumentan la expresión de proteínas relacionadas con la metilación

Previamente, mediante ensayos de Pull-Down observamos que EhMyb10 se asocia a proteínas involucradas en la modificación de la cromatina, entre ellas EhPKMTs. Además, el gen *ehmat1a* que codifica para EhMAT1A se sobreexpresa en la condición EhMyb10ox, y es la enzima responsable de la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM) el cual es el principal donador de grupos metilo. Por ello, decidimos evaluar si la sobreexpresión de EhMyb10 tiene un efecto en la abundancia de proteínas relacionadas con la metilación como EhMAT1A y EhPKMT2. Los resultados muestran que en extractos totales de trofozoitos EhMyb10ox hay una mayor cantidad de EhMAT1A y EhPKMT2 en comparación con la condición control (**Figura 29A-B**), como control de carga se usó el anticuerpo α -actina el cual reconoció proteínas de 40 kDa cuya abundancia es similar en ambas condiciones (**Figura 29D**). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EhMyb10 se asocia con cambios en proteínas involucradas en la metilación y regulación epigenética, lo que sugiere un posible papel en la regulación de la cromatina y en procesos asociados a la regulación transcripcional. Adicionalmente, analizamos el patrón de proteínas metiladas en extractos totales mediante un anticuerpo que reconoce lisinas dimetiladas y observamos un mayor reconocimiento de lisinas dimetiladas en los extractos de EhMyb10ox (M) en comparación con el control (V). Estas proteínas se detectaron en un rango de 17-100 kDa, sugiriendo que la sobreexpresión de EhMyb10 podría modular la metilación de lisinas directa o indirectamente, lo cual podría estar relacionado con el aumento observado en EhMAT1A y EhPKMT2 (**Figura 4D**).

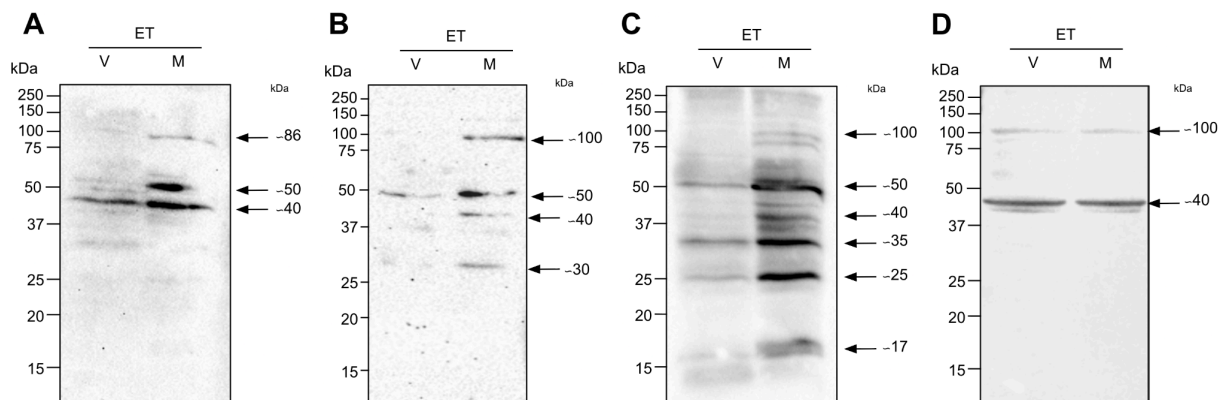


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de EhMyb10 en la abundancia proteica de EhMAT1A, EhPKMT2 y en el patrón de dimetilación de lisinas. Se analizó la abundancia proteica de EhMAT1A y EhPKMT2 mediante Western blot en extractos totales de proteínas de trofozoitos pEhEx (V) y EhMyb10ox (M). **A)** Detección de EhMAT1A, mediante un anticuerpo α -EhMAT1A (1:1000). **B)** Detección de EhPKMT2, utilizando un anticuerpo α -EhPKMT2 (1:1000). **C)** Análisis del patrón global de dimetilación en residuos de lisina utilizando un anticuerpo α -pan-dimetil-lisinas (1:1000). **D)** Como control de carga de utilizó un anticuerpo α -actina (1:1000)

9.4 Colocalización de EhMyb10 con proteínas involucradas en procesos de metilación

Para determinar la posible colocalización de EhMyb10 con proteínas implicadas en la organización de la cromatina y el metabolismo de metilos, como EhPKMT2 y EhMAT1A, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en trofozoítos transfectados con el vector pEhEx (control) y en trofozoítos que sobreexpresan EhMyb10 (EhMyb10ox). En primer lugar, se analizó la colocalización entre EhMyb10 y EhPKMT2. La detección de EhMyb10 mediante el anticuerpo α -HA reveló su localización tanto en el citoplasma como en el núcleo de los trofozoítos. Por su parte, EhPKMT2 fue detectada predominantemente en el núcleo, con una señal más intensa en los trofozoítos EhMyb10ox en comparación con el control. El análisis de superposición de señales reveló colocalización parcial en regiones nucleares periféricas entre EhMyb10 y EhPKMT2, lo que sugiere una asociación espacial en compartimentos nucleares asociados a cromatina (**Figura 31**). Posteriormente, se analizó la colocalización de EhMyb10 y EhMAT1A. Los resultados mostraron que EhMAT1A tiene distribución citoplásmica y nuclear, con un enriquecimiento principalmente nuclear tanto en la condición control como en la condición EhMyb10ox. Asimismo, al superponer las señales de ambas proteínas observados que colocalizan principalmente en la periferia nuclear, patrón similar al observado con EhPKMT2 (**Figura 32**).

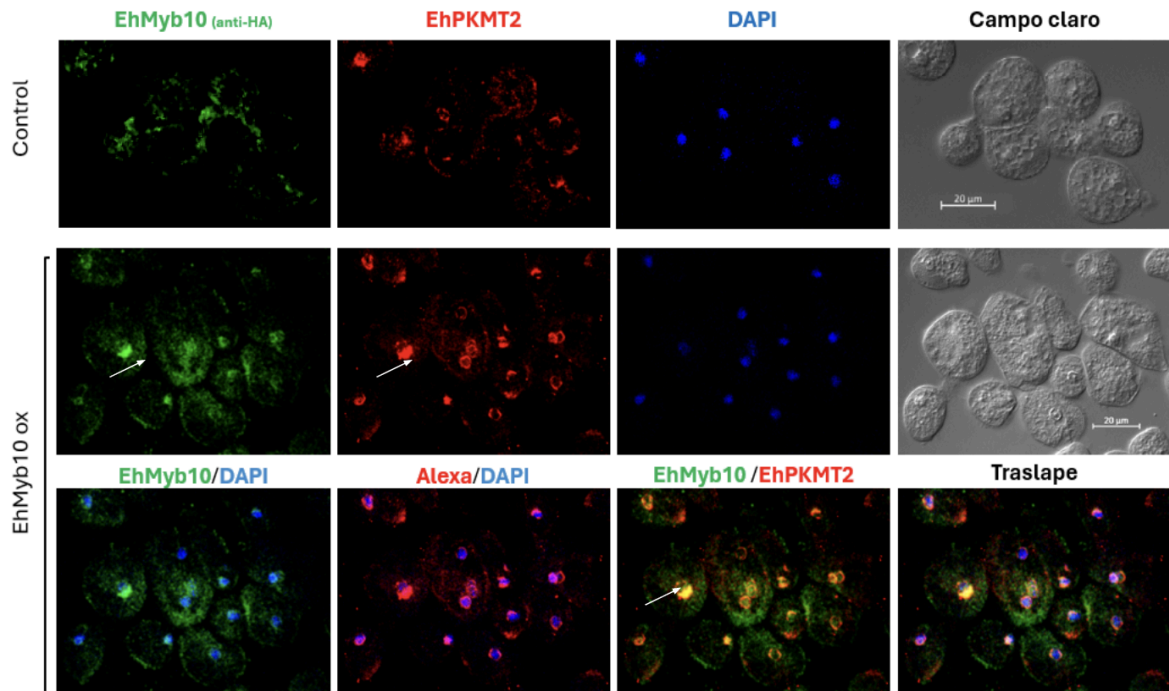


Figura 31. Colocalización de EhMyb10 con EhHKMT2 en el núcleo de trofozoítos EhMyb10ox. Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* transfectados que sobreexpresan a EhMyb10 acoplada a una etiqueta de

HA (EhMyb10ox) y trofozoitos transfectados con un vector vacío como control. Las muestras se fijaron e incubaron con anticuerpos primarios α -HA (ratón) y α -EhPKMT2 (conejo), ambos diluidos 1:100, seguidos de anticuerpos secundarios α -FITC (ratón) y α -Alexa-647 (conejo) en la misma dilución.

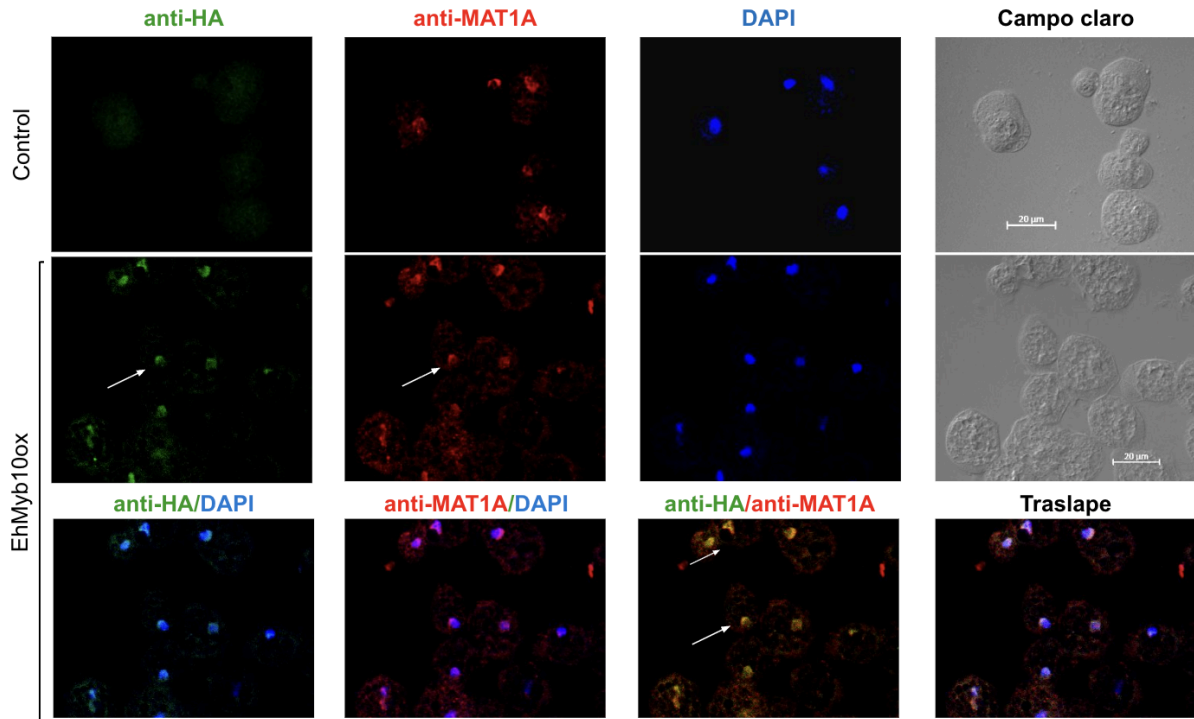


Figura 32. Colocalización de EhMyb10 con EhMAT1A en el núcleo de trofozoitos EhMyb10ox. Se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* transfectados que sobreexpresan a EhMyb10 acoplada a una etiqueta de HA (EhMyb10ox) y trofozoitos transfectados con un vector vacío como control. Las muestras fueron fijadas e incubadas con el anticuerpo primario α -HA (ratón) y α -MAT1A (conejo) (1:100), ambos diluidos 1:100, seguidos de anticuerpos secundarios α -FITC (ratón) y α -Alexa-647 (conejo) en la misma dilución. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

9.5 Colocalización de EhMyb10 con marcas de enhancers y promotores activos en trofozoitos EhMyb10ox

Para evaluar si EhMyb10 presenta características de un FT pionero en *E. histolytica*, se analizó su colocalización con las marcas epigenéticas asociadas a enhancers activos H3K4me1 y H3K27ac mediante inmunofluorescencia en trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox. Cabe recordar que H3K4me1 es una marca característica de enhancers tanto activos como “poised”, mientras que H3K27ac se asocia con elementos reguladores activos, incluyendo tanto enhancers como promotores. Por ello, la presencia simultánea de ambas marcas es indicativa de enhancers en estado activo de transcripción.

En los trofozoitos control (pEhEx), no se detectó señal α -HA, confirmando la especificidad del anticuerpo, mientras que H3K4me1 mostró un patrón periférico anular en el núcleo. En los trofozoitos EhMyb10ox, EhMyb10 presentó una distribución puntual enriquecida en la periferia y centro nuclear, patrón que coincide espacialmente con el de

H3K4me1, como se evidencia por la superposición de señales en la imagen de fusión (**Figura 33A**). De manera similar, EhMyb10 mostró colocalización focal con H3K27ac en los trofozoitos EhMyb10ox, principalmente en el centro nuclear (**Figura 33B**). En conjunto, estos resultados sugieren que EhMyb10 se localiza en proximidad a regiones enriquecidas con marcas epigenéticas características de enhancers activos.

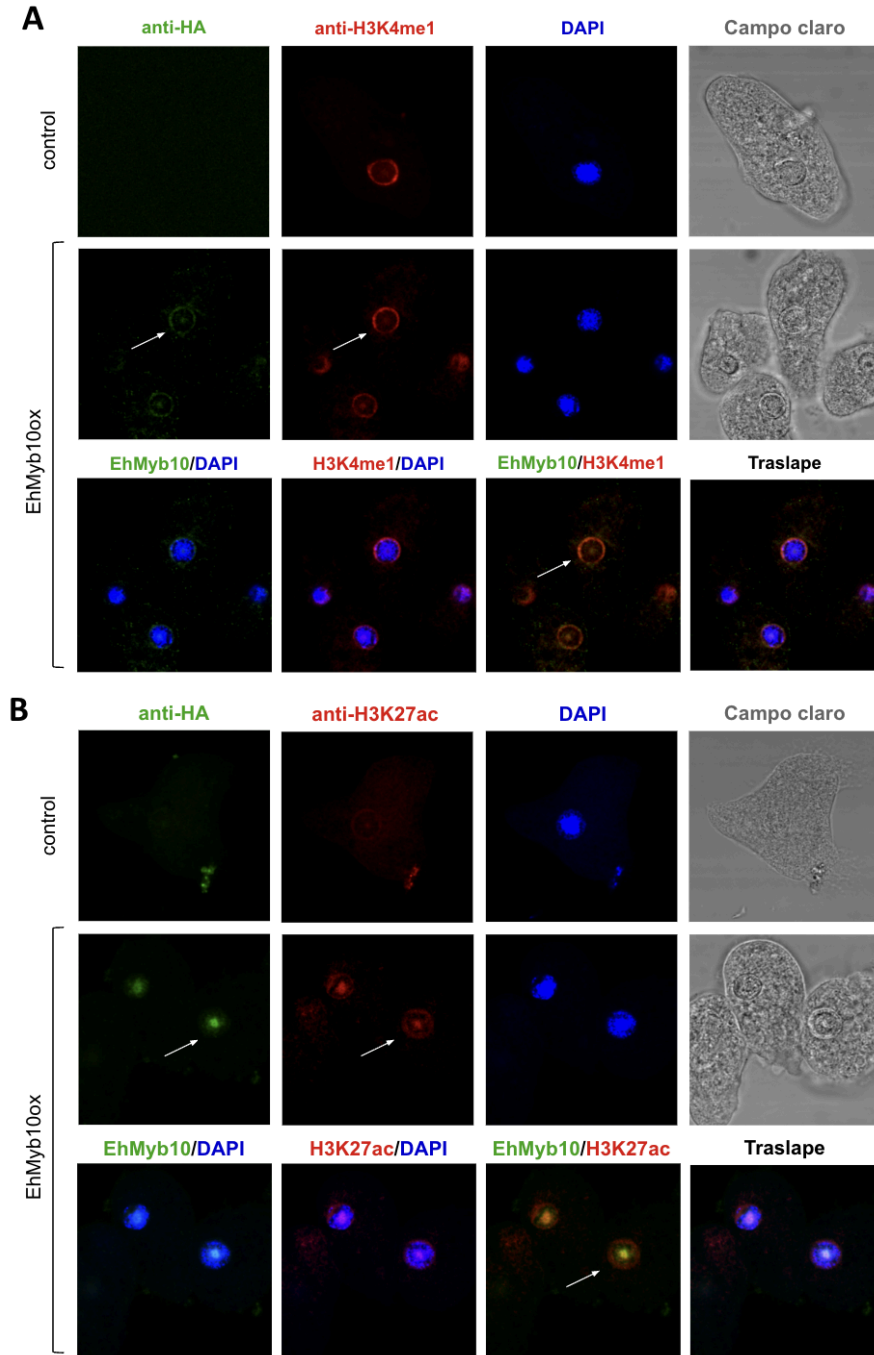


Figura 33. Colocalización de EhMyb10 con las marcas H3K4me1 y H3K27ac asociadas a enhancers y promotores activos en trofozoitos EhMyb10ox. A) H3K4me1 y B) H3K27ac. Se utilizaron trofozoitos EhMyb10ox y pEhEx (como control), fijados e incubados con el anticuerpo primario α -HA (1:100), α -H3K4ME1 (1:100) y α -H3K27ac (1:100), seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC (ratón) y Alexa (conejo) en la misma dilución (1:200). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

9.6 Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional en trofozoitos EhMyb10ox

Las PTMs de las histonas son determinantes en la organización de la cromatina y en la regulación de la expresión génica, ya que establecen un código epigenético que define el estado transcripcional de las distintas regiones del genoma. En particular, la acetilación de histonas, como H4K12ac, se asocia con cromatina abierta y regiones transcripcionalmente activas, facilitando el acceso de la maquinaria transcripcional al DNA. En contraste, la trimetilación de H3K27 (H3K27me3) es una marca represiva asociada con el silenciamiento génico y la formación de heterocromatina facultativa. Dado que EhMyb10 podría actuar como un FT pionero capaz de reconocer cromatina compactada, evaluamos su posible asociación con regiones de cromatina activa (H4K12ac) y represiva (H3K27me3) mediante ensayos de inmunofluorescencia en trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox

En trofozoitos EhMyb10ox se observó la colocalización de EhMyb10 con H4K12ac (**Figura 34A**). De manera interesante, la señal nuclear no fue uniforme, sino que mostró patrones focales semejantes a las denominadas “fábricas de transcripción”, que son condensados nucleares especializados donde se concentra la maquinaria transcripcional activa. También se observó colocalización entre EhMyb10 y la marca H3K27me3 en la periferia del núcleo, aunque con menor intensidad (**Figura 34B**). La localización en la periferia nuclear se asocia con regiones de heterocromatina, lo cual fue corroborado mediante el control de localización nuclear laminin B1 (**Figura 35**).

Para tener una mayor evidencia de colocalización entre EhMyb10, H4K12ac y H3K27me3, se realizó un inmunomarcaje en microscopía electrónica de transmisión (MET), utilizando partículas de oro de diferente tamaño para distinguir simultáneamente a EhMyb10 de las marcas epigenéticas H4K12ac y H3K27me3. Este abordaje permitió una resolución espacial significativamente mayor que la inmunofluorescencia convencional. En estos ensayos, H4K12ac se localizó predominantemente en regiones de menor densidad electrónica, compatibles con eucromatina, mientras que H3K27me3 se asoció con regiones de mayor densidad electrónica, características de heterocromatina (**Figura 36A**). De manera interesante, EhMyb10 colocalizó con ambas marcas, lo que indica su presencia tanto en regiones transcripcionalmente activas como en regiones represivas de la cromatina, y que es consistente con los resultados obtenidos por inmunofluorescencia (**Figura 36B**).

Estos resultados sugieren que EhMyb10 puede asociarse con distintos estados de la cromatina y posiblemente ejercer funciones duales en la regulación transcripcional de programas transcripcionales tanto de activación como de silenciamiento génico en este parásito.

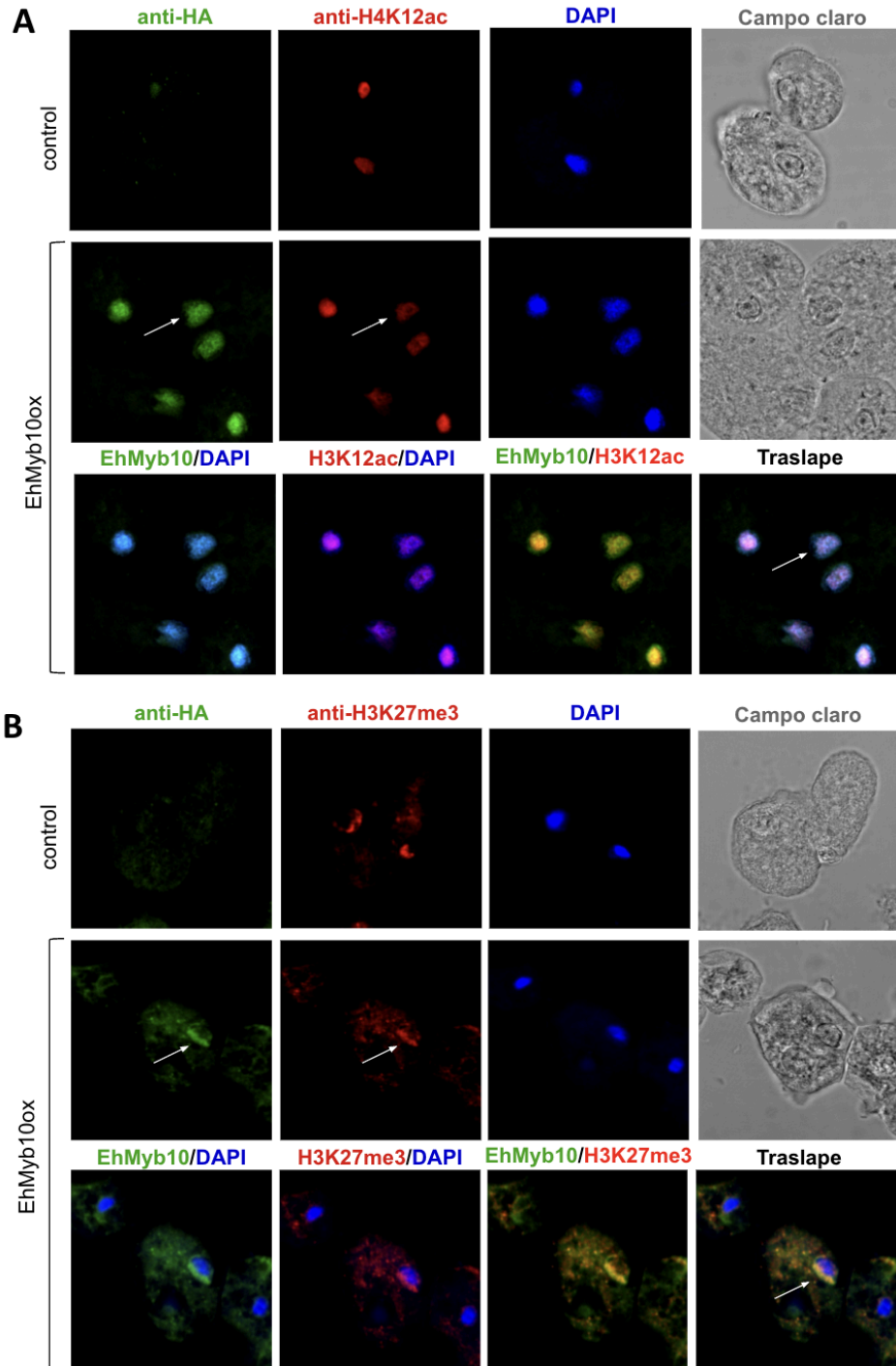


Figura 34. Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional en trofozoitos EhMyb10ox. A) H4K12ac y B) α -H3K27me3. Se utilizaron trofozoitos EhMyb10ox y pEhEx (como control), fijados e incubados con el anticuerpo primario α -HA (1:100), α -H4K12ac (1:100) y α -H3K27me3 (1:100), seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a FITC (ratón) y Alexa (conejo) (1:200). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

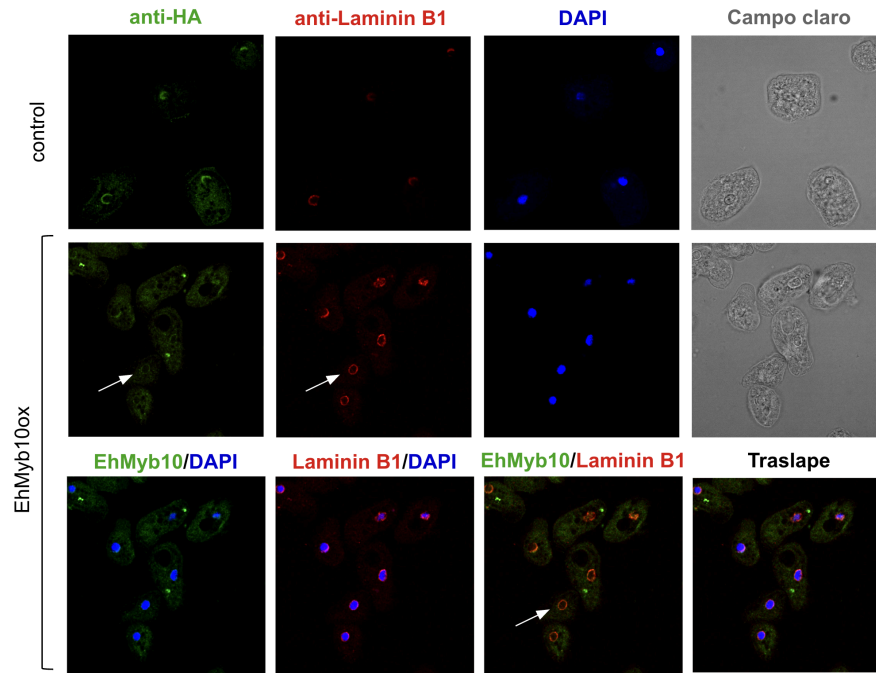


Figura 35. Localización nuclear de laminina B1. Las células se incubaron con anticuerpos α -HA y α -laminina B1 (1:100), seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con FITC y Alexa (1:200), respectivamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

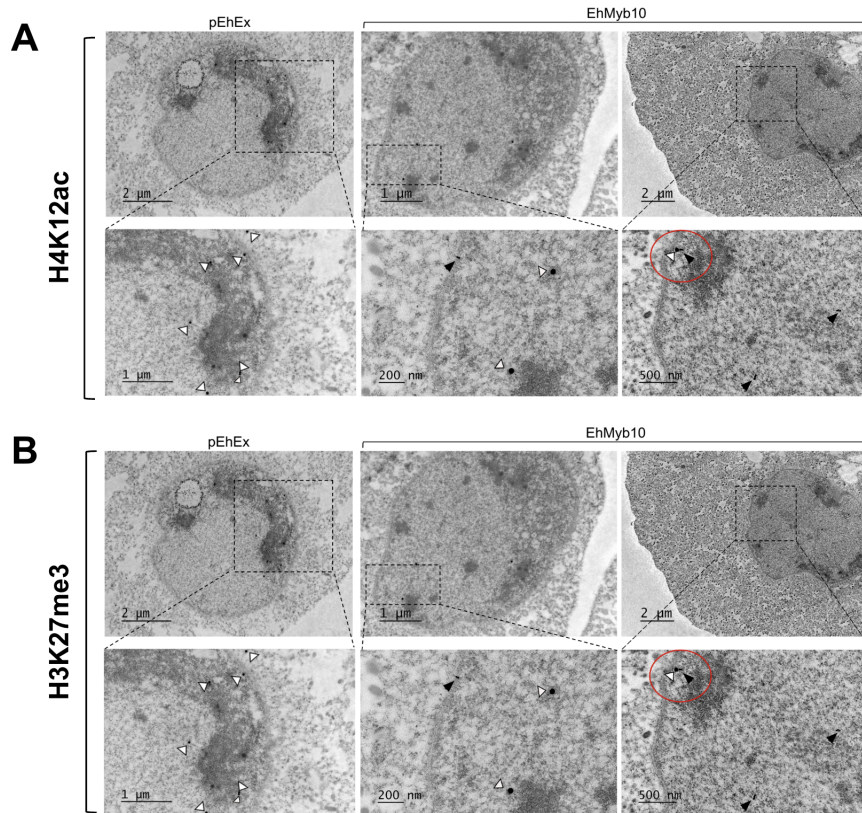


Figura 36. Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional. Secciones ultrafinas de las células pEhEx y EhMyb10ox fueron incubadas con un anticuerpo α -HA (dilución 1:40), detectado con partículas de oro de 15 nm, y con anticuerpos contra **A)** H4K12ac o **B)** H3K27me3 (dilución 1:20), detectados con partículas de oro de 30 nm. Las cabezas de flecha blancas indican las partículas de 30 nm, mientras que las negras señalan las partículas de 15 nm.

9.7 Validación de la interacción de EhMyb10 con EhPKMT2

Como antecedente de este trabajo, se realizó un ensayo de Pull-Down con la proteína recombinante EhMyb10 acoplada a GST y extractos nucleares para identificar proteínas que interaccionen con este FT. Una parte de los eluidos fue enviada a identificación por masas y otra guardada a -70°C . Entre las proteínas identificadas se encontró a EhPKMT2 y dado que observamos la colocalización con EhMyb10 en el núcleo decidimos validar la interacción entre EhMyb10 y EhPKMT2 en estas fracciones. Para ello se separaron por electroforesis SDS-PAGE, se corroboró su integridad con azul de Coomassie y se realizó un WB. En el gel teñido con azul de Coomassie se puede observar la presencia de GST o EhMyb10r, como bandas de 25 y 43 kDa respectivamente así como de bandas adicionales que corresponden a las proteínas que interaccionan con las mismas (**Figura 37A**). En el ensayo de WB se observó que el α -EhPKMT2 reconoce solo una banda de ~ 43 kDa en los eluidos de la proteína EhMyb10 recombinante, pero no en los eluidos de GST. Además, en los controles de la fracción nuclear insoluble, se observó una señal de ~ 60 y 29 kDa que podría corresponder a la proteína endógena con modificaciones postraduccionales, proteólisis parcial, o a la presencia de isoformas con diferente peso molecular (**Figura 37B**). Estos resultados validan la interacción de EhMyb10 con esta metiltransferasa.

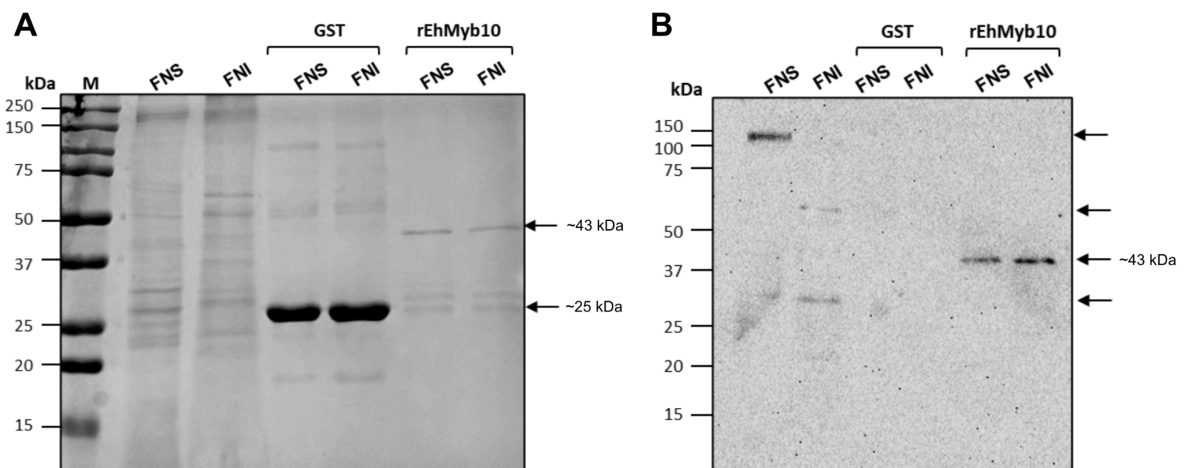


Figura 37. Validación de la interacción de EhMyb10 y EhPKMT2. **A)** Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie blue brilliant que muestra las fracciones nucleares y los eluidos de ensayos de Pull-Down. Las muestras analizadas incluyen fracción nuclear soluble (FNS), fracción nuclear insoluble (FNI), eluidos del ensayo de Pull-Down con GST y fracción nuclear soluble (GST-S), eluidos del Pull-Down con GST y fracción nuclear insoluble (GST-I), eluidos del Pull-Down con GST-EhMyb10 y fracción nuclear soluble (EhMyb10-S), y eluidos del Pull-Down con GST-EhMyb10 y fracción nuclear insoluble (EhMyb10-I). El carril M corresponde al marcador molecular. Las bandas de ~ 43 kDa y ~ 25 kDa están indicadas con flechas. **B)** Ensayo de Western blot, utilizando un anticuerpo α -EhPKMT2 de conejo (1:100).

9.8 Inmunodetección de EhMyb10 y proteínas asociadas a procesos de metilación en inmunoprecipitados de histona H3

Con el objetivo de evaluar una posible asociación de EhMyb10 con proteínas relacionadas con la estructura de la cromatina, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra la histona H3 en extractos nucleares solubles de trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox. Como control negativo, se realizaron inmunoprecipitaciones con un anticuerpo no relacionado (α -NR), correspondiente a un anticuerpo secundario acoplado a HRP. Debido a que EhMyb10 (~20 kDa), la histona H3 (~17 kDa) y EhPKMT2 (~43 kDa) presentan pesos moleculares cercanos a las cadenas ligera (~25 kDa) y pesada (~50 kDa) de las IgG utilizadas durante la inmunoprecipitación, las muestras fueron analizadas bajo condiciones no reductoras para disminuir la interferencia generada por la disociación completa de las inmunoglobulinas y facilitar la interpretación de las señales obtenidas por Western blot.

Los eluidos de las inmunoprecipitaciones con H3 se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% e inmunodetección con anticuerpos contra H3, EhMyb10 y EhPKMT2. Se detectó señal correspondiente a H3 (~17 kDa) tanto en la condición control como en EhMyb10ox, aunque la intensidad de la señal fue mayor en la condición EhMyb10ox (**Figura 38A**). Asimismo, se observaron señales entre ~20 y ~30 kDa compatibles con EhMyb10, así como señales entre ~50 y ~60 kDa compatibles con EhPKMT2 en ambas condiciones experimentales (**Figura 38B-C**).

En contraste, en los eluidos obtenidos con el anticuerpo no relacionado no se detectaron señales equivalentes, observándose únicamente las bandas correspondientes a las cadenas pesada y ligera de las IgG. Esto sugiere que las señales detectadas en las inmunoprecipitaciones con H3 corresponden específicamente a proteínas asociadas a los complejos inmunoprecipitados (**Figura 38D-F**).

No obstante, las señales observadas en el rango de la cadena pesada presentaron una intensidad considerablemente mayor en las inmunoprecipitaciones con H3 respecto al control α -NR. Esto podría indicar que algunas de las proteínas de interés se encuentran formando parte de complejos multiproteicos asociados a H3 que, debido a las condiciones no reductoras, no fueron completamente desnaturalizados, ocasionando un corrimiento electroforético más lento. Estos resultados sugieren una posible asociación de EhMyb10 y EhPKMT2 con complejos asociados a la histona H3.

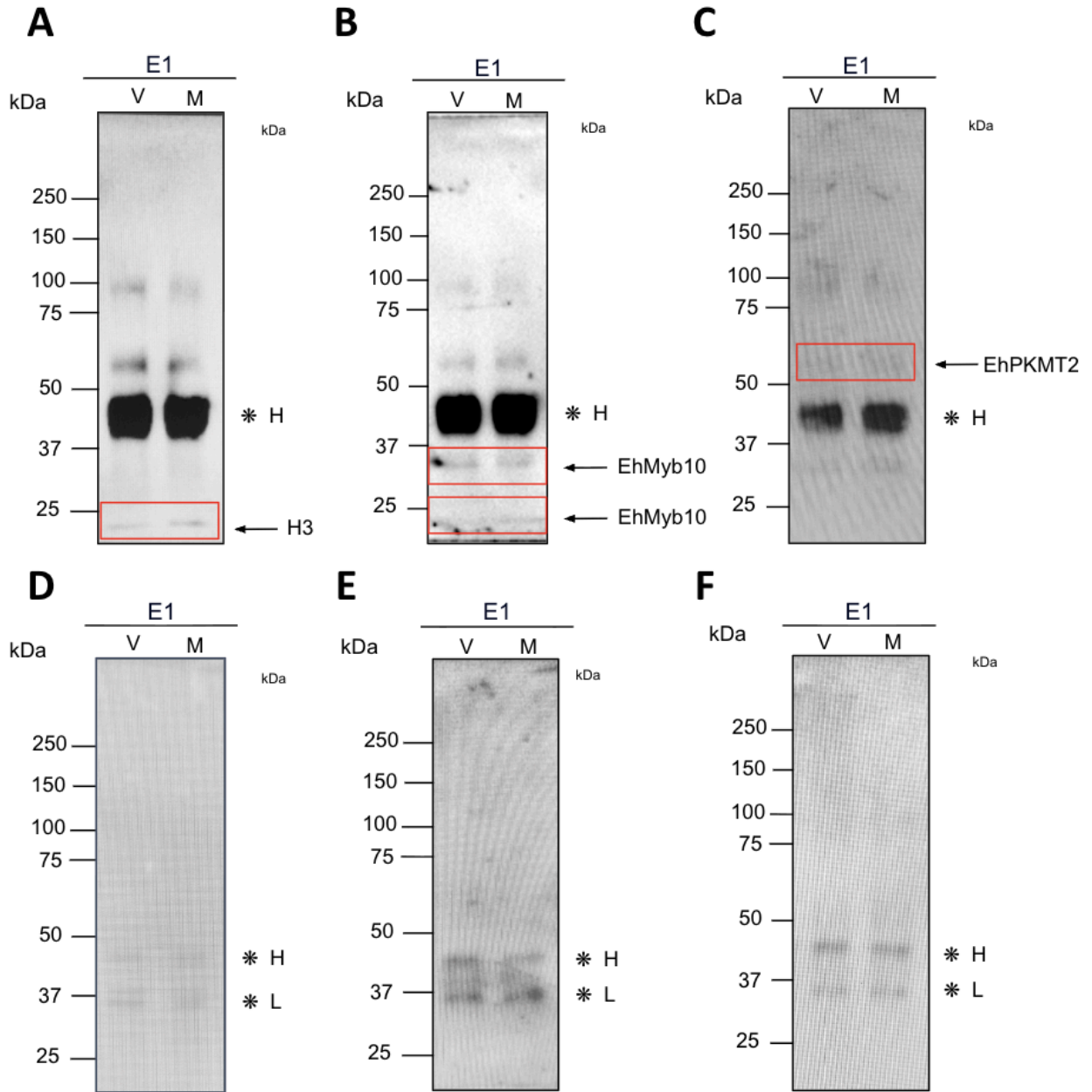


Figura 38. Detección de H3, EhMyb10 y EhPKMT2 en fracciones inmunoprecipitadas con histona H3. Se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo α -H3 y un anticuerpo no relacionado (α -NR) como control negativo en extractos nucleares solubles de trofozoitos pEhEx (V) y EhMyb10ox (M). **A-C)** Inmunodetección de H3 (α -H3, 1:2500), EhMyb10 (α -EhMyb10, 1:200) y EhPKMT2 (α -EhPKMT2, 1:200), respectivamente, en los eluidos obtenidos mediante IP con α -H3. **D-F)** Inmunodetección de H3, EhMyb10 y EhPKMT2, respectivamente, en los eluidos obtenidos mediante IP con α -NR, utilizando las mismas diluciones. Los eluidos (E1) se obtuvieron en condiciones no reductoras y se analizaron mediante SDS-PAGE al 10%. Las flechas indican el peso molecular aproximado de las proteínas inmunodetectadas, mientras que los asteriscos señalan las cadenas pesada (H) y ligera (L) de las inmunoglobulinas (IgG).

9.9 Análisis del reclutamiento de EhMyb10 al promotor del gen *ehmat1a* de *E. histolytica*

Con el objetivo de evaluar el reclutamiento de EhMyb10 al promotor de uno de sus posibles genes blanco, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando como candidato la región promotora del gen *ehmat1a*, debido a que este gen incrementa su expresión en la condición EhMyb10ox. Debido a que el promotor de *ehmat1a* comprende una región de 551 pb, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para analizarlo en dos fragmentos de tamaño similar. El primer par de primers amplifica la región comprendida entre -498 y -267 pb (amplicón de 231 pb), mientras que el segundo amplifica la región de -267 a +8 pb (amplicón de 275 pb) (**Figura 39A**).

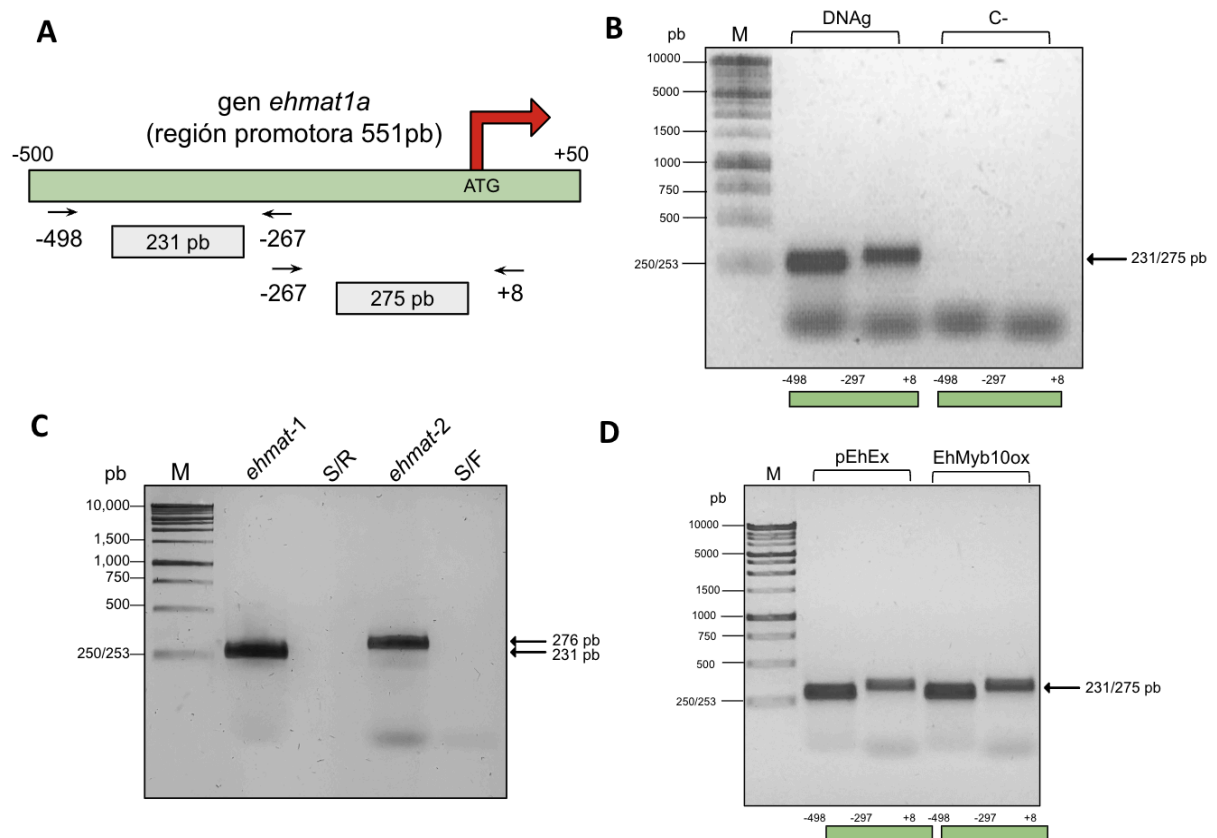


Figura 39. Validación de oligonucleótidos para el análisis del promotor de *ehmat1a*. **A)** Esquema del promotor de *ehmat1a*. Se diseñaron dos pares de primers que amplifican la región promotora en dos amplicones que corresponden a 231 pb (-400 a -270) y 275 pb (-270 a +8). **B)** PCR con DNA genómico (DNAG) como control positivo y reacción sin DNA como control negativo. **C)** PCR con DNAG en la que se omitió individualmente el primer forward o reverse para evaluar la especificidad. **D)** PCR del input correspondiente a las condiciones pEhEx y EhMyb10ox. Los recuadros verdes indican las regiones del promotor correspondientes a los amplicones analizados, y las flechas negras señalan el tamaño de los productos en pares de bases (pb).

Para verificar la especificidad de los oligonucleótidos, se realizaron ensayos de PCR utilizando DNA genómico como control positivo. Ambos pares de oligonucleótidos amplificaron los fragmentos esperados de aproximadamente 231 y 275 pb, respectivamente, mientras que el control negativo no mostró amplificación (**Figura 39B**). Adicionalmente, se realizaron reacciones de PCR omitiendo el primer forward o reverse de manera individual, observándose ausencia de amplificación en ambas condiciones, lo que confirmó la especificidad de los oligonucleótidos y descartó amplificaciones inespecíficas (**Figura 39C**). Posteriormente, se evaluó la amplificación de ambas regiones promotoras utilizando la cromatina correspondiente al *input* de las condiciones pEhEx y EhMyb10ox. En ambas condiciones se obtuvieron los amplicones esperados, indicando un procesamiento adecuado de la cromatina para los ensayos de ChIP (**Figura 39D**).

Una vez validadas las condiciones experimentales, se realizaron ensayos de ChIP utilizando cromatina de trofozoitos pEhEx y EhMyb10ox. Como control positivo se empleó el anticuerpo α -H3 y como control negativo un anticuerpo no relacionado (α -NR). Para evaluar el reclutamiento de EhMyb10 a la región promotora de *ehmat1a*, se utilizó el anticuerpo α -EhMyb10 (**Figura 40A-B**).

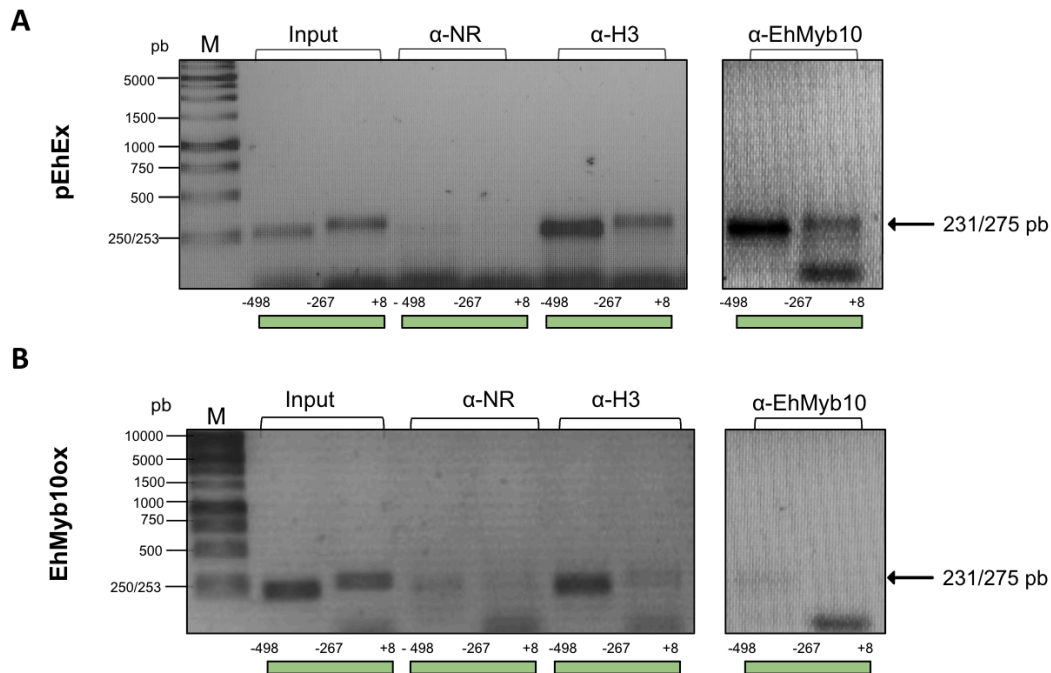


Figura 40. Análisis del reclutamiento de EhMyb10 al promotor de *ehmat1a*. El análisis del reclutamiento se realizó mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Se emplearon anticuerpos contra la histona H3 (control positivo), un anticuerpo no relacionado (α -NR, control negativo) y α -EhMyb10 para evaluar la asociación de EhMyb10 con la cromatina en las condiciones pEhEx y EhMyb10ox. Los rectángulos verdes indican las regiones del promotor del gen *ehmat1a* correspondientes a los amplicones analizados. Las flechas negras señalan el tamaño de los amplicones en pares de bases (pb).

Los resultados mostraron amplificación de las regiones promotoras inmunoprecipitadas con el anticuerpo α -H3, mientras que no se detectó amplificación en las inmunoprecipitaciones realizadas con el anticuerpo α -NR en ninguna de las condiciones analizadas. Por otro lado, se observó amplificación de la región promotora en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo α -EhMyb10 en la condición pEhEx; sin embargo, en la condición EhMyb10ox no se detectó amplificación. Asimismo, la región comprendida entre -498 y -267 pb mostró una señal de amplificación más evidente, sugiriendo una mayor asociación de EhMyb10 con esta región promotora distal.

En conjunto, estos resultados sugieren que EhMyb10 podría asociarse de manera específica con la región promotora del gen *ehmat1a*, indicando que este gen podría corresponder a un posible blanco regulado por este FT.

10. Discusión

E. histolytica es un parásito cuya capacidad de colonización e invasión tisular depende de mecanismos de expresión génica altamente regulados (Ehrenkaufer *et al.*, 2008, Meneses *et al.*, 2010;). La regulación transcripcional en este organismo constituye un proceso dinámico que integra vías de señalización, factores de transcripción específicos y proteínas modificadoras de cromatina (Guillén, 2021; Meneses *et al.*, Ehrenkaufer *et al.*, 2009; 2010; Borbolla *et al.*, 2016; Lozano *et al.*, 2020). En este contexto, los factores de transcripción de la familia Myb han emergido como reguladores relevantes en diversos procesos biológicos del parásito, incluyendo la virulencia y la diferenciación de trofozoito a quiste (Meneses *et al.*, 2010; Ehrenkaufer *et al.*, 2009). En particular, EhMyb10 es un miembro de la familia EhMybR2R3 cuya alta identidad estructural con el DBD-MYB de c-Myb sugiere la posibilidad de que comparta propiedades funcionales con este FT pionero de vertebrados (Meneses *et al.*, 2010; Fuglerud *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan evidencias experimentales iniciales que apoyan la hipótesis de que EhMyb10 podría funcionar como un posible FT pionero en este parásito.

En este trabajo sobreexpresamos de manera estable el FT EhMyb10 en trofozoítos de *E. histolytica*. Esta estrategia ha sido utilizada previamente para la caracterización de otros factores de transcripción de la amiba, como EhMyb-dr y EhPC4, así como de miembros de la familia Myb en eucariotas superiores (Ehrenkaufer *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2009; de la Cruz *et al.*, 2014). En particular, los estudios realizados con c-Myb han demostrado que la sobreexpresión de este factor facilita la identificación de proteínas asociadas y el análisis de los mecanismos que regulan su actividad transcripcional (Jin *et al.*, 2006). Por ello, la generación de trofozoítos EhMyb10ox constituye una herramienta útil para explorar las redes de interacción y las posibles funciones regulatorias de este FT en *E. histolytica*.

Para identificar proteínas que interactúan con EhMyb10, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Este ensayo permitió identificar 32 proteínas candidatas a interactuar con este FT mediante espectrometría de masas por IMS-DIA-MS. El análisis ontológico de estas proteínas reveló que, aunque una proporción importante carece de anotación funcional específica, lo que refleja el nivel de caracterización aún limitado del proteoma de *E. histolytica*, las proteínas clasificadas se distribuyeron principalmente en categorías de función molecular de unión y de actividad catalítica, y en categorías de tipo proteico relacionadas con el metabolismo del RNA, moduladores de interacciones proteicas y proteínas del

citoesqueleto. De manera notable, entre las proteínas identificadas destacan proteínas involucradas en vías de señalización celular como proteínas de la familia Ras GTPasas y componentes de la lectina Gal/GalNAc, uno de los principales factores de adhesión y virulencia de *E. histolytica* que media el reconocimiento y la unión del parásito a las células del hospedero (Guillén, 2021).

En *E. histolytica*, las GTPasas de la superfamilia Ras, que incluye las familias Ras, Rho y Rab, constituyen reguladores centrales de diversos procesos celulares asociados a la virulencia, la patogenicidad y la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Bosch *et al.*, 2013). Se ha demostrado que las GTPasas de la familia Rho, así como los RhoGEF y los efectores Rho (forminas y quinasas activadas por p21) regulan el citoesqueleto dinámico de actina de *E. histolytica* y procesos celulares asociados con la patogénesis, como migración, invasión, fagocitosis y evasión de la respuesta inmune del huésped (Bosch *et al.*, 2013). Por su parte, las GTPasas Rab participan en el tráfico vesicular necesario para la fagocitosis y la pinocitosis, así como para la secreción de factores de virulencia conocidos, como amebaporos y cisteína proteasas (Bosch *et al.*, 2013). Estos antecedentes otorgan relevancia funcional a la presencia de proteínas RAS GTPasa en el interactoma de EhMyb10, ya que sugieren que este FT podría participar en la integración de señales provenientes de estas cascadas para modular la expresión de genes relacionados con la patogenicidad del parásito.

Estos hallazgos adquieren mayor relevancia al ser contrastados con los resultados del ensayo de pull-down previo realizado con la proteína recombinante EhMyb10r-GST (Aguirre, Tesis de Licenciatura, 2023), en el que se identificaron proteínas con funciones relacionadas con vías de señalización, entre ellas una serina/treonina quinasa, una proteína tirosina fosfatasa, una proteína quinasa, una proteína activadora de GTPasa Rab putativa y una proteína que contiene el dominio RhoGAP. La presencia de estas proteínas en el interactoma de EhMyb10, identificadas por dos abordajes experimentales independientes, es consistente con un modelo en el que este FT no opera de manera aislada, sino asociado en una red de señalización que involucra receptores de membrana como la lectina Gal/GalNAc, tanto quinasas activadoras como GTPasas reguladoras. En *E. histolytica*, se ha descrito que los receptores de superficie como la lectina Gal/GalNAc, los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y las cinasas transmembrana (TMKs) activan cascadas de señalización intracelular que incluyen las GTPasas de pequeño tamaño y las cinasas de serina/treonina, las cuales regulan tanto la remodelación del citoesqueleto como la activación de factores de transcripción implicados en la enquistación y la virulencia (Guillen, 2021). Por lo tanto, la activación de

proteínas GTPasas GPCRs y cinasas transmembrana (TMKs) que desencadenan vías de transducción de señales diversas que convergen sobre cinasas de serina/treonina y tirosina, posiblemente, podrían fosforilar y regular la actividad de EhMyb10. Esta propuesta es consistente con el análisis *in silico* realizado previamente (Aguirre, Tesis de Licenciatura, 2023), que reveló que EhMyb10 presenta múltiples sitios susceptibles a fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina, lo que indica que este FT podría ser blanco de regulación postraduccional por parte de cinasas intracelulares del parásito. Un posible mecanismo de regulación de EhMyb10 que involucra fosforilación podría ser similar a lo descrito en el FT pionero c-Myb. Se ha demostrado que c-Myb es fosforilado en residuos de serina 11 y 12 *in vivo* por la caseína cinasa II (CKII), en su DBD que modula su afinidad por el DNA (Oelgeschläger *et al.*, 1995). Asimismo, la fosforilación del residuo de serina 116 por la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA) altera la estabilidad de los complejos formados por c-Myb-DNA, afectando su capacidad de unión y, potencialmente, su actividad reguladora sobre la expresión génica (Andersson *et al.*, 2003).

Las implicaciones de estos hallazgos para la comprensión de la patogenicidad de *E. histolytica* son significativas. Si EhMyb10 actúa como un integrador de señales de vías RAS/Rho/Rab-cinasa y su actividad es modulada por fosforilación, entonces este FT podría funcionar como un regulador clave en la transición entre el estado comensal y el estado invasivo del parásito, vinculando la percepción de señales del microambiente intestinal, mediada por la lectina Gal/GalNAc y Ras/Cinasas, con cambios en el programa transcripcional y epigenético del núcleo. Esta hipótesis es coherente con los datos de RNA-seq que reportan cambios en la expresión de *ehmyb10* en condiciones de virulencia y colonización intestinal (Gilchrist *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2016), y con la identificación de componentes de la lectina Gal/GalNAc en el interactoma de EhMyb10 en el presente trabajo. Sin embargo, se requieren ensayos experimentales como ensayos de fosforilación *in vitro* con las cinasas candidatas identificadas, mutagénesis dirigida de los sitios de fosforilación de EhMyb10 y análisis de la actividad transcripcional del FT, etc, que puedan validar esta posible vía de señalización (**Figura 41**).

Por otro lado, una diferencia notable entre los resultados de inmunoprecipitación del presente trabajo y los del análisis de pull-down reportado previamente (Aguirre, Tesis de Licenciatura, 2023) es que en el ensayo de inmunoprecipitación *in vivo* no se identificaron de manera robusta proteínas modificadoras de cromatina como EhPKMT2. Esta diferencia podría explicarse por varias razones. En primer lugar, los ensayos de inmunoprecipitación en células

vivas capturan únicamente interacciones que ocurren en el contexto celular nativo (Li *et al.*, 2025), el cual puede verse influido por modificaciones postraduccionales del propio EhMyb10, variaciones en la concentración de proteínas interactuantes o en la dinámica del complejo en el momento del análisis. En contraste, los ensayos de pull-down con proteína recombinante, aunque útiles para identificar interacciones directas, carecen de las modificaciones postraduccionales que, *in vivo*, pueden modular la afinidad de unión del FT por sus proteínas blanco (Lackner *et al.*, 2024; Louche *et al.*, 2007). Además, es posible que interacciones transitorias o de baja afinidad (Wu *et al.*, 2025), como las que suelen establecerse entre factores de transcripción y proteínas modificadoras de la cromatina durante la remodelación epigenética, sean difíciles de capturar mediante inmunoprecipitación convencional (Wu *et al.*, 2025). Esto se ha observado en sistemas eucariotas superiores, lo que demuestra que la interacción de c-Myb con coactivadores como p300/CBP es dinámica y transitoria, ya que la acetilación de histonas inducida posteriormente provoca la disociación del FT de la cromatina (Fuglerud *et al.*, 2018).

A pesar de que la espectrometría de masas del ensayo de inmunoprecipitación no identificó directamente a EhPKMT2 ni a EhMAT1A en los eluidos, los resultados de Western blot en extractos totales de trofozoítos de EhMyb10ox mostraron un incremento en la abundancia proteica de ambas proteínas en comparación con la condición control. Este hallazgo es significativo porque sugiere que la sobreexpresión de EhMyb10 tiene un efecto funcional en la maquinaria de metilación del parásito. En mamíferos, se ha demostrado que c-Myb actúa como regulador positivo de MAT2A, el gen que codifica para la subunidad catalítica de la metionina adenosiltransferasa (MAT) en tejidos extrahepáticos, y que su unión al promotor de MAT2A en células de carcinoma hepatocelular promueve directamente su transcripción (Ramani *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2001). De forma análoga, los datos de RNA-seq de trofozoítos de EhMyb10ox reportados previamente (Castillo, Tesis de Maestría, 2024) muestran que el gen *ehmat1a* es uno de los genes con mayor nivel de sobreexpresión, lo cual es consistente con el aumento proteico observado en el presente trabajo. Por otro lado, el incremento en EhPKMT2 podría interpretarse como un efecto secundario de la sobreexpresión de EhMyb10: si EhMyb10 “promueve” la apertura de la cromatina y la activación de genes diana, entre ellos, posiblemente, el propio gen *ehpkmt2* o genes que regulan su estabilidad proteica, el efecto final sería un aumento de los niveles de esta metiltransferasa. Estudios en células de mamíferos han establecido que las metiltransferasas de lisina de histonas (HKMTs) son frecuentemente reclutadas a regiones regulatorias, en conjunto con factores de

transcripción, para establecer marcas epigenéticas permisivas, como H3K4me1 y H3K4me3, características de enhancers y promotores activos, respectivamente (Hyun *et al.*, 2017; Jozwik *et al.*, 2016).

El aumento del patrón global de proteínas dimetiladas en lisina observado mediante el anticuerpo α -pan-dimetil-lisina en extractos de trofozoítos de EhMyb10ox es consistente con los incrementos observados en EhMAT1A y EhPKMT2. EhMAT1A cataliza la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), el principal donante universal de grupos metilo en reacciones de metilación biológica (Ramani *et al.*, 2017; Katoh *et al.*, 2011; Kera *et al.*, 2013). Un aumento en la disponibilidad de SAM, consecuencia del incremento en EhMAT1A, podría potenciar la actividad de las metiltransferasas de histonas y proteínas no histonas, generando el patrón elevado de dimetilación observado. Esto es coherente con el modelo propuesto para el módulo SAMIT en mamíferos, en el que MATII es reclutada a regiones de cromatina para proporcionar SAM local y favorecer la metilación de histonas (Katoh *et al.*, 2011; Kera *et al.*, 2013). En *E. histolytica*, los niveles de SAM y la actividad MAT han sido poco estudiados en relación con la regulación epigenética; sin embargo, los resultados aquí presentados sugieren que EhMyb10 podría funcionar como un regulador que conecta la expresión de genes metabólicos clave, como *ehmat1a*, con el estado epigenético de la cromatina, estableciendo un circuito de retroalimentación positiva que amplifica la activación transcripcional en regiones específicas del genoma.

Los ensayos de inmunofluorescencia confirmaron la colocalización de EhMyb10 con EhPKMT2 y EhMAT1A principalmente en la periferia nuclear. Esta distribución periférica nuclear es relevante desde el punto de vista epigenético, ya que en eucariotas se ha descrito que la periferia del núcleo contiene tanto regiones de heterocromatina asociadas a la lámina nuclear como zonas de transición entre cromatina activa y represiva (Hansen *et al.*, 2018; Cremer *et al.*, 2001; Tecalco *et al.*, 2021). La colocalización de EhMyb10 con EhPKMT2 en la periferia nuclear podría indicar que ambas proteínas actúan conjuntamente en regiones de cromatina con características de enhancers en estado *poised* o en genes que están en transición entre un estado represivo y activo (Liu *et al.*, 2023). En eucariotas superiores, el FT pionero FOXA1, no solo reconoce enhancers previamente marcados con H3K4me1, sino que también participa activamente en el establecimiento del paisaje epigenético asociado con la activación transcripcional. FOXA1 recluta a la metiltransferasa MLL3 a regiones de enhancers y/ promotores de genes específicos para facilitar la disposición de H3K4me1 y H3K4me3, marcas asociadas a enhancers y promotores activos, respectivamente (Jozwik *et al.*, 2016). Los datos

presentados en esta tesis sugieren un mecanismo similar en *E. histolytica*, donde EhMyb10 podría reclutar a EhPKMT2 a sitios regulatorios específicos para promover la modificación de histonas y la apertura cromatínica local.

Un hallazgo central de este trabajo es la colocalización de EhMyb10 con las marcas epigenéticas H3K4me1 y H3K27ac, características de enhancers activos, en trofozoítos EhMyb10ox. La monometilación de H3K4 (H3K4me1) es una marca bien establecida de enhancers tanto en estado activo como *poised* en eucariotas, mientras que la acetilación de H3K27 (H3K27ac) distingue específicamente a los enhancers activos de los inactivos (Liu *et al.*, 2023). La presencia simultánea de EhMyb10 en regiones enriquecidas con ambas marcas es consistente con el modelo de función pionera propuesto para c-Myb en células hematopoyéticas humanas: c-Myb se une a la cromatina semi-cerrada asociada con H3K4me1 y recluta a los coactivadores p300/CBP, que acetilan H3K27 para generar un enhancer activo, permitiendo el acceso de otros FT y de la maquinaria transcripcional (Fuglerud *et al.*, 2018). Aunque en *E. histolytica* no se ha demostrado formalmente la existencia de enhancers comparables a los descritos en eucariotas superiores, dado el nivel de caracterización limitado de los mecanismos regulación transcripcional y de la arquitectura cromatínica en este parásito (Singh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 1997; Bruchhaus *et al.*, 1993;), los presentes datos sugieren que mecanismos equivalentes podrían existir en *E. histolytica*, con EhMyb10 actuando como un regulador de la accesibilidad cromatínica en elementos reguladores análogos a los enhancers de organismos superiores.

De manera interesante, EhMyb10 mostró colocalización no solo con marcas de activación transcripcional (H4K12ac), sino también con la marca represiva H3K27me3, tanto en ensayos de inmunofluorescencia como en microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta última técnica, de mayor resolución espacial, permitió confirmar que EhMyb10 se localiza en regiones de eucromatina (asociadas con H4K12ac) y en regiones de heterocromatina (asociadas con H3K27me3), respectivamente (Liu *et al.*, 2023). La capacidad de un FT pionero de localizarse en regiones de cromatina condensada, incluyendo heterocromatina, ha sido documentada para factores como PAX7 y TCF1, que pueden unirse a regiones marcadas con H3K27me3 y H3K9me3 para inducir la activación de las secuencias subyacentes (Barral *et al.*, 2024; Johnson *et al.*, 2018; Mayran *et al.*, 2018; Fuglerud *et al.*, 2017; Fuglerud *et al.*, 2018; Zaret *et al.*, 2020; Slattery *et al.*, 2014). No obstante, la presencia de EhMyb10 en regiones de heterocromatina también plantea la posibilidad de que este FT participe en el mantenimiento o modulación del silenciamiento génico en regiones específicas

del genoma de *E. histolytica*. En este sentido, la colocalización de EhMyb10 con H4K12ac y H3K27me3 podría sugerir su participación en un mecanismo dual de regulación transcripcional, activando genes en regiones de eucromatina y contribuyendo a la dinámica de la heterocromatina en otras regiones.

La validación de la interacción entre EhMyb10 y EhPKMT2 mediante Western blot en fracciones de pull-down con la proteína recombinante EhMyb10r-GST respaldó respaldar los datos de colocalización de ambas proteínas. El anticuerpo α -EhPKMT2 reconoció una banda de aproximadamente 43 kDa exclusivamente en los eluidos de EhMyb10r, pero no en los eluidos de GST solo, lo que confirma que la interacción es específica y dependiente de EhMyb10. Este resultado es coherente con los datos previos de pull-down (Aguirre, Tesis de Licenciatura, 2023) y amplía la evidencia de una asociación entre EhMyb10 y esta metiltransferasa de lisinas. EhPKMT2 (EhHKMT2) pertenece a la familia SET y ha sido caracterizada como una histona lisina metiltransferasa cuyo dominio SET presenta mayor similitud con SMYD3 que con otras PKMTs humanas, y cuya actividad se ha asociado con la metilación de H3K4, una marca relacionada con la activación transcripcional en *E. histolytica* (Borbolla *et al.*, 2016). La interacción de EhMyb10 con EhPKMT2 es conceptualmente análoga a la descrita entre FOXA1 y MLL3 en células de cáncer de mama, donde FOXA1 facilita el reclutamiento de esta metiltransferasa a los enhancers para la disposición de H3K4me1 (Jozwik *et al.*, 2016). En conjunto, estos datos respaldan un posible mecanismo en el que EhMyb10 podría actuar como un andamio molecular que facilita el reclutamiento de EhPKMT2 a regiones regulatorias específicas del genoma amebiano, promoviendo la deposición de marcas de activación transcripcional.

Los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-H3 revelaron señales compatibles con H3, EhMyb10 y EhPKMT2 en los eluidos de ambas condiciones experimentales, lo que sugiere que estas proteínas podrían formar parte de complejos multiproteicos asociados a la cromatina. La coprecipitación de EhMyb10 con H3 es consistente con los datos de pull-down previos que mostraron la interacción de EhMyb10 con histonas (H2A y H2B) (Aguirre, Tesis de Licenciatura, 2023), y con el modelo de función pionera que implica la unión directa del FT con nucleosomas (Fuglerud *et al.*, 2017; Fuglerud *et al.*, 2018). Sin embargo, la interpretación de estos resultados es compleja debido a la interferencia de las cadenas pesada y ligera de las IgGs en el rango de peso molecular de las proteínas de interés, y a las condiciones no reductoras empleadas durante el ensayo. En eucariotas superiores, se determinó que c-Myb se une a los extremos N-terminal de las

histonas H2B, H3 (H3.3) y H4, evidenciando que esta interacción es esencial para la función pionera del FT (Fuglerud *et al.*, 2017; Mo *et al.*, 2005). En *E. histolytica*, la confirmación definitiva de la interacción directa de EhMyb10 con histonas requiere abordajes adicionales como ensayos de FRET, doble híbrido en levadura, o técnicas de microscopía avanzada de superresolución, tal como se plantea en las perspectivas de este trabajo.

El análisis del reclutamiento de EhMyb10 en el promotor del gen *ehmat1a* mediante ensayos de ChIP constituye uno de los resultados más relevantes y, al mismo tiempo, más complejos de interpretar en este trabajo. Los ensayos mostraron un enriquecimiento de EhMyb10 en la región promotora distal de *ehmat1a* (−498 a −267 pb) en la condición control (vector vacío, pEhEx), mientras que en la condición de sobreexpresión (EhMyb10ox) no se detectó amplificación. A primera vista, este resultado podría interpretarse como una paradoja: si EhMyb10 activa la expresión de *ehmat1a*, como lo sugieren los datos de RNA-seq (Castillo, Tesis de Maestría, 2024) y Western blot, ¿por qué no se detecta su reclutamiento al promotor en la condición de sobreexpresión? Una explicación plausible, consistente con el modelo de función pionera, es que bajo condiciones basales, EhMyb10 se une establemente al promotor de *ehmat1a* para iniciar la apertura cromatínica y la activación transcripcional del gen. En contraste, durante la sobreexpresión sostenida de EhMyb10, la cromatina en la región promotora de *ehmat1a* podría haberse remodelado previamente hacia un estado abierto y transcripcionalmente activo, reduciendo la necesidad de una unión estable del FT al promotor en el momento del análisis. Este mecanismo es análogo al descrito para c-Myb, donde la acetilación de H3K27 inducida por el reclutamiento de p300/CBP provoca la disociación del FT de la cromatina tras la activación del gen diana (Fuglerud *et al.*, 2018). De igual manera, en el contexto de FoxA1, se ha propuesto que la función pionera implica un ciclo de unión, remodelación y disociación del FT a medida que la cromatina se abre y otros reguladores ocupan los sitios de unión (Zaret, 2020; Barral *et al.*, 2024).

Los hallazgos presentados en este trabajo contribuyen en la comprensión de los mecanismos de regulación transcripcional en *E. histolytica*. En primer lugar, sugieren que este parásito cuenta con al menos un FT con propiedades de posible FT pionero, EhMyb10, lo que amplía el repertorio de mecanismos reguladores epigenéticos conocidos en este organismo más allá de los descritos previamente para factores como URE3-BP y EhMyb-dr (Gilchrist *et al.*, 2001; Ehrenkauf *et al.*, 2009). En segundo lugar, la posible conexión entre EhMyb10, EhMAT1A y EhPKMT2 sugiere la existencia de un módulo funcional que integra el metabolismo de SAM con la regulación epigenética de la cromatina, similar al módulo

SAMIT descrito en mamíferos (Kato *et al.*, 2011; Kera *et al.*, 2013). Esta integración podría ser particularmente importante en condiciones de virulencia, donde la disponibilidad de SAM y la regulación de la metilación de histonas podrían modular la expresión de genes asociados con la patogenicidad del parásito. Sin embargo, es importante reconocer las limitaciones del presente trabajo (**Figura 41**). Los ensayos de ChIP requieren repetición y análisis cuantitativo mediante qPCR para confirmar los resultados obtenidos. Asimismo, la confirmación de la función pionera de EhMyb10 requeriría ensayos de ATAC-seq para evaluar si su sobreexpresión promueve la apertura de la cromatina a escala genómica, y ensayos de ChIP-seq para mapear en forma global los sitios de unión de este FT en el genoma de *E. histolytica*. De igual manera, los ensayos de gen reportero serían necesarios para demostrar formalmente la capacidad de EhMyb10 para activar la transcripción del gen *ehmat1a*. A pesar de estas limitaciones, el conjunto de evidencias experimentales reunidas en este trabajo sugiere que EhMyb10 podría actuar como un FT pionero en *E. histolytica*, con una actividad central en la regulación epigenética de este parásito.

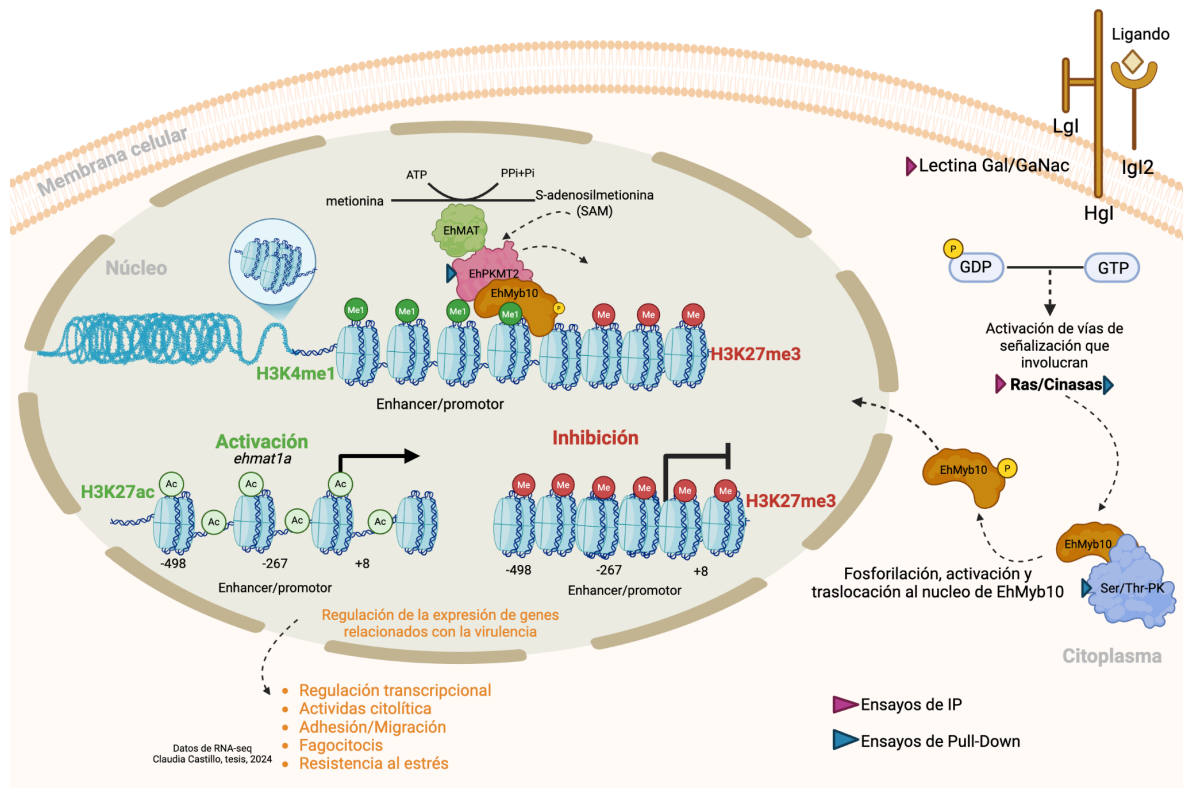


Figura 41. Modelo de la función reguladora de EhMyb10 en *E. histolytica*. EhMyb10 podría actuar como un FT con características de pionero, integrando señales provenientes de vías Ras/cinasas y de la lectina Gal/GaNAc. Su posible activación por fosforilación y translocación al núcleo podrían favorecer la interacción con proteínas asociadas a metilación, como EhMAT1A y EhPKMT2, así como con marcas epigenéticas relacionadas con activación (H3K4me1 y H3K27ac) y represión (H3K27me3) transcripcional y promover la remodelación de la cromatina para regular expresión de genes asociados con virulencia y adaptación del parásito.

11. Conclusiones

- La sobreexpresión de EhMyb10 modifica la abundancia de EhMAT1A y EhPKMT2, así como el patrón global de proteínas dimetiladas, lo que sugiere su participación en procesos de metilación de proteínas relacionados con la regulación de la expresión génica.
- Los ensayos de inmunoprecipitación indican que EhMyb10 podría formar parte de complejos proteicos multifuncionales que conectan la regulación transcripcional con procesos de transducción de señales, reorganización del citoesqueleto, metabolismo celular y procesos relacionados con la virulencia del parásito.
- La colocalización de EhMyb10 con EhMAT1A, EhPKMT2 y marcas epigenéticas asociadas a enhancers activos, así como su localización en regiones de cromatina activa y represiva, sugiere que esta proteína podría asociarse con cromatina en distintos estados de accesibilidad y participar en mecanismos de regulación epigenética.
- Los ensayos de ChIP sugieren una posible interacción de EhMyb10 con la región promotora distal del gen *ehmat1a*, indicando que este podría corresponder a un posible gen blanco regulado por EhMyb10.
- En conjunto, los hallazgos obtenidos respaldan la hipótesis de que EhMyb10 presenta características compatibles con un FT pionero y podría desempeñar un papel importante en la regulación epigenética y transcripcional de *E. histolytica*.

12. Perspectivas

- Realizar ensayos de IP optimizando empleando condiciones más astringentes y extractos nucleares solubles para la identificación de proteínas que interaccionan con EhMyb10 por espectrometría de masas.
- Realizar ensayos que permitan determinar interacciones directas con las proteínas de interés, por ejemplo, ensayos de FRET o doble híbrido.
- Realizar ensayos de ChIP empleando anticuerpos dirigidos contra la H3H4me1/3, H4K12ac u otras histonas y cuantificar los amplicones.
- Realizar ensayos de gen reportero para determinar si EhMyb10 activa la transcripción del gen *ehmat1a*.
- Realizar ensayos de ChIP-seq para mapear los sitios de unión de este FT en el genoma de *E. histolytica*.
- Realizar ensayos de ATAC-seq para determinar si EhMyb10 promueve la apertura de la cromatina.

13. Referencias bibliográficas

1. Abdelraheem, E., Thair, B., Varela, R. F., Jockmann, E., Popadić, D., Hailes, H. C., Ward, J. M., Iribarren, A. M., Lewkowicz, E. S., Andexer, J. N., Hagedoorn, P. L., & Hanefeld, U. (2022). Methyltransferases: Functions and Applications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 23(18), e202200212. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200212>
2. Abhyankar, M. M., Hochreiter, A. E., Hershey, J., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O., Sobral, B. W. S., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr., & Gilchrist, C. A. (2008). Characterization of an *Entamoeba histolytica* high-mobility-group box protein induced during intestinal infection. *Eukaryotic Cell*, 7(9), 1565–1572. <https://doi.org/10.1128/EC.00123-08>
3. Aguirre, D. (2023). Interactoma del factor de transcripción EhMyb10: Evidencias de su papel en la regulación cotranscripcional en el parásito **Entamoeba histolytica** [Tesis de Licenciatura]. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO.
4. Andersson, K. B., Kowenz-Leutz, E., Brendeford, E. M., Tygset, A. H., Leutz, A., & Gabrielsen, O. S. (2003). Phosphorylation-dependent down-regulation of c-Myb DNA binding is abrogated by a point mutation in the v-myb oncogene. *The Journal of biological chemistry*, 278(6), 3816–3824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209404200>
5. Bannister, A., Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395 (2011). <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
6. Barral, A., & Zaret, K. S. (2024). Pioneer factors: roles and their regulation in development. *Trends in genetics : TIG*, 40(2), 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.10.007>
7. Bedford, M. T., & Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell*, 18(3), 263–272.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.003>

8. Bies, J., Markus, J., & Wolff, L. (2002). Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. **The Journal of biological chemistry*, 277*(11), 8999–9009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110453200>

9. Binder, M., Ortner, S., Plaimauer, B., Födinger, M., Wiedermann, G., Scheiner, O., & Duchêne, M. (1995). Sequence and organization of an unusual histone H4 gene in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 71(2), 243–247. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00044-n](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00044-n)

10. Bönisch, C., & Hake, S. B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable?. **Nucleic acids research*, 40*(21), 10719–10741. <https://doi.org/10.1093/nar/gks865>

11. Borbolla-Vázquez, J., Orozco, E., Betanzos, A., & Rodríguez, M. A. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasites & vectors*, 8, 219. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0820-7>

12. Borbolla-Vázquez, J., Orozco, E., Medina-Gómez, C., Martínez-Higuera, A., Javier-Reyna, R., Chávez, B., Betanzos, A., & Rodríguez, M. A. (2016). Identification and functional characterization of lysine methyltransferases from **Entamoeba histolytica**. **Molecular Microbiology*, 101*(2), 351-365. <https://doi.org/10.1111/mmi.13394>

13. Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Experimental & molecular medicine*, 45(3), e15. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.30>

14. Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C., & Tannich, E. (1993). Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA and cell biology*, 12(10), 925–933. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.925>
15. Castañón-Sánchez, C. A., Luna-Arias, J. P., de Dios-Bravo, M. G., Herrera-Aguirre, M. E., Olivares-Trejo, J. J., Orozco, E., & Hernández, J. M. (2010). *Entamoeba histolytica*: A unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein Expression and Purification*, 70(1), 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.12.007>
16. Castillo, C. (2024). Efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción EHMYB10 y el factor de splicing EHDC5 sobre el transcriptoma de **Entamoeba histolytica** [Tesis de Maestría]. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO.
17. CDC - DPDx - Amebiasis. (2019). <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>
18. Chávez, B., & Gonzales, A. (2013). *Entamoeba histolytica*: La estructura interna de un destructor por naturaleza. *Ciencia*, 64(2), 42–49.
19. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1852-8. doi: 10.1038/nprot.2006.288.
20. Chouhan, B. P. S., Gade, M., Martinez, D., Toledo-Patino, S., & Laurino, P. (2022). Implications of divergence of methionine adenosyltransferase in archaea. *FEBS open bio*, 12(1), 130–145. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13312>
21. Clark, C. G., Alsmark, U. C., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noël, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Hall, N. (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in parasitology*, 65, 51–190. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(07\)65002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(07)65002-7)

22. Copeland, R., Solomon, M. & Richon, V. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8, 724–732 (2009).
<https://doi.org/10.1038/nrd2974>

23. Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews. Genetics*, 2(4), 292–301.
<https://doi.org/10.1038/35066075>

24. de Dios-Bravo, G., Luna-Arias, J. P., Riverón, A. M., Olivares-Trejo, J. J., López-Camarillo, C., & Orozco, E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants *in vitro*. *The FEBS Journal*, 272(6), 1354–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04566.x>

25. de la Cruz, O. H., Muñiz-Lino, M., Guillén, N., Weber, C., Marchat, L. A., López-Rosas, I., Ruíz-García, E., Astudillo-de la Vega, H., Fuentes-Mera, L., Álvarez-Sánchez, E., Mendoza-Hernández, G., & López-Camarillo, C. (2014). Proteomic profiling reveals that EhPC4 transcription factor induces cell migration through up-regulation of the 16-kDa actin-binding protein EhABP16 in *Entamoeba histolytica*. *Journal of proteomics*, 111, 46–58.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.041>

26. Ehrenkaufer, G., & Singh, U. (2008). Transcriptional Regulatory Networks in *Entamoeba histolytica*. *Current Drug Targets*, 9(11), 931-937.
<https://doi.org/10.2174/138945008786786109>

27. Ehrenkaufer, G. M., Hackney, J. A., & Singh, U. (2009). A developmentally regulated Myb domain protein regulates expression of a subset of stage-specific genes in *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, 11(6), 898–910.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01300.x>

28. Ehrenkaufer, G.M., Haque, R., Hackney, J.A., Eichinger, D.J. and Singh, U. (2007), Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cellular Microbiology*, 9:

1426-1444. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00882.x>

29. Foda, B. M., & Singh, U. (2015). Dimethylated H3K27 Is a Repressive Epigenetic Histone Mark in the Protist *Entamoeba histolytica* and Is Significantly Enriched in Genes Silenced via the RNAi Pathway. *The Journal of biological chemistry*, 290(34), 21114–21130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.647263>

30. Födinger, M., Ortner, S., Plaimauer, B., Wiedermann, G., Scheiner, O., & Duchêne, M. (1993). Pathogenic *Entamoeba histolytica*: cDNA cloning of a histone H3 with a divergent primary structure. *Molecular and biochemical parasitology*, 59(2), 315–322. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90229-q](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90229-q)

31. Fuglerud, B. M., Ledsaak, M., Rogne, M., Eskeland, R., & Gabrielsen, O. S. (2018). The pioneer factor activity of c-Myb involves recruitment of p300 and induction of histone acetylation, followed by acetylation-induced chromatin dissociation. **Epigenetics & chromatin*, 11*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0208-y>

32. Fuglerud, B. M., Lemma, R. B., Wanichawan, P., Sundaram, A. Y. M., Eskeland, R., & Gabrielsen, O. S. (2017). A c-Myb mutant causes deregulated differentiation due to impaired histone binding and abrogated pioneer factor function. **Nucleic acids research*, 45*(13), 7681–7696. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx364>

33. Gilchrist, C. A., Baba, D. J., Zhang, Y., Crasta, O., Evans, C., Caler, E., Sobral, B. W., Bousquet, C. B., Leo, M., Hochreiter, A., Connell, S. K., Mann, B. J., & Petri, W. A. (2008). Targets of the *Entamoeba histolytica* transcription factor URE3-BP. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(8), e282. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000282>

34. Gilchrist, C. A., Holm, C. F., Hughes, M. A., Schaenman, J. M., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr. (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11838–11843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007375200>

35. Gilchrist, C. A., Leo, M., Line, C. G., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr. (2003). Calcium modulates promoter occupancy by the *Entamoeba histolytica* Ca²⁺-binding transcription factor URE3-BP. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4646–4653. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211271200>

36. Gilchrist, C. A., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr. (1998). Control of ferredoxin and Gal/GalNAc lectin gene expression in *Entamoeba histolytica* by a cis-acting DNA sequence. *Infection and Immunity*, 66(5), 2383–2386.

37. Gilchrist, C. A., Moore, E. S., Zhang, Y., Bousquet, C. B., Lannigan, J. A., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr. (2010). Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica* by the URE3-BP transcription factor. *mBio*, 1(1), e00057-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00057-10>

38. Guillén N. (2023). Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence*, 14(1), 2158656. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2158656>

39. Guillen N. Signals and signal transduction pathways in *Entamoeba histolytica* during the life cycle and when interacting with bacteria or human cells. *Mol Microbiol*.2021;115:901–915. <https://doi.org/10.1111/mmi.14657>

40. Han, D., Huang, M., Wang, T. et al. Lysine methylation of transcription factors in cancer. *Cell Death Dis* 10, 290 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1524-2>

41. Hansen, A. S., Cattoglio, C., Darzacq, X., & Tjian, R. (2018). Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 9(1), 20–32. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1389365>

42. Hendriks, I. A., & Vertegaal, A. C. (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(9), 581–595. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.81>

43. Hendriks, I. A., D'Souza, R. C., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M., & Vertegaal, A. C. (2014). Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature structural & molecular biology*, 21(10), 927–936. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2890>

44. Henikoff, S., & Smith, M. M. (2015). Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a019364. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>

45. Hernández-Cuevas, N. A., Weber, C., Hon, C. C., & Guillén, N. (2014). *Gene expression profiling in Entamoeba histolytica identifies key components in iron uptake and metabolism.* *PLOS ONE*, 9(9), e107102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107102>

46. Hickey, C. M., Wilson, N. R., & Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(12), 755–766. <https://doi.org/10.1038/nrm3478>

47. Hu, G., Cui, K., Northrup, D., Liu, C., Wang, C., Tang, Q., Ge, K., Levens, D., Crane-Robinson, C., & Zhao, K. (2013). H2A.Z facilitates access of active and repressive complexes to chromatin in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell stem cell*, 12(2), 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.003>

48. Huguenin, M., Bracha, R., Chookajorn, T., & Mirelman, D. (2010). Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*: insight into histone and chromatin modifications. *Parasitology*, 137(4), 619–627. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991363>

49. HUGUENIN M, BRACHA R, CHOOKAJORN T, MIRELMAN D. Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*: insight into histone and chromatin modifications. *Parasitology*. 2010;137(4):619-627.

doi:10.1017/S0031182009991363

50. Hyun, K., Jeon, J., Park, K. *et al.* Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* **49**, e324 (2017). <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>

51. Igarashi, K., & Katoh, Y. (2013). Metabolic Aspects of Epigenome: Coupling of S-Adenosylmethionine Synthesis and Gene Regulation on Chromatin by SAMIT Module. In: Kundu, T. (eds) **Epigenetics: Development and Disease**. Subcellular Biochemistry, vol 61. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_5

52. Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet*, 33*(Suppl 3), 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>

53. Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>

54. Jin, S., Zhao, H., & Gewirtz, A. M. (2006). c-Myb-Interacting Proteins and Their Functions. *Blood*, 108(11), 1423. <https://doi.org/10.1182/blood.v108.11.1423.1423>

55. Johnson, J. L., Georgakilas, G., Petrovic, J., Kurachi, M., Cai, S., Harly, C., Pear, W. S., Bhandoola, A., Wherry, E. J., & Vahedi, G. (2018). Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity*, 48(2), 243–257.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.012>

56. Jonas, F., Navon, Y. & Barkai, N. Intrinsically disordered regions as facilitators of the transcription factor target search. *Nat Rev Genet* **26**, 424–435 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41576-025-00816-3>

57. Jozwik, K. M., Chernukhin, I., Serandour, A. A., Nagarajan, S., & Carroll, J. S. (2016). FOXA1 Directs H3K4 Monomethylation at Enhancers via Recruitment of the Methyltransferase MLL3. *Cell reports*, 17(10), 2715–2723. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.028>

58. Karakatsanis, N. M., Hamey, J. J., & Wilkins, M. R. (2024). Taking Me away: the function of phosphorylation on histone lysine demethylases. *Trends in biochemical sciences*, 49(3), 257–276. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.12.004>

59. Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Tashiro, S., Ito, T., Ohta, M., Kera, Y., Noda, T., & Igarashi, K. (2011). Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Molecular cell*, 41(5), 554–566. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.018>

60. Kera, Y., Katoh, Y., Ohta, M., Matsumoto, M., Takano-Yamamoto, T., & Igarashi, K. (2013). Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *The Journal of biological chemistry*, 288(19), 13592–13601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429738>

61. Klemm, S. L., Shipony, Z., & Greenleaf, W. J. (2019). Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature reviews. Genetics*, 20(4), 207–220. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0089-8>

62. Kotb, M., & Geller, A. M. (1993). Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacology & therapeutics*, 59(2), 125–143. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(93\)90042-c](https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90042-c)

63. Lackner, A., Qiu, Y., Armanus, E., Macapagal, A. N. K., Leonidas, L., Xu, H., & McNulty, R. (2024). Measuring Interactions Between Proteins and Small Molecules or Nucleic Acids. *Current protocols*, 4(7), e1105. <https://doi.org/10.1002/cpz1.1105>

64. Lanouette, S., Mongeon, V., Figeys, D., & Couture, J. F. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular systems biology*, 10(4), 724. <https://doi.org/10.1002/msb.134974>

65. Li, H., Ma, X., Shi, D., & Wang, P. (2025). Proximity Ligation Assay: From a Foundational Principle to a Versatile Platform for Molecular and Translational

Research. *Biomolecules*, 15(10), 1468. <https://doi.org/10.3390/biom15101468>

66. Liu, R., Wu, J., Guo, H., Yao, W., Li, S., Lu, Y., Jia, Y., Liang, X., Tang, J., & Zhang, H. (2023). Post-translational modifications of histones: Mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. *MedComm*, 4(3), e292. <https://doi.org/10.1002/mco2.292>
67. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433(7028), 865–868. <https://doi.org/10.1038/nature03291>
68. Lopez F. Gene Expression: The Basics of Transcription and Translation. *J Biol Today's World*, 2023,12(1), 001.
69. Louche, A., Salcedo, S. P., & Bigot, S. (2017). Protein–Protein interactions: Pull-Down assays. *Methods In Molecular Biology*, 1615, 247-255. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_20
70. Lozano-Amado, D., Ávila-López, P. A., Hernández-Montes, G., Briseño-Díaz, P., Vargas, M., Lopez-Rubio, J. J., Carrero, J. C., & Hernández-Rivas, R. (2020). A class I histone deacetylase is implicated in the encystation of **Entamoeba invadens**. **International journal for parasitology*, 50*(12), 1011–1022. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.05.014>
71. Lu, Y., Zhang, Y., Yao, J., Bai, W., & Li, K. (2025). Histone Modifications: Potential Therapeutic Targets for Diabetic Retinopathy. *Biomolecules*, 15(4), 575. <https://doi.org/10.3390/biom15040575>
72. Luna-Arias, J. P., Hernández-Rivas, R., de Dios-Bravo, G., García, J., Mendoza, L., & Orozco, E. (1999). The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: Cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal

microscopy. *Microbiology*, 145, 33–40.

73. Luo, A., Kong, J., Chen, J., Xiao, X., Lan, J., Li, X., Liu, C., Wang, P. Y., Li, G., Li, W., & Chen, P. (2023). H2B ubiquitination recruits FACT to maintain a stable altered nucleosome state for transcriptional activation. *Nature communications*, 14*(1), 741. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36467-3>
74. Már, M., Nitsenko, K., & Heidarsson, P. O. (2023). Multifunctional Intrinsically Disordered Regions in Transcription Factors. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 29(21), e202203369. <https://doi.org/10.1002/chem.202203369>
75. Marchat, L. A., Gómez, C., Pérez, D. G., Paz, F., Mendoza, L., & Orozco, E. (2002). Two CCAAT/enhancer binding protein sites are cis-activator elements of the *Entamoeba histolytica* *EhPgpl* (*mdr*-like) gene expression. *Cellular Microbiology*, 4(11), 725–737. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00220.x>
76. Matafora, V., D'Amato, A., Mori, S., Blasi, F., & Bachi, A. (2009). Proteomics analysis of nucleolar SUMO-1 target proteins upon proteasome inhibition. *Molecular & cellular proteomics* : MCP, 8(10), 2243–2255. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900079-MCP200>
77. Mayran, A., Khetchoumian, K., Hariri, F., Pastinen, T., Gauthier, Y., Balsalobre, A., & Drouin, J. (2018). Pioneer factor Pax7 deploys a stable enhancer repertoire for specification of cell fate. *Nature genetics*, 50(2), 259–269. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0035-2>
78. Maze, I., Noh, K. M., & Allis, C. D. (2013). Histone regulation in the CNS: basic principles of epigenetic plasticity. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38*(1), 3–22. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.124>
79. Medina-Gómez, C., Bolaños, J., Borbolla-Vázquez, J., Munguía-Robledo, S., Orozco, E., & Rodríguez, M. A. (2021). The atypical protein arginine methyltransferase of

- Entamoeba histolytica* (EhPRMTA) is involved in cell proliferation, heat shock response and *in vitro* virulence. *Experimental parasitology*, 222, 108077. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108077>
80. Mendoza, L., Orozco, E., Rodríguez, M. A., García-Rivera, G., Sánchez, T., García, E., & Gariglio, P. (2003). Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology*, 149(4), 885–893. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25892-0>
 81. Merritt, E. A., & Medical Structural Genomics of Pathogenic Protozoa (MSGPP). (2011). *Methionine-adenosyltransferase from Entamoeba histolytica* (PDB ID: 3SO4) [Data set]. RCSB Protein Data Bank. <https://doi.org/10.2210/pdb3so4/pdb>
 82. Millán-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A. J., & Schneider, R. (2022). Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function. *Nature reviews. Genetics*, 23*(9), 563–580. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>
 83. Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Laumonnier, Y., Xu, H., & Leutz, A. (2005). Histone H3 tail positioning and acetylation by the c-Myb but not the v-Myb DNA-binding SANT domain. *Genes & development*, 19(20), 2447–2457. <https://doi.org/10.1101/gad.355405>
 84. Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl, G. R., Dokmanovic, M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W. S., Meluh, P. B., Johnson, E. S., & Berger, S. L. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes & development*, 20(8), 966–976. <https://doi.org/10.1101/gad.1404206>
 85. Niland, C. N., Ghosh, A., Cahill, S. M., & Schramm, V. L. (2021). Mechanism and Inhibition of Human Methionine Adenosyltransferase 2A. *Biochemistry*, 60(10), 791–801. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00998>

86. Oelgeschläger, M., Krieg, J., Lüscher-Firzlaff, J. M., & Lüscher, B. (1995). Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Molecular and cellular biology*, 15(11), 5966–5974. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.5966>
87. Ong, C. T., & Corces, V. G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature reviews. Genetics*, 12(4), 283–293. <https://doi.org/10.1038/nrg2957>
88. Oss-Ronen, L., Sarusi, T., & Cohen, I. (2022). Histone Mono-Ubiquitination in Transcriptional Regulation and Its Mark on Life: Emerging Roles in Tissue Development and Disease. **Cells*, 11*(15), 2404. <https://doi.org/10.3390/cells11152404>
89. Paquin, K. L., & Howlett, N. G. (2018). Understanding the Histone DNA Repair Code: H4K20me2 Makes Its Mark. *Molecular cancer research : MCR*, 16(9), 1335–1345. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0688>
90. Purdy, J. E., Pho, L. T., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr. (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78(1–2), 91–103. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02614-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02614-X)
91. Ramakrishnan, G., Gilchrist, C. A., Musa, H., Torok, M. S., Grant, P. A., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (2004). Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 138(2), 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.09.002>
92. Ramazi, S., Allahverdi, A., & Zahiri, J. (2020). Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. **Journal of biosciences*, 45*, 135.

93. Ren, W., Fan, H., Grimm, S.A. *et al.* DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation. *Nat Commun* **12**, 2490 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22665-4>

94. Rendón-Gandarilla FJ, Álvarez-Hernández V, Castañeda-Ortiz EJ, Cárdenas-Hernández H, Cárdenas-Guerra RE, Valdés J, Betanzos A, Chávez-Munguía B, Lagunes-Guillen A, Orozco E, López-Canovas L and Azuara-Liceaga E (2018) Telomeric Repeat-Binding Factor Homologs in *Entamoeba histolytica*: New Clues for Telomeric Research. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:341. doi: 10.3389/fcimb.2018.00341

95. Reyes, A. A., Marcum, R. D., & He, Y. (2021). Structure and Function of Chromatin Remodelers. *Journal of molecular biology*, 433(14), 166929. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166929>

96. Rodríguez, J. L., Boukaba, A., Sandoval, J., Georgieva, E. I., Latasa, M. U., García-Trevijano, E. R., Serviddio, G., Nakamura, T., Avila, M. A., Sastre, J., Torres, L., Mato, J. M., & López-Rodas, G. (2007). Transcription of the MAT2A gene, coding for methionine adenosyltransferase, is up-regulated by E2F and Sp1 at a chromatin level during proliferation of liver cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(4), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.009>

97. Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. **Epigenetics*, 7*(10), 1098–1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>

98. Ryu, H. Y., & Hochstrasser, M. (2021). Histone sumoylation and chromatin dynamics. *Nucleic acids research*, 49(11), 6043–6052. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab280>

99. Ryu, H. Y., Su, D., Wilson-Eisele, N. R., Zhao, D., López-Giráldez, F., & Hochstrasser, M. (2019). The Ulp2 SUMO protease promotes transcription elongation through regulation of histone sumoylation. *The EMBO journal*, 38(16), e102003.

<https://doi.org/10.15252/embj.2019102003>

100. Ryu, H. Y., Zhao, D., Li, J., Su, D., & Hochstrasser, M. (2020). Histone sumoylation promotes Set3 histone-deacetylase complex-mediated transcriptional regulation. *Nucleic acids research*, 48(21), 12151–12168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1093>
101. Schaenman, J. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (2001). Identification of two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding proteins with homology to the RNA-binding motif RRM. *The Journal of biological chemistry*, 276(2), 1602–1609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006866200>
102. Shiio, Y., & Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13225–13230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735528100>
103. Sincennes, M. C., Brun, C. E., Lin, A. Y. T., Rosembert, T., Datzkiw, D., Saber, J., Ming, H., Kawabe, Y. I., & Rudnicki, M. A. (2021). Acetylation of PAX7 controls muscle stem cell self-renewal and differentiation potential in mice. *Nature communications*, 12(1), 3253. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23577-z>
104. Singh, U., & Ehrenkaufer, G. M. (2009). Recent insights into *Entamoeba* development: identification of transcriptional networks associated with stage conversion. *International journal for parasitology*, 39(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.004>
105. Singh, U., & Pearson, R. (2010). Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cellular Microbiology*, 12(12), 1681–1690. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01524.x>
106. Singh, U., Rogers, J. B., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (1997). Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the hgl5 gene of the

- protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8812–8817. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8812>
107. Singh, U., Rogers, J. B., Mann, B. J., & Petri, W. A., Jr (1997). Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the hgl5 gene of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8812–8817. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8812>
108. Sinha, K. K., Bilokapic, S., Du, Y., Malik, D., & Halic, M. (2023). Histone modifications regulate pioneer transcription factor cooperativity. *Nature*, 619*(7969), 378–384. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06112-6>
109. Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
110. Su, J. H., Zheng, P., Kinrot, S. S., Bintu, B., & Zhuang, X. (2020). Genome-Scale Imaging of the 3D Organization and Transcriptional Activity of Chromatin. *Cell*, 182(6), 1641–1659.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.032>
111. Suter D. M. (2020). Transcription Factors and DNA Play Hide and Seek. *Trends in cell biology*, 30(6), 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.003>
112. Tecalco-Cruz, A. C., Macías-Silva, M., Ramírez-Jarquín, J. O., Ríos-López, D. G., & Zepeda-Cervantes, J. (2021). Mecanismos básicos en la modulación de la expresión génica: algunas implicaciones en el envejecimiento del cerebro. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.0.295>
113. Torres-Guerrero, H., Peattie, D. A., & Meza, I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 45(1), 121–130.

[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90033-3)

114. Trebicz-Geffen, M., Shahi, P., Nagaraja, S., Vanunu, S., Manor, S., Avrahami, A., & Ankri, S. (2017). Identification of S-Nitrosylated (SNO) Proteins in *Entamoeba histolytica* Adapted to Nitrosative Stress: Insights into the Role of SNO Actin and *In vitro* Virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 192. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00192>
115. van Driel, R., Fransz, P. F., & Verschure, P. J. (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *Journal of cell science*, 116(Pt 20), 4067–4075. <https://doi.org/10.1242/jcs.00779>
116. Wang, X., Angelis, N., & Thein, S. L. (2018). MYB - A regulatory factor in hematopoiesis. *Gene*, 665, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.065>
117. Wang Z. (2021). Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells*, 10(12), 3327. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>
118. Wu, S., Zhang, S., Liu, C. M., Fernie, A. R., & Yan, S. (2025). Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Protein Interactome Studies. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 24(1), 100887. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2024.100887>
119. Wu, T. F., Yao, Y. L., Lai, I. L., Lai, C. C., Lin, P. L., & Yang, W. M. (2015). Loading of PAX3 to Mitotic Chromosomes Is Mediated by Arginine Methylation and Associated with Waardenburg Syndrome. *The Journal of biological chemistry*, 290(33), 20556–20564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607713>
120. Xiao, L., & Xia, K. (2025). Functions of Intrinsically Disordered Regions. *Biology*, 14(7), 810. <https://doi.org/10.3390/biology14070810>
121. Yamada, Y., Wang, H.-Y., Fukuzawa, M., Barton, G. J., & Williams, J. G. (2008). A new family of transcription factors. *Development*, 135(18), 3093–3101.

<https://doi.org/10.1242/dev.026377>

122. Yang, H., Huang, Z. Z., Wang, J., & Lu, S. C. (2001). The role of c-Myb and Sp1 in the up-regulation of methionine adenosyltransferase 2A gene expression in human hepatocellular carcinoma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(9), 1507–1516.
<https://doi.org/10.1096/fj.01-0040com>
123. Zaret, K. S. (2020). Pioneer Transcription Factors Initiating Gene Network Changes. **Annual review of genetics*, 54*, 367–385.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-030220-015007>
124. Zhou, Y., & Ness, S. A. (2011). Myb proteins: angels and demons in normal and transformed cells. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 16*(3), 1109–1131.
<https://doi.org/10.2741/3738>

14. Anexos



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



Genómicas
hoy



POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Enfermedades metabólicas, cómo influye el encendido y apagado de genes: cuando llegar primero sí importa

Danna Paola Aguirre-Casimiro¹, Patricia Cuellar-Silva¹, Elisa Azuara-Liceaga^{1*}

¹ Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México

✉ elisa.azuara@uacm.edu.mx

Introducción

Si el ADN que contienen nuestras células se extendiera en toda su longitud, mediría casi dos metros, sin embargo, en el núcleo, este no se encuentra totalmente extendido sino que está organizado de forma muy compacta, en una estructura llamada **cromatina**, lo cual permite que se organice. Este nivel de compactación representa un gran problema para la célula porque, de esta manera, la información contenida en el ADN no está accesible y se dificulta su lectura. Para resolverlo existe un grupo especial de proteínas llamadas factores de transcripción *pioneros*. Estos factores derivan su nombre de su capacidad para llegar primero al ADN y unirse a regiones compactas de la cromatina para promover su apertura y encender los genes de manera que a partir de estos se extraiga la información para sintetizar proteínas. Los *pioneros* reclutan proteínas modificadoras de la cromatina que alteran la estructura nucleosomal, permitiendo la unión de otros factores de transcripción, encendiendo los genes en momentos específicos para la célula. Esta función los convierte en elementos clave durante la programación celular, permitiendo que las células modifiquen su identidad funcional durante el desarrollo embrionario y en procesos de reprogramación celular.

Entre los *pioneros* mejor estudiados se encuentran FOXA1 y FOXA2, que regulan el desarrollo del hígado y el páncreas; y GATA4, que además de su papel en la diferenciación celular, está implicado en la regulación del metabolismo de lípidos en el hígado. Los *pioneros* aseguran el encendido de los genes cuyos productos proteicos son necesarios para el mantenimiento del equilibrio metabólico, destacando su relevancia tanto en la salud como en la patogénesis de las enfermedades metabólicas, como la resistencia a la insulina, la diabetes *mellitus* (DM), la esteatosis hepática, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la aterosclerosis.

Aguirre-Casimiro et al., Genómicas Hoy 30 (2025)

Factores de transcripción generales y pioneros

El funcionamiento celular depende del encendido y apagado de genes (control transcripcional) en respuesta a diferentes eventos o condiciones ambientales. Este proceso depende de los factores de transcripción (FT), que son proteínas especializadas que se unen a regiones específicas del ADN, conocidas como **potenciadores** (elementos reguladores, involucrados en el

13

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Danna Paola Ixylit Aguirre Casimiro

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

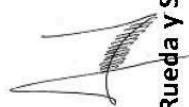
**A Potential Role for Phosphorylation in the Regulation of the Transcription Factor
EhMyb10 in *Entamoeba histolytica***

Por:

Danna Paola Aguirre Casimiro, Patricia Cuellar, Elisa Azuara Liceaga

En la modalidad de cartel durante el X Congreso de la Rama de Transducción de Señales
19 - 23 de octubre de 2025, Puebla, Puebla.

Atentamente
Comité Organizador



Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega



Dra. Mariana Segovia Mendoza



Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

Eduardo Monjaraz G.

Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán



A Potential Role for Phosphorylation in the Regulation of the Transcription Factor EhMyb10 in *Entamoeba histolytica*

Danna Paola Aguirre-Casimiro¹, Patricia Cuellar¹, Elisa Azuara-Liceaga¹

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, UACM, Plantel del Valle, Calle S. Lorenzo 290, Col del Valle Sur, Benito Juárez, 03104 Ciudad de México, CDMX, Tel. 55 5488 6661 ext. 15302

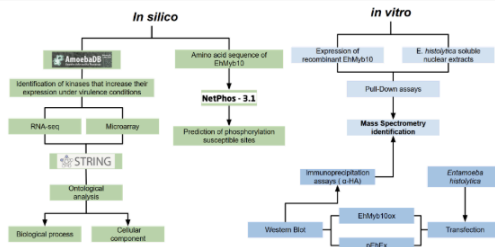
INTRODUCTION

Entamoeba histolytica, the causative agent of human amoebiasis, relies on complex **signal transduction pathways** to adapt to environmental changes and regulate its virulence. These pathways control **gene expression** through the activation of **transcription factors (TFs)**, whose activity is often modulated by **post-translational modifications (PTMs)** such as phosphorylation.

At least **34 Myb proteins** have been identified in *E. histolytica*, grouped into two main subfamilies: **EhMybR2R3**, which retain the conserved R2R3 repeats in their DNA binding domain found in other eukaryotes; and **EhMybSHAQKYF**, characterized by a single repeat containing the SHAQ(Y/F)F motif. Myb proteins are TFs implicated in key processes such as **virulence regulation**, **cell cycle control**, and **cyst differentiation** in this parasite.

In addition, the parasite encodes **307 protein kinases** (~3.7% of its proteome), which **90% are transmembrane kinases**, emphasizing the central role of **phosphorylation-dependent signaling** in environmental sensing and transcriptional regulation. Among these factors, **EhMyb10**, an R2R3-type TF, may serve as a phosphorylation-regulated link between **signal transduction** and **virulence gene expression**.

METHODOLOGY



Objective

To determine the role of the EhMyb10 transcription factor in signal transduction and assess how its activity may be regulated by phosphorylation in *Entamoeba histolytica*.

RESULTS

1 EhMyb10 as a Potential Target of Kinase-Mediated Regulation
The *E. histolytica* transcription factor EhMyb10 contains 14 predicted phosphorylation sites, indicating that its activity could be regulated through specific kinase-mediated phosphorylation.

Table 1. Predicted Phosphorylation Sites

Amino acid residue	Position	Kinase
NDYTYNYSI	12	-
NYSTYKSE	17	PKC
YSTYKSEK	18	-
ITYKSEKVK	20	PKC
FGEKSWVEV	52	CKI
KEVGTSEK	62	PKC
VGRSNGQC	64	PKC
KRPWSEED	86	CKI, RSK
RPPWSEED	87	CKI
GBKWSSEK	105	PKC, cdk2
WSEKSKLS	108	PKC
SKKLSGRTA	112	PKC
YKALSINK	127	PKC
RNKLSGFE	133	PKA

Figure 1. Domain architecture and 3D model of EhMyb10. A) Domains were retrieved from UniProt and schematized with DOG 2.0. B) The 3D structure predicted by AlphaFold3 and visualized in PyMOL highlights residues susceptible to phosphorylation predicted by NetPhos 3.1 (Table 1).

RESULTS

2 EhMyb10-kinase interactome
EhMyb10 likely interacts with kinase proteins whose expression increases under virulence conditions in *Entamoeba histolytica*. Several of these kinases contain one or two transmembrane domains and signal peptides. Their annotated Gene Ontology (GO) biological process includes protein phosphorylation activity.

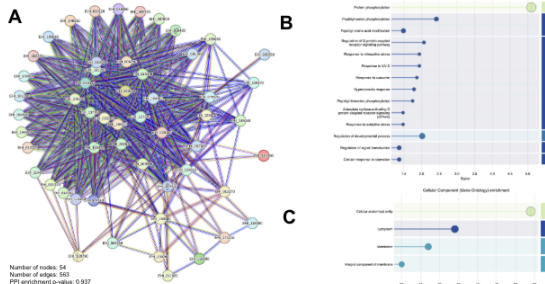


Figure 2. Kinases upregulated under virulence conditions in *E. histolytica*. A) Protein kinases with gene expression patterns similar to EhMyb10 (fold change ≥ 2.5) were identified in AmoebaDB. Interactions were analyzed with STRING, and GO enrichment was performed for biological process (B) and cellular component (C) categories.

RESULTS

3 Serine/threonine kinases interact with recombinant EhMyb10
EhMyb10 binds to kinases and phosphatases probably to regulate its function.

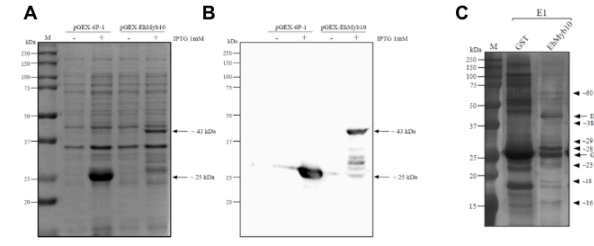


Table 2. Proteins in Pull-Down Identified by IMS-DIA-MS

Annotation	(%) coverage
Serine/threonine kinase, putative	10.53
Serine/threonine kinase, putative	10.53
Protein tyrosine phosphatase, putative	17.25
Protein kinase, putative	10.44
Rab GTPase-activating protein, putative	19.87

Figure 3. Pull-Down assay with recombinant EhMyb10. A) and B) EhMyb10-GST was expressed and purified. C) Pull-Down assays were done using the EhMyb10-GST and soluble nuclear extracts from *E. histolytica*. Samples were analyzed by IMS-DIA-MS (Table 2).

RESULTS

4 EhMyb10 interacts with Gal/GalNAc lectin and Ras GTPases

Anti-HA immunoprecipitation from nuclear extracts of EhMyb10-overexpressing trophozoites revealed interactions with the Gal/GalNAc lectin and Ras family GTPases, suggesting a role in signal transduction.

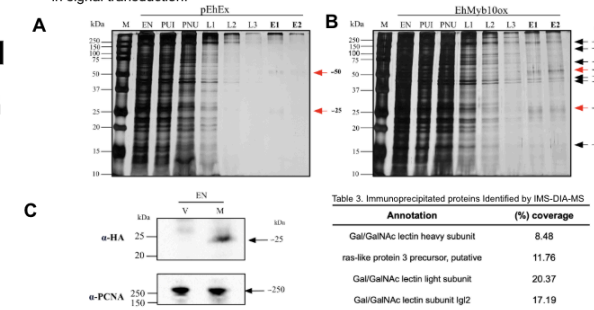


Table 3. Immunoprecipitated proteins identified by IMS-DIA-MS

Annotation	(%) coverage
Gal/GalNAc lectin heavy subunit	8.48
ras-like protein 3 precursor, putative	11.76
Gal/GalNAc lectin light subunit	20.37
Gal/GalNAc lectin subunit Ig2	17.19
Ras family GTPase	29.35

Figure 4. Immunoprecipitation of EhMyb10-HA. A) and B) Nuclear extracts were obtained from *E. histolytica* trophozoites transfected with the empty vector (pEHEx) or overexpressing EhMyb10-HA (EhMyb10ox) and used for immunoprecipitation (IP) assays. C) EhMyb10 overexpression was confirmed by Western blot using an anti-HA antibody. Immunoprecipitated proteins were identified by IMS-DIA-MS (Table 3).

RESULTS

5 Proposed model of EhMyb10 phosphorylation and its role in virulence-related signal transduction

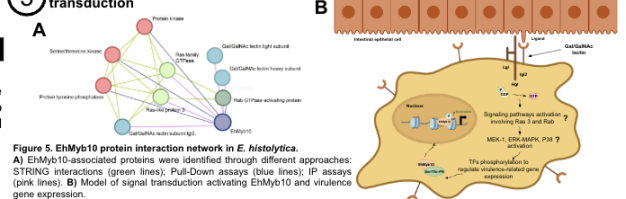


Figure 5. EhMyb10 protein interaction network in *E. histolytica*. A) EhMyb10-associated proteins were identified through different approaches: STRING interactions (green lines); Pull-Down assays (blue lines); IP assays (pink lines). B) Model of signal transduction activating EhMyb10 and virulence gene expression.

CONCLUSIONS

- EhMyb10 has multiple predicted phosphorylation sites, suggesting kinase regulation.
- EhMyb10 displays expression patterns similar to virulence-associated kinases in *E. histolytica*.
- EhMyb10 interacts with kinases, Gal/GalNAc lectin and Ras GTPases, linking it to signal transduction and virulence networks.
- EhMyb10 phosphorylation's functional role requires further experimental confirmation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support of the CCoT of UACM through project UACM-CCoT-2025-CON-05 and of SECITI through project CBF-2025-I-3795.

Danna Paola Aguirre Casimiro and Patricia Cuellar Silva received support from a master's scholarship (CVU 1341151) and a postdoctoral fellowship (CVU 333090) from SECITI.

Contact us

paola.aguirre@estudiante.uacm.edu.mx
elisa.azuara@uacm.edu.mx





Facultad de Medicina



UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México
Nada humano me es ajeno

SIMPOSIO 2026: “ENLACE UACM-UNAM: DE LAS CIENCIAS GENÓMICAS A LA FISIOLÓGIA CELULAR” (Del 20 al 22 de enero del 2026)

Se otorga la presente constancia a:

Danna Paola Aguirre Casimiro

Por su valiosa participación con la presentación del cartel:
“Análisis del interactoma de EhMyb10: Evidencias de su papel como factor de transcripción pionero en el parásito Entamoeba histolytica”

Comité Organizador

Marina Macías Silva

Marcela Sosa
Marcela Sosa

Marina Macías Ángeles Tecalco Víctor Color Marcela Sosa Eva Palacios Martha Robles

UACM Análisis del interactoma de EhMyb10: Evidencias de su papel como factor de transcripción pionero en el parásito *Entamoeba histolytica*

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

Danna Paola Aguirre Casimiro^a, Patricia Cuellar^a, Elizabeth J. Castañeda-Ortiz^a, Daniel Daniel Talamás-Lara^a, Rodríguez Mario A^a, Valdés Jesús^a, Elisa Azuara-Liceaga^a

^aPosgrado en Ciencias Genómicas, UACM, ^bUnidad de Microscopía Electrónica, ^cLaboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LaNSE), Cinvestav-IPN

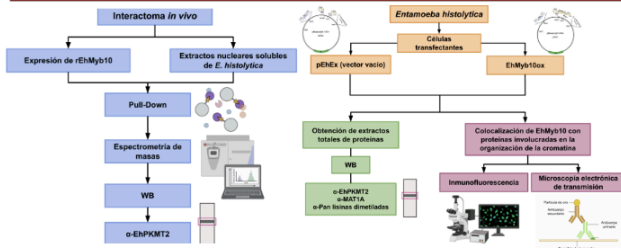
^dDepartamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav-IPN, ^eDepartamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN. paola.aguirre@estudiante.uacm.edu.mx, elisa.azuara@uacm.edu.mx



INTRODUCCIÓN

- Los factores de transcripción pioneros se unen a cromatina cerrada y reclutan complejos remodeladores para regular la expresión génica.
- EhMyb10, un factor MYB de *Entamoeba histolytica* con un DBD MYB con alta identidad al FT pionero c-Myb.
- EhMyb10 interactúa con proteínas modificadoras de cromatina, incluyendo la metiltransferasa EhPKMT2.
- Su sobreexpresión incrementa los niveles de EhPKMT2 y EhMAT, enzimas clave en las vías de metilación de proteínas.
- EhMyb10 colocaliza con marcas de activación y represión transcripcional (H3K4me1, H4K12ac, H3K27me3).
- Estos resultados sugieren que EhMyb10 podría actuar como un FT pionero, con un papel central en la regulación epigenética en este parásito.

METODOLOGÍA



OBJETIVO

Determinar las interacciones proteína-proteína de EhMyb10 y analizar su localización en regiones subcelulares de los trofozoitos de *E. histolytica*.

RESULTADOS

1. Expresión de la proteína rEhMyb10 y ensayo de Pull-Down con extractos nucleares de *E. histolytica*

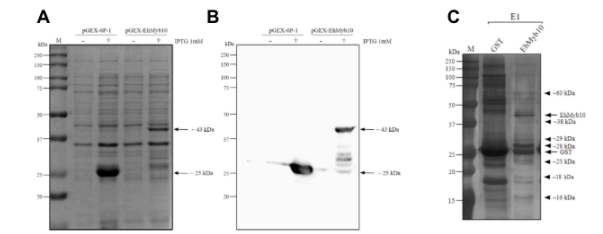


Figura 1. Ensayo de Pull-Down con EhMyb10 recombinante. A) y B) Se expresó y purificó la proteína recombinante rEhMyb10-GST. C) Los ensayos de Pull-Down se realizaron utilizando EhMyb10-GST y extractos nucleares solubles de *E. histolytica*. Las muestras se analizaron mediante IMS-DIA-MS (Tabla 1).

2. Detección de la proteína EhPKMT2 en los eluidos del ensayo de Pull-Down

Proteína	Cobertura (%)
Condensin complex subunit 2	12.71
SET domain-containing protein	67.98
CDK protein	15.51
Tudor domain-containing protein	12.48
Isoform H2A, putative	36.84
Isoform H2A, putative	6.29
Nucleosom-like domain-containing protein	7.92
Protein arginine N-methyltransferase domain-containing protein	2.13

Figura 2. Inmunodetección de EhPKMT2 en eluidos de Pull-Down. A) Gel de poliacrilamida con fracciones nucleares solubles (FNS) e insolubles (FNI) de trofozoitos de *E. histolytica* y eluidos del ensayo de Pull-Down con GST (control) y rEhMyb10. B) Western blot con anticuerpo anti-EhPKMT2, donde se detecta una banda (~43 kDa, flecha) en los eluidos de rEhMyb10 de ambas fracciones nucleares.

3. La sobreexpresión de EhMyb10 aumenta los niveles EhMAT1A y EhPKMT2 y tiene un efecto sobre el patrón de metilación.

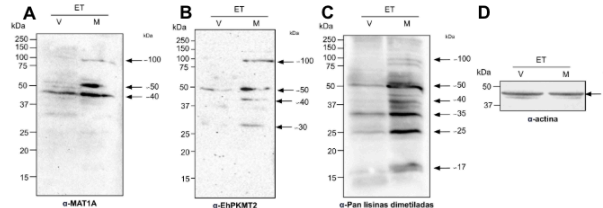


Figura 3. Inmunodetección de EhMAT, EhPKMT2 y del patrón de metilación en trofozoitos EhMyb10ox. A) Inmunodetección de EhMAT muestra mayor abundancia en EhMyb10ox respecto al control. B) EhPKMT2 presenta un patrón similar, con aumento en EhMyb10ox. C) Análisis del patrón de metilación con anticuerpo anti-pan lisinas dimetiladas muestra mayor abundancia de proteínas dimetiladas en EhMyb10ox. D) Actina se utilizó como control de carga. Las flechas indican los pesos moleculares aproximados.

4. Colocalización nuclear de EhMyb10, EhPKMT2 y EhMAT en trofozoitos EhMyb10ox

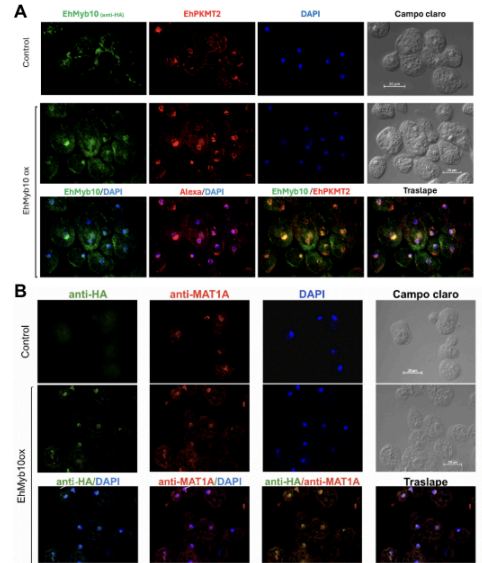


Figura 4. Colocalización de EhMyb10 con EhPKMT2 y EhMAT en el núcleo. A) EhMyb10 colocaliza con EhPKMT2 principalmente en la periferia nuclear. B) EhMyb10 colocaliza con EhMAT en el núcleo de trofozoitos EhMyb10ox.

5. Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación (H3K4me1 y H4K12ac) y represión transcripcional (H3K27me3) en trofozoitos EhMyb10ox

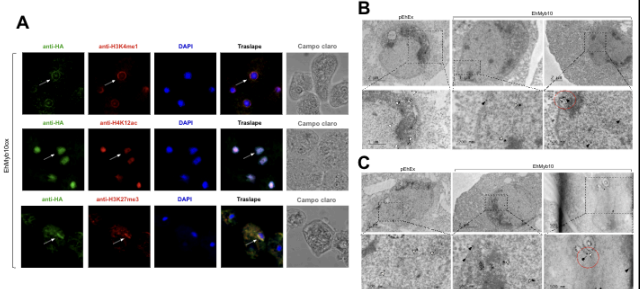
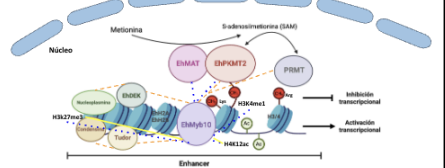


Figura 5. Colocalización de EhMyb10 con marcas de activación y represión transcripcional. A) Colocalización de EhMyb10 con la marca de activación H3K4me1, H4K12ac y H3K27me3 observada en la periferia y el centro nuclear. B) Colocalización de EhMyb10 con la marca represiva H3K27me3. C) Colocalización de EhMyb10 con la marca de activación H4K12ac. EhMyb10 se señala con flechas negras (partículas de oro de 15 nm) y las marcas epigenéticas con flechas blancas (partículas de oro de 30 nm).

CONCLUSIONES

6. Modelo molecular hipotético de la función pionera de EhMyb10 en la regulación de la expresión génica

Figura 5. Modelo molecular de la función potencial de EhMyb10 como factor de transcripción pionero en *E. histolytica*. Las proteínas asociadas a EhMyb10 se identificaron mediante diferentes métodos: ensayos IP (líneas naranjas); ensayos de inmunofluorescencia (líneas azules) y ensayos de microscopía electrónica de transmisión (líneas amarillas).



DISCUSIÓN

En conjunto, los resultados sugieren que EhMyb10 actúa como un factor de transcripción pionero en *Entamoeba histolytica*, al interactuar con enzimas modificadoras de cromatina, aumentar los niveles de EhPKMT2, EhMAT, y de proteínas dimetiladas en lisinas. Su colocalización con marcas de activación y represión transcripcional indica un papel central en la regulación epigenética y en la organización dinámica de la cromatina en este parásito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del CoYT de la UACM a través del proyecto UACM-CoYT-2025-CON-05 y de SECITI mediante el proyecto CBF-2025-I-3795. Danna Paola Aguirre Casimiro y Patricia Cuellar Silva recibieron apoyo mediante una beca de maestría (CVU 1341151) y una estancia posdoctoral (CVU 333090), respectivamente, otorgadas por SECITI.

Contacto

paola.aguirre@estudiante.uacm.edu.mx
elisa.azuara@uacm.edu.mx



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



POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

SEMANA DEL CEREBRO: UN DÍA EN LA UACM

OTORGA LA PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A: Danna Paola I. Aguirre Casimiro

por haber obtenido la mención honorífica en el concurso de infografía en el evento "Semana del cerebro: Un día en la UACM".

UACM Del Valle, 18 de marzo de 2026

Comité organizador



Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz
Posgrado en Ciencias Genómicas-UACM



Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquí
Instituto de Fisiología Celular-UNAM



Mtra. Eva G. Palacios Serrato
Posgrado en Ciencias Genómicas-UACM



Lic. Enrique Oropeza Martínez
Posgrado en Ciencias Genómicas-UACM

Amebas come-cerebros

El peligro no solo está en el agua

Danna Paola I. Aguirre Casimiro^a, Elisa Azuara Liceaga^a
^aPosgrado en Ciencias Genómicas, UACM.

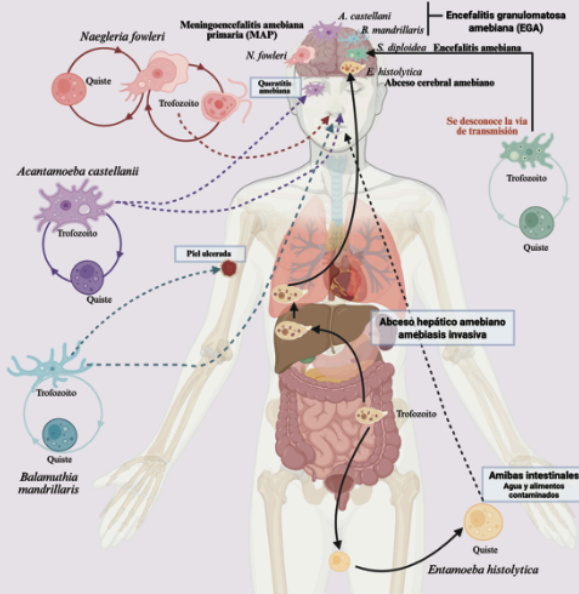
1 Amebas de vida libre (AVL)

- Son amebas anfizoicas (pueden vivir independiente de un hospedero pero pueden adaptar a el)
- Se alimentan de bacterias
- Se distribuyen mundialmente en agua dulce y costera, arroyos, polvo, suelo y aguas residuales, y unidades de calefacción, ventilación y aire acondicionado.



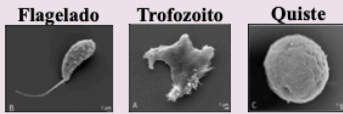
3 Transmisión

La infección por amebas de vida libre suele ocurrir durante actividades acuáticas en agua dulce, ingresando principalmente por la cavidad nasal; sin embargo, algunas especies también pueden entrar a través de la piel o por ingestión de agua y/o alimentos contaminados.

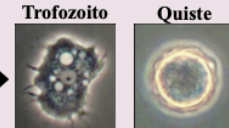


2 Estadios de vida

Naegleria fowleri



Acanthamoeba castellanii



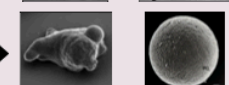
Balamuthia mandrillaris



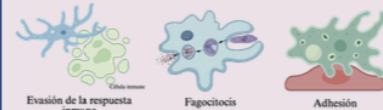
Sappinea diploidea



Entamoeba histolytica



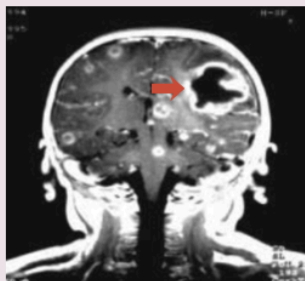
4 Mecanismos de virulencia de las amebas



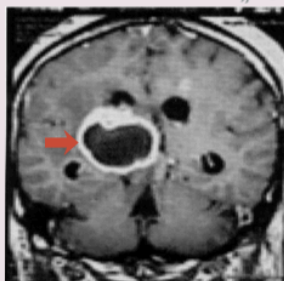
Especie	Factor / mecanismo	Función
<i>N. fowleri</i>	Proteínas formadoras de poros	Uso de neurinas
	Proteasas	Rompe uniones celulares
<i>A. castellanii</i>	Lectina de unión a mucosa + acantópodos	Adhesión fuerte
	Fosfolipasas y proteasas	Destructión de tejidos
<i>B. mandrillaris</i>	Proteína de unión a galactosa	Adhesión a matriz extracelular
	Ecto-ATPasas	Destructión de células inmunes (evasión)
<i>E. histolytica</i>	Lectina Gal/GalNAc	Adhesión al epitelio intestinal
	Amoebopores y proteasas	Lisis celular y daño tisular

5 Enfermedad

Síntomas: fiebre, cefalea intensa, náuseas, cambios conductuales, convulsiones, déficit neurológico focal, **abscesos cerebrales**.



Encefalitis amebiana granulomatosa



Absceso cerebral amebiano

6 Diagnóstico

- Frecuente diagnóstico post-mortem
- Microscopía (LCR): trofozoitos
- PCR (~94%): identificación específica
- Biopsia + inmunomarcaje
- Espectrometría de masas: detección rápida
- Neuroimagen (RM)



7 Tratamiento

- *E. histolytica*: metronidazol (resistencia)
- Amebas de vida libre: Anfotericina B (alta toxicidad)





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

Danna Paola Ixyalit Aguirre Casimiro

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. Erika 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



2º Simposio de Estudiantes
Hispanohablantes de Bioinformática
& Biología Computacional
1 y 2 Abril de 2025 | Evento virtual y gratuito



EL C3MITE del 2SEH2BIOINFO, otorga el presente



CERTIFICADO

DE ASISTENCIA A:

Danna Paola Ixyalit Aguirre Casimiro

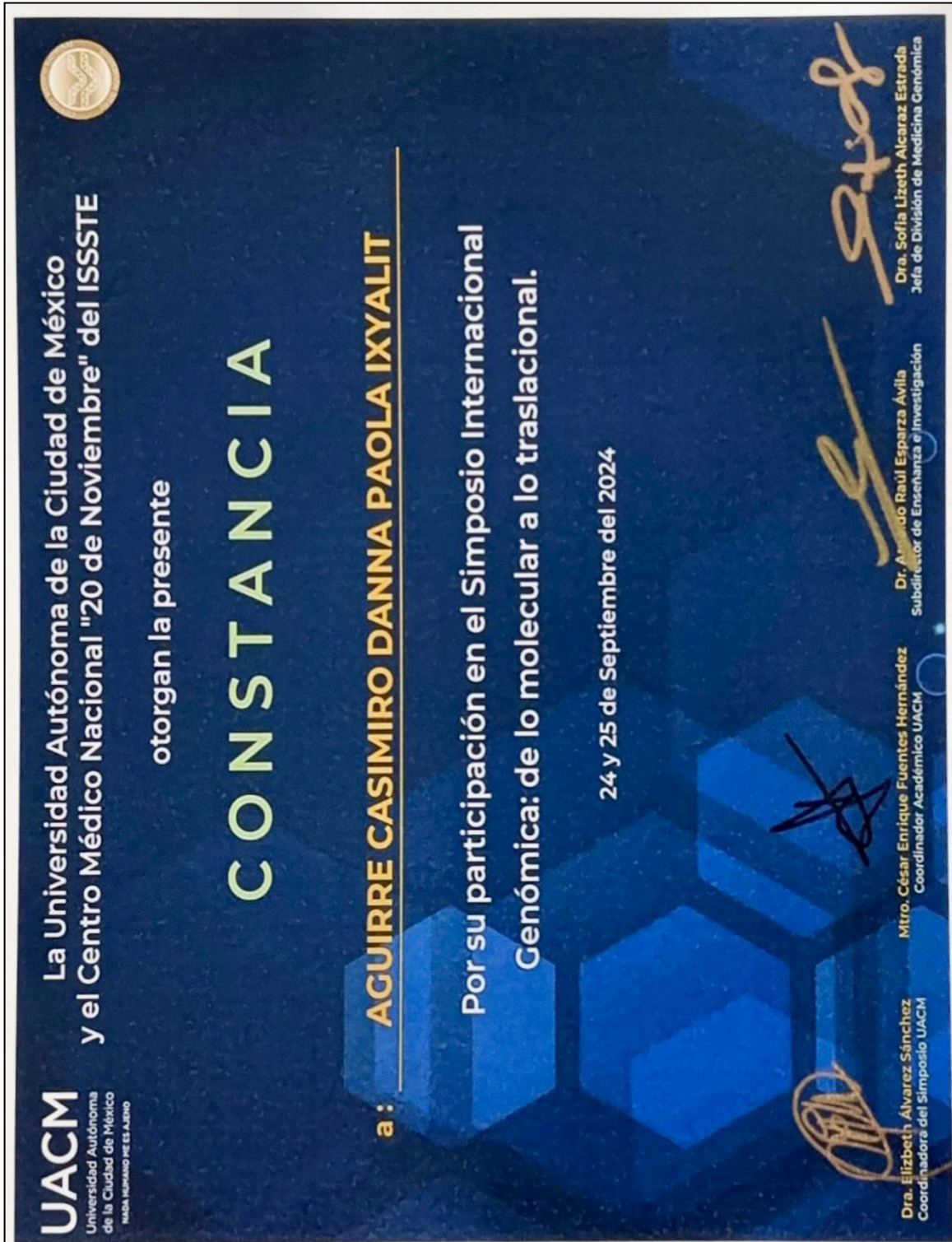
por su participaci3n en el Segundo Simposio de la Comunidad de Bioinformáticos Hispanohablantes 2025, realizado en modalidad virtual los días 1 y 2 de abril, con una duraci3n total de 12 horas.



Sebasti3n Urquiza Zurich
Advanced Center for Chronic Disease
(ACCDIS), Universidad de Chile
RSG- Chile



Jose Abel Lovaco Flores
Centro de Investigaci3n y de
Estudios Avanzados del IPN,
Unidad Irapuato (Cinvestav)
RSG- M3xico



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

**COLEGIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

CONSTANCIA



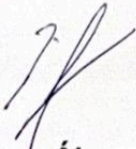
a

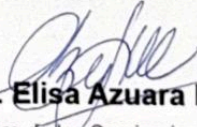
Aguirre Casimiro Danna Paola Ixyalit

Por su asitencia a los:

Seminarios de Investigación y Divulgación de la Ciencia organizados por el Posgrado en Ciencias Genómicas

Que se desarrollaron durante el semestre 2025-II


Mtra. Erika Lorena Álvarez Ramírez
Coordinadora del Colegio de Ciencia y Tecnología
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.


Dra. Elisa Azuara Liceaga
Coordinadora de los Seminarios de Investigación
y Divulgación de la Ciencia
Posgrado en Ciencias Genómicas



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

25
UACM
5001-5086

CA Coordinación
Académica

La Universidad Autónoma de la Ciudad de México
por medio de la Coordinación Académica,
otorgan la presente:

CONSTANCIA a
Aguirre Casimiro Danna Paola

Por su participación en la Feria

 **Zócalo de las
Ciencias**

CIENCIAS GENÓMICAS

llevada a cabo el 6 de marzo de 2026,
en el Zócalo de la Ciudad de México.


Dra. María Elizabeth Alvarez Sánchez
Coordinadora Académica-UACM