



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

Análisis *in silico* de Modificaciones  
Postraduccionales en el factor  
EhHSTF7 de *Entamoeba histolytica*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

DAFNE ANDREA JIMÉNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR EXTERNO:

Dra. María de Consuelo Gómez García

ASESOR INTERNO:

Dra. Maritere Domínguez Rojas

Cuatitlán Izcalli, México., Mayo de 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: Tesis

**Análisis in silico de Modificaciones Postraduccionales en el factor EhHSTF7 de Entamoeba histolytica.**

Que presenta la pasante: **Dafne Andrea Jiménez Hernández.**

Con número de cuenta: **313157075** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	
VOCAL	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana</u>	
1er. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Análisis in silico de Modificaciones Postraduccionales en el factor EHHSTF7 de Entamoeba histolytica.**

Que presenta la pasante: **Dafne Andrea Jiménez Hernández.**

Con número de cuenta: **313157075** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Análisis in silico de Modificaciones Postraduccionales en el factor EhhSTF7 de Entamoeba histolytica.**

Que presenta la pasante: **Dafne Andrea Jiménez Hernández.**  
Con número de cuenta: **313157075** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**


**Análisis in silico de Modificaciones Postraduccionales en el factor EhHSTF7 de Entamoeba histolytica.**

Que presenta la pasante: **Dafne Andrea Jiménez Hernández.**  
Con número de cuenta: **313157075** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Mayo de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana</u>	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**


**Análisis in silico de Modificaciones Postraduccionales en el factor EHHSTF7 de Entamoeba histolytica.**

Que presenta la pasante: **Dafne Andrea Jiménez Hernández.**  
Con número de cuenta: **313157075** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana</u>	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*

## **Agradecimientos**

A la D. en C. Maritere Domínguez Rojas por su guía y acompañamiento durante el proyecto de tesis.

A la D. en C. María del Consuelo Gómez García por su dirección en esta línea de investigación, consejos y opiniones para enriquecer este trabajo.

A la M. en C. Fabiola Bello Santos por su orientación para comprender esta línea de investigación.

Al Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana, la Q.F.B Nydia Berenice González Ángeles, a L.B.D Larisa Andrea González Salcedo, y la Dra. María Eugenia Aranda Barradas, por su tiempo en la revisión y nuevas perspectivas para la conclusión de este trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme aprender nuevos conocimientos por medio del uso de sus instalaciones y profesorado, para ponerlas en práctica en el ámbito de la investigación y personal.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS .....	V
ÍNDICE DE GRAFICOS .....	VI
ÍNDICE DE DIBUJOS.....	VI
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	4
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1. <i>ENTAMOEBA HISTOLYTICA</i> .....	8
1.1.1. Ciclo biológico .....	10
1.1.2. Amebiosis y su impacto en la sociedad.....	12
1.1.3. Patogenicidad .....	13
1.1.4. Genoma de Entamoeba histolytica .....	15
1.1.5. Transcripción.....	16
1.1.6. Promotores.....	17
1.2. ELEMENTOS DE RESPUESTA.....	18
1.2.1. Respuesta al choque térmico .....	18
1.2.2. Funcionamiento de EhHSTF7 en la respuesta al choque térmico .....	20
1.3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES .....	21
1.3.1. Modificaciones postraduccionales en HSTF ..	22
1.3.2. Fosforilación.....	22
1.3.3. Sumoilación.....	24
1.3.4. Acetilación.....	25
1.4. BIOINFORMÁTICA .....	28
1.4.1. Amoeba Database .....	29
1.4.2. NetPhos 3.0.....	31

1.4.3. GPS-SUMO 2.0.....	32
1.4.4. GPS-PAIL 2.0.....	33
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>35</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>37</b>
3.1. Pregunta.....	38
3.2. Hipótesis.....	38
<b>IV. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>V. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>38</b>
<b>VI. METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
6.1. Obtención de la secuencia de aminoácidos del EhHSTF7.....	40
6.2. Determinación de los sitios de Fosforilación .....	40
6.3. Identificación de los sitios de Sumoilación .....	40
6.4. Identificación de los sitios de Acetilación.....	40
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
7.1. Características generales del factor de choque térmico EhHSTF7.....	41
7.2. Comparación de factores de choque térmico de diferentes especies.....	42
7.3. Datos predictivos <i>in silico</i> de la fosforilación del factor EhHSTF7.....	43
7.4. Datos predictivos <i>in silico</i> de sumoilación del factor EhHSTF7.....	48
7.5. Datos predictivos <i>in silico</i> de acetilación del factor EhHSTF7.....	52
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>

<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>XI. REFERENCIAS .....</b>	<b>78</b>
11.1. Artículos consultados .....	78
11.2. Tesis.....	86
11.3. Libros Consultados.....	87
11.4. Páginas Web Consultadas.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Protozoarios del género Entamoeba.</i> .....	9
<i>Figura 2. Fases de desarrollo de Entamoeba histolytica.</i> .....	10
<i>Figura 3. Ciclo biológico de Entamoeba histolytica.</i> .....	11
<i>Figura 4. Proteínas expresadas/secretadas por el trofozoíto de E. histolytica consideradas factores de virulencia.</i> .....	14
<i>Figura 5. Promotor de una célula eucariota.</i> .....	17
<i>Figura 6. Acetilación y desacetilación de HSF.</i> .....	27
<i>Figura 7. Activación y atenuación de HSF1.</i> .....	28
<i>Figura 8. Bases de datos de VEuPathDB.</i> .....	30
<i>Figura 9. Base de datos AmoebaDB</i> .....	30
<i>Figura 10. Base de datos NetPhos 3.1.</i> .....	32
<i>Figura 11. Base de datos GPS-SUMO 2.0.</i> .....	33
<i>Figura 12. Base de datos GPS-PAIL 2.0.</i> .....	34
<i>Figura 13. Predicción de dominios y sitios de fosforilación in silico del factor EhHSTF7 de E. histolytica.</i> .....	46
<i>Figura 14. Ubicación de los sitios predictivos de fosforilación en la estructura 3D del EhHSTF7.</i> .....	47
<i>Figura 15. Comparación de la predicción de dominios y sitios de fosforilación in silico de HSFs de diferentes especies.</i> .....	48

<i>Figura 16. Predicción de sitios de sumoilación in silico del factor EhHSTF7 en E. histolytica .....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17. Ubicación de los sitios predictivos de sumoilación en la estructura 3D del EhHSTF7.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 18. Comparación de la predicción de dominios y sitios de sumoilación in silico de HSFs de diferentes especies.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 19. Predicción de sitios de acetilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 20. Ubicación de los sitios predictivos de acetilación en la estructura 3D del EhHSTF7.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 21. Comparación de la predicción de dominio y sitio de acetilación in silico de HSFs de diferentes especies. ....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22. Estado de oligomerización de los HSFs en mamíferos.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 23. Cambios moleculares. Efectos de SUMO en la función proteica.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 24. Ubicación de los sitios predictivos de fosforilación, sumoilación y acetilación en la estructura 3D del EhHSTF7 .....</i>	<i>75</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Factores de transcripción de choque térmico (HSTFs) de Entamoeba histolytica, datos de análisis in silico. ....</i>	<i>20</i>
---	-----------

<i>Tabla 2. Características generales del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenida por un análisis in silico.</i> .....	42
<i>Tabla 3. Comparación de factores de choque térmico en diferentes especies</i> .....	43
<i>Tabla 4. Datos predictivos de los sitios de fosforilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenida por un análisis in silico.</i> .....	44
<i>Tabla 5. Datos predictivos de los sitios de sumoilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenidos por análisis in silico.</i> .....	49
<i>Tabla 6. Datos predictivos de acetilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenida por análisis in silico.</i> .....	53

## **ÍNDICE DE GRAFICOS**

<i>Gráfico 4.1 Predicción de los sitios de fosforilación de EhHSTF7</i> ...	45
---	----

## **ÍNDICE DE DIBUJOS**

<i>Dibujo 1. Sitios potenciales de fosforilación</i> .....	46
<i>Dibujo 2. Sitios potenciales de sumoilación.</i> .....	50
<i>Dibujo 3. Sitios potenciales de acetilación</i> .....	53

## RESUMEN

Los factores de transcripción de choque térmico (HSTFs) son proteínas que regulan la expresión de diversos genes en respuesta a diferentes tipos de estrés como el térmico, farmacológico, e inmunológico, entre otros. Sin embargo, las modificaciones postraduccionales han presentado un papel fundamental en el funcionamiento de los HSTFs en organismos eucariontes; la fosforilación, metilación, acetilación, sumoilación y ubiquitinación han sido las más investigadas y han reflejado ser necesarias en diferentes momentos de regulación de los factores HSTF. En el protozooario *Entamoeba histolytica*, conocido por ser el agente causal de la amebiosis, se ha identificado una familia de siete factores EhHSTFs. Particularmente el gen *Ehhstf7* que codifica al factor de choque térmico siete (EhHSTF7), es el que presenta los mayores niveles de expresión de ARNm en trofozoítos cultivados en un estrés térmico o con emetina, un fármaco antiamebiano. Por lo que en este trabajo se plantea identificar y caracterizar mediante herramientas bioinformáticas las modificaciones postraduccionales, particularmente sitios de fosforilación, sumoilación y acetilación en el factor EhHSTF7 de *Entamoeba histolytica*. Se utilizaron las plataformas Amoeba DB (<http://amoebadb.org/amoeba>) para la obtención de la secuencia de 197 aminoácidos con el uso del número de identificación o ID EHI\_200020; NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) para la predicción de sitios de fosforilación con una probabilidad de score >0.5; GPS-SUMO 2.0 (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) para predecir sitios de sumoilación e interacciones SUMO en el factor y por último GPS-PAIL 2.0 (<http://pail.biocuckoo.org/>) para predecir los sitios de acetilación, seleccionando todas las histonas acetiltransferasas

que podrían estar interaccionando. Las predicciones se representaron en la estructura del factor EhHSTF7. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de catorce sitios potenciales de fosforilación del factor EhHSTF7 en *E. histolytica*, los aminoácidos que presentan esta modificación fueron las serinas, treoninas y tirosinas, que tras el cambio conformacional y químico ocasionado por la fosforilación potencialmente el factor interacciona con cinasas involucradas en procesos biológicos de diferenciación, y supervivencia como EGFR y PKC; al igual que con la cinasa SRC involucrada en los procesos de patogenicidad como la adhesión, fagocitosis; la cinasa PKA cuyo homólogo en el protozario es PI4, la cual otorga la función de la señalización de localización nuclear, y la cinasa GSK3 que estaría involucrada en el proceso de recuperación, es decir, como regulador de la proteostasis. Con respecto a los sitios de sumoilación de factor EhHSTF7 únicamente se predijeron cinco sitios de interacción o SIMs; estos sitios se activan únicamente tras el daño producido por choque térmico, es decir que aparecen como parte del proceso de recuperación en la proteostasis, ya que estos sitios que se encuentran cerca de un sitio de fosforilación pueden ser inhibidos o mejorados, como es el caso del intervalo de aminoácidos SIM del número 18 al 22, 46 al 50 y 125 al 129 del EhHSTF7. Finalmente se identificaron dos sitios potenciales de acetilación dentro del factor EhHSTF7 en las posiciones K112 y K186. Se ha descrito que los sitios de acetilación presentes en el factor EhHSTF7 se ven afectados por las HATs o complejos remodeladores de cromatina, en específico puede presentar una modificación en el aminoácido K112 caracterizado como lisina funcional, ya que se encuentra cerca del DBD, una acetilación en ese aminoácido tiene un efecto en el proceso de transcripción interfiriendo en la capacidad de



unión entre factor y el DNA. En conclusión, el factor EhHSTF7 es potencialmente susceptible a presentar fosforilaciones, sumoilaciones y acetilaciones que pueden ser cruciales en su papel de factor de transcripción de acuerdo con las condiciones en las que se encuentre el protozooario.

## ABSTRACT

Heat shock transcription factors (HSTFs) are proteins that regulate the expression of various genes in response to different types of stress such as thermal, pharmacological, and immunological, among others. However, post-translational modifications have played a fundamental role in the function of HSTFs in eukaryotic organisms; phosphorylation, methylation, acetylation, sumoylation and ubiquitination have been the most investigated and have shown to be necessary at different times of regulation of HSTF factors. The protozoan *Entamoeba histolytica*, known to be the causative agent of amoebiasis, a family of seven EhHSTFs has been identified. In particular, the *Ehhstf7* gene that encode the thermic shock factor seven (EhHSTF7), is the one with the highest levels of mARN expression in trophozoites cultured under heat stress or with emetine, an antiamoebic drug. Therefore, in this work it is proposed to identify and characterize potential post-translational modifications using bioinformatic tools, particularly sites of phosphorylation, sumoylation and acetylation in the EhHSTF7 factor of *Entamoeba histolytica*. Amoeba DB platforms (<http://amoebadb.org/amoeba>) were used to obtain the sequence of 197 amino acids with the use of the identification number or ID EHI\_200020; NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) for the prediction of phosphorylation sites with a probability score > 0.5; GPS-SUMO 2.0 (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) to predict sumoylation sites and SUMO interactions in the factor and finally GPS-PAIL 2.0 (<http://pail.biocuckoo.org/>) to predict the sites acetylation, selecting all histone acetyltransferases that could be interacting. The predictions were represented in the structure of the factor EhHSTF7. The

results show the presence of fourteen potential phosphorylation sites of the EhHSTF7 factor in *E. histolytica*, the amino acids that present this modification are serine, threonine and tyrosine, which potentially interact with kinases involved in biological processes of differentiation, survival as it is EGFR and PKC; as with the SRC kinase involved in pathogenicity processes such as adhesion, phagocytosis; the PKA kinase whose homologue in the protozoan is PI4, which provides the function of nuclear localization signaling, and the GSK3 kinase, which would be involved in the recovery process, that is, as a regulator of proteostasis. Regarding the sumoylation sites, only five interaction sites or SIMs were predicted, these sites are activated only after damage caused by heat shock, that is, they appear as part of the recovery process in proteostasis, since these sites that are found near a phosphorylation site can be inhibited or enhanced, as is the case of the SIM amino acid range 18-22, 46-50 and 125-129 of EhHSTF7.

Finally, two potential acetylation sites were identified at positions K112 and K186. It has been described that acetylation sites in the EhHSTF7 are affected by HATs or chromatin remodeling complexes; specifically, a modification may occur in the amino acid K112, characterized as a functional lysine, since it is close to the DBD, an acetylation in that amino acid influences the transcription process, interfering with the binding capacity between the factor EhHSTF7 and DNA. In conclusion, the EhHSTF7 factor is potentially susceptible to phosphorylation, sumoylation and acetylation that can be crucial in its role as a transcription factor according to the conditions in which the protozoan is exposed.

## I. INTRODUCCIÓN

El protozooario *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la parasitosis denominada entamebiosis o popularmente denominada “amibiasis” o “amebiasis”, la cual fue notificada entre los siglos XVI y XVII en México como una de las enfermedades que ocasiona una gran morbilidad y mortalidad. En el mundo, esta parasitosis afecta anualmente a más de 500 millones de personas y causa cerca de 50,000 a 100,000 muertes (Lorenzi *et al.*, 2010). En México el boletín epidemiológico de la semana 41 del año 2020 publicado por la Secretaria de Salud, registró 90,135 casos clínicos de entamebiosis intestinal, y 454 casos de absceso hepático amebiano (Secretaria de Salud, 2020).

De acuerdo con diversos estudios, desde 1975 se describieron factores de virulencia que estaban relacionados con la interacción entre el parásito y la célula diana (enterocito o hepatocito). Los factores provocan la adherencia, fagocitosis y lisis de la célula diana (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). De este mismo modo, se descubrió que el genoma de *E. histolytica* posee los genes que confieren el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR), proporcionando la sobrevivencia del trofozoíto en condiciones *in vitro*. Este fenotipo es dado por la sobreexpresión de los genes *EhPgp*; de estos genes se han estudiado el gen *EhPgp1* que se expresa de manera constitutiva y el gen *EhPgp5* que se expresa de forma inducible, cuando el parásito se encuentra en medios de cultivo con el fármaco emetina; de origen alcaloide, y es usado como tratamiento contra la

amebiosis, cuya acción es la de bloquear la síntesis proteica (Delgadillo, 2003; Nieto *et al.*, 2017).

Los factores de estrés externos como fármacos, altas temperaturas, pH y metales pesados inducen la síntesis de diferentes proteínas que ayudan a los diversos organismos, entre ellos a los parásitos, a restaurar la homeostasis ante estas situaciones de estrés. Por ejemplo, el caso de la expresión de los genes *Pgp* que codifican para las *p*-glicoproteínas, de las cuales la *p*-glicoproteína 1 es conocida como una proteína resistente a múltiples fármacos o MDR1, que bombea sustancias ajenas, entre ellas fármacos, hacia el exterior de las células; también se encuentran los genes *hsp* que codifican para las proteínas de choque térmico (HSP) que al sobreexpresarse conservan o degradan otras proteínas que se desnaturalizaron por el incremento de la temperatura (Kregel, 2002).

Esta respuesta se ve regulada, por activación o inhibición de genes que codifican *p*-glicoproteínas o proteínas de choque térmico (HSP), por elementos de choque térmico (HSE), los cuales se encuentran en los promotores de los genes *Pgp* y *hsp*, entre otros (Gómez *et al.*, 2007). Estos HSEs son reconocidos por los factores de transcripción de choque térmico (HSTFs) (Lewin, 2008). En el parásito *E. histolytica* se han identificado 7 genes que codifican a estos factores nombrados EhHSTF1, EhHSTF2, EhHSTF3, EhHSTF4, EhHSTF5, EhHSTF6, EhHSTF7 (Macías *et al.*, 2012). Particularmente, el gen *EhHSTF7* es el que presenta mayor expresión en trofozoítos crecidos en presencia de 8 $\mu$ M de emetina y ante el estrés térmico a 42°C. En estudios

realizados por Bello (2015) mostraron que el EhHSFT7 se encuentra en el núcleo cuantitativamente en mayor proporción cuando el parásito es expuesto a un estrés térmico o a emetina. Asimismo, determinó que el factor puede oligomerizarse y fosforilarse en el citoplasma, traslocarse e hiperfosforilarse en el núcleo.

De esta forma se concluye que para que este factor EhHSTF7 se active deben llevarse a cabo modificaciones postraduccionales en el núcleo que de forma indirecta influyen en la transcripción de respuesta al choque térmico, así como al fenotipo MDR. En otros organismos como el humano, el ratón, la levadura, se ha observado que las modificaciones postraduccionales son mecanismos fundamentales para la función de los HSFs, en donde las fosforilaciones están directamente involucradas en la activación transcripcional de este factor. No obstante, esta no es la única modificación, ya que las acetilaciones, metilaciones, sumoilaciones y ubiquitinaciones también son importantes en el papel de los HSFs (Nakai, 2016). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es plantear que las modificaciones postraduccionales de los HSFs vistas en otros organismos también pueden suceder en protozoarios como *E. histolytica*.

### **1.1. *Entamoeba histolytica***

*Entamoeba histolytica* es un parásito del reino Protista, subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Familia Entamoebidae, Género *Entamoeba* (INSST, 2015).

Está relacionado con la enfermedad actualmente conocida como amebiosis, descrita por Fedor Lösch, en 1875 en San Petersburgo, con el aislamiento de trofozoítos móviles en las heces de un campesino con disentería, que llamó <Amoeba coli>. Para 1903, Schaudinn lo nombró *Entamoeba histolytica* y lo separó de los no patógenos que denominó <Entamoeba coli> (Gutiérrez, 2008).

El género *Entamoeba* comprende varias especies, de las cuales seis habitan en el intestino del hombre; *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba hartmanni* y *Entamoeba coli* (Figura 1). Tres de ellas, al ser morfológicamente idénticas, son de interés clínico, donde *E. histolytica* y *E. moshkovskii* son consideradas patógenas y *E. dispar* como no patógena, tras descubrir algunas diferencias genéticas y bioquímicas (Gutiérrez, 2008).

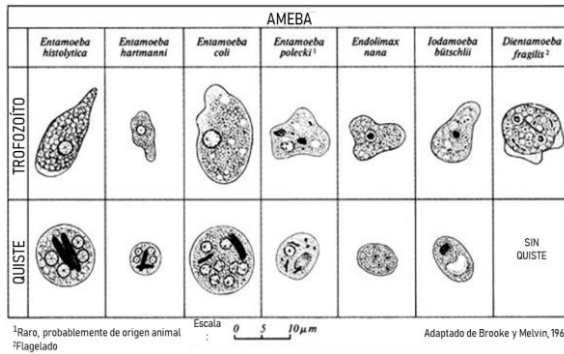


Figura 1. Protozoarios del género *Entamoeba*. Diferentes especies pertenecientes al género *Entamoeba* y sus fases de desarrollo (Clark, 1994) Modificado inglés-español

Tras el avance de las técnicas microscópicas para la diferenciación de organismos microscópicos en la Figura 2 (A) se muestra con microscopia electrónica de barrido al trofozoíto de *E. histolytica* y en la Figura 2 (B) la forma de quiste con microscopio óptico.

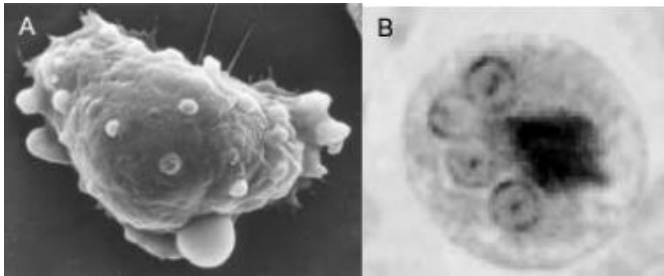


Figura 2. Fases de desarrollo de *Entamoeba histolytica*. Trofozoíto (A) y quiste (B) (Llop, 2001)

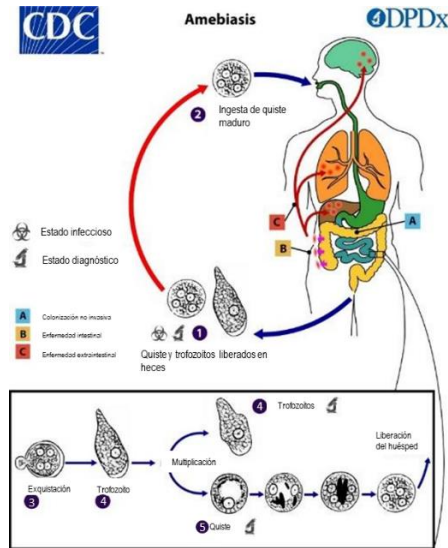
### 1.1.1. Ciclo biológico

Los quistes de *Entamoeba histolytica* se adquieren por vía fecal-oral, debido a la ingesta de quistes por contaminación de comida, manos o agua con heces o materia fecal, o contacto sexual. La transformación de quiste a trofozoíto ocurre en el intestino delgado, y los trofozoítos son liberados migrando al intestino grueso. Estos se mantienen confinados en la luz intestinal provocando una infección no invasiva, es decir viaja hacia el intestino delgado sin causar lesiones traumáticas Figura 3 (A) transmitiendo los quistes y se les conoce como portadores asintomáticos. Los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal; ocasionando una enfermedad intestinal Figura 3 (B), también pueden migrar



al sistema circulatorio, encontrándose en sitios extraintestinales como el hígado, cerebro y pulmones, ocasionando una enfermedad extraintestinal, es decir migraciones erráticas Figura 3 (C) (CDC, 2020).

La fase de trofozoíto se reproduce por fisión binaria contrayendo sus pseudópodos y formando una pared, esto cerca del colon y dando lugar a los quistes, los cuales pueden sobrevivir días o semanas en el medio ambiente, manteniéndose en estado infeccioso activo, mientras que los trofozoitos al ser eliminados por las heces son destruidos una vez que están fuera y tras su ingesta en alimentos contaminados por aguas residuales son destruidos por el jugo gástrico (CDC, 2020).



*Figura 3. Ciclo biológico de Entamoeba histolytica. Modificado inglés-español*

1) Quistes y trofozoítos liberados por heces, 2) Ingesta de quistes maduros, 3) Desenquistamiento, 4) Liberación, 5) Multiplicación por fisión binaria, formación del quiste inmaduro.

A) Colonización no invasiva B) Enfermedad intestino grueso C) Enfermedad extraintestinal, migración errática. Tomado de <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>

### **1.1.2. Amebiosis y su impacto en la sociedad**

Los primeros relatos de amebiosis en México se remontan al año 1611, cuando fray García Guerra, Arzobispo de México y Virrey de la Nueva España, falleció tras presentar un cuadro clínico caracterizado por fiebre y dolor en el área hepática; el médico azteca, Martín de la Cruz, describió la enfermedad y Mateo Alemán planteó la asociación entre disentería y absceso hepático amebiano (AHA). En el siglo XVIII el absceso hepático amebiano fue reconocida como una de las enfermedades más graves y epidémicas, en las cuales se requería de intervención quirúrgica aunado con un tratamiento. (Pinilla *et al.*, 2008)

En el mundo, la entamebiosis ha afectado a más de 500 millones de personas, causando cerca de 50,000 a 100,000 muertes (Lorenzi *et al.*, 2010). En la actualidad en México se han reportado 90,135 casos de amebiasis intestinal, y 454 casos de absceso hepático por el boletín epidemiológico de la semana 41 del año 2020 por la Secretaria de Salud (Secretaría de Salud, 2020)

La mayoría de las infecciones se ubican en el área de la luz intestinal como “amebiosis luminal” que es asintomática. La colitis amebiana o la amebiosis intestinal invasiva ocurre

cuando es invadida la mucosa intestinal. Infecciones severas crónicas pueden desencadenar complicaciones como peritonitis, perforaciones y la formación de granulomas, denominados coloquialmente como “ameboma” (Fleta, 2000).

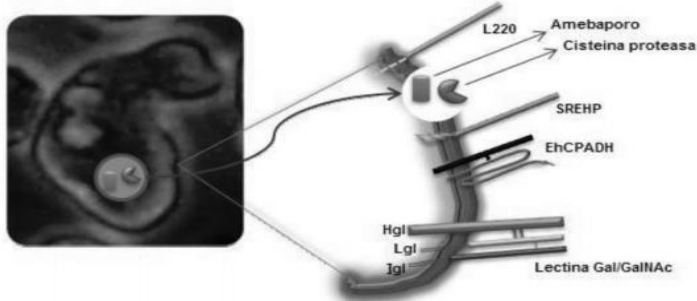
Los abscesos hepáticos amebianos son la manifestación clínica más común como entamebiosis extraintestinal, los abscesos pleuropulmonares, cerebrales y lesiones necróticas en el área perianal y genital que también se llegan a observar, aunque se presentan con menor frecuencia (Fleta, 2000).

Especies patogénicas de *Entamoeba* ocurren en todo el mundo y frecuentemente han sido relacionadas con la contaminación de agua potable con heces fecales humanas. La amebiosis producida por *E. histolytica* principalmente se presenta en países en desarrollo, mientras que en ciudades industrializadas los grupos de riesgo son hombres que tienen sexo con hombres, viajeros, inmigrantes recientes, inmunocomprometidos, entre otros (INSST, 2015).

### **1.1.3. Patogenicidad**

A partir de 1975 se comenzaron a describir los factores de virulencia, que dieron a conocer la patogenicidad de *E. histolytica*, los cuales interaccionan con la célula diana (enterocito o hepatocito): 1) colonización, reducción/disrupción de la mucosa y citólisis. La colonización sucede tras la proteólisis de la mucina MUC2 presente en la mucosa intestinal con el contacto de lectinas del parásito como Gal/GalNAc y glucoproteínas; 2) adherencia y fagocitosis

de células diana, y 3) el uso de cisteín-proteasas y la formación de amebaporos, ocasionando así la lisis celular, ya que las cisteín-proteasas son capaces de degradar colágeno, fibrinógeno, elastina y laminina, presentes en la matriz extracelular de la célula diana, que los trofozoítos atraviesan ocasionando la forma invasiva de la enfermedad. Las cisteín-proteasas podrían participar en la evasión de la respuesta inmune del hospedador, mediante la proteólisis de las moléculas IgA, IgG, y el componente C3a del complemento, participando como quimioatrayentes de glóbulos blancos (neutrófilos, macrófagos, polimorfonucleares) (Santiago, 2010) (Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009). Estos factores de virulencia se muestran expresados en la siguiente imagen de manera ilustrativa y su distribución en la membrana del trofozoíto de *E. histolytica* (Figura 4).



*Figura 4. Proteínas expresadas/secretadas por el trofozoíto de E. histolytica consideradas factores de virulencia.*

*Las principales proteínas estudiadas a la fecha son: proteína de membrana de 220 kDa (L220), amebaporos, proteasas de cisteína, proteína rica en serina (SREHP), complejo heterodimérico adhesina/proteasa de cisteína (EhCPADH) y la lectina de adhesión lectina Gal/GalNAc*

*(Tomada de Trejos-Suárez & Castaño-Osorio, 2009).*

#### 1.1.4. Genoma de *Entamoeba histolytica*

Anteriormente el genoma de *E. histolytica* comprendía 23,751,783 pares de bases (bp) distribuidos en 888 andamios (Loftus *et al.*, 2005); después de un reensamblaje *in silico* se determinó que el genoma comprende 20,799,072 pares de bases (bp), organizados en 1.496 andamios, con 8,201 genes y un contenido de GC del 24.2 % (Lorenzi *et al.*, 2010).

El genoma de *E. histolytica* está compuesto de cromosomas lineales y un número de moléculas similares a los plásmidos. Los genes ARNr están localizados exclusivamente en algunos de los ADN circulares (Bhattacharyaa *et al.*, 2000). Dentro del genoma de *E. histolytica* se ha descubierto que posee genes involucrados con mecanismos de resistencia a múltiples fármacos o MDR, es decir, la capacidad que tienen las células para desarrollar resistencia a una droga usada como agente selectivo, y además presentar resistencia cruzada a fármacos no relacionados con la bioquímica o estructura del agente selectivo. Los fármacos a los cuales es resistente en el fenotipo “resistencia a múltiples fármacos” (MDR) son del tipo alcaloide, como la emetina que bloquea la síntesis de proteínas, y se ha usado como medicamento amebicida (Delgadillo, 2003).

La resistencia a múltiples fármacos se debe al decremento en la acumulación intracelular de los fármacos, mediada por el incremento de la expulsión de los fármacos. La expulsión del fármaco es dada por proteínas denominadas glicoproteínas-P o *Gp-P*, que proteínas similares han sido codificadas por el gen *mdr1* humano. Las *Gp-P* llevan a cabo la función

de una bomba que expulsa los fármacos del interior al exterior de la célula. Dentro de los genes en *E. histolytica* se han encontrado cuatro que codifican para cuatro proteínas semejantes a las *Gp-P* de mamífero: *EhPgp1*, *EhPgp2*, *EhPgp5* y *EhPgp6*. De los genes anteriores se ha descrito que poseen una expresión mayor a *EhPgp1* cuya expresión es de forma constitutiva, y a *EhPgp5* con una expresión de tipo inducible (Delgadillo, 2003) (Nieto *et al*, 2017).

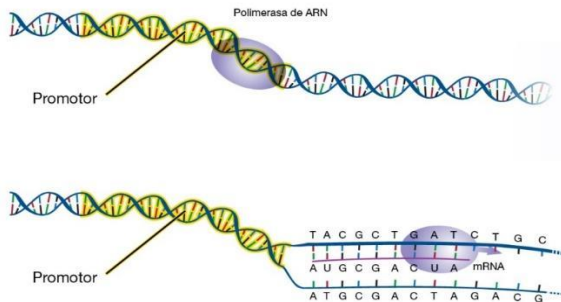
### 1.1.5. Transcripción

Las enzimas encargadas de la transcripción tanto en células eucariotas como procariotas son las ARN polimerasas, que desde 1969 se dividieron en ARN polimerasa I que da lugar al ARN ribosomal (ARNr), y la ARN polimerasa II que sintetiza al ARN mensajero (ARNm), así como ARN nucleares pequeños ARN nuclear, micro ARN, ARN telomerasa; la ARN polimerasa III que transcribe ARN pequeños, como ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal 5S y ARN pequeño nuclear (Lewin, 2008). Para llevar a cabo la regulación de genes inducibles, la ARN polimerasa II al encontrarse involucrada en la transcripción de genes de proteínas codificadas, y debido a que no puede unirse por sí misma en la región promotora, requiere de factores de transcripción que se unan a la secuencia de ADN específica presente en la región promotora y formar complejos con coactivadores como histonas acetiltransferasas (HATs) y complejos de remodelación de cromatina (Nakai, 2016).

### 1.1.6. Promotores

Un promotor es una secuencia de ADN localizada en el extremo 5' de los genes la cual puede contener diferentes secuencias consenso de la unión para factores de transcripción que participarán en su control transcripcional en diferentes momentos (Figura 5) (Margulies, 2020).

Las células eucariotas codifican para proteínas con promotores con una secuencia consenso TATAAA llamada caja TATA, así como muchos promotores presentan una caja CAAT con la secuencia consenso GGNCAATCT, además existen secuencias iniciadoras (Inr), secuencias potenciadoras (enhancers) entre otras, que permiten tener un control único del patrón de expresión de cada gen (Lewin, 2008; Gómez, 2018).



*Figura 5. Promotor de una célula eucariota*

*Se observa la sección del promotor en color amarillo, así como la sección de lectura de la ARN polimerasa.*

*(Tomada de Margulies, 2020).*

## 1.2. Elementos de respuesta

Los elementos de respuesta son aquellas secuencias consenso altamente conservadas, es decir, están presentes en la mayoría de los seres vivos independiente de su evolución, que son activadas por estímulos externos e internos. Se dividen en respuestas de choque térmico (HSE), elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), elemento de respuesta al suero (SER), elemento de respuesta a los metales (MRE), elemento de respuesta a ésteres (Lewin, 2008).

### 1.2.1. Respuesta al choque térmico

La respuesta del choque térmico está relacionada con mecanismos de control en la expresión génica, se activa con cambios de temperatura y provoca la modificación en la traducción de ARNm. En eucariontes existen secuencias de respuesta de choque térmico (HSE) las cuales son reconocidas por los factores de choque térmico (HSTFs) (Lewin, 2008). Los HSE se encuentran en los promotores de genes *hsp*, asegurando la sobrevivencia de la célula bajo condiciones de estrés (Romero-Díaz *et al.*, 2007).

En la zona promotora del gen de resistencia a múltiples fármacos *EhPgp5* de *E. histolytica* se localizó un elemento funcional de respuesta a choque térmico (HSE), responsable de la inducción de la expresión del gen *EhPgp5* cuando los trofozoítos se encuentran en condiciones de estrés, específicamente en presencia del fármaco emetina (Macías *et al.*, 2005).



Por otro lado, los HSTFs son considerados integradores primarios de la respuesta transcripcional durante el estrés, cuando la sobreexpresión es silenciada, o la traducción se detiene y se estanca el ciclo celular, y con esta respuesta se dilucidan mecanismos de supervivencia en condiciones de daño proteico (Vihervaara & Sistonen, 2014).

Las condiciones de estrés tienen la característica de ser variables, de las cuales se han estudiado el aumento de la temperatura, la presencia de metales pesados, fármacos, infecciones, y estrés oxidativo (Macías *et al.*, 2012).

El estrés de choque térmico ocasiona una acumulación de proteínas desnaturalizadas, presenciando un aumento en la producción de HSP, las cuales proporcionan protección de otros tipos de estrés, como estrés oxidativo, inflamación o apoptosis, creando protección cruzada (Richter *et al.*, 2010).

Las HSP son proteínas inducidas por estrés, como el choque térmico; poseen efectos citoprotectores, es decir mantienen la estabilidad celular, tienen actividades como chaperonas, participan en el ensamblaje y transporte de proteínas y polipéptidos tanto en condiciones normales como después de estímulos estresantes; se ha descubierto que son altamente conservadas, presentes en una gran cantidad de seres vivos, y su localización es variable, se encuentran en citoplasma, mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo. Existe una amplia variedad de HSP; sin embargo, las más estudiadas son las de 60, 70, 90, 110 kDa, ya que se expresan tanto en condiciones normales u óptimas o bajo estrés térmico (Kregel, 2002).

### 1.2.2. Funcionamiento de EhHSTF7 en la respuesta al choque térmico

En la amiba *E. histolytica* se han descrito con mayor detalle la presencia de siete genes pertenecientes a la familia *hsf* que codifican los factores EhHSTF1, EhHSTF2, EhHSTF3, EhHSTF4, EhHSTF5, EhHSTF6, EhHSTF7. Por medio de análisis *in silico* Bello (2015) recopiló los datos de los factores de transcripción de choque térmico de *Entamoeba histolytica* de la base de datos Amoeba Database (Tabla 1). Estos factores presentan una homología secuencial que va del 33% al 74% entre los siete factores de choque térmico y el HSF1 humano, es relevante para el proceso de secuenciación y tomar el HSF1 humano como sonda blanco. Se han identificado en los EhHSTFs sitios potenciales de fosforilación, que indican la presencia de modificaciones postraduccionales en estos factores de choque térmico, de los cuales se identificaron los residuos de Serina (S), Treonina (Y), y Tirosina (T), excepto EhHSTF7 cuyos sitios de fosforilación son S y T (Macías *et al.*, 2012).

Tabla 1. Factores de transcripción de choque térmico (HSTFs) de *Entamoeba histolytica*, datos de análisis *in silico*.

HSTFs	No. acceso AmoebaDB	aa	kDa	Sitios fosforilación	NLS
EhHSTF1	EHI_008230	170	20.44	Ser, Thr, Tyr	No
EhHSTF2	EHI_049510	279	32	Ser, Thr, Tyr	Si
EhHSTF3	EHI_087630	268	32.12	Ser, Thr, Tyr	Si
EhHSTF4	EHI_142120	340	39.38	Ser, Thr, Tyr	Si
EhHSTF5	EHI_137000	330	37.38	Ser, Thr, Tyr	Si
EhHSTF6	EHI_008660	217	31	Ser, Thr, Tyr	Si
EhHSTF7	EHI_200020	197	23.35	Ser, Tyr	No

*Recopilación de EhHSTFs de Amoeba Database, se muestra el número de acceso, el largo de la cadena de aminoácidos, peso molecular en kiloDaltons, sitios de fosforilación y señales de localización nuclear (NLS). (Tomada de Bello, 2015).*

Debido a que los factores de transcripción choque térmico HSTFs regulan la expresión de los genes *hsp*, se deduce que en la amiba la proteína HSP100 es transcrita como respuesta al estrés térmico, y la proteína S-nitrosoglutationa (GSNO) al contener tres elementos HSE en su región promotora, podría estar controlada por algún EhHSTF (Macías *et al.*, 2012).

De igual manera se presentan cambios cuando existe un choque térmico en el factor de virulencia lectina *Gal/GalNAc*, el cual está relacionado con la adhesión al epitelio intestinal, y su respuesta al estrés está ligado con el contacto, muerte y fagocitosis de la célula del huésped (Macías *et al.*, 2012).

### **1.3. Modificaciones postraduccionales**

Las modificaciones postraduccionales ocurren en las proteínas una vez que son sintetizadas por los ribosomas del mRNA a cadenas polipeptídicas; se conoce por sus siglas en inglés PTM. Las proteínas sufren una modificación covalente, generalmente de tipo enzimático. Las modificaciones más conocidas son la fosforilación, metilación y acetilación; actualmente se han destacado la ubiquitinación y sumoilación (Elguero, 2019).

Las modificaciones postraduccionales tienen un efecto modulador en la función biológica de dicha proteína, altera la localización celular, su capacidad de interacción con otras proteínas o puede llevar a la desnaturalización de la proteína afectada por estas modificaciones (Pérez-Sala Gozalo, 2012).

### **1.3.1. Modificaciones postraduccionales en HSTF**

Anteriormente se creía que los HSFs activaban exclusivamente la expresión de proteínas chaperonas en respuesta a las condiciones que provocaba el mal plegamiento de la proteína, tras reconocer un promotor de unión al sitio referente como un HSE. Sin embargo, se ha visto que la familia de HSFs de los mamíferos comprenden proteínas que de forma independiente o en conjunto conducen a una serie de eventos de regulación genética que activan o reprimen la transcripción (Gómez-Pastor *et al.*, 2018). Estas modificaciones postraduccionales en los HSTFs pueden aumentar la capacidad de transcripción, definiendo el grado y duración de su transcripción, o suprimiendo dicha actividad (Vihervaara & Sistonen, 2014).

### **1.3.2. Fosforilación**

La fosforilación de proteínas es considerada una modificación postraduccional con relevancia en la regulación, ya que puede activar proteínas en forma de “cascada”,

amplificando las señales y modulando procesos como el crecimiento o muerte celular (Pérez-Sala Gozalo, 2012).

Cuando las células se encuentran en condiciones de choque térmico o presencia de metales pesados, se ha observado que el peso de los HSFs aumenta considerablemente, como es el caso del HSF1 humano, donde presenta una hiperfosforilación en dichas condiciones. Dentro de los aminoácidos que son principalmente fosforilados en los HSFs son las serinas, debido a su ubicación más frecuente como residuo, y las características químicas de su grupo R el cual permite la formación de ésteres de fosfato (Nakai, 2016; Campbell & Farrell, 2016).

La fosforilación puede modular directamente la actividad de los factores de transcripción en por lo menos seis niveles de regulación:

- 1) Afectando la estabilidad del factor. Por ejemplo, la activación del factor de transcripción 2 (AFT2) y p53 que protegen contra la degradación mientras que la fosforilación facilita la degradación de MyoD y E2F-1.
- 2) Afecta la localización celular de los factores de transcripción, determinando la duración de su localización nuclear. Como es el caso de NFAT y FKHRL1, un miembro de la familia Forkhead (proteínas FOX), que regulan la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular; donde un estado alto de fosforilación previene su localización nuclear.
- 3) Facilita la interacción proteína-proteína y su oligomerización. Como es el caso de la asociación CREB-CBP y la dimerización de STAT.

4) Afecta la actividad de unión al ADN. Por ejemplo, la actividad de unión al ADN de c-Jun que es regulado tanto positivamente como negativamente por la fosforilación en un sitio específico, mientras que la fosforilación promueve la actividad de unión al ADN de STAT.

5) Regula la actividad transcripcional de factores como HSF-1.

6) Marcación de un factor de transcripción por inactivación como consecuencia de su habilidad de activar la transcripción (descrito en *S. cerevisiae*). Como es TFIIH, un componente de maquinaria de transcripción general, que fosforila Gcn4 y Msn2, dirigiendo la degradación de la vía ubiquitin-proteosoma y exportación nuclear. Debido a esta regulación conservada, E2F-1 humano se ha mostrado que es fosforilado por TFIIH, que resulta en su degradación (Holmberg, 2002).

### 1.3.3. Sumoilación

En la sumoilación las proteínas se unen covalentemente a un péptido llamado SUMO (small ubiquitin-like modifier) similar a la ubiquitina, esta unión altera la superficie de la proteína e interfiere o promueve la interacción proteína-proteína creando cambios conformacionales en las mismas (López Farfán, 2011).

En descubrimientos recientes han aparecido proteínas y dominios de proteínas que contienen motivos de interacción-SUMO (SIMs) que interacciona de forma no-covalente con SUMO, y a partir de estos descubrimientos se han podido

entender los efectos que tienen la sumoilación en la reparación del ADN, la actividad transcripcional, la formación de cuerpos nucleares, localización y estabilidad de las proteínas, respuesta al estrés, la progresión del ciclo celular, entre otras (Kerscher, 2007).

Las proteínas y algunos reguladores transcripcionales que reportan la sumoilación como PTM, son p53, c-Jun, c-Myb, AP-2, receptor andrógeno, proteína de leucemia promielocítica (PML) y I $\kappa$ B $\alpha$ . La sumoilación se ha mostrado que actúa antagonistamente a la ubiquitinación mediante la mejora en la estabilidad proteica, como ejemplo esta la sumoilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ . En el caso de p53, mediante la modificación de SUMO-1 se ha reportado que afecta la capacidad de transactivación, así como su localización intracelular. Se han localizado cuerpos nucleares en PML donde la unión covalente con SUMO-1 es esencial para la integridad funcional y estructural de esta proteína (Hietakangas *et al.*, 2003).

#### **1.3.4. Acetilación**

La acetilación de N<sup>ε</sup>-lisina en eucariontes ha sido una de las modificaciones postraduccionales (PTMs) relativamente más abundantes, y que han tenido mayor impacto en la función, estructura, estabilidad y localización de cientos de proteínas involucradas en diversos procesos celulares; la acetilación surge de la donación del grupo acetilo de la acetilCoA al grupo  $\epsilon$ -amino del residuo de lisina, que es catalizada de forma reversible por lisina acetiltransferasa

(KATs) y deacetilasas (KDACs). La acetilación de las lisinas puede cambiar el tamaño conformación o carga, esto altera la afinidad de unión al ADN, actividad enzimática, estabilidad proteica, interacción proteína-proteína o su localización (Kuhn *et al.*, 2014).

La acetilación es considerada una parte fundamental del control epigenético de la expresión génica y está asociada con la activación de regiones transcripcionales. El balance entre actividades enzimáticas opuestas de histonas acetiltransferasas (HATs) e histonas diacetilasas (HDACs), controlan directamente el nivel de acetilación de las histonas e inhibidores de HDACs induciendo una hiperacetilación de cromatina. Existen diferentes clases de HDACs, la clase I y II son clásicas y cuya actividad es inhibida por tricostatina A (TSA), por otro lado, la clase III es una familia NAD<sup>+</sup> dependiente de proteínas y su actividad no es afectada por TSA (Fritah *et al.*, 2009). Una de las HDACs de lisina dependientes de NAD<sup>+</sup> es la sirtuina-1 (SIRT1) la cual se encontró que está involucrada en la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans*; funciona de acuerdo con la viabilidad nutricional. El grupo de Morimoto (2016) examinó la regulación de HSF1 por SIRT1 en condiciones de estrés; y encontró que HSF1 es inducible a la acetilación de lisina 80 (Lys80) por p300 durante el choque térmico, que es desacetilada por SIRT1. Por lo tanto, SIRT inhibe la atenuación de HSR y p300 la promueve, controlando la estabilidad de HSF1 mediante la degradación proteosomal. Y con esto se define que por SIRT1 el complejo HFS1-ADN se disocia por la acetilación de Lys80 (Figura 6) (Nakai, 2016).



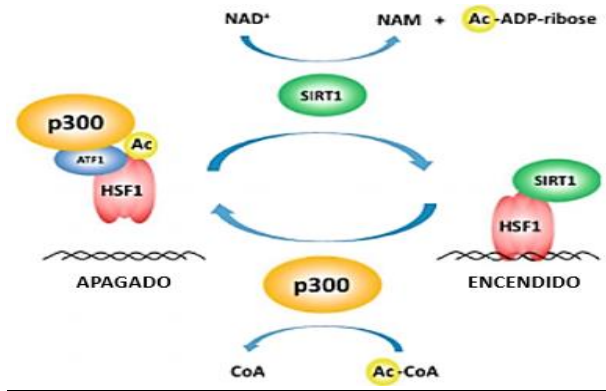
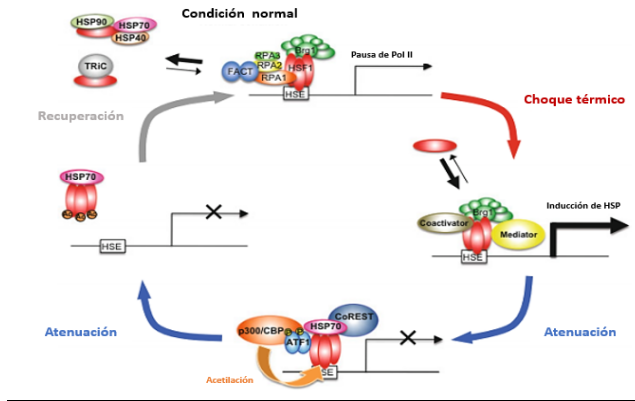


Figura 6. Acetilación y desacetilación de HSF.

*HSF1 es desacetilado por SIRT1 en condición sin estrés, SIRT1 rompe NAD<sup>+</sup> y produce nicotinamida (NAM), simultáneamente el grupo acetil es transferido de HSF1 a la parte ADP-ribose de NAD<sup>+</sup> para generar O-acetil-ADP ribosa. En respuesta al choque térmico, HSF1 se une al ADN y recluta p300 que es dependiente de ATF1. p 300 acetila a HSF1 mediante la transferencia del grupo acetilo de acetil-CoA. HSF1 acetilado se disocia de ADN.*  
(Nakai, 2016)

Cuando las células son liberadas del estrés, la transcripción inducida de HSF1 es apagada. HSP70 y HSP40 alcanzan los niveles más altos y se unen al dominio de activación de la transcripción de HSF1, suprimiendo su actividad. Además, el corepresor CoREST es reclutado al promotor donde mediante la interacción de HSP70 inhibe la transcripción de HSF1. HSF1 acetilado libera al trímero HSF1 del ADN y acelera la atenuación de HSR (Figura 7). El proceso de atenuación puede ser de dos formas: reducción del potencial de activación en la transcripción y la actividad de HSF1 en la unión al ADN (Nakai, 2016).



*Figura 7. Activación y atenuación de HSF1. HSF1 monomérico interactúa con HSP90, HSP70 y HSP40 bajo condiciones sin estrés. HSF1 se disocia de HSP90 y HSP70 durante choque térmico, forma trímeros y se une al HSE. Coactivadores que incluyen son BRG1 y mediadores de ensamblaje vía HSF1 en la región promotora. HSP70, HSP40 y CoREST suprimen la actividad transcripcional de HSF1 durante la fase de atenuación, y p300/CBP libera HSF1 del ADN mediante la acetilación. Modificado de (Nakai, 2016).*

### 1.4. Bioinformática

Tras la creación del Proyecto del Genoma Humano (HUGE) se formaron nuevas disciplinas con el fin de enriquecer la colaboración del gremio científico mediante la integración de diversas disciplinas como la Bioinformática, que se define como una subdisciplina de la biología y las ciencias computacionales encargada de adquirir, almacenar, analizar y diseminar la información biológica, en su mayoría de secuencias de ADN y aminoácidos; esta subdisciplina hace uso de programas informáticos que tienen diversas aplicaciones (Austin, 2020).

Dentro de las áreas de aplicación de la Bioinformática se encuentran: 1) problemas relativos específicamente al Dogma Central de la Biología Molecular, 2) problemas relativos a la simulación de procesos biológicos, 3) problemas relativos al desarrollo de nuevas tecnologías y organización, 4) problemas relativos a la formación profesional, 5) problemas relativos a los datos, es decir, adquisición, almacenamiento, presentación y análisis de éstos. Dentro de este trabajo se aplicará el uso de esta herramienta en problemas del Dogma Central de la Biología Molecular que hace referencia al análisis de secuencias, estructuras o funciones; realizando una proyección a su afeción con los procesos biológicos, prediciendo la dinámica de los componentes (Coltell, 2003).

#### **1.4.1. Amoeba Database**

La Fuente Informática de Patógenos Eucariontes, Vectores y Hospederos (VEuPathDB por sus siglas en inglés) es uno de dos centros de recursos bioinformáticos (BRCs) fundados por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos de América (NIAID), con soporte adicional de Wellcome Trust (UK) (Aurrecoechea C, 2011).

Mediante los recursos provistos de Plasmodium Genome Database por Burroughs Wellcome Fund (2000-2) y una búsqueda por parte de NIAID (2002-6), se comenzó la recopilación de datos y el acceso público en el 2004 a las plataformas computacionales y al programa de análisis permitiendo la colección, manejo, integración y manipulación de

la información genómica y otras series de datos relevantes a los patógenos de enfermedades infecciosas, incluyendo su interacción con hospederos mamíferos, y vectores invertebrados de enfermedades. Se fundaron dos BCRs: 1) VEuPathDB, enfocado en patógenos eucariontes y vectores invertebrados de enfermedades infecciosas, juntando datos de EuPathDB, FungiDB y VectorBase (Figura 8). 2) PATRIC y VIPR enfocado en patógenos bacteriales y virales (Aurrecoechea C, 2011).



Figura 8. Bases de datos de VEuPathDB

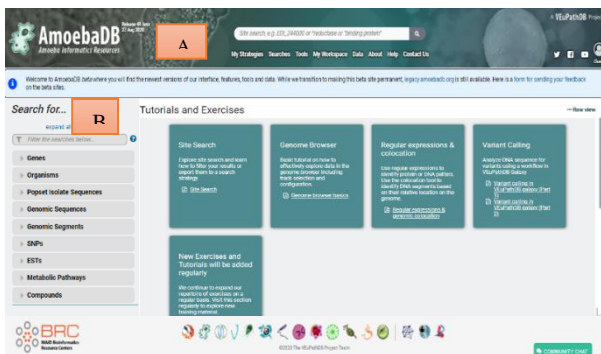


Figura 9. Base de datos AmoebaDB

(A) Banner, contiene links de registro, herramientas de búsqueda, páginas de información. (B) Panel izquierdo provee de

*tablas desplegables, búsqueda de secuencias genómicas, genes, vías metabólicas, SNPs, ESTs. Anexa Tutoriales y ejercicios para aprender a manipular los segmentos. (Aurrecochea C, 2011)*

### 1.4.2. NetPhos 3.0

Es un servidor que predice los sitios de fosforilación de proteínas eucariontes, en los aminoácidos serina, treonina, o tirosina. Se realizan predicciones genéricas y de cinasas específicas como: proteína serina/treonina cinasa del gen ataxia telangiectasia mutado o ATM, caseína cinasas 1 o CKI, caseína cinasa 2 o CKII, calcio calmodulina cinasas 2 o CaM-II, proteína cinasa dependiente de ADN o ADNPK, receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR, enzima glucógeno sintasa cinasa 3 o GSK3, cinasa receptor de la enzima insulina o INSR, proteína cinasa A o PKA, proteína cinasa B o PKB, proteína cinasa C o PKC, proteína cinasa G o PKG, cinasa ribosomal S6 o RSK, proteína tirosina cinasa proto-oncogénica o SRC, cinasa dependiente de ciclina 1 o cdc2, cinasas dependiente de ciclina cdk5, y proteína cinasa activadora del mitógeno p38 o p38MAPK (Blom *et al.*, 1999; Blom *et al.*, 2004).

Se anexa la secuencia de interés en formato FASTA, seguido de la selección de los aminoácidos que se quieren predecir o los tres juntos, y se selecciona el score, es decir la probabilidad con la que pueden suceder dichas predicciones que va de 0 a 1.0 (Blom *et al.*, 1999; Blom *et al.*, 2004).

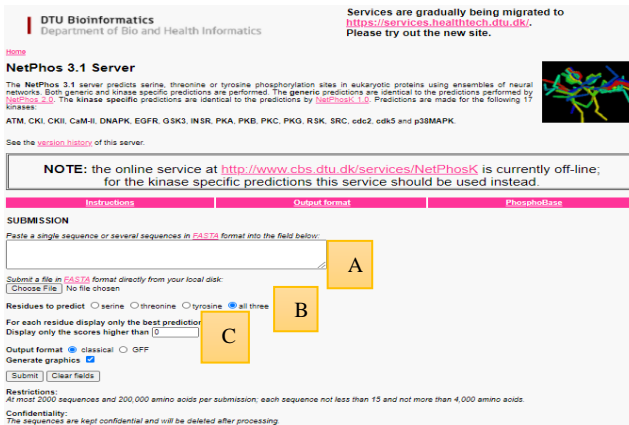


Figura 10. Base de datos NetPhos 3.1.

(A) formato FASTA. (B) selección de aminoácidos serina (S), tirosina (Y), treonina (T). (C) seleccionar el score. (Blom et al., 1999; Blom et al., 2004)

### 1.4.3. GPS-SUMO 2.0

Mediante modificaciones covalentes de residuos de lisina específicas en sustratos proteicos, o por interacciones no covalentes con proteínas, las SUMOs juegan un rol esencial en la regulación de los procesos de variedad biológica. Por lo que identificar sitios de sumoilación y motivos de interacción-SUMO (SIMs) en proteínas se ha vuelto fundamental para entender diversas funciones biológicas (Zhao et al., 2014).

Con esta herramienta por medio de la mejora de algoritmos de predicción y la adición de nuevos SIMs como característica de predicción, se desarrolló la versión mejorada de SUMOsp, que se tituló GPS-SUMO. En esta plataforma se recolectaron de literatura científica 983 sitios de sumoilación

en 545 proteínas y 151 SIMs conocidos en 80 proteínas (Zhao *et al.*, 2014).

Figura 11. Base de datos GPS-SUMO 2.0.

(A) Coloca la secuencia en formato FASTA. (B) Selección del umbral para sumoilación (alto, medio, bajo, todos, ninguno) y la Interacción SUMO (alto, medio, bajo, todos, ninguno) (Zhao *et al.*, 2014).

#### 1.4.4. GPS-PAIL 2.0

Existen dos tipos de acetilación en las proteínas. La acetilación  $N\alpha$ -terminal es catalizada por una variedad de acetiltransferasas N-terminal (NATs), las cuales transfieren mitades acetyl de acetyl-CoA al grupo  $\alpha$ -amino de los residuos amino-terminales de la proteína; esta acetilación es rara en procariontes, y se estima que el 85% de las proteínas de eucariontes la presentan. El segundo tipo es la acetilación  $N\epsilon$ -lisina, que modifica específicamente el grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, esta última, aunque es menos común,

se encuentra conservada tanto en procariontes como eucariontes. Además, el proceso de acetilación y desacetilación también está regulada por las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas desacetilasas (HDACs) respectivamente (Deng *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2006).

En esta plataforma se desarrollan las predicciones de sustratos y sitios de 7 HATs incluyendo: CREBBP, EP300, HAT1, KAT2A, KAT2B, KAT5, KAT8. Con uso de JAVA1.5 (Deng *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2006).

The screenshot shows the GPS-PAIL web interface. At the top, there is a logo for GPS and the title 'GPS-PAIL - Prediction of acetylation on Internal Lysines'. Below this is a navigation bar with links: HOME, PRODUCTS OF CUCKOO, DOWNLOAD, USER GUIDE, CITED BY, LINK, and CONTACT. The main content area is divided into a sidebar and a main panel. The sidebar contains 'PRODUCTS OF CUCKOO' with sub-links for 'PTMs Predictor', 'Tools', and 'Database'. The main panel features a 'GPS-PAIL Online Service' section with instructions for downloading the Stand-alone Program and a link for comprehensive prediction. Below this is a form for HAT prediction. Section (A) shows radio buttons for selecting HAT(s): All, CREBBP, EP300, HAT1, KAT2A, KAT2B, KAT5, and KAT8. Section (B) is a large text area for entering the sequence in FASTA format, with an option to upload a file. Section (C) shows radio buttons for selecting the threshold: High, Medium (selected), Low, and All, along with 'Example', 'Clear', and 'Submit' buttons.

**Figura 12. Base de datos GPS-PAIL 2.0.**  
**(A) Selección de HAT(s).** **(B) Ingreso de secuencia FASTA.** **(C) Selección del umbral (alto, medio, bajo, todo)**  
 (Deng *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2006)



## II. ANTECEDENTES

Se han realizado trabajos sobre *E. histolytica* donde se caracterizaron la estructura y función del promotor del gen *EhPgp5*, demostrado que la actividad transcripcional de este gen es inducible en presencia del fármaco emetina (Pérez *et al.*, 1998) Así mismo, en otros textos se ha demostrado que el mecanismo inducible es dependiente de la concentración de emetina, y que su sobreexpresión es consecuencia de la activación del promotor que se encuentra regulado por el elemento de respuesta a emetina (ERE), el cual es un elemento HSE (Nieto *et al.*, 2005)

La presencia de un elemento HSE funcional en el promotor del gen *EhPgp5* bajo las condiciones de cultivo con emetina (Nieto *et al.*, 2005), sugiere que el mecanismo se encuentra regulado por HSTFs.

En *E. histolytica* se identificó una familia de genes HSTF que está conformada por siete miembros que codifican para diferentes proteínas denominadas: EhHSTF1, EhHSTF2, EhHSTF3, EhHSTF4, EhHSTF5, EhHSTF6, y EhHSTF7 (Macías *et al.*, 2012).

Interesantemente, al evaluar la expresión de ARNm de los HSTFs en trofozoitos de *E. histolytica* se encontró que el gen EhHSTF7 presenta la mayor expresión a las 4 horas de estrés térmico y con 8  $\mu$ M de emetina. Más aún, al realizar el análisis y cuantificar la expresión de ARNm del gen *EhPgp5* se mostró que presenta un aumento en su patrón de expresión semejante al factor EhHSTF7, indicando que podría este último estar regulando a nivel transcripcional la

expresión del gen *EhPgp5* que está involucrado en el fenotipo de resistencia a fármacos.

Ahora bien, Bello (2015), al estudiar al factor EhHSTF7 del parásito *E. histolytica*, demostró que este factor se sobreexpresa en los trofozoítos expuestos a emetina y a choque térmico, que se oligomeriza y que se encuentra hiperfosforilado en los aminoácidos tirosina ante estos dos tipos de estrés. Además, se observó que este factor se trasloca al núcleo en estas mismas condiciones. Estas características son similares a las descritas para los HSFs de los organismos como el humano, el ratón y la levadura, entre otros (Bello, 2015; Nieto *et al.*, 2017; Nakai, 2016).

Como ya se mencionó anteriormente para que los HSFs se activen se ha demostrado que requieren sufrir una o varias PTMs como la fosforilación, acetilación, sumoilación, metilación, entre otras (Nakai, 2016). *E. histolytica* es un parásito que contiene la maquinaria para poder realizar varias de estas PTMs y sin duda la más estudiada es la fosforilación (Bello, 2015; Nieto *et al.*, 2017; Nakada-Tsuki, 2019). Sin embargo, se ha documentado la presencia de genes implicados en algunas de las PTMS como metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, entre otras (Ponder & Bogyo, 2007; Anwar & Goutinath, 2013; Feng *et al.*, 2016; Bernes *et al.*, 2005)

### III. JUSTIFICACIÓN

El parásito *Entamoeba histolytica* es un protozoario causante de la amebiasis, la cual en México ha sido una de las enfermedades causantes de una gran morbilidad y mortalidad. En diferentes estudios se ha descrito los factores de virulencia, así como su fenotipo MDR, expresado por los genes *EhPgp*.

Existen proteínas que ayudan a restaurar la homeostasis al encontrarse el parásito en situaciones de estrés como la exposición a fármacos, altas temperaturas, cambios de pH y metales pesados, entre otros; algunas de estas proteínas son expresadas por los genes *Pgp* o genes *hsp* las cuales codifican *p*-glicoproteínas o HSP respectivamente. Sin embargo, su exposición ante estas situaciones depende de un control transcripcional finamente orquestado y regulado en el que están involucradas secuencias consenso como los HSE, factores de transcripción como los EhHSTFs y la maquinaria basal de transcripción. Pero además los factores de transcripción deben de pasar por otros eventos que les permitan activarse y funcionar como son las PTMs.

Por esta razón en este trabajo se plantea identificar mediante análisis *in silico* la presencia de modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación y sumoilación, en la secuencia de aminoácidos del factor EhHSTF7 de *E. histolytica* y sugerir el impacto en la función celular con respecto a su resistencia al medio ambiente aplicando estrés.

**3.1.Pregunta:**

¿Cuáles son las modificaciones postraduccionales que presenta el EhHSTF7 y cuáles serán sus implicaciones en *Entamoeba histolytica*?

**3.2. Hipótesis:**

El factor EhHSTF7 del parásito *E. histolytica* presentará modificaciones postraduccionales similares al factor HSF1 del humano, y sus implicaciones serán con respecto a la supervivencia y metabolismo del parásito cuando se encuentra en estados de estrés, específicamente choque térmico e influencia de fármacos.

**IV. OBJETIVO GENERAL**

Identificar sitios de modificaciones postraduccionales para fosforilación, sumoilación y acetilación en el factor EhHSTF7 de *Entamoeba histolytica*.

**V. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar sitios potenciales de fosforilación del factor EhHSTF7.
- Identificar sitios potenciales de sumoilación del factor EhHSTF7.
- Identificar sitios potenciales de acetilación del factor EhHSTF7.

## Estrategia experimental

### Selección de la secuencia del factor EhHSTF7

Amoeba Database (<http://amoebadb.org/amoeba>)  
ID <EHI\_200020> proteína de 197 aminoácidos



### Obtención de datos predictivos

Sitios de Fosforilación	NetPhos 3.1 <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/</a>
Sitios de Sumoilación	GPS-SUMO 2.0 <a href="http://sumosp.biocuckoo.org/">http://sumosp.biocuckoo.org/</a>
Sitios de Acetilación	GPS-PAIL <a href="http://pail.biocuckoo.org/">http://pail.biocuckoo.org/</a>



### Discusión

Representar en la estructura del factor EhHSTF7  
Analizar las implicaciones funcionales de PTMs en *Entamoeba histolytica*

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Obtención de la secuencia de aminoácidos del EhHSTF7

Se realizó la búsqueda de la secuencia del factor EhHSTF7 en la base de datos Amoeba Database (<http://amoebadb.org/amoeba>) donde se usó del número de identificación o ID <EHI\_200020>, que se obtuvo del trabajo de Bello (2015). Se seleccionó la secuencia de 197 aminoácidos.

### 6.2. Determinación de los sitios de Fosforilación

Tras obtener la secuencia, se introdujo en la plataforma NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>), donde se seleccionó que los sitios predijeran los aminoácidos serina, tirosina y treonina; cuyo *score* fuera >0.5 de posibilidades de fosforilación.

### 6.3. Identificación de los sitios de Sumoilación

Igualmente se introdujo la secuencia en la plataforma GPS-SUMO 2.0 (<http://sumosp.biocuckoo.org/>), utilizando los límites para los sitios de “sumoilación” e “interacción SUMO” <all>.

### 6.4. Identificación de los sitios de Acetilación

Se usó la plataforma GPS-PAIL 2.0 (<http://pail.biocuckoo.org/>), seleccionando todas las histonas

acetiltransferasas de interacción posible <HAT(s): All>, y un umbral alto < threshold high> para predecir los sitios de acetilación en la secuencia.

Una vez obtenidas las tablas o gráficos que arrojados por los diferentes programas se colocaron los datos en una figura que representa la estructura del factor EhHSTF7, se colocó el dominio de unión al ADN y el dominio de oligomerización, y por medio de símbolos se ubicaron los sitios de fosforilación, sumoilación y acetilación a lo largo de la estructura. Posteriormente por medio de la literatura, artículos de investigación, se analizó la funcionalidad que poseen esas modificaciones postraduccionales al momento de la transcripción, así como el impacto en el ciclo metabólico o celular del protozooario *E. histolytica*.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Características generales del factor de choque térmico EhHSTF7

Para poder realizar la búsqueda de los sitios potenciales de fosforilación, sumoilación y acetilación en el EhHSTF7 de *E. histolytica*, primeramente se obtuvo la secuencia completa del factor de la página Amoeba Database (<http://amoebadb.org/amoeba>), así como información de algunas de sus características generales (Tabla 2) como el código de acceso, número total de aminoácidos, y sitios posibles de fosforilación. De igual manera se hizo uso de los datos obtenidos por Bello (2015) (Tabla 1) para facilitar su

búsqueda. Como se puede ver el factor está formado por 197 aminoácidos que generan una proteína de 25kDa.

*Tabla 2. Características generales del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenida por un análisis in silico. (EHI\_200020 heat shock transcription factor, putative, 2020)*

HSTFs	# de acceso	Secuencia genómica (pb)	Secuencia del ARN (pb)	Secuencia de aminoácidos	Sitios posibles de fosforilación
EhHSTF7	EHI_200020	662	594	197	Ser, Tyr

## 7.2. Comparación de factores de choque térmico de diferentes especies

Se realizó una comparación de los HSF de diferentes especies. Se hizo uso de las herramientas Uniprot (Tabla 3) para obtener el nombre del gen y el nombre de la proteína de cada una de las especies de diferente rango evolutivo, y Prosite (Tabla 3) para dilucidar los aminoácidos conservados (en mayúsculas) que se han mantenido y modificado dando así las características que requiere cada especie.

Con la finalidad de evidenciar que la presencia de proteínas que participan en los procesos de choque térmico que permanecen en los diferentes rangos evolutivos.



*Tabla 3. Comparación de factores de choque térmico en diferentes especies*

Organismo	Gen	Secuencia CLUSTAL (Prosite)
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1: IMSS A	EhHSTF7 HSF_ENTHI/57-81	IprfFKHsNfSSFVRQLNiYgFHFV
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c)	HSF HSF_YEAST/214-238	LpkyFKHsNfASFVRQLNmYgWHKV
<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly)	HSF HSF_DROME/88-112	LplnYKHnNmASFIRQLNmYgFHKI
<i>Homo sapiens</i> (Human)	HSF1 HSF1_HUMAN/57-81	LpkyFKHnNmASFVRQLNmYgFRKV

### 7.3. Datos predictivos *in silico* de la fosforilación del factor EhHSTF7

Una vez obtenida la secuencia de aminoácidos del EhHSTF7, ésta se introdujo en el programa NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) para buscar sitios potenciales de fosforilación tomando como criterio que los aminoácidos presentaran más de 0.5 de *score* en la probabilidad de fosforilación. De tal forma que el programa identificó 19 sitios de fosforilación en la secuencia completa del EhHSTF7 (Tabla 4, Gráfico 4.1), de los cuales 4 sitios se repiten ya que intervienen diferentes cinasas, por lo que se descartaron, quedando únicamente 14 sitios, de los cuales 4 sitios corresponden a S136, S138, Y181 y S191.

*Tabla 4. Datos predictivos de los sitios de fosforilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenida por un análisis in silico. (Blom et al., 1999) (Blom et al., 2004)*

#	aa	Secuencia	Score	Cinasa
13	T	QNDNTPPTF	0.539	p38MAPK
16	T	NTPTTFIVK	0.779	PKC
30	S	NDEKSKDLI	0.510	CKII
50	S	VVLESVQLA	0.500	cdc2
56	T	QLASTVIPR	0.703	PKC
65	S	FFKHSNFSS	0.533	PKG
68	S	HSNFSSFVR	0.808	PKC
124	S	EMYRSLQ	0.554	PKA
136	S	LQKESVSTT	0.547	cdc2
136	S	LQKESVSTT	0.514	PKA
138	S	KESVSTTNQ	0.940	Unsp
138	S	KESVSTTNQ	0.570	PKA
152	S	NMLFSLKLR	0.823	PKC
172	Y	TECLYFINQ	0.635	Unsp
181	Y	DENRYGQQQ	0.832	Unsp
181	Y	DENRYGQQQ	0.600	EGFR
181	Y	DENRYGQQQ	0.520	SRC
191	S	RNPPSTGIT	0.519	PKA
191	S	RNPPSTGIT	0.506	GSK3

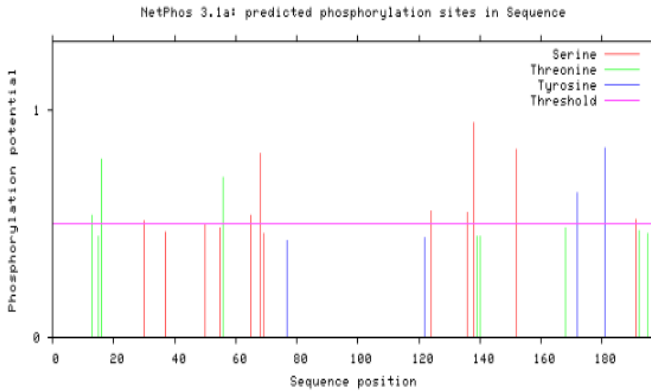
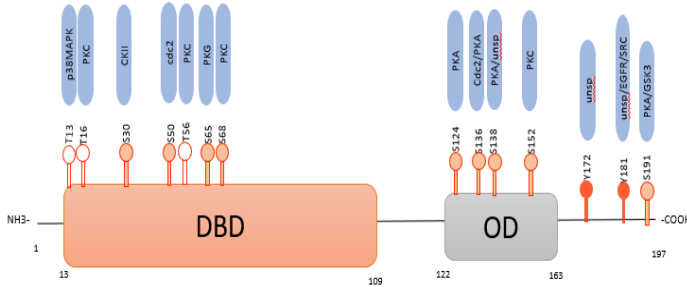


Gráfico 4.1 Predicción de los sitios de fosforilación de EhHSTF7.

La línea horizontal de color rojo indica el score de 0.5 por lo tanto aquellos aminoácidos que estuvieron por arriba de este valor fueron considerados como posibles sitios y contemplados en este análisis. Los aminoácidos de interés se indican con los colores rojo para serina, verde para treonina y azul para tirosina, y están por encima de la línea horizontal.


En la Figura 13 se muestran los sitios potenciales de fosforilación obtenidos por NetPhos 3.1 en la estructura del factor EhHSTF7 en donde también se representaron el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de oligomerización (OD) previamente descritos por Macías (2012). Además, se investigó cuáles serían las posibles cinasas que estarían fosforilando estos aminoácidos en *E. histolytica* encontrándose que son las cinasas EGFR, SRC, PKA, y GKS3. Es importante resaltar que los únicos aminoácidos fosforilados evidenciados experimentalmente hasta el momento en el EhHSTF7 han sido las tirosinas, y de acuerdo con el análisis

*in silico* las tirosinas 172 y 181 (Y172 y Y181) son las únicas que presenta el factor EhHSTF7 (Bello, 2015).



*Figura 13. Predicción de dominios y sitios de fosforilación in silico del factor EhHSTF7 de E. histolytica.*

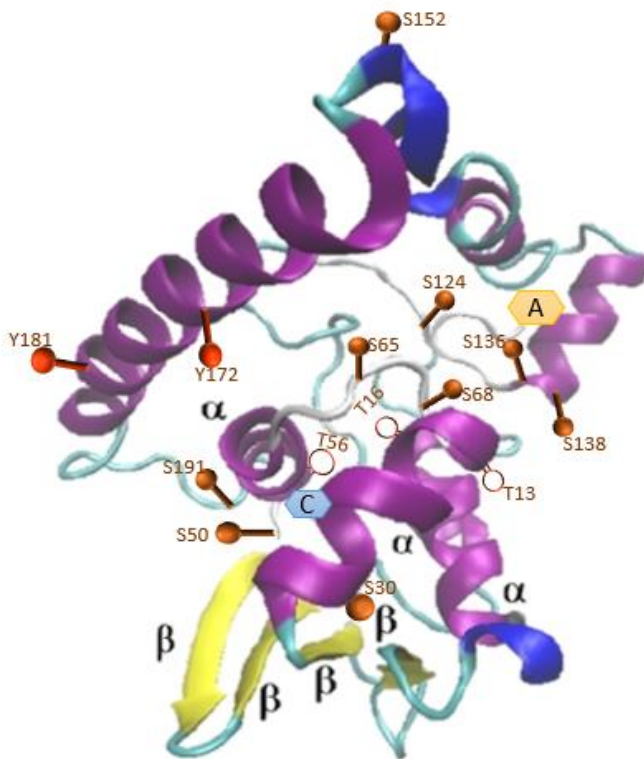
*Tomada y modificada de (Bello, 2015)*

Treonina (Y)  Serina (S)  Tirosina (T) 

#### *Dibujo 1. Sitios potenciales de fosforilación*

En la Figura 14 se muestra la representación 3D del factor EhHSTF7 obtenida del trabajo de tesis de Bello (2020), donde se muestran de color amarillo las 4  $\beta$ -hélices, y de color morado y azul las 3  $\alpha$ -hélices. A su vez se colocaron los sitios predictivos de fosforilación obtenidos de NetPhos 3.1. Mediante esta representación se aprecian los sitios que se encuentran más expuestos, entre ellos se encuentran las S50, S65, S68, S124, S136, S191 que, aunque se observa que tienen una proyección hacia el frente, la cercanía con otros sitios o con las mismas  $\alpha$ -hélices, lleva aun reacción por lo voluminosos que son los grupos funcionales provocando un impedimento estérico. Por otro lado, la S138, S152, Y172, Y181 no muestran en este modelo que

interaccionen con la cadena u otro sitio por su tamaño, y así poder interactuar con otras proteínas o enzimas; estos sitios se encuentran dentro del dominio de oligomerización (OD) y al final de la cadena, respectivamente de forma ascendente. Nuevamente por este medio se corrobora el área de los sitios que se han identificado experimentalmente como sitios de fosforilación, ubicados en la última  $\alpha$ -hélice.



*Figura 14. Ubicación de los sitios predictivos de fosforilación en la estructura 3D del EhHSTF7. Modificado de (Bello, 2020)*

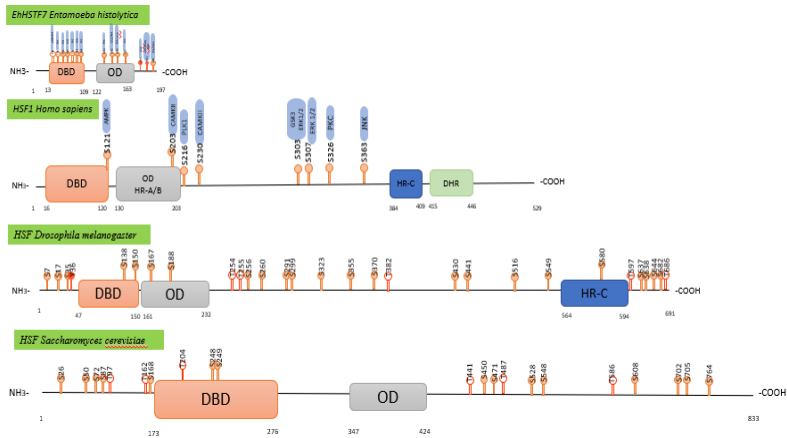


Figura 15. Comparación de la predicción de dominios y sitios de fosforilación in silico de HSFs de diferentes especies.

Los sitios de fosforilación de HSF1 humano han sido comprobados en su mayoría, el de las demás especies es en relación con la base de datos utilizada.

#### 7.4. Datos predictivos in silico de sumoilación del factor EhHSTF7

La sumoilación es una modificación que también ha sido reportada en otros HSTFs y que tienen un papel relevante en la activación de este factor (Bayona *et al.*, 2011; López Farfán., 2011), por lo que decidimos investigar si en la secuencia del factor EhHSTF7 estaban presentes sitios susceptibles a ser reconocidos por la maquinaria de sumoilación. Para esto, usando la herramienta bioinformática GPS-SUMO versión 2.0 (<http://sumosp.biocuckoo.org/>) y utilizando los límites para “sumoilación” e “interacción

SUMO” <all>, se identificaron 5 sitios de sumoilación posibles presentes en el factor EhHSTF7, los cuales están representados por intervalos de 4 aminoácidos donde se llevan a cabo las interacciones SUMO (Tabla 5).

Tabla 5. Datos predictivos de los sitios de sumoilación del factor EhHSTF7 de *E. histolytica* obtenidos por análisis in silico. (Ren et al., 2009) (Zhao et al., 2014).

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	P-Value	Type
HSF_ENTHI	18 - 22	DNTPTTF IVKLF ELVNDEK	15.393	0	0.561	SUMO Interaction
HSF_ENTHI	20	TPTTFIVKLFELVND	1.01	0	0.68	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	29	FELVNDEKSKDLICW	1.698	0	0.098	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	31	LVNDEKSKDLICWSR	2.064	0	0.39	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	46 - 50	EQNRPGF VVLES VQLASTV	12.594	0	0.578	SUMO Interaction
HSF_ENTHI	63	TVIPRFKHSNFSSF	0.409	0	0.952	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	81	LNHYGFHKVDHPLGQ	0.385	0	1	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	96	CFHHPFKEGHPPELL	1.755	0	0.481	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	102 - 106	FKEGHPE LLCKI RRQQPKR	4.69	0	0.845	SUMO Interaction
HSF_ENTHI	105	GHPPELLCKIRRQQPK	1.647	0	0.213	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	112	KIRRQQPKRAEAENA	0.877	0	0.228	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	125 - 129	NAEMYRS LLQRL EDLQKES	4.174	0	0.874	SUMO Interaction
HSF_ENTHI	134	QRLEDLQKESVSTTN	0.733	0	0.724	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	153 - 157	LNNMLFS LKRLI DEMEEQM	1.681	0	0.981	SUMO Interaction
HSF_ENTHI	154	NNMLFSKLRIDEME	0.978	0	0.279	Sumoylation Nonconensus
HSF_ENTHI	186	NRYGQQQRNPPSTG	1.23	0	0.136	Sumoylation Nonconensus

Los posibles sitios de sumoilación obtenidos por GPS-SUMO versión 2.0 fueron ubicados en la figura esquemática del factor EhHSTF7 (Figura 16), en donde se puede observar que tres de los sitios están dentro del DBD y dos en el dominio de oligomerización.

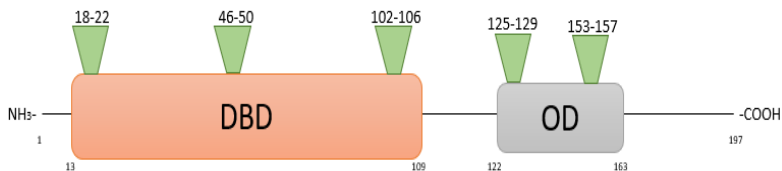


Figura 16. Predicción de sitios de sumoilación in silico del factor EhHSTF7 en *E. histolytica*

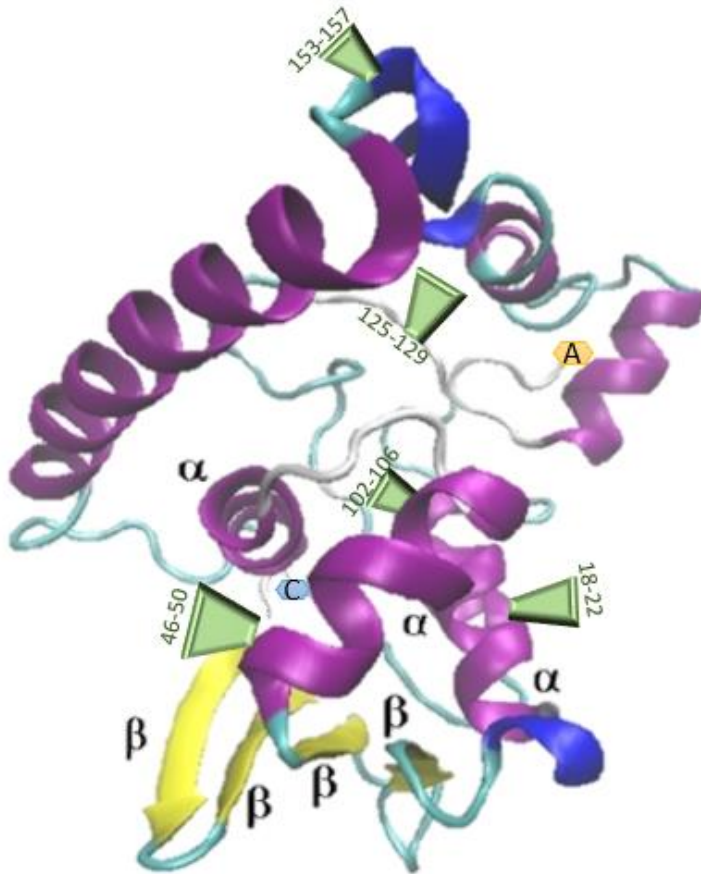
Val/Ile-X-Val/Ile-Val/Ile-X



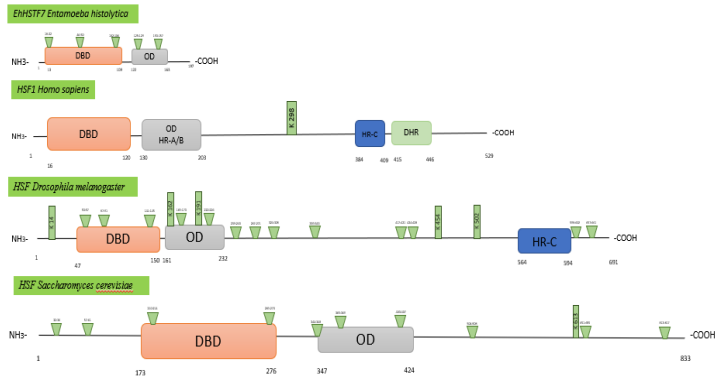
*Dibujo 2. Sitios potenciales de sumoilación. Secuencia de 5 aminoácidos que puede respetar el intervalo de secuencia Val/Ile-X-Val/Ile-Val/Ile-X aunque no siempre cumplen esta regla las interacciones SIM.*

En la Figura 17 se muestra la representación 3D del factor EhHSTF7 obtenida del trabajo de tesis de Bello (2020), donde se muestran de color amarillo las 4  $\beta$ -hélices, y de color morado y azul las 3  $\alpha$ -hélices. Se colocaron los sitios predictivos de sumoilación obtenidos de GPS-SUMO 2.0, los sitios de interacción SUMO (SIMs) de los aminoácidos 102-106 y 125-129 se ubican en una zona donde el volumen de los grupos funcionales provoca un impedimento estérico, haciendo complicado su interacción con el péptido SUMO. Mientras que los SIMs de los aminoácidos 18-22, 46-50 y 153-157 se ubican en una zona de fácil acceso para el péptido SUMO. Los SIMs 18-22 y 46-50 se ubican al inicio del dominio a ADN (DBD) y el SIM del aminoácido 153-157 se ubican en la sección final del dominio de oligomerización (OD).





*Figura 17. Ubicación de los sitios predictivos de sumoilación en la estructura 3D del EhHSTF7.  
Modificado de (Bello, 2020)*



*Figura 18. Comparación de la predicción de dominios y sitios de sumoilación in silico de HSFs de diferentes especies. Los sitios de sumoilación de HSF1 humano han sido comprobados en su mayoría, el de las demás especies es en relación con la base de datos utilizada.*

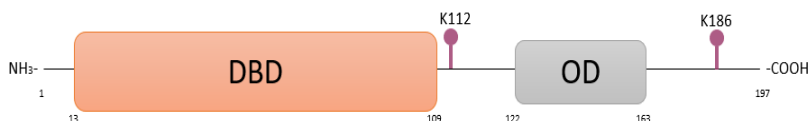
## 7.5. Datos predictivos in silico de acetilación del factor EhHSTF7

La acetilación es una modificación que puede ocurrir en diferentes proteínas, entre ellas las HSFs (Nakai, 2016). Es por esto que decidimos investigar si el EhHSTF7 presenta sitios potenciales de acetilación utilizando la plataforma GPS-PAIL versión 2.0 (<http://pail.biocuckoo.org/>) y un umbral alto <Threshold high >. Los resultados mostraron la presencia de 2 sitios de acetilación en el aminoácido Lys 112 y Lys 186 del factor EhHSTF7 de *E. histolytica*, seguido de que la histona HAT que podría estar accionando en ambos sitios es CREBBP (Tabla 6).


*Tabla 6. Datos predictivos de acetilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica obtenida por análisis in silico. (Xue et al., 2006).*

ID	Posición	Peptide	HAT	Score	Cutoff
HSP_ENTHI	112	KIRQQQFKAEAEVA	CREBBP	1.544	1.348
HSP_ENTHI	186	NRVQQQKRNFPSTG	CREBBP	1.867	1.348

En la (Figura 19), se esquematiza la posición de los dos sitios de acetilación, en donde se observa que el sitio K112 se encuentra entre los dominios DBD y OD, mientras que el sitio K186 está en el extremo -COOH.



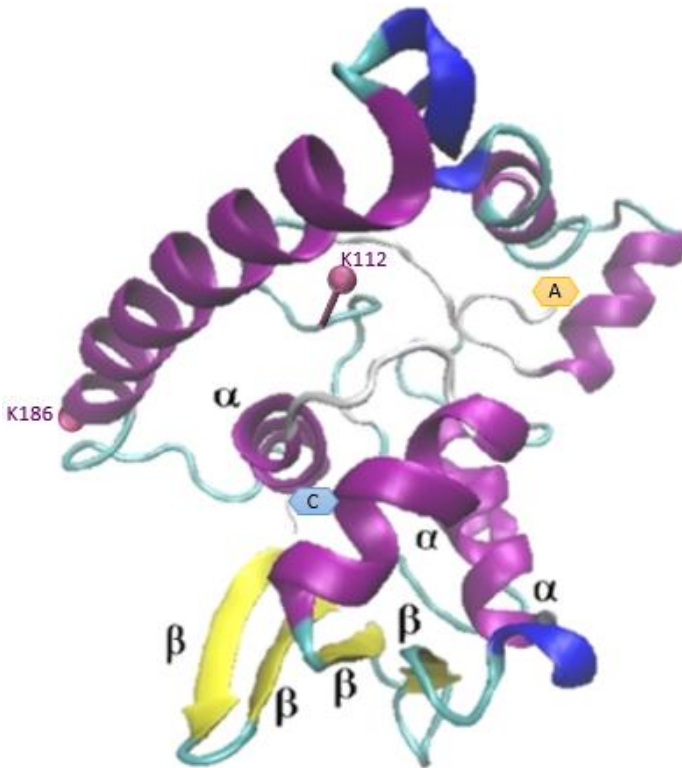
*Figura 19. Predicción de sitios de acetilación del factor EhHSTF7 de E. histolytica*

Lisina (K) 

### *Dibujo 3. Sitios potenciales de acetilación*

En la Figura 20 se muestra la representación 3D del factor EhHSTF7 obtenida del trabajo de tesis de Bello (2020), donde se muestran de color amarillo las 4  $\beta$ -hélices, y de color morado y azul las 3  $\alpha$ -hélices. Se colocaron los sitios de predicción de acetilación obtenido por GPS-PAIL 2.0, donde el aminoácido K112 ubicado después del dominio de ADN (DBD) de acuerdo con la ubicación en su representación 3D, la cercanía con las  $\alpha$ -hélices, puede interferir la acción de las histonas debido al impedimento estérico que

representa, sin embargo, si la conformación tridimensional es modificada podrían interaccionar las histonas con el aminoácido si se observa de la parte trasera. Por otro lado, el aminoácido K186 ubicado cerca del final de la cadena, se ubica en la parte posterior de la última cadena en la estructura 3D.



*Figura 20. Ubicación de los sitios predictivos de acetilación en la estructura 3D del EhHSTF7.  
Modificado de (Bello, 2020)*

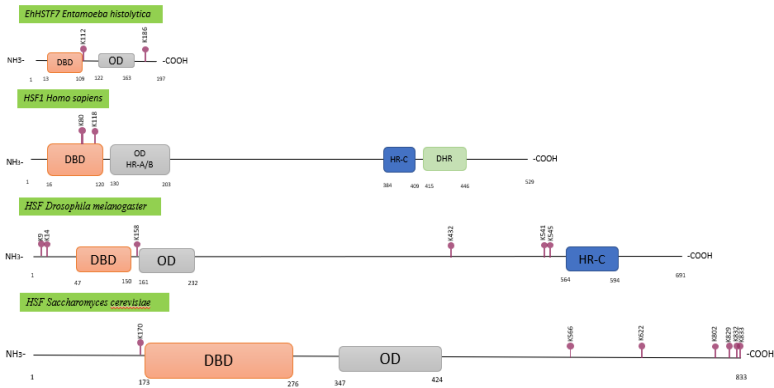


Figura 21. Comparación de la predicción de dominio y sitio de acetilación in silico de HSFs de diferentes especies. Los sitios de acetilación de HSF1 humano han sido comprobados experimentalmente, el de las demás especies es en relación con la base de datos utilizada.

## VIII. DISCUSIÓN

El factor de transcripción de choque térmico (HSTF) es una molécula maestra y crucial en la regulación transcripcional de los organismos y no solo ante el estrés térmico, sino también ante otras situaciones de estrés como la exposición a fármacos, la respuesta inmune, diferentes concentraciones de sales o iones incluso en eventos como la diferenciación o división celular (Nakai, 2016; Liebelt *et al.*, 2019 y Hietakangas *et al.*, 2003).

Los HSTF han sido identificados en varias especies a lo largo de la evolución. Primeramente, se identificaron en

*Drosophila* donde se buscaron secuencias que indujeran la transcripción de HSP70 obteniendo la secuencia consenso del HSE, y mediante la inducción de choque térmico fue como se observó que el HSF se unía al HSE. En levaduras se une el HSF al HSE de manera constitutiva pero su actividad transcripcional se activa por choque térmico a diferencia de *Drosophila* y células humanas, donde tanto la unión al HSE y su actividad transcripcional son inducidas por choque térmico. Se han reconocido en el humano seis diferentes HSFs: el HSF1, HSF2 y HSF3; éste último como pseudo gen y HSF4, que están involucrados en la respuesta a estrés térmico, mientras que el HSF5 y el HSF6 se expresan en células germinales como factor de transcripción en respuesta al estrés térmico (Nakai, 2016; Weizmann Institute of Science, 2020 y Wu, 2007). En el ratón se han identificado dos factores llamados HSF1 y HSF2, mientras que en el pollo se han identificado el HSF3 y HSF4. Todos ellos han conservado evolutivamente el DBD y el OD (Nakai, 2016; Nakai, *et al.*, 1997 y Fujimoto, 2010).

Se ha visto que en levaduras no solo el HSF regula la expresión de genes durante el choque térmico, sino que también en condiciones de crecimiento normal. Esto abrió camino para la investigación de cómo podrían estar involucrados los HSFs durante el crecimiento; con esto se puso en experimentación qué pasaría con la deficiencia de estos factores. En las células de ratón tras la deficiencia de los factores HSF1, HSF2 y HSF4 hubo defectos en procesos del desarrollo; el proceso de meiosis fue alterado en ausencia de los factores HSF1 y HSF2 en células germinales

masculinas y femeninas. De igual forma en linfocitos B de pollo se demostró que el HSF1, HSF2 y HSF3 son indispensables para el crecimiento celular y supervivencia en condiciones normales. Por otro lado, el HSF1 humano ha sido de los factores más estudiados principalmente por estar involucrado en el crecimiento y supervivencia de células cancerígenas y en la regulación de la expresión de las HSPs que se encuentran implicadas en el plegamiento, crecimiento celular, diferenciación, respuesta al estrés y vías apoptóticas (Nakai, 2016).

Como característica para que el HSF funcione requiere, una vez que censa el estrés, se trimerice, se fosforile y transloque al núcleo, en donde reconocerá el HSE del promotor del gen que va a transcribir. Por lo que como puede verse la fosforilación es una modificación postranscripcional fundamental para la activación de este factor (Bello, 2015; Nakai, 2016; Larson, *et al.*, 1988; Sorger, *et al.*, 1987 y Wu, 1984).

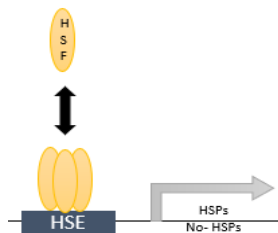


Figura 22. Estado de oligomerización de los HSFs en mamíferos. Modificado de (Nakai, 2016).

En *Entamoeba histolytica* se han identificado siete HSTF; EhHSTF1, EhHSTF2, EhHSTF3, EhHSTF4, EhHSTF5, EhHSTF6 y EhHSTF7, de los cuales el EhHSTF7 se encuentra sobreexpresado en trofozoítos de este parásito y particularmente se encuentra en mayor cantidad en el núcleo durante condiciones de estrés térmico y con emetina, indicando su presencia como regulador durante ambos tipos de estrés (Bello, 2015). Interesantemente en nuestros resultados al evaluar si el factor EhHSTF7 de *E. histolytica* presenta posibles sitios de fosforilación, encontramos que sí y son varios, localizados a lo largo de la secuencia.

Uno de los efectos de células eucariotas al responder a temperaturas elevadas es el incremento de proteínas de choque térmico (HSPs) que facilitan el doblamiento de proteínas y proteínas no-HSPs mediante diversas funciones incluidas la degradación (Nakai, 2016).

Durante procesos de retroalimentación negativa de las HSPs, estímulos directos, modificaciones transcripcionales, variabilidad del medio ambiente, estrés patológico, choque térmico, entre otros, inducen la activación de los HSFs, transformándose de monómeros a trímeros y uniéndose al ADN (Nakai, 2016).

La regulación de la actividad de los HSF interviene en la capacidad de control de la proteostasis; es decir, la homeostasis proteica, en la cual se encuentra involucrada la síntesis, doblamiento, mantenimiento conformacional y degradación proteica, así mismo su distribución subcelular, disposición y abundancia (Nakai, 2016; Klaips *et al.*, 2018).



Por otro lado, en *E. histolytica* se induce la expresión del gen *EhPgp5* cuando los trofozoítos son cultivados en presencia de emetina. Esto debido a la presencia de un HSE en su promotor, el cual es reconocido por un EhHSTF específicamente (Nieto *et al.*, 2017).

Una forma de identificar que las células se encuentran en choque térmico es mediante el aumento de peso molecular en los factores de respuesta, como en el caso del HSF1 humano, en el que ocurre una hiperfosforilación y trimerización (Nakai, 2016). En el caso del factor EhHSTF7 de *E. histolytica* en el trabajo de Bello se demostró que después de permanecer tiempos prolongados en condiciones de estrés térmico y con emetina, el factor aumento su peso molecular a 108 kDa, en comparación con su estado basal de 102 kDa, indicando una hiperfosforilación (Bello, 2015).

Lo anterior indica que la PTM de fosforilación es relevante en el proceso de activación del factor EhHSTF7 en pruebas de laboratorio.

Se sabe que el proceso o ciclo de fosforilación o defosforilación requiere de enzimas como las cinasas que presentan una actividad catalítica, transfiriendo grupos fosforilo desde un nucleósido trifosfatado (como ATP) hacia aminoácidos hidroxilados; éstas realizan el proceso de fosforilación, mientras que las fosfatasas catalizan la hidrólisis del enlace éster fosfórico, provocando la defosforilación (Hernández Fernández, 2012).

Las cinasas se clasifican de forma general en tres grupos: las que transfieren el grupo fosforilo hacia residuos de serina o treonina (seril(treonil)-proteína cinasa, S/TPK), las

que transfieren el grupo hacia residuos de tirosina (tiroxil-proteína cinasa, YPK) y las que lo transfieren a cualquiera de los tres aminoácidos anteriores (S/YPK). Y las fosfatasa se dividen también en tres grupos: las que catalizan la hidrólisis del enlace del fosfato a residuos de serina o treonina (S/TPP), las que catalizan en residuos de tirosina (YPP), y en ambos residuos (S/YPP) (Hernández Fernández, 2012). Sin embargo, en el parásito *E. histolytica*, aunque se ha reportado la presencia de cinasas (PK) y fosfatasa (PP), en diferentes el análisis *in silico* se ha demostrado que presenta fosfatasa inusuales en procesos de fosforilación, las cuales tienen una baja similitud con respecto a las fosfatasa humanas, haciéndolas un blanco importante para fármacos (Anwar & Goutinath, 2013).

Dentro de la literatura se ha encontrado en reportes de fosforilación de HSFs en diferentes organismos eucariontes, que el aminoácido fosforilado más frecuente es la serina, esto se debe a que la serina se ubica más frecuente como residuo, es decir, forman parte de secuencia consenso; otra de las razones es que al igual que la treonina y tirosina, presenta grupos hidroxilo que permiten la formación de ésteres de fosfato (Campbell & Farrell, 2016).

Dentro de los resultados de la modificación postraduccional de fosforilación planteados en la representación de la estructura primaria del factor (Figura 13) y comparando con la estructura 3D (Figura 14), los sitios posibles de fosforilación serían los aminoácidos serina (S138 y S152), tirosinas (Y172, Y181) y serina (S191). Esta última serina depende de la conformación que tome la estructura ya que, si

la S191 se encuentra proyectada detrás del plano las cinasas, podría interactuar con ese sitio, caso contrario podría presentar efecto estérico y no llevarse a cabo dicha interacción. Por otro lado, las cinasas que pueden interactuar con estos aminoácidos son EGFR, SRC, PKA, PKC y GSK3.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, la cinasa EGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico tiene actividad de tirosina cinasa, y en el ser humano sirve como marcador de supervivencia para células tumorales. Los ligandos activan los dímeros EGFR por medio de la trans-autofosforilación de residuos de tirosina en la zona citoplasmática del receptor; las tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para el reclutamiento de señales de transducción y activadores de sustratos intracelulares, que posteriormente estimulan señales intracelulares de cascadas de transducción que están envueltas en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Jassal & Castagnoli, 2007).

La cinasa EGFR fosforilada se ve involucrada en la formación de PI3K por medio de diferentes complejos, que de acuerdo con Nakada-Tsukui (2019), el genoma humano tiene un tipo de PI3K, la proteína vacuolar de soporte 34 (Vps34) identificada por una mutación de la misma que confiere sensibilidad a la temperatura. Esta proteína tiene como subunidad reguladora al p150; a su vez se ha identificado que Vps34 participa en el tráfico de membrana, endocitosis, fagocitosis y autofagia mediante la síntesis de fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P). En *E. histolytica* se presenta un homólogo de Vps34 (EHI\_096560) y de p150

(EHI\_044190), y aunque no se han demostrado su localización o función, sí se ha demostrado el papel del producto PtdIns3P, sugiriéndose que participa en la vía endocítica en *E. histolytica*, es decir que el homólogo de Vps34 se puede encontrar involucrado en la síntesis de PtdIns3P en fagosomas, por lo tanto, este homólogo (Vps34) juega un papel en la respuesta a estados de inanición. Así mismo, las PI3K provocan el reclutamiento de efectores PI como la cinasa Akt que se encuentra involucrada en procesos de supervivencia celular y procesos metabólicos. De las PI3K se conoce que igualmente tienen potencial como blancos de drogas/fármacos (Nakada-Tsukui, 2019). Por lo tanto, la presencia de la cinasa EGFR tiene un impacto en la fagocitosis, autofagia y endocitosis de *E. histolytica* en los estados de inanición, como proceso de supervivencia.

Por otro lado, la cinasa SRC presenta una actividad de tirosina cinasa en el ser humano, participa en vías de señalización que controlan la transcripción de genes, respuesta inmune, adhesión celular, progresión del ciclo celular, apoptosis, migración y transformación; juega un papel en la activación de otras proteínas cinasas; al igual que regula la organización del citoesqueleto mediante la fosforilación de sustratos específicos que se localizan en los filamentos de actina (Wang *et al.*, 2011). De la misma manera la cinasa SRC también puede fosforilar a EGFR, y afectar la transmisión de la señal celular (Jassal *et al.*, 2020). Con lo anterior podemos decir que la cinasa SRC podría fosforilar la cinasa EGFR afectando al factor EhHSTF7 de *E. histolytica* y estar involucrada en los procesos patológicos que presenta

el parásito específicamente en la adhesión y el proceso de fagocitosis.

Por lo tanto, en *E. histolytica* bajo las condiciones de choque térmico y exposición de emetina sería más probable que la acción de un homólogo de la cinasa EGFR tuviera acción de fosforilación de tirosinas en el factor EhHSTF7.

Ahora bien, la proteína cinasa A o PKA es una enzima que depende de la concentración de cAMP (adenosín monofosfato cíclico) el cual regula el metabolismo del glucógeno, lípidos y glucosa; al fosforilar el HSF1 humano promueve su localización nuclear y su actividad transcripcional (Murshid, *et al.*, 2010). Y de acuerdo con Nakada-Tsukui la PKA y PI3K humano comparte una homología significativa con la cinasa PI4 tipo III, en *E. histolytica* la homología se corroboró por medio de homología menor de  $1 \cdot 10^{-10}$  en la proteína de unión a PI4KIII $\alpha$ , es decir TTC7 (EHI\_118850), encargada de regular la señal de transducción de la membrana plasmática. Los humanos presentan dos isotipos de PI4K tipo III (EHI\_148700) de los cuales PI4KIII $\alpha$  este homólogo no presenta una secuencia de localización nuclear bipartita (NLS) y un dominio PH; sin embargo, aunque PI4KIII $\beta$  no presenta estos dominios, presenta zonas ricas en aminoácidos básicos y leucinas que potencialmente sirven como señales de localización nuclear y exportación. En el parásito *E. histolytica* presenta un homólogo de TTC7, proteína de unión a PI4KIII $\alpha$ , por lo tanto, se infiere que PI4KIII $\alpha$  tiene una acción como potencial PI4 cinasa; aunque no presentan NLS de forma predictiva, se especula que por la riqueza en aminoácidos básicos y

leucinas esto puede otorgar la función de NLS, al igual que el humano (Nakada-Tsukui, 2019). Esto concuerda con lo reportado por Bello (2015), quién detectó la presencia del factor EhHSTF7 en la fracción nuclear de trofozoítos de *E. histolytica* expuestos a emetina y a choque térmico, con un aumento en el peso molecular, de 102 a 108 kDa, sugiriendo que ante estos tipos de estrés el factor se oligomeriza y en el núcleo se hiperfosforila.

La proteína cinasa C o PKC forma parte de las cinasas que fosforilan diversas proteínas en los residuos de serina y treonina, entre estas están los factores de transcripción (Torrecillas, 2003). Dentro de las funciones fisiológicas en las que participa esta cinasa se encuentra el mecanismo de señalización que conduce a la proliferación celular, apoptosis, reordenamiento del citoesqueleto de actina, modulación de canales iónicos y el proceso de secreción. La activación de la PKC puede deberse a factores de crecimiento, señales extracelulares dadas por la activación de la fosfolipasa C, que provoca la hidrólisis de fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol dando como resultado a los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3); así mismo otros factores que intervienen en su actividad enzimática son el ion calcio y el estado de fosforilación de la enzima (Torrecillas, 2003). En el protozoario *E. histolytica* se ha evaluado el papel de la fosfolipasa C, que en el caso de este protozoario es responsable de la ruptura de fosfatidilinositol 4,5-fosfato [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] a inositol 1,4,5-trifosfato [Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>] y DAG, la fosfolipasa C se identificó como receptor que media la vía de señalización de

crecimiento.  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  está envuelto en la liberación del calcio del retículo endoplásmico; aunque este proceso está altamente conservado en eucariontes, en los protistas no se han encontrado genes ortólogos de receptores para  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Sin embargo, se ha observado que el calcio es liberado por  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  en organismos que no presentan este receptor. Por lo tanto, una forma de evaluar la acción de PKC en *E. histolytica* sería mediante la presencia de DAG en el núcleo, ya que su acumulación es seguida de la translocación de PKC al núcleo para la fosforilación de proteínas blanco, así como la evaluación de la presencia de  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , la cual está involucrada en la regulación transcripcional, la remodelación de cromatina y el ciclo celular (Nakada-Tsukui, 2019; Shi, *et al.*, 2006; Bua, *et al.*, 2013 y Stijf-Bultsma, *et al.*, 2015). Como parte de la funcionalidad de  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  junto con las unidades ricas en lectina Gal/GalNAc dependientes de colesterol provocan un incremento de calcio seguido de la adhesión a células de mamíferos, sugiriendo que  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  forma parte de la patogenia en la vía de señalización de la adhesión celular (Nakada-Tsukui, 2019).

Por último, la cinasa glucógeno sintasa (GSK3) es una serin/tirosin cinasa; se ha reportado que el isotipo  $\text{GSK3}\beta$  fosforila el HSF1 de humano regulándolo negativamente y promoviendo la salida nuclear del factor (Xavier *et al.*, 2000). Se ha demostrado que este isotipo inhibe la unión al ADN y la actividad transcripcional del HSF1 en células que presentan choque térmico, se ha observado un retardo en la atenuación del HSF1 durante la recuperación (Chengkai,

2018). Por lo tanto, en el caso del factor EhHSTF7 de *E. histolytica*, esta cinasa o un homólogo podría participar en una regulación negativa en la actividad del factor cuando es expuesto a un estrés térmico o en presencia de un fármaco antiamebiano como la emetina una vez que inicia el proceso de recuperación del parásito regulando la proteostasis.

La sumoilación ha sido reportada como una modificación postraducciona que a nivel molecular altera la superficie proteica afectando la interacción con otras macromoléculas, promoviendo cambios conformacionales (López Farfán, 2011). Se ha mencionado que interviene en procesos de regulación transcripcional, respuesta al daño del ADN, control epigenético, transporte núcleo-citoplasma, localización y estabilidad de proteínas, respuesta al estrés y progresión del ciclo celular; y afecta a las proteínas mediante la interacción de superficies o la inducción de cambios conformacionales que resulta de la interacción proteína-proteína. Se ha visto que la sumoilación en factores de choque térmico (HSF1 y HSF2) tiene un efecto positivo, aumentando su actividad transcripcional (López Farfán, 2011; Bayona *et al.*, 2011).

Algunos autores especulan que la PTM SUMO inhibe la interacción HSF2-ADN mediante la distribución aleatoria de la interferencia estérica; sin embargo, simulaciones de dinámicas moleculares (MD) de rayos X de alta resolución indican que son cambios conformacionales de DBD los responsables del efecto de inhibición (Feng *et al.*, 2016).

Se han identificado 3 isoformas (SUMO 1, 2 y 3) que se expresan en células animales. SUMO 1 comparte el 48% de



identidad con respecto a SUMO 2 y 3. Mientras que estas últimas presentan una similitud del 95%; conocidos comúnmente como SUMO 2/3 (Liebelt, *et al*, 2019). Tras el descubrimiento de los miembros de la familia SUMO 2/3 se observó que las modificaciones SUMO se acumulan después del choque térmico en comparación con SUMO 1, como es el caso del HSF1 humano, donde es modulada la transcripción de proteínas de choque térmico (HSP) durante etapas prolongadas de estrés. Así mismo, se determinó que específicamente SUMO 2 es reclutada para abrir la cromatina durante un choque térmico y se ha descrito como indispensable para la activación del gen inducible *HASPAIA* (HSP70) (Liebelt *et al.*, 2019).

En el trabajo de Ponder (2007) se determinó que todos los protozoarios parasíticos estudiados (excepto *Giardia* spp.) presentan un solo homólogo SUMO, mientras que *Trypanosoma cruzi* presenta dos homólogos, que son similares al de las levaduras. Así mismo mediante alineamientos se reveló que todos los parásitos presentan al menos un aminoácido después del motivo diglicina final, confirmando que necesitan de una enzima procesadora antes de que SUMO pueda ser conjugado (Ponder & Bogyo, 2007).

Como se mencionó, la sumoilación afecta la función de las proteínas y es de las siguientes tres maneras (Figura 23): 1) cuando la sumoilación se encuentra cerca de la superficie de una proteína blanco y prevé la unión de otra proteína, uniéndose a la proteína blanco, 2) creando una nueva unión

en la superficie, 3) induciendo el cambio conformacional, esto si la proteína blanco contiene un motivo SIM en adición a un sitio aceptor SUMO (Meulmeester, 2008).

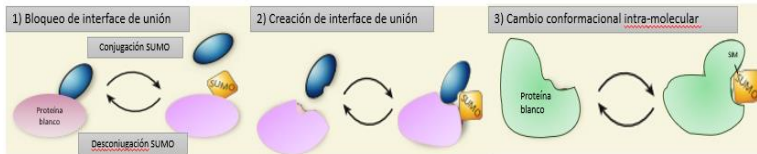


Figura 23. Cambios moleculares. Efectos de SUMO en la función proteica.

Tomado de Meulmeester, 2008. Modificación inglés-español

En condiciones normales de proteostasis, los blancos comunes de SUMO son las lisinas, que se encuentran localizadas en los motivos de sumoilación consenso y durante el choque térmico afecta a las lisinas que no se encuentran localizadas en estos motivos consenso demostrando la posibilidad de tener como objetivo una acción protectora; se puede sugerir que su acción protectora surge de la demostración de la mejora en la solubilidad proteica por medio de esta PTM, ya que previenen la agregación de proteínas que fueron plegadas incorrectamente antes de que sean destruidas por degradación proteosomal, cuyo proceso también es facilitado por chaperonas durante la recuperación (Liebelt *et al.*, 2019). Esto de manera concreta se lleva a cabo por una conjugación temprana de SUMO2/3 y una subsecuente ubiquitinación minimizando la agregación de proteínas asegurando su solubilidad y promoviendo su degradación (Liebelt *et al.*, 2019).

En el caso de los resultados predictivos de sumoilación de EhHSTF7 de *E. histolytica* (Tabla 5) no se presentaron zonas de sumoilación consenso, sin embargo, se mostraron 5 posibles interacciones con motivos SUMO (SIM) (Figura 16).

Las interacciones SUMO se llevan a cabo cuando se presentan las secuencias Ser-X-Ser o Val/Ile-X-Val/Ile-Val/Ile, permitiendo que las proteínas se unan a los SIMs (Kerscher, 2007).

Los SIM consisten en un núcleo hidrofóbico, flanqueado por residuos de aminoácidos ácidos, mediada por afinidad baja, es decir, por interacciones no covalentes entre SIM-proteínas y SUMO libre. Los SIM's se han encontrado en enzimas de maquinaria de conjugación SUMO, en proteínas blanco SUMO y en proteínas envueltas en represión SUMO-dependiente de genes de transcripción (Meulmeester, 2008).

Con lo anterior se puede sugerir que el parásito *E. histolytica* puede presentar la PTM de sumoilación únicamente en caso de verse afectado por factores de estrés como el choque térmico, promoviendo la protección, para el regreso a su estado basal.

Dentro de estos resultados se observó que algunos sitios de sumoilación (Figura 17) coinciden con sitios de fosforilación, ya sea porque se encuentran dentro de una cercanía considerable o se superponen. Por esta razón se realizó la investigación de cuáles eran las posibles afecciones por la presencia de estas posibles interacciones.

Meulmeester (2008) menciona que la fosforilación de una proteína blanco cerca de la unión o de sitios de sumoilación puede mejorar o inhibir la sumoilación.

De acuerdo con el trabajo de Hietakangas (2003), la fosforilación de la serina 303 del HSF1 humano es un prerrequisito para que ocurra la modificación SUMO inducible a estrés, específicamente en la sumoilación que ocurre en la lisina 298. Esto fue corroborado tras evaluar la mutación de serina 303, la cual previene la sumoilación del HSF1, indicando que la serina 303 media el efecto promotor de sumoilación por el cambio conformacional de HSF, exponiendo el sitio de sumoilación.

Los sitios de interacción SIM en *E. histolytica* que presentan una fosforilación o un sitio cercano de fosforilación, son la interacción que va del aminoácido 18-22 con un *p-value* 0.561 con una fosforilación en T16, S30, la interacción que va del aminoácido 46-50 con un *p-value* 0.578 con una fosforilación en S30, S50 y T56. Estas interacciones se encuentran dentro del DBD, al igual que la interacción SUMO del aminoácido 102-106 con un *p-value* de 0.845, sin embargo, este último no se encuentra cerca de posibles sitios de fosforilación. De acuerdo con sus respectivos *p-value*, y a que éste debe ser  $<0.5$ , la interacción de los aminoácidos 18-22 se acerca más a esta característica, posee un *score* mayor de 15, y los sitios de fosforilación más cercanos son T13, T16 y S30, sugiere que al encontrarse dentro del DBD, la sumoilación estaría apareciendo durante la recuperación del choque térmico, interpretando que la fosforilación de T16 (*score* 0.779) inhibe o mejora la sumoilación en el sitio de

interacción 18-22. De acuerdo con la estructura 3D (Figura 17), los SIMs 18-22 y 46-50 se encuentran en una localización donde es posible esta interacción, al igual que se proyecta que el sitio de fosforilación T13 (*score* 0.539) se encuentra más cercano que T16 (*score* 0.779), indicando que con respecto a su disposición estructural es más probable que T13 sea el que esté más relacionado con la inhibición o mejora del sitio de sumoilación, tal como ha sido reportado para los sitios 303 y 298 del HSF1 humano (Hietakangas *et al.*, 2003).

A la par del intervalo de interacción de aminoácidos 125-129 con un *p-value* 0.874 se encuentra cercano al sitio de fosforilación S124 con *score* 0.554, y el último intervalo del aminoácido 153-157 con un *p-value* de 0.981, al sitio S152 con un *score* de 0.823. Por lo que de acuerdo Hietakangas (2003) y Meulmeester (2008) en el último intervalo puede existir un efecto inhibitor de sumoilación en el factor EhHSTF7 entre la S124 y K155.

Los anteriores resultados, al representarlos en la estructura 3D (Figura 17), mostraron que los SIMs que estarían presentando un efecto estérico son los intervalos de aminoácidos 102-106 y 125-129 indicando que dicha interacción no sería posible a menos de que ocurra un cambio en la conformación estructural y de acuerdo con Meulmeester el sitio que podría presentar dicho cambio conformacional por la presencia de un sitio de fosforilación sería el intervalo de 125-129 ya que el sitio más cercano de fosforilación posible sería S138.

Las PTMs en la cromatina juegan un papel muy importante en la expresión de los genes, crecimiento celular y la diferenciación. Las marcas postraduccionales son alteradas por enzimas modificadoras de histonas, como las HATs y las HDACs. La acetilación de histonas es un proceso reversible, que promueve el desdoblamiento, tanto local como altamente ordenado de las estructuras de la cromatina facilitando la expresión génica (Park, 2018).

Se ha encontrado mediante análisis *in silico* que el genoma de *E. histolytica* presenta HAT pertenecientes a las familias GNAT y MYST, al igual que la presencia de proteínas capaces de remover los grupos acetilo presentes en la terminación amino de las histonas, específicamente HDACs de clase I. Se ha descrito que la histona H4 de *E. histolytica* comparte un 74% de identidad con la H4 de mamíferos, y la diferencia radica en la presencia de 3 inserciones extras en la sección amino terminal, y la última inserción presenta la característica de poseer 3 residuos de lisinas extra, que pueden servir como blancos de PTMS como acetilación o metilación (Lozano-Amado *et al.*, 2016).

Los factores de transcripción tienen una actividad de HAT y muchos correpresores presentan actividad desacetilasa, lo que ayuda a la formación de la estructura de la cromatina, afectando el estado transcripcional del gen (Raya, 2004).

Para inducir la transcripción de genes durante un choque térmico, el HSF se une a elementos regulatorios y recluta coactivadores, incluyendo enzimas modificadoras de cromatina y complejos que remodelan el nucleosoma que

mueve o desplaza histonas al promotor y al cuerpo del gen (Takii *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que los factores de transcripción como el HSF1 reclutan un componente de complejos de remodelación de cromatina (SWI/SNF), incluyendo BRG1 y la lisina acetiltransferasa p300 (KATB). La p300 estabiliza a HSF1 por medio de la acetilación de lisinas no-funcionales K208 y K298, el silenciamiento de p300 puede reducir la cantidad de la forma monomérica de HSF1, manteniendo el balance y así, la homeostasis celular (Takii *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018).

Por otro lado, la acetilación de K118 y K80 suprime la activación de HSF1 humano mediante la reducción de la actividad de la unión HSF1-DNA, pero no la estabilidad de la proteína HSF1 (Huang *et al.*, 2018).

El HSF1 humano interacciona con factores de transcripción miembros de la familia CREB (ATF1, CREB y CREM). Takii y colaboradores (2015) demostraron que el complejo HSF1-ATF1 promueve la expresión de HSP70 durante el choque térmico, al igual que es necesario para el reclutamiento máximo de coactivadores como BRG1 y KAT3B, y para el reclutamiento de SWI/SNF. Asimismo, evaluaron la interacción de ATF1-BRG1, determinando que promueve el estado activo de la cromatina de HSP70 durante el choque térmico. Por otro lado, la interacción ATF1-p300/CBP promueve el apagado “shutdown” de la expresión de HSP70 durante la recuperación de un estrés agudo; esto tiene una relación con el reclutamiento de p300/CBP mediado por ATF, ya que acelera el apagado de la actividad de

unión HSF1-DNA durante la recuperación, posiblemente mediante la acetilación de HSF1.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la Tabla 6, el EhHSTF7 de *E. histolytica* presenta dos sitios potenciales de acetilación en las lisinas K112 y K186, los cuales pueden interactuar con la HAT CREBBP. Esta HAT es una proteína de unión a elementos de respuesta cAMP, y actúa como un factor de transcripción (Stelzer *et al*, 2016). Interesantemente, únicamente K112 sería una lisina funcional en el EhHSTF7, ya que se encuentra cerca del DBD (Figura 19), por lo que de acuerdo con lo mencionado anteriormente sería el sitio donde se llevaría a cabo la posible reducción de la actividad de unión EhHSTF7-DNA, mientras que en la representación de la estructura 3D (Figura 20) la localización del aminoácido K112 indica que en la zona posterior del factor se lleva a cabo la interacción provocando un cambio conformacional. Por otro lado, aunque se tendría que evaluar experimentalmente si presenta la interacción con otros factores de transcripción, la interacción con CREBBP al estar relacionada con los miembros de la familia CREB, se podría suponer la formación del complejo EhHSTF7-ATF1, y decir que la acetilación del factor promueve la homeostasis metabólica al apagar la expresión del *hsp* (Takii *et al.*, 2015).



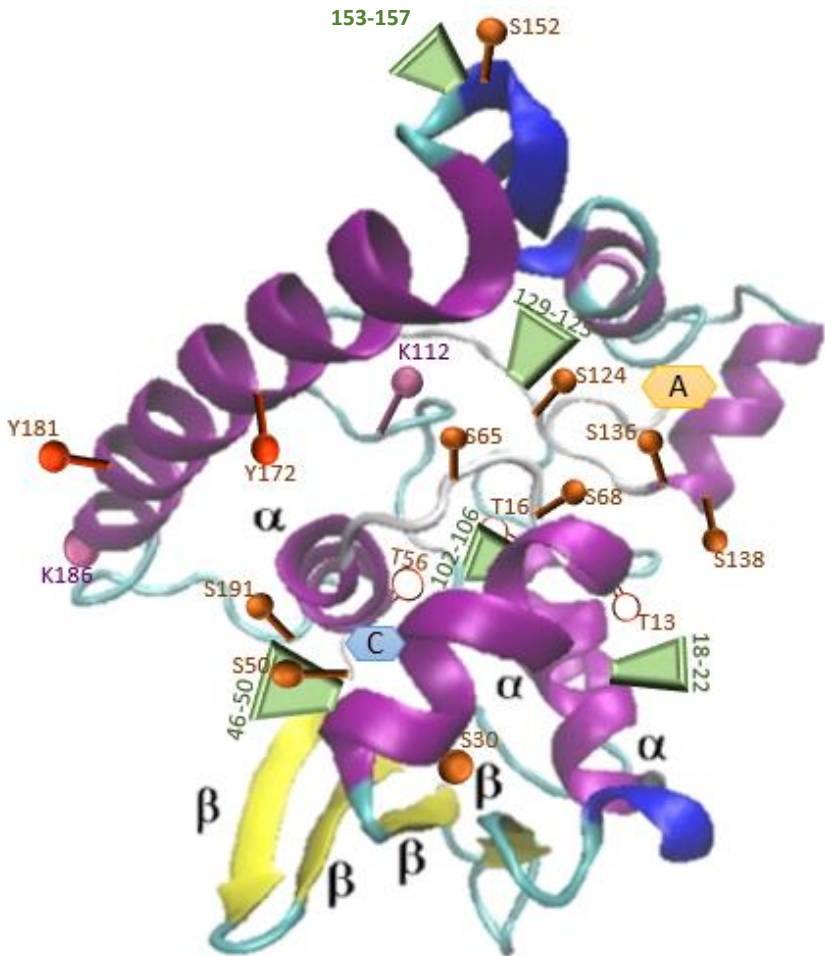


Figura 24. Ubicación de los sitios predictivos de fosforilación, sumoilación y acetilación en la estructura 3D del EhHSTF7. Modificado de Bello, 2020

## IX. CONCLUSIONES

El factor EhHSTF7 de *E. histolytica* presenta sitios potenciales para tres diferentes modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la sumoilación y la acetilación, los cuales fueron identificados mediante un análisis *in silico*. Los resultados sugieren que la fosforilación del factor puede afectar procesos celulares de proliferación, diferenciación y los relacionados con su virulencia como la fagocitosis y la adhesión; de igual forma tras la inducción de estrés, que puede ser provocado por estados de inanición, e intervenir en la supervivencia y la regulación de la proteostasis. Por otro lado, la sumoilación se presenta como una forma de reestablecer el sistema después de una afección por estrés que está de la mano con la fosforilación, ya que en el caso de *E. histolytica* al parecer la sumoilación y la fosforilación compiten y en situación de estrés la fosforilación se mantiene por más tiempo, mientras que la sumoilación toma lugar cuando se regresa al estado basal. Por último, la acetilación se mostró como un proceso de estabilidad en las proteínas, y en EhHSTF7 posiblemente tenga una actividad de promover la expresión de las HSP durante el choque térmico, y a su vez por el reclutamiento de coactivadores y factores por parte de la HAT reducir la actividad del factor y así mantener la homeostasis después de la respuesta al choque térmico.

## X. PERSPECTIVAS

- Con este trabajo se da pauta a entender cómo las modificaciones postraduccionales intervienen en la transcripción del factor de choque térmico EhHSTF7 y afectan el metabolismo del parásito *E. histolytica*.
- El conocer la presencia de la fosforilación, sumoilación y acetilación en el EhHSTF7 y los factores que intervienen en los mecanismos de señalización, da camino a nuevas investigaciones.
- El análisis *in silico* se ha vuelto una herramienta de inicio para brindar un camino al investigador y dilucidar la orientación de una investigación experimental.

## XI. REFERENCIAS

### 11.1. Artículos consultados

- Ankri, S. (2002). Strategies of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* to evade the innate immune responses of intestinal epithelial cells. *Journal of Biosciences*, 27(6), 609-614. doi:10.1007/BF02704855
- Anwar, T., & Goutinath, S. (2013). Analysis of the Protein Phosphatome of *Entamoeba histolytica* Reveals an Intricate Phosphorylation Network. *PLoS ONE*, 8(11), e78714. doi:10.1371/journal.pone.0078714
- Aurrecochea C, B. A. (2011). AmoebaDB and Microsporididb: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. *Nucleic Acids Res.*, D612-9. doi:10.1093/nar/gkq1006
- Bakatselou, C., & Clark, C. (2000). A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Achieves of Medical Research*, 31.
- Bayona, J. C., Nakayasu, E. S., Laverrière, M., Aguilar, C., Sobreira, T. J., Choi, H., . . . Alvarez, V. E. (2011). SUMOylation Pathway in *Trypanosoma cruzi*: Functional Characterization and Proteomic Analysis of Target Proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(12). doi:10.1074/mcp.M10.007369
- Bernes, S., Siman-Tov, R., & Ankri, S. (2005). Epigenetic and classical activation of *Entamoeba histolytica* heat shock protein 100 (EHsp100) expression. *FEBS Letters*, 30111(579), 6395–6402. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.101
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., & Bhattacharya, S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*.

- International Journal of Parasitology*, 30(4), 401-410.  
doi: 10.1016/S0020-7519(99)00189-7
- Bua, D., Martin, G., Binda, O., & Gozani, O. (2013) Nuclear phosphatidylinositol-5-phosphate regulates ING2 stability at discrete chromatin targets in response to DNA damage. *Sci Rep.* 3:2137. doi: 10.1038/srep02137
- Chengkai, D. (2018). The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: from proteomic stability to oncogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 373(1738). doi:10.1098/rstb.2016.0525
- Coltell, O. (2003). La disciplina de Bioinformática: definición y caracterización. *Informática y Salud*, 43, 29-34. Obtenido de [http://www.congana.org/Seis/is/is43/IS43\\_29.pdf](http://www.congana.org/Seis/is/is43/IS43_29.pdf)
- Delgadillo, D. M. (2003). Resistencia a múltiples drogas. Un mecanismo de evasión celular ante los tratamientos quimioterapéuticos. *Revista Casa del Tiempo*. Obtenido de <http://www.uam.mx/difusion/revista/nov2003/index.html>
- Elguero, B., Gonilski, D., Cárdenas, C., Fuertes, M., & Arzt, E. (2019). Modifications in the Cellular Proteome and Their Clinical Application. *Medicina*, 79(61), 570-575. Recuperado el 2020, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31864228/>
- Feng, H., Wang, S., Guo, L., Puneekar, A. S., Ladenstein, R., Wang, D.-C., & Liu, W. (2016). MD simulation of high-resolution -ray structures reveals post-translational modification dependent conformational changes in HSF-DNA interaction. *Protein Cell*, 7(12), 916-920. doi:10.1007/s13238-016-0331-0

- Fleta, J., Bueno, O., & Bueno, M. (2000). Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. *Elsevier*, 3(36), 96-101. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-amebiasis-intestinal-absceso-hepatico-amebiano-15325>
- Fritah, S., Col, E., Boyault, C., Govin, J., Sadoul, K., Chiocca, S., . . . Vourc'h, C. (2009). Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat shocked cells. *Molecular biology of the cell*, 20(23), 4976-4984. doi:10.1091/mbc.e09-04-0295
- Fujimoto M, Nakai A (2010) The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J* 277:4112–44125
- Gómez Sandoval, J., Talamás Rohana, P., & Aguirre García, M. (2014). Proteínas fosfatasas de parásitos: más allá de una función. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 4-12. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000100002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100002)
- Gómez-Pastor, R., Burchfiel, E., & Thiele, D. (2018). Regulations of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 4-19. doi:10.1038/nrm.2017.73
- Gutiérrez Cisneros, M. J. (2008). Amebiasis en España: Diagnóstico Molecular y Estudio Epidemiológico de una Parasitosis Emergente. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de <https://epri-nts.ucm.es/8205/1/T30232.pdf>
- Hernández Fernández, R. A. (2012). Kinasas y fosfatasas: el yin y el yang de la vida. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 11(1), 15-24. Obtenido de

scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1729-519X2012000100004

- Hietakangas, V., Ahlskog, J., Jakobsson, A., Hellesuo, M., Sahlberg, N., Holmberg, C., . . . Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of Serine 303 Is a Prerequisite for the Stress-Inducible SUMO Modification of Heat Shock Factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(8), 2953-2968. doi:10.1128/MCB.23.8.2953-2968.2003
- Holmberg, C. I., Tran, S. E., Eriksson, J. E., & Sistonen, L. (2002). Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27(12), 619-627. doi:10.1016/S0968-0004(02)02207-7
- Huang, C., Wu, J., Xu, L., Wang, J., Chen, Z., & Yang, R. (2018). Regulation of HSF1 protein stabilization: An update review. *European Journal of Pharmacology*, 822(1), 69-77. doi:10.1016/j.ejphar.2018.01.005
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO reports*, 8(6), 550-555. doi:10.1038/sj.embor.7400980
- Klaips, C. L., Jayaraj, G. G., & Hartl, F. U. (2018). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of cell biology*, 217(1), 51-63. doi:10.1083/jcb.201709072
- Kregel, K. (2002). Molecular Biology of Thermoregulation Invite Review: Heat shock proteins: modify factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92.
- Kuhn, M. L., Zemaitaitis, B., Hu, L. I., Sahu, A., & Sorensen, D. (2014). Structural, Kinetic and Proteomic Characterization of Acetyl Phosphate-Dependent Bacterial Protein Acetylation. *PLoS ONE*, 9(4), e94816. doi:10.1371/journal.pone.0094816

Referencias

- Larson, J.S., Schuetz, T.J., Kingston, R. E., (1988) Activation in vitro of sequence-specific DNA binding by a human regulatory factor. *Nature* 335:372–375
- Liebelt, F., Sebastian, R. M., Moore, C. L., Mulder, M., Ovaa, H., Shoulders, M. D., & Vertegaal, A. (2019). SUMOylation and the HSF1-Regulated Chaperone Network Converge to Promote Proteostasis in Response to Heat Shock. *Cell reports*, 26(1), 236-249e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.027
- Loftus, B., Anderson, I., & Davies, R. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433, 865-868. doi:10.1038/nature03291
- Lorenzi, H., Puiu, D., Miller, J., Brinkac, L., Amedeo, P., Hall, N., & Caler, E. (15 de Jun de 2010). New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. (J. Carlton, Ed.) *PLoS neglected tropical diseases*, 4(6), 716. doi:10.1371/journal.pntd.0000716.
- Lozano-Amado, D., Herrera-Solorio, A. M., Valdés, J., Alemán-Lazarini, L., Almaraz-Barrera, M., Luna-Rivera, E., . . . Hernández-Rivas, R. (2016). Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear boies in *Entamoeba histolytica*. *Parasites & Vectors*, 9(19). doi: 10.1186/s13071-016-1298-7
- Macías, M., Sánchez, L., Gómez, A., Náder, E., Estanislao, C., & Gómez, M. (2012). *Los factores de transcripción de choque térmico (HSTFs) de Entamoeba histolytica en modelos de patogénesis de las enfermedades infecciosas II*. Benemértia Universidad de Puebla.
- Meulmeester, E., & Melchoir, F. (2008). Cell biology: SUMO. *Nature*, 452(10), 709-711.



- Murshid, A., Chou, S., Prince, T., Zhang, Y., Bharti, A., & Calderwood, S. (2010). Protein Kinase A Binds and Activates Heat Shock Factor 1. *PLoS ONE*, 5(11), e13830. doi:10.1371/journal.pone.0013830
- Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N., Maehama, T., & Nozaki, T. (2019). Phosphatidylinositol Kinases and Phosphatases in *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 9(150). doi: 10.3389/fcimb.2019.00150
- Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K (1997) HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 17:469–481
- Nieto, A., Pérez Ishiwara, D. G., Orozco, E., Sánchez Monroy, V., & Gómez García, C. (2017). A Novel Heat Shock Element (HSE) in *Entamoeba histolytica* that Regulates the Transcriptional Activation of the EhPgp5 Gene in the Presence of Emetine Drug. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7(492). doi:10.3389/fcimb.2017.00492
- Nieto, A., Pérez, D. G., Orozco, E., Paz, F., & Gómez, C. (2005). *Entamoeba histolytica* EhPgp5 transcriptional activation depends on putative emetine response elements. *Experimental Parasitology*, 110.
- Orozco, E., López, C., Gómez, C., Pérez, D., Marchat, L., Bañuelos, C., & Delgadillo, D. (2002). Multidrug resistance in protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 51(4).
- Pérez, D., Gómez, C., López-Bayghen, E., Tannich, E., & Orozco, E. (1998). Transcriptional analysis of the EhPgp5 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug

- resistant mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(13).
- Pérez-Sala Gozalo, M. (2012). Modificaciones postraduccionales de proteínas: mecanismos clave en el control de su actividad. *SEBBM*. doi:10.18567/sebbmdiv\_RPC.2012.01.2
- Pinilla, A. E., López, M. C., & Viasus, D. F. (2008). Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista médica de Chile*, 136(1), 118-124. doi:10.4067/S0034-98872008000100015
- Ponder, E. L., & Bogyo, M. (Nov de 2007). Ubiquitin-Like Modifiers and Their Deconjugating Enzymes in Medically Important Parasitic Protozoa. *Eukaryotic Cell*, 6(11), 1943-1952. doi:10.1128/EC.00282-07
- Raya Pérez, J. C. (2004). La estructura de la cromatina y la regulación de la transcripción. *Acta Universitaria. Universidad de Guanajuato*, 14(1), 59-66. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41614106>
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2), 253-266. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.006.
- Romero-Díaz, M., Gómez, C., López-Reyes, I., Martínez, M. B., Orozco, E., & Rodríguez, M. A. (2007). Structural and functional analysis of the *Entamoeba histolytica* EhrabB gene promoter. *BMC molecular biology*, 8, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-82>
- Shi, X., Hong, T., Walter, K., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., et al. (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96-99. doi: 10.1016/j.cell.2066.11.042
- Stijf-Bultsma, Y., Sommer, L., Tauber, M., Baalbaki, M., Giardoglou, P., Jones, D., et al. (2015) The basal transcription

- complex component TAF3 transduces changes in nuclear phosphoinositides into transcriptional output. *Mol. Cell* 58, 453-467. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.009
- Stelzer, G., Rosen, R., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., . . . Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis. (W. I. Science, Ed.) *Current Protocols in Bioinformatics*, 1.30.1-1.30.33. doi:10.1002/cpbi.5.
- Sorger, P. K., Pelham, H.R., (1987) Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J* 6:3035–3041
- Takii, R., Fujimoto, M., Tan, K., Takaki, E., Hayashida, N., Nakato, R., . . . Nakai, A. (2015). ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. *Mol. Cell Biol.* 35(1), 11-25. doi:10.1128/MCB.00754-14
- Trejos-Suárez, J., & Castaño-Osorio, J. C. (2009). Factores de virulencia del patógeno intestinal. *Infectio*, 13(2), 100-110. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v13n2/v13n2a05.pdf>
- Vihervaara, A., & Sistonen, L. (2014). HSF1 at a glance. *Journal of Cell Science*, 127, 261-266. doi:10.1242/jcs.132605
- Wang, Y., Cao, H., Chen, J., & McNiven, M. A. (01 de May de 2011). A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Molecular Biology of the Cell*, 22(9), 1421-1624. doi: 10.1091/mbc.e10-09-0785
- Wu, C., (1984) Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature* 311:81–84
- Wu H, Xu J, Pang ZP, et al. (2007) Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation

bias in human embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(34):13821-13826. DOI: 10.1073/pnas.0706199104.

Xavier, I. J., Mercier, P., McLoughlin, C., Ali, A., Woodgett, J., & Ovsenek, N. (2000). Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 29147–29152. doi:10.1074/jbc.M002169200

## 11.2. Tesis

Bello, F. (2015). Immunolocalización del factor EhHSTF7 en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* expuestos a estrés. *Tesis Maestría*. IPN Escuela de Medicina y Homeopatía.

López Farfán, D. C. (septiembre de 2011). Análisis de la función de la RPB7, la SUMO E3 ligasa SIZ1 y la SUMOilación de la cromatina en la regulación del sitio de expresión de la VSG en *Trypanosoma brucei*. España: Universidad de Granada. Obtenido de Referencias <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/21001/20353364.pdf?sequence=1>

Park, W. J. (2018). Anthranilamide 유도체의 합성과 PCAF Histone Acetyltransferase 저해 활성 및 세포독성 / Synthesis and PCAF Histone Acetyltransferase Inhibitory Activity and Cytotoxicity of Anthranilamide Derivatives. Daegu, Korea: Catholic University of Daegu. Obtenido de <http://dcollection.cu.ac.kr/jsp/common/DcLoOrgPer.jsp?sItemId=000000003848>

### 11.3. Libros Consultados

- Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2016). *Bioquímica, 8a. edición. Volumen I*. México: CENGAGE Learning.
- Lewin, B. (2008). *GENESIS IX*. España: Reverté.
- Llop A. (2001). Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III. Cap. 84 Amebas. Editorial Ciencias Médicas, Habana.
- Nakai, A. (2016). *Heat Shock Factor*. Japan: Springer.

### 11.4. Páginas Web Consultadas

- Austin, C. (2020). *Bioinformática: National Human Genome Research Institute*. Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 294(5), 1351-1362. Obtenido de NetPhos-3.1: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunka, S. (2004). *Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino sequence*. Obtenido de NetPhos 3.1: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>
- Claros, G. M. (s.f.). *Modificaciones covalentes*. Obtenido de BioROM: [http://www.biorom.uma.es/contento/av\\_bma/apuntes/T16/modCov.htm](http://www.biorom.uma.es/contento/av_bma/apuntes/T16/modCov.htm)
- Coltell, O. (2003). La disciplina de Bioinformática: definición y caracterización. *Informática y Salud*, 43, 29-34. Obtenido de [http://www.conganat.org/Seis/is/is43/IS43\\_29.pdf](http://www.conganat.org/Seis/is/is43/IS43_29.pdf)

Referencias

- EHI\_200020 heat shock transcription factor, putative.* (2020).  
Obtenido de AmoebaDB:  
[https://amoebadb.org/amoeba/app/re-cord/gene/EHI\\_200020#PdbSimilarities](https://amoebadb.org/amoeba/app/re-cord/gene/EHI_200020#PdbSimilarities)
- Entamoeba histolytica Assembly and Gene Annotation.* (2020).  
Obtenido de ENSEMBL: [https://protists.ensembl.org/Entamoeba\\_histolytica/Info/Annotation/](https://protists.ensembl.org/Entamoeba_histolytica/Info/Annotation/)
- INSST. (2015). *Entamoeba histolytica*. Recuperado el 22 de marzo de 2020, de DATABIO: <https://insst.es/documentos/94886/354041/Entamoeba+histolytica+2016.pdf/2eb89214-8e9b-4ccd-b392-a8eb95eb0940>
- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fargat, A., . . . D'Eustachio, P. (2020). *The reactome pathway knowledgebase. Nucleic acids research*. doi:10.1093/nar/gkz1031
- Jassal, B., & Castagnoli, L. (2007). *Signaling by EGFR*. Obtenido de Reactome, 73: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-177929>
- Margulies, E. (2020). *Promotor*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Promotor>
- Ren, J., Gao, X., Jin, C., Zhu, M., Wang, X., Shaw, A. (2009). Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics*, 9, 3406-3412
- Secretaria de Salud. (2020). *Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información*. Obtenido de Gobierno de México, Salud:  
<https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>

- Weizmann Institute of Science (2020) HSF5 gene (protein coding): Heat shock transcription factor 5. *Gene Cards. The Human Gene Database*. Obtenido de [https://www.genecards.org/cgi-bin/card-disp.pl?id\\_type=hgnc&id=26862](https://www.genecards.org/cgi-bin/card-disp.pl?id_type=hgnc&id=26862)
- Xue, Y., Li, A., & Yao, X. (02 de Jan de 2006). *PAIL: Prediction of Acetylation on Internal Lysines*. Obtenido de GPS-PAIL: <http://bdmpail.biocuckoo.org/prediction.php>
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W325-W330.