



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Expresión de las metiltransferasas de lisina EhHKMT2 y
EhHKMT4 de *Entamoeba histolytica* durante la eritrofagocitosis”**

T E S I S

Que presenta

SUSANA MUNGUÍA ROBLEDO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Director de tesis:

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco al CINVESTAV y al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular por brindarme un lugar dentro de sus aulas y laboratorios.

Agradezco al Dr. Mario Alberto Rodríguez por aceptarme en su laboratorio y como parte de su equipo de trabajo. Gracias Doctor por acompañarme durante este proceso que de manera personal e intelectual no fue nada fácil. Por escuchar cada una de mis dudas y ayudarme con paciencia a resolverlas, por alentar cada una de mis ideas y por dirigirme en todo momento.

Agradezco también a mis asesoras, la Dra. Esther Orozco, la Dra. Ana Lorena Gutierrez Escolano y la Dra. Rossana Arroyo, por ser parte de mi comité evaluador y por cada una de sus aportaciones a mi trabajo y la atención que me brindaron cada vez que acudí a ellas.

Al grupo de trabajo en general, y en especial a mis compañeros de laboratorio Ed, Jeni, Chris, Ramón, Martha, Mariana, Josúe y Javi; al auxiliar Carlos Vázquez y al técnico Mario; a Miriam, Mitzi y Ausencio del laboratorio de la Dra Orozco. A todos ustedes, gracias por ayudarme durante el aprendizaje de técnicas y procedimientos y por escucharme en todo momento, pero también gracias por enseñarme que la vida va más allá de lo que puedas aprender en un laboratorio. Gracias por todos esos buenos momentos y también por los malos que nos han hecho personas más fuertes. Gracias por pasar de ser buenos compañeros de trabajo, a ser unos buenos amigos. Los quiero mucho.

También quiero agradecer a todos los amigos que me brindaron apoyo durante estos últimos dos años. De manera muy especial gracias a Helenita y Raúl, mis mejores amigos, porque han escuchado mil veces mis problemas con la tesis, me han visto llorar y me han ayudado a salir adelante; gracias porque no me dejaron sola ni un momento. Gracias por pasar conmigo por los peores y los mejores momentos. Este logro también es de ustedes, los amo con todo mi corazón para siempre.

Agradezco especialmente a mi familia, mi papá Carlos, mi mamá Rocío a mi hermano Carlos y a mi hermana Laura y su esposo Omar. Porque han apoyado cada una de mis decisiones, desde el día que decidí estudiar una maestría. Porque me escuchan siempre aunque no entiendan de qué les estoy hablando. Por creer en mí a veces más de lo que yo misma creo. Y creo que no se los digo lo suficiente, pero todo lo que he logrado hasta ahora, es porque ustedes están conmigo, soy el reflejo de mi familia y me siento muy orgullosa de ello. Gracias por ayudarme a hacer un sueño posible, aunque no comprendan el por qué. Los amo.

Finalmente agradezco a Dios por la vida que me ha dado, la sabiduría que ha puesto en mí y por darme entendimiento a cosas que son ajenas para muchas personas. Porque a pesar de que no fue un camino fácil, Él permaneció siempre fiel y Su palabra me dio la fortaleza para seguir:

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas” (Josué 1:9)

ÍNDICE

Índice	i
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción	1
• Epidemiología	1
• Características morfológicas	4
• Ciclo de vida	6
• Cuadro clínico	8
• Diagnóstico	10
• Tratamiento	12
• Patología	13
• Factores de virulencia	13
Antecedentes	18
• Regulación epigenética	18
• Metiltransferasas de lisina y marcas epigenéticas de lisina	19
• Metiltransferasas de lisina en <i>Entamoeba histolytica</i>	24
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivo general	33

Objetivos particulares	33
Estrategia experimental	34
Metodología	35
• Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	35
• Eritrofagocitosis	35
• Obtención de RNA total	36
• Diseño de iniciadores	36
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
• Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	40
• Electroforesis de proteínas	40
• Western blot	40
• Microscopía confocal	41
• Análisis estadístico	42
Resultados	43
• Localización de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la fagocitosis	43
• Nivel de transcripción de <i>Ehhkmt2</i> y <i>Ehhkmt4</i> durante la eritrofagocitosis	49
• Niveles de expresión de proteína de EhHKMT2y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis	54
Discusión	56
Conclusiones	61
Perspectivas	62
Bibliografía citada	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de amibiasis en México en los últimos 20 años.	3
Figura 2. Morfología de <i>E. histolytica</i> .	5
Figura 3. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	7
Figura 4. Ejemplos representativos de estructuras que contienen el dominio SET.	21
Figura 5. Localización subcelular de EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4.	25
Figura 6. Reconocimiento de marcas epigenéticas sobre histonas comerciales catalizadas por EhHKMTs.	26
Figura 7. Localización de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis.	28
Figura 8. Asociación de EhHKMT2 y EhHKMT4 con el complejo EhCPADH.	29
Figura 9. Localización subcelular de EhHKMT2 durante la eritrofagocitosis.	45
Figura 10. EhHKMT2 se localiza en prolongaciones citoplásmicas.	46
Figura 11. Localización subcelular de EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis.	47
Figura 12. EhHKMT4 se localiza en el núcleo durante la eritrofagocitosis.	48
Figura 13. <i>Ehhkmt2</i> y <i>Ehhkmt4</i> amplifican a 60°C.	50
Figura 14. Incremento en el nivel de transcrito de <i>Ehhkmt2</i> durante la eritrofagocitosis.	52

Figura 15. El nivel de transcrito de *Ehhkmt4* se mantiene durante la eritrofagocitosis. 53

Figura 16. Expresión de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis. 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores para RT-qPCR	37
Tabla 2. Condiciones para PCR de punto final	38
Tabla 3. Condiciones para RT-qPCR	39

RESUMEN

Entamoeba histolytica posee diferentes factores de virulencia que deben ser regulados para poder provocar enfermedad en el hospedero que parasita. Uno de los mecanismos de regulación estudiados en diferentes organismos es la remodelación de la cromatina a través de la metilación de histonas en residuos de lisina y arginina por metiltransferasas. En parásitos como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*, se ha reportado la presencia de estas enzimas y su actividad se ha relacionado con la regulación de ciclo celular y la expresión de genes de virulencia. Además, se ha observado que estas enzimas también pueden metilar proteínas en el citoplasma y participar directamente en mecanismos de patogenicidad.

E. histolytica posee cuatro metiltransferasas de lisina (EhHKMT's), las cuales presentan actividad enzimática de metiltransferasa sobre histonas comerciales y tres de ellas se localizan en núcleo y citoplasma. Adicionalmente, se observó que dos de ellas (EhhKMT2 y EhHKMT4) se encuentran presentes en vacuolas que contienen eritrocitos fagocitados. Por lo que en este trabajo se decidió estudiar la expresión de estas enzimas durante la eritrofagocitosis.

Nuestros resultados indican que en condiciones basales EhHKMT2 y EhHKMT4 se encuentran dispersas en el citoplasma y en la región perinuclear, pero durante la eritrofagocitosis se relocalizan hacia la membrana citoplásmica, bocas fagocíticas y vacuolas que contienen eritrocitos en su interior. Por otro lado, se observó que durante la eritrofagocitosis el nivel de mRNA de EhHKMT2 aumenta, mientras que el nivel de proteína disminuye, mientras que en EhHKMT4 tanto el nivel de mRNA como el de la proteína de mantienen constantes durante este evento. En conjunto, estos resultados sugieren la participación de ambas enzimas durante la eritrofagocitosis, pero el mecanismo aún se desconoce.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica has different virulence factors that must be regulated in to cause disease in its host. One of these regulation mechanisms, studied in several organisms, is the chromatin remodeling through histone methylations on lysine and arginine residues by methyltransferases enzymes. It has been reported in parasites like *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* the presence of those enzymes and their activity has been related to the regulation of cell cycle and expression of virulence genes. Furthermore, it has been observed that these enzymes also methylate cytoplasmic proteins participating in pathogenic mechanisms.

E. histolytica possesses four lysine methyltransferases (EhHKMTs) which have methyltransferase activity on commercial histones. Moreover, two of them, EhHKMT2 and EhHKMT4 are located in vacuoles containing phagocytosed erythrocytes. Then, the aim of this study was to analyze the expression of these proteins during erythrophagocytosis.

Our results indicate that in basal conditions EhHKMT2 and EhHKMT4 are dispersed over the cytoplasm and surrounding the nucleus, but during the erythrophagocytosis both proteins are relocated toward the cytoplasmic membrane, phagocytic cups and vacuoles containing erythrocytes. On the other hand, during erythrophagocytosis the mRNA expression of EhHKMT2 increased, meanwhile the protein expression decreased. However, the mRNA and protein expression of EhHKMT4 remained during erythrophagocytosis. Altogether, the data obtained suggest the participation of both enzymes during the erythrophagocytosis, but the mechanism involved remain unknown.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario que pertenece al orden *Amoebida*, clase *Lobosa*, super-clase *Rhizopoda* y subphylum *Sarcodina* (Integrated Taxonomic Information System. *Entamoeba histolytica*. Taxonomic serial: 43907. <http://www.itis.gov/>). Este microorganismo fue descrito por primera vez en San Petersburgo, Rusia, en 1875 por Friedrich Lösch (Botero & Restrepo, 2012). Actualmente, la organización Mundial de la Salud lo describe como el agente etiológico de la amibiasis intestinal (WHO, 1997), aunque otra de sus manifestaciones clínicas más comunes es el absceso hepático amibiano (Samie, 2012; Stanley, 2001)

- **Epidemiología**

El único hospedero natural de *E. histolytica* es el humano (Flisser & Pérez-Tamayo, 2006; Ximénez *et al*, 2011), en el cual coloniza la mucosa del intestino grueso; sin embargo, es capaz de invadir la mucosa y diseminarse a otros órganos como hígado, pulmones y piel, entre otros (WHO, 1997; Asociación de Médicos de Sanidad Exterior, 2012, CDC, 2013).

La vía de infección es fecal-oral, es decir que se da mediante la ingesta de agua y alimentos contaminados con quistes de *E. histolytica*, los cuales pueden llegar por dos mecanismos principales: el manejo de alimentos por personal portador con hábitos higiénicos deficientes o por contaminación del agua por el uso de fertilizantes fecales o fecalismo a ras de suelo (Flisser & Pérez-Tamayo, 2006); es por ello que esta enfermedad es más común en países en vías de desarrollo, donde la higiene y sanitización son deficientes (Samie *et al*, 2012).

La obtención de datos epidemiológicos se dificulta debido al diagnóstico inapropiado, a la carencia de servicios médicos y a la omisión del reporte de esta enfermedad; además, en los últimos años, la epidemiología de la amibiasis ha sufrido cambios, debido a la descripción de las especies no patógenas *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*, las cuales son morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica* (Ali *et al*, 2008; Ximénez *et al*, 2009; Samie *et al*, 2012). Sin

embargo, antes de la descripción de la separación de especies patógenas y no patógenas, Walsh (Walsh, 1986) estimó que *E. histolytica* infecta alrededor de 50 millones de personas en el mundo, lo que causa aproximadamente entre 40 a 100 mil muertes al año, representando la cuarta causa de muerte debida a infección por protozoarios, después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis; y la 3ª causa de morbilidad, después de la malaria y la tricomoniasis (Gómez *et al*, 2007). De todos los casos de amibiasis, el 90 % son asintomáticos y sólo el 10 % presenta manifestaciones clínicas (Ximénez *et al*, 2009; Samie *et al*, 2012); además se estima que sólo el 10% de los pacientes que presentan colitis amibiana desarrollan absceso hepático (Stanley & Reed, 2001; Ximénez *et al*, 2009).

En países desarrollados, la población afectada corresponde a personas de la tercera edad, viajeros y homosexuales, además de tener brotes de manera esporádica debido a la contaminación de fuentes de agua (Gómez *et al*, 2007). Por otro lado, en países en vías de desarrollo la distribución en la población es general (Gómez *et al*, 2007, Samie *et al*, 2012) y se considera endémica en México, India, países del sur de África, centro y sur de América, así como países Asiáticos del Pacífico (Ximénez *et al*, 2009).

En México, el número de casos de amibiasis ha disminuido de manera drástica en los últimos 20 años (figura 1), y pasó de ser la 3ª causa de enfermedad en 1995, a ser la 15ª en el año 2015, siendo la población más afectada, los individuos entre 25 y 45 años de edad, seguido de los niños entre 5 y 9 años de edad (www.epidemiología.salud.gob.mx).

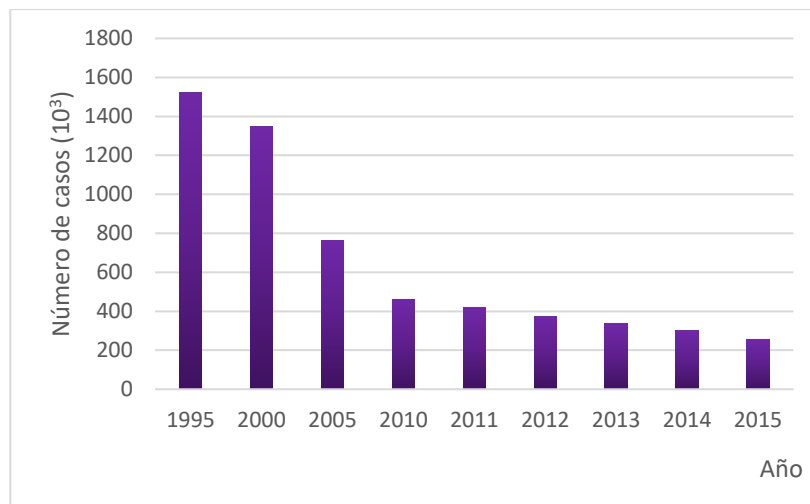


Figura 1. Número de casos de amibiasis en México en los últimos 20 años.
Casos de amibiasis reportados al año.

Fuente: www.epidemiología.salud.gob.mx

- **Características morfológicas.**

E. histolytica presenta dos estadios durante su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste (figura 2).

El trofozoíto o forma vegetativa mide 20 a 40 μm de diámetro, es móvil gracias a la emisión de pseudópodos amplios, hialinos y transparentes que se proyectan hacia el exterior de la célula y que se diferencian del citoplasma que es de aspecto granuloso (Gómez *et al*, 2007; Ximénez *et al*, 2011; Botero & Restrepo, 2012). Sólo presenta un núcleo con cariosoma central y con cromatina condensada en gránulos de tamaño uniforme en la periferia de la membrana nuclear, carece de organelos como mitocondria, así como de retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien desarrollados; sin embargo, posee una gran cantidad de vacuolas y ribosomas dispersos o formando pequeños grupos en el citoplasma (Torres-Guerrero *et al*, 1991; Flisser & Pérez-Tamayo, 2006; Gómez *et al*, 2007; Botero & Restrepo, 2012). Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria (Flisser & Pérez-Tamayo, 2006; Ximénez *et al*, 2011).

Los quistes son estructuras redondeadas u ovaladas que miden de 10 a 16 μm de diámetro, poseen una pared gruesa de quitina y en su interior se encuentran de cuatro núcleos esféricos con gránulos de cromatina periférica y un cariosoma central. El quiste maduro, contiene ribosomas ensamblados que se denominan “cuerpos cromatoides” (Stanley, 2003; Gómez *et al*, 2007; Ximénez *et al*, 2011). Los quistes se mantienen viables durante 8 días en heces o suelo a temperatura ambiente, aunque bajo condiciones de temperatura y humedad favorables pueden mantenerse viables hasta por 12 días, mientras que en agua se mantienen viables hasta por 30 días. Los quistes son resistentes al cloro, sin embargo, son sensibles a la desecación y a temperaturas menores a 5°C y mayores a 40°C (Flisser & Pérez-Tamayo, 2006; Samie *et al*, 2012).

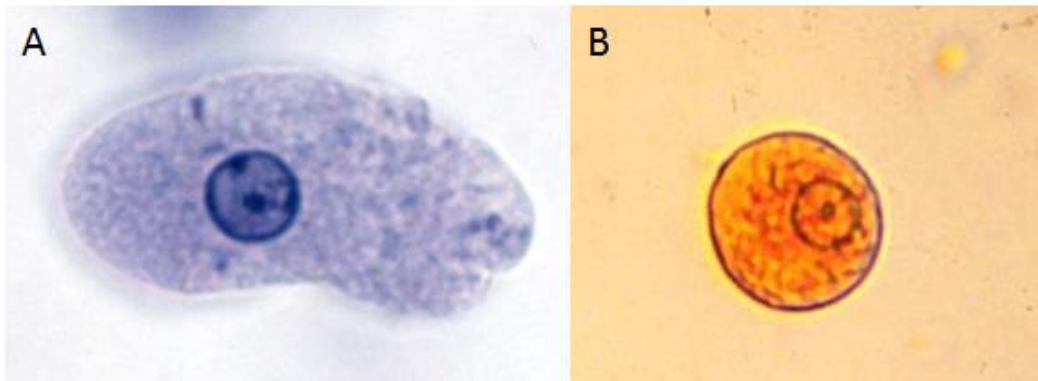


Figura 2. Morfología de *E. histolytica*. A) Trofozoíto, en el cual se observa su núcleo con cromatina de distribución periférica y regular y nucléolo central. B) Quiste, en el cual sólo se observa uno de los cuatro núcleos.

(Tomado de: <http://atlasdeparasitologia.blogspot.mx/p/protozoarios.html>)

- **Ciclo de vida**

El ciclo de vida (figura 3) comienza con la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes maduros, que es la fase infectiva. En el estómago, el ácido estomacal debilita la pared del quiste y las condiciones alcalinas en el intestino delgado, terminan de debilitar la pared quística, permitiendo que se liberen cuatro trofozoítos, los cuales posteriormente se dividen, dando lugar ocho trofozoítos metacíclicos, los cuales migran al intestino grueso, donde se sitúan en la mucosa o la superficie de las glándulas de Lieberkühn; aunque se desconoce la dosis necesaria de quistes para que *E. histolytica* colonice la mucosa intestinal (Ximénez *et al*, 2011). Posteriormente, los trofozoítos pueden alcanzar la submucosa y los vasos sanguíneos, por donde son capaces de diseminarse hacia el hígado, pulmones, piel u otros órganos en donde son incapaces de enquistarse y por ende de diseminarse hacia un nuevo hospedero (Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012; CDC, 2013).

Conforme los trofozoítos avanzan por el colón, comienza el proceso de enquistamiento. Los trofozoítos comienzan a eliminar las vacuolas alimenticias y demás inclusiones intracitoplásmicas, se inmovilizan y forman pre-quistes, los cuales adquieren una cubierta y dan lugar a quistes inmaduros con un núcleo, que posteriormente se dividirán para dar lugar a quistes tetranucleados, en los cuales se termina el proceso de formación de la pared quística. Finalmente, los quistes son eliminados junto con las heces. En algunos casos también se pueden encontrar trofozoítos (especialmente en heces diarreicas) y prequistes en las heces; sin embargo, éstos no son considerados infectivos, debido a su incapacidad para sobrevivir a las condiciones medioambientales (Gómez *et al*, 2007; Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012; CDC, 2013).

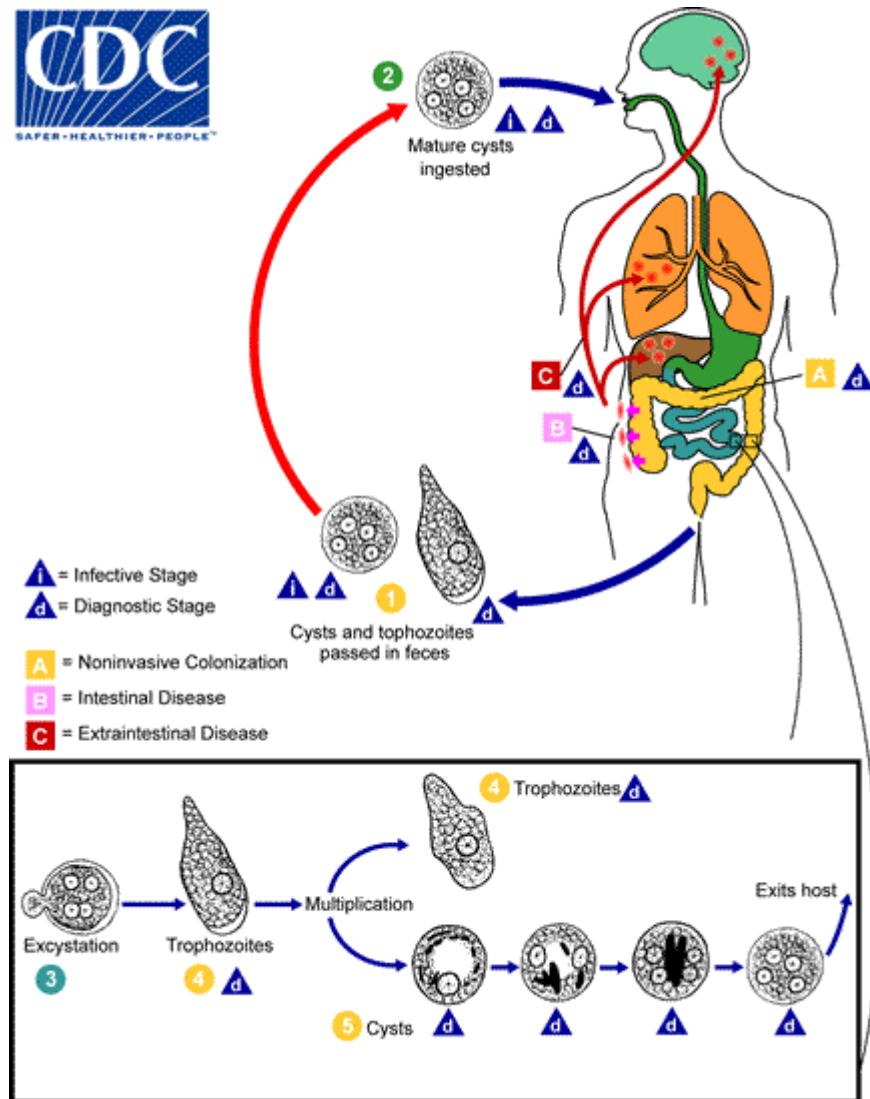


Figura 3. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El ciclo de vida comienza con la ingestión de un quiste maduro, el cual pierde la pared durante su paso por el estómago y el intestino delgado y coloniza el intestino grueso, donde se divide por fisión binaria; en algunos casos, los trofozoítos pueden invadir otros órganos además del colón. En el colón, los trofozoítos comienzan el proceso de enquistamiento y son eliminados junto con las heces.

(Tomado de: <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>)

- **Cuadro clínico**

Las manifestaciones clínicas de la amibiasis pueden clasificarse dependiendo de la invasividad, en asintomática o invasiva, en su forma aguda y crónica o por el sitio de la infección, en intestinales o extraintestinales. (Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012).

La amibiasis asintomática se refiere cuando se observa en un examen coprológico que un individuo libera quistes mediante las heces, pero este no presenta ninguna sintomatología. Esta forma es no invasiva y es de gran importancia, debido a que estos individuos contribuyen a la diseminación de la enfermedad (Botero & Restrepo, 2012).

La amibiasis intestinal aguda dura de una a cuatro semanas (Ximénez *et al*, 2009) y se caracteriza por la presencia de dolor abdominal, diarrea con moco y/o sangre (disentería), pujo y tenesmo; los síntomas sistémicos como fiebre y otros, son muy poco frecuentes (Ximénez *et al*, 2011; Botero & Restrepo, 2012). Si no se recibe tratamiento durante esta etapa, la amibiasis puede evolucionar a un estado grave (Botero & Restrepo, 2012), especialmente en niños menores de 5 años, mujeres embarazadas, personas de la tercera edad, particularmente si padecen alguna otra enfermedad crónica como diabetes mellitus o pacientes inmunodeprimidos o inmunosuprimidos (Stanley, 2003; Ximénez *et al*, 2012). Las formas graves de la enfermedad incluyen ameboma (masa amibiana que puede obstruir el conducto intestinal), colitis amibiana fulminante y colón megatóxico. Algunos de los síntomas que se pueden presentar en las formas complicadas de la amibiasis son dolor abdominal severo, tenesmo intenso (con hasta 20 episodios de deposición diarreaica con sangre al día); además puede haber algunos síntomas sistémicos como fiebre, taquicardia e hipotensión. El pronóstico de esta enfermedad es grave, especialmente si hay perforación intestinal. La mortalidad de la disentería es del 1%, pero se incrementa hasta el 75% en las complicaciones (Ximénez *et al*, 2009).

La amibiasis crónica (colitis no disentérica) es la forma más frecuente en individuos de todas las edades y es de evolución prolongada; se caracteriza por tener síntomas no específicos, como periodos de dolor abdominal y episodios de

diarrea autolimitante con presencia ocasional de moco y rara vez de sangre seguida de periodos de constipación de duración e intensidad variables. Esta condición crónica puede evolucionar a cualquiera de las otras formas de amibiasis o a la curación espontánea (Ximénez *et al*, 2011; Botero & Restrepo, 2012).

Por otro lado, la forma extraintestinal más frecuente es el absceso hepático amibiano, el cual es más común en niños menores a 5 años y adultos jóvenes o en edad productiva (Stanley, 2003; Ximénez *et al*, 2009; Ximénez *et al*, 2011); sin embargo, se cree que la diseminación a otros órganos es poco frecuente, debido a las bajas tasas de morbilidad de amibiasis extra-intestinal en comparación con la prevalencia de infecciones asintomáticas o amibiasis intestinal (Ximénez *et al*, 2011).

Los síntomas del absceso hepático amibiano son variables y por ello su diagnóstico puede ser complicado (Ali *et al*, 2008). Sin embargo, algunos síntomas comunes que sugieren esta patología son fiebre, escalofríos y diaforesis, anorexia y dolor abdominal en el hipocondrio derecho que incrementa durante la inspiración, y que puede irradiarse hacia el hombro y hacia atrás; además el hígado aumenta de volumen y se vuelve blando (Ali *et al*, 2008; Ximénez *et al*, 2011). Estos síntomas suelen ser agudos, pero pueden ser crónicos característicamente con anorexia y pérdida de peso (Stanley, 2003). Generalmente, no hay ictericia, pero cuando se presenta, además de la pérdida de ruidos intestinales, roce pleural o pericárdico, entonces es una señal de alarma de ruptura del absceso (Stanley, 2003; Ximénez *et al*, 2011).

La amibiasis pulmonar es la segunda forma extra-intestinal más común de la amibiasis que normalmente se da por diseminación directa a partir del absceso hepático amibiano, aunque también puede pasar a pulmón por diseminación hematogena e incluso linfática desde una lesión primaria en el intestino (Shamsuzzaman & Hashiguchi, 2002). Generalmente afecta el lóbulo inferior y medio del pulmón derecho, aunque puede colonizar cualquier lóbulo de ambos pulmones (Shamsuzzaman & Hashiguchi, 2002). Esta forma de amibiasis afecta entre el 7 y 20% de los pacientes con absceso hepático amibiano (Stanley, 2003).

Los pacientes presentan tos, dolor en el cuadrante superior derecho y fiebre; además en algunos casos puede haber hemoptisis, y si el paciente desarrolla una fístula hepato-bronquial, pueden expulsar esputo de color café con material necrótico y en algunos casos con trofozoítos (Shamsuzzaman & Hashiguchi, 2002; Stanley, 2003).

- **Diagnóstico**

Debido al cuadro clínico que se presenta durante la amibiasis intestinal, es necesario que se diferencie de otras enfermedades similares, especialmente con aquellas que producen diarrea, ya sean causadas por virus (Rotavirus), bacterias (*Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* sp.) u otros parásitos intestinales (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* sp., *Trichuris* sp., *Strongyloides* sp., *Schistosoma* sp.) (Botero & Restrepo, 2012). Además, el diagnóstico preciso es importante no sólo en los pacientes con disentería, sino en los portadores asintomáticos que pueden seguir diseminando la enfermedad (Tanyuksel & Petri, 2003).

El diagnóstico de rutina del laboratorio se basa en la demostración de presencia de trofozoítos o quistes en las heces o mucosa intestinal del paciente por medio de microscopía (Stanley, 2003; Samie *et al*, 2012); sin embargo, esta técnica tiene varias limitaciones. Por ejemplo, antes se creía que sólo *E. histolytica* tenía la capacidad de fagocitar eritrocitos y está era una característica para diferenciarla de otras amibas intestinales; sin embargo, se descubrió que *E. dispar* también puede fagocitar eritrocitos (Samie *et al*, 2012; Tanyuksel & Petri, 2003). Por otro lado, no todos los trofozoítos de *E. histolytica* contienen eritrocitos en su interior, especialmente durante infecciones crónicas (Tanyuksel & Petri, 2003). Otra limitación de esta técnica, es que existen tres especies morfológicamente indistinguibles de *Entamoeba* (*E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*), de las cuales sólo *E. histolytica* es patógena (Samie *et al*, 2012). Otra de las limitaciones más importantes de esta técnica diagnóstica, es que el personal debe estar capacitado y tener suficiente experiencia para poder identificar a los quistes o trofozoítos, que pueden ser confundidos con artefactos presentes en la muestra

(Tanyuksel & Petri, 2003). Además, otro factor importante a considerar, es el tiempo que transcurre entre la toma de muestra y el análisis de la misma, puesto que esto disminuye la sensibilidad, debido a la alteración de las estructuras o pérdida de los mismos (los trofozoítos se lisan en 30 minutos), especialmente si no se usa un fijador o no se conserva la muestra a 4°C (Tanyuksel & Petri, 2003; Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012).

Existen otras técnicas de laboratorio que se utilizan para el diagnóstico de esta enfermedad. Una de ellas es el cultivo de heces o de muestras de absceso hepático y el análisis isoenzimático, el cual es más sensible que la microscopía (Ali *et al*, 2008) y se consideró como el estándar de oro por algunos años (Samie *et al*, 2012). Desafortunadamente, esta técnica es costosa debido al equipo y los reactivos necesarios para llevarla a cabo, y toma de una a cuatro semanas para obtener el resultado, lo cual no es factible ni práctico en un laboratorio de rutina. Aunque, es una herramienta que se utiliza en laboratorios de investigación (Tanyuksel & Petri, 2003; Samie *et al*, 2012).

También se han desarrollado técnicas serológicas para la detección de anticuerpos, especialmente en países desarrollados; sin embargo, en zonas endémicas, este tipo de diagnóstico no es funcional, ya que la población ha estado constantemente expuesta al patógeno y, por lo tanto, no se puede diferenciar de una infección pasada de una actual, además de resultar demasiado costosos (Tanyuksel & Petri, 2003; Samie *et al*, 2012).

Una de las técnicas que si ha tenido éxito, especialmente en el diagnóstico de absceso hepático, es la ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Samie *et al*, 2012), basada tanto en la detección de anticuerpos como de antígenos de *E. histolytica* (Tanyuksel & Petri, 2003).

Para el diagnóstico de absceso hepático amibiano, se debe identificar la lesión en el hígado, ya sea mediante ultrasonido (que es el estándar de oro), rayos X o tomografía computarizada, además de la prueba serológica correspondiente. En estos pacientes usualmente no se encuentran trofozoítos ni quistes en heces. (Stanley, 2003, Ximénez *et al*, 2011).

- **Tratamiento**

Los fármacos que existen para el tratamiento de la amibiasis se dividen en dos: amebicidas lumbinales, que actúan principalmente contra los parásitos que colonizan la mucosa intestinal; y los amebicidas sistémicos, los cuales actúan contra los parásitos invasivos (OMS, 1996), por lo cual, el tratamiento depende del cuadro clínico del paciente.

En el caso de los portadores asintomáticos de *E. histolytica*, la OMS recomienda la administración de amebicidas lumbinales para reducir el riesgo de transmisión y proteger al paciente de la forma invasiva de la enfermedad; uno de los más utilizados es el furoato de diloxanida, aunque también se pueden usar paramomicina o iodoquinol (OMS, 1996, Stanley, 2003).

A los pacientes con colitis amibianas, así como a aquellos con formas invasivas de la enfermedad, primero debe tratarseles con un amebicida sistémico, seguido de uno luminal, para eliminar cualquier microorganismo que pudiera sobrevivir a nivel intestinal (OMS, 1996; Stanley, 2003). En caso de perforación intestinal o colitis amibiana fulminante, se administran también antibióticos para tratar de reducir las infecciones secundarias causadas por la microbiota intestinal (Stanley, 2003). Los fármacos sistémicos que se utilizan en la actualidad, son los derivados de los 5-nitroimidazoles, entre los cuales se encuentran el metronidazol, ornidazol, timidazol y secnidazol; el más utilizado es el metronidazol, el cual es efectivo y seguro, además, a pesar de que se han reportado fallas en el tratamiento con este fármaco, no se ha reportado que existan cepas resistentes al mismo, por lo cual sigue siendo una excelente opción para el tratamiento (Upcroft *et al*, 1999; Stanley, 2003).

En el caso de los pacientes que presentan absceso hepático amibiano, el tratamiento debe ser con un agente sistémico, seguido de uno luminal. Dependiendo del grado de daño en el tejido hepático, se puede hacer un drenaje quirúrgico; sin embargo, este debe evitarse en la medida de lo posible (Stanley, 2003).

- **Patología**

El hallazgo patognomónico típico de la amibiasis intestinal, son las úlceras localizadas en el ciego, predominantemente en el colon, en el sigmoideo y en el recto (Gómez *et al*, 2007). Estas úlceras pueden ser de dos tipos: nodulares e irregulares. Las úlceras nodulares son redondeadas, de un diámetro entre 1 a 5 mm, con áreas de mucosa ligeramente elevadas y áreas necróticas en el centro, rodeadas por un borde de tejido edematoso. Estas áreas necróticas pueden ser hemorrágicas o estar cubiertas por una sustancia mucosa amarillenta. Estas lesiones pueden llegar a cubrir la mayor parte de la mucosa del colon y provocar edema y eritema en las regiones que no presentan úlceras. Por otro lado, las úlceras irregulares miden de 1 a 5 cm y generalmente se encuentran en el ciego y el colon ascendente, son edematosas con bordes elevados y llenas de fibrina. En las regiones en las que no hay ulceración, la mucosa se encuentra congestionada y edematosa (Espinosa-Cantellano & Martínez Palomo, 2000).

Por otro lado, cuando el parásito alcanza el hígado provoca un único absceso que se describe como una lesión circunscrita de hepatocitos muertos, células lisadas y detritus celular. Esta lesión está rodeada por tejido conectivo con algunas células inflamatorias y trofozoítos. El parénquima adyacente no se encuentra afectado por lo general (Stanley, 2003).

- **Factores de virulencia**

Para que *E. histolytica* cause una infección, requiere una combinación de capacidades para defenderse, atacar y migrar. Estos eventos son el resultado de un conjunto de factores de virulencia con acciones coordinadas y reguladas sucesivamente durante la invasión (Faust & Guillen, 2012). En diversos estudios *in vitro* se ha observado que el proceso patogénico de *E. histolytica* consiste en la adhesión a las células del hospedero, lisis celular y fagocitosis de las células del hospedero (Stanley, 2001; Bhattacharya & Bhattacharya, 2015).

Entonces, el primer paso en la invasión es la adherencia de los trofozoítos a las células epiteliales del colon (Stanley & Reed, 2001), el cual es esencial para la

invasión, ya que de ser bloqueado, se inhibe la citólisis por parte de la ameba (Martínez-Palomo *et al*, 1985; Bhattacharya & Bhattacharya, 2015). Para que esto pueda llevarse a cabo, el parásito primero debe lograr cruzar la barrera de moco que se encuentra recubriendo el epitelio intestinal, la cual está compuesta principalmente por agua y mucinas (proteínas altamente glicosiladas) (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). *In vitro* se ha observado que este moco tiene la capacidad de prevenir la adhesión de los trofozoítos a las células, mediante la inhibición de la lectina de adhesión (Chadee K. *et al*, 1987). Aunque el mecanismo por el cual se eliminan las mucinas se desconoce con certeza, se propone que *E. histolytica* puede unirse a las mucinas mediante la lectina de unión a galactosa y N-acetil-D-galactosamina (lectina Gal/GalNAc), lo cual a su vez permite la secreción de proteinasas, produciendo un efecto paradójico en el que se degradan las mucinas y a la vez estimulan su secreción, provocando hiperplasia de las células caliciformes y que estas en un punto agoten su capacidad de reemplazar la mucina que es degradada por el parásito (Espinosa-Cantellano & Martínez Palomo, 2000; Moncada *et al*, 2003; Huston, 2004; Gómez *et al*, 2007; Cornick *et al*, 2016).

Una vez que se ha superado la barrera de mucinas, *E. histolytica* alcanza los enterocitos superficiales y se une a ellos principalmente por medio de la lectina Gal/GalNAc, la cual es un heterodímero formado por una cadena pesada (170 kDa) y una cadena ligera (30/31 kDa) (Espinosa-Cantellano & Martínez Palomo, 2000; Huston, 2004; Gómez *et al*, 2007); en la subunidad pesada se encuentra el dominio de unión a carbohidratos y una cola citoplasmática que puede estar involucrada en la señalización, mientras que la función de la subunidad pequeña se desconoce, pero si es inhibida, disminuye la virulencia de *E. histolytica* (Stanley & Reed, 2001). Además, se ha observado que está relacionada con el evento de citólisis dependiente de contacto (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Otras moléculas que participan en la adhesión de *E. histolytica* son: una lectina de 220 kDa con capacidad de unión a oligosacáridos de N-acetilglucosamina, el complejo EhCPADH, una proteína rica en serinas (SREHP) y el lipofosfoglicano de superficie (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Huston, 2004).

Una vez que se ha logrado la adhesión y el contacto con la célula blanco, ocurre una lisis celular, tanto de las células blanco, como de los linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Gómez *et al*, 2007). Una de las moléculas que podría participar en la lisis celular, es una proteína denominada “amebaporo”, que es un péptido de 77 aminoácidos que tiene la capacidad de formar poros en la membrana; existen tres isoformas, A, B y C, siendo la primera la más abundante (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000), pero la última de estas la que presenta mayor actividad (Gómez *et al*, 2007). Este péptido es soluble en agua, pero rápidamente puede insertarse en la membrana, permitiendo el intercambio de agua, iones y otras moléculas pequeñas, lo cual provoca la lisis celular. Sin embargo, no se ha logrado demostrar su participación en el proceso de citólisis, ya que no son secretados de manera espontánea (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

Por otra parte, la descamación de capas superficiales de la mucosa deja particularmente susceptible a la invasión a las capas más profundas; esta invasión se da gracias al desplazamiento de la ameba mediante la extensión de pseudópodos hacia las capas basales del epitelio. Además, durante esta invasión, los trofozoítos deben lisar a las células adyacentes y degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC). Se cree que estos eventos están relacionados entre sí y posiblemente ocurre en ciclos de anclaje a la MEC, desplazamiento del trofozoíto y degradación de la MEC (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). La interacción de los trofozoítos con fibronectina y otros sustratos de la MEC provoca la reorganización del citoesqueleto de actina, induciendo la formación de placas de adhesión; este reconocimiento parece involucrar una proteína de unión a fibronectina de 37 kDa y un receptor tipo integrina de 140 kDa (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Por otro lado, las placas de adhesión están compuestas principalmente por filamentos de actina y cuatro proteínas de unión a actina: vinculina, α -actinina, tropomiosina y miosina I (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Estas placas de adhesión no solamente son importantes en la adhesión y locomoción, sino que aparentemente participan también en la

degradación de los componentes de la MEC, ya que se ha observado la presencia de actividad proteolítica en ellas (Vázquez *et al*, 1995).

Otras proteínas que son de gran interés en la citólisis son las proteasas. Las cisteína proteasas (CPs) son las proteasas más abundantes en el parásito (Bruchhaus & Matthiensen, 2015). Se han identificado 50 genes que codifican para pre-pro-cisteína-proteasas, pero de estos, el 90 % de la actividad se debe a EhCP 1, 2 y 5 (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Stanley, 2001). Las CPs tienen actividad frente a una gran cantidad de sustratos, entre los que también se encuentran los componentes de la MEC (Schulte & Scholze, 1989; Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Las CPs son secretadas por el trofozoíto y se suelen encontrar en grandes cantidades especialmente en el absceso hepático amibiano (Stanley, 2003). Por otro lado, se ha observado que EhCP5 participa en la inducción de IL-8 e IL-1 β , que son citosinas proinflamatorias que están relacionadas con la inflamación y el daño tisular; así como en la disminución de la permeabilidad en monocapas de células (Stanley, 2001). *E. histolytica* también posee al menos tres genes que codifican para serina-proteasas, las cuales están relacionadas con la degradación de las uniones estrechas (Barrios-Ceballos *et al*, 2005). Además, los trofozoítos de *E. histolytica* poseen una metalocolagenasa de membrana que degrada colágena tipo I y III (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000, Teixeira *et al*, 2012).

Otra forma que tienen las amibas de provocar la muerte de las células del hospedero es mediante la inducción de la apoptosis, la cual es dependiente de contacto, provocando el incremento intracelular de calcio en la célula del hospedero (Ravdin *et al*, 1988; Huston *et al*, 2003; Mortimer & Chadee, 2015). Se ha observado que la apoptosis de las células del hospedero favorece la fagocitosis por parte de las amibas (Huston *et al*, 2003).

Una vez que se ha provocado la muerte celular por cualquiera de los procesos anteriormente descritos, se lleva a cabo la fagocitosis, que es otro de los factores de virulencia importante durante el proceso patogénico de *E. histolytica*. Este parásito tiene la capacidad de fagocitar microorganismos residentes del intestino y

células del hospedero durante la invasión tisular, sean o no del sistema inmune (Okada & Nozaki, 2006). En 1983, Orozco y colaboradores encontraron que, si *E. histolytica* reducía la capacidad de fagocitar eritrocitos, entonces reducía considerablemente su virulencia (Orozco *et al*, 1983) además de presentar defectos en su crecimiento (Battacharya & Bhattacharya, 2015). Para que la fagocitosis se lleve a cabo, debe existir un reconocimiento de ligandos por parte de los receptores de la célula (Okada & Nozaki, 2006). Uno de los receptores que parecen estar involucrados es la lectina Gal/GalNac; sin embargo, su papel durante la fagocitosis no es completamente claro, debido a que la unión de algunos ligandos a esta lectina no siempre induce la fagocitosis, y en otros casos se ha observado que la fagocitosis de células apoptóticas no es inhibida al bloquear esta lectina, sugiriendo la existencia de otros receptores involucrados (Battacharya & Bhattacharya, 2015). Entre otros receptores que se sugiere que participan en la fagocitosis podemos encontrar al complejo EhCPADH (García-Rivera *et al*, 2000) y a las proteínas ricas en serinas (SREHP) (Teixeira *et al*, 2008). Debido a que no se sabe con certeza cuales son los receptores específicos involucrados en la fagocitosis, las vías de señalización que se activan durante este proceso tampoco han sido profundamente estudiadas (Battacharya & Bhattacharya, 2015). Sin embargo, se ha observado la participación de proteínas de la familia de cinasas transmembranales (Boethner *et al*, 2008; Buss *et al*, 2010) así como de vías de señalización de calcio (Jain *et al*, 2008). Otro de los procesos que participan durante la fagocitosis y formación de pseudópodos es el remodelamiento del citoesqueleto de actina, en el cual participan diferentes proteínas que parecen estar conservadas en este organismo, como son las GTPasas Rac, Rab y Rho; intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), Arp 2/3, proteínas de unión a calcio (EhCaBP-1), miosina, actina, actinina, cinasas de serina/treonina (PAK) y forminas, entre otras; sin embargo, la participación de estas proteínas no es necesariamente específica de la fagocitosis (Okada *et al*, 2005; Battacharya & Bhattacharya, 2015).

ANTECEDENTES

- **Regulación epigenética**

La epigenética se define como cambios hereditarios en un organismo que pueden alterar los niveles de expresión genética, sin alterar la secuencia de DNA y que puede ser segregado durante la mitosis (Arzate-Mejía *et al*, 2011; Croken *et al*, 2012, Allis & Jenuwein, 2016). Estos cambios pueden estar mediados por varios mecanismos que se pueden clasificar en dos: 1) regulación epigenética basada en RNA (RNA de interferencia) y 2) regulación epigenética vía modificación de la cromatina (modificación del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas) (Croken *et al*, 2012). La regulación epigenética de genes usualmente se refiere a la regulación de genes por cambios en la estructura de la cromatina, lo cual modifica la accesibilidad de los complejos transcripcionales y polimerasas a la cromatina, ya sea por la modificación del DNA o de las proteínas asociadas a este, principalmente las histonas, que pueden sufrir cambios post-traduccionales para formar eucromatina (cromatina abierta y accesible para la transcripción) o heterocromatina (cromatina compacta e inaccesible para la transcripción)(Croken *et al*, 2012).

La metilación del DNA desempeña un papel central en la transmisión de la información epigenética a través de la incorporación de un grupo metilo a la posición 5' de la citosina, siempre y cuando se encuentre en el contexto del dinucleótido CpG. Esta metilación es sinónimo de represión (Arzate-Mejía *et al*, 2011) y participa en el silenciamiento de genes de manera permanente e irreversible en distintas etapas del desarrollo y en la expresión monoalélica (Recillas & Escamilla 2004).

Por otro lado, las histonas forman octámeros alrededor de los cuales se enrolla el DNA para darle estabilidad (nucleosomas) (Luger *et al*, 1997; Recillas & Escamilla, 2004; Croken *et al*, 2012). Generalmente en las histonas, el extremo amino terminal sale fuera del nucleosoma y por lo tanto es blanco de varias modificaciones post-traduccionales (Rice & Allis, 2001). Las histonas poseen más de 50 sitios de modificación y estas pueden ser metilación, citrulinación, acetilación, fosforilación, sumoilación, ADP-ribosilación, entre otras (Arzate-Mejía *et al*, 2011; Leinhart & Brown, 2011). La combinación de diferentes modificaciones post-

traduccionales de histonas, dan lugar a un “código de histonas” que resultan en diferentes eventos nucleares (Leinhart & Brown, 2011). Las funciones de varias modificaciones post-traduccionales de histonas parecen ser conservadas. En general, la acetilación de histonas está relacionada con la activación de genes y la metilación está relacionada tanto con la activación como con la represión de genes, dependiendo el residuo de la histona que se metile (Croken *et al*, 2012) así como la cantidad de metilos que se adicionen (mono-, di- o tri-metilación) (Völkel & Angrand, 2006). Además, se ha observado que la metilación de histonas se relaciona con la represión de genes debido a que tiene la capacidad de reclutar proteínas de unión a metilos, las cuales se asocian a otras proteínas represivas como las histonas desacetilasas (Rice & Allis, 2001). Por otro lado, se ha visto que la acetilación de histonas es efímera en la naturaleza, mientras que la metilación se observa más ampliamente distribuida y confiere memoria epigenética de larga duración (Leinhart & Brown, 2011).

- **Metiltransferasas de lisina y marcas epigenéticas de lisina**

Tanto las lisinas como las argininas de las histonas 3 y 4 son blanco de metilaciones por enzimas que pertenecen a distintas familias de proteínas. La familia PRMT tiene como sustrato las argininas, mientras que la familia de proteínas que contienen dominio SET y las proteínas Dot1/DOT1L son específicas para lisinas. Las argininas pueden ser monometiladas, asimétricamente di-metiladas, y simétricamente dimetiladas, mientras que las lisinas pueden ser mono-, di- o tri-metiladas (Qian & Zhou, 2006; Völkel & Angrand, 2006; Borbolla-Vázquez *et al*, 2015).

Casi todas las metiltransferasas de lisinas poseen un dominio SET, por lo cual conforman una familia de proteínas, la excepción son las metiltransferasas de la familia DOT1, que metilan la lisina 79 de la región globular de la histona 3 y que estructuralmente no están relacionadas con la familia SET (Dillon *et al*, 2005).

El dominio SET se describió por primera vez como una secuencia conservada en tres proteínas de *Drosophila melanogaster*: el Supresor de variegación 3-9 (Su(var)3-9), que es un modificador de posición-efecto de variegación; el

Potenciador de Zeste (E(z) por sus siglas en inglés) que es un regulador de cromatina del grupo Polycomb; y Trithorax (Trx), que es un regulador de cromatina del grupo de Trithorax. Este dominio es de aproximadamente 130 aminoácidos y se ha encontrado en todos los organismos eucariontes que se han estudiado (Dillon *et al*, 2005). Hay siete subfamilias de proteínas con dominio SET que se clasifican de acuerdo a los motivos que se encuentran alrededor de este dominio (Dillon *et al*, 2005), las cuales pueden metilar tanto histonas como otras proteínas (Lanouette, 2014),

La estructura de las proteínas de la familia SET (figura 4) se ha determinado con base en los cristales de dos miembros de la familia SUV39 (DIM-5 de *Neurospora crassa* y CLR4 DE *Schizoaccharomyces pombe*). La estructura revela la presencia de un pliegue β que no se había descrito previamente, el cual tiene una serie de cadenas β curvadas que forman varias hojas pequeñas empacadas que forman una estructura tipo gancho (knot-like) junto con los dominios pre- y post-SET (Schubert *et al*, 2003; Dillon *et al*, 2005; Qian & Zhou, 2006).

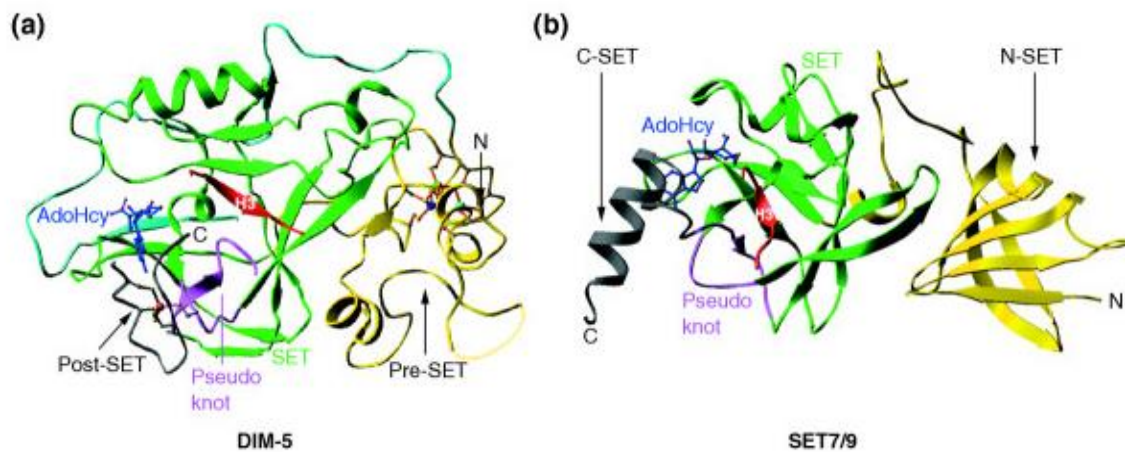


Figura 4. Ejemplos representativos de estructuras que contienen el dominio SET. (a) DIM-5 de *Neurospora crassa* (código 1PEG.pdb de Protein DataBank) (b) SET 7/9 humana (1O9S.pdb). Se indican los dominios pre-SET, SET y post-SET en DIM-5 y los dominios N-SET, SET y C-SET de SET7/9. Se ilustran el pseudonudo formado por dos motivos conservados de SET y el péptido unido de histona 3. El bioproducto de la reacción AdoHcy se representa adherido y los iones de Zinc se muestran como pelotas. N: amino terminal, C: carboxilo terminal. (Tomado de: Dillon *et al*, 2005).

En contraste con otras enzimas que modifican a las histonas, las metiltransferasas de lisina de histonas (HKMTs) tienen una alta especificidad por los residuos que metilan (Völkel & Angrand, 2007). En general, se ha observado que las marcas epigenéticas de metilación en H3K4 (histona 3, lisina 4), H3K36 (histona 3, lisina 36) y H3K79 (histona 3, lisina 79) están relacionadas con los genes transcripcionalmente activos, mientras que las marcas H3K9 (histona 3, lisina 9), H3K27 (histona 3, lisina 27) y H4K20 (histona 4, lisina 20) se relacionan con represión transcripcional (Völkel & Angrand, 2007; Leinhart & Brown, 2011).

En eucariontes inferiores, la metilación de H4K20 se da mediante una única enzima que puede catalizar los tres niveles de metilación, mientras que en eucariontes superiores, hay distintas enzimas para cada nivel: PR-Set7 cataliza la monometilación, mientras que las enzimas de la subfamilia Suv4-20 son responsables de la di- y tri-metilación global (Wu & Rice, 2011; Beck *et al*, 2012). La marca H4K20me1 (histona 4, lisina 20 monometilada) está relacionada con el ciclo celular de mamíferos, protegiendo la estabilidad del genoma, replicación del DNA, mitosis y transcripción (Beck, *et al*, 2012); esta marca aumenta durante la fase G2 y está disminuida en la mitosis y en la fase S para evitar condensación prematura del DNA (Wu & Rice, 2011). En otros organismos también se ha encontrado esta marca epigenética y se ha descrito su función. Por ejemplo, en *Schizosaccharomyces pombe* la metilación de H4K20 hecha por SET9 participa en el reclutamiento de la proteína Crb2 cuando hay daño en el DNA (Sautel *et al*, 2007). Además, se ha encontrado esta marca en algunos miembros del phylum *Apicomplexa*, como *Toxoplasma gondii*, en donde TgSET8 es el responsable de generar una marca H4K20me1, la cual se ha observado en la periferia del núcleo como un patrón punteado, mientras que H4K20me3 se observa como un anillo en la periferia nuclear, en donde se encuentra la heterocromatina. Además, se ha observado que esta marca fluctúa durante el ciclo celular, por lo cual es probable que participe en la regulación de este (Sautel *et al*, 2007). También se ha observado que TgSET8 es activa en los quistes quiescentes, sugiriendo que hay un nivel elevado de H4K20me1 en los bradizoítos; y se ha especulado que TgSET8 participa en la represión de genes en los taquizoítos, facilitando la conversión y manteniendo

a los bradizoítos (Dixon *et al*, 2010). Por otro lado, en esquizontes jóvenes y maduros de *Plasmodium falciparum* se ha observado la marca epigenética H4K20me3 altamente concentrada en algunos focos discretos, usualmente agrupados en pares alrededor del núcleo, sugiriendo una marca telomérica (Sautel *et al*, 2007).

La metilación de H3K9 está principalmente asociada con el silenciamiento transcripcional y la formación de heterocromatina, regulando positivamente la proteína de heterocromatina 1 (HP1) en mamíferos (Shinkai, 2007). En *P. falciparum* H3K9me3 participa en la represión de los genes *var*, que participan en la variación antigénica de este parásito, mientras que H3K4me2/3 participa en actividad transcripcional y memoria epigenética (Pérez-Toledo *et al*, 2009). La metilación de H3K4 también participa en la activación de los genes *var* en *P. falciparum*, mediante la actividad de PfSET10 que se encuentra en la periferia nuclear y colocaliza con el sitio de expresión activa de los genes *var*. Además es responsable del mantenimiento de un estado disponible para la re-activación de estos genes en las células hijas (Volz *et al*, 2012).

Sin embargo, cabe resaltar que existen datos en mamíferos que indican que las metiltransferasas de lisina pueden tener otros sustratos además de las histonas y que esto cumple diferentes funciones, principalmente de regulación (Lanouette, 2014). Entre estas proteínas se encuentran algunas relacionadas con la transcripción como p53, E2F1, TAF10, el receptor de andrógenos (AR), p65 y Rel A (relacionados con activación de NFK β), GATA, entre otros; proteínas que regulan la cromatina, proteínas que regulan la síntesis de proteínas como EF1 α 1, metiltransferasas y demetilinasas como DNMT1 y 3, G9a y GLP, chaperonas como HSP90 y 70; y otras proteínas como calmodulina, RUBISCO (en plantas), y citrato sintasa, tubulina (Huang & Berger, 2008; Donlin *et al*, 2012; Cao *et al*, 2013; Lanouette, 2014; Vermillion *et al*, 2014; Giaccia, 2016; Park *et al*, 2016). Por otro lado, en *T. gondii* se ha observado que una metiltransferasa de lisina, AKMT está involucrada en la motilidad del parásito, metilando alguna proteína en el citoplasma,

aunque hasta la fecha no se ha logrado reconocer a su substrato (Heaslip, 2011; Sivagurunathan, 2013)

- **Metiltransferasas de lisina en *Entamoeba histolytica***

E. histolytica posee genes que codifican para las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y se ha observado que su genoma está organizado en nucleosomas (Torres-Guerrero *et al*, 1991). El extremo amino de las histonas de *E. histolytica* diverge de la secuencia primaria de las histonas de metazoarios, pero contienen varios residuos de arginina y lisina que son blancos potenciales para la acetilación y metilación (Lozano-Amado *et al*, 2016). Hasta hace poco, las únicas modificaciones que se habían visto que están presentes son: la di- y tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3 (Mirelman *et al*, 2008) y la dimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (Foda y Singh, 2015). Posteriormente y de manera sorpresiva se reportó que *E. histolytica* carecía de la marca H4K20me3 (Lozano-Amado *et al*, 2016). En contraste con estos resultados, Borbolla-Vázquez y colaboradores demostraron que *E. histolytica* si posee esta modificación, además de las marcas epigenéticas H3K4me3, H4K20me2 (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016) y H4R3me2 (Borbolla-Vázquez *et al*, 2015).

En 2016, Borbolla y colaboradores (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016) encontraron en el genoma de *E. histolytica*, cuatro genes que codifican para metiltransferasas de lisina, las cuales llamaron EhHKMT1, EhHKMT2, EhHKMT3 Y EhHKMT4. Las cuatro HKMTs se expresan en los trofozoítos y al menos EhHKMT1, 2 y 4 se encuentran en el núcleo y dispersas en el citoplasma (figura 5) (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016). En ese trabajo, mediante ensayos *in vitro* utilizando como sustrato histonas de ternera comerciales, se encontró que EhHKMT1 cataliza la dimetilación de la lisina 20 de la histona 4, EhHKMT2 cataliza la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 y EhHKMT4 cataliza la trimetilación de la lisina 20 de la histona 4 (figura 6) (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016). Sin embargo, no se ha confirmado aún si estas enzimas realizan las mismas modificaciones en las histonas amibianas.

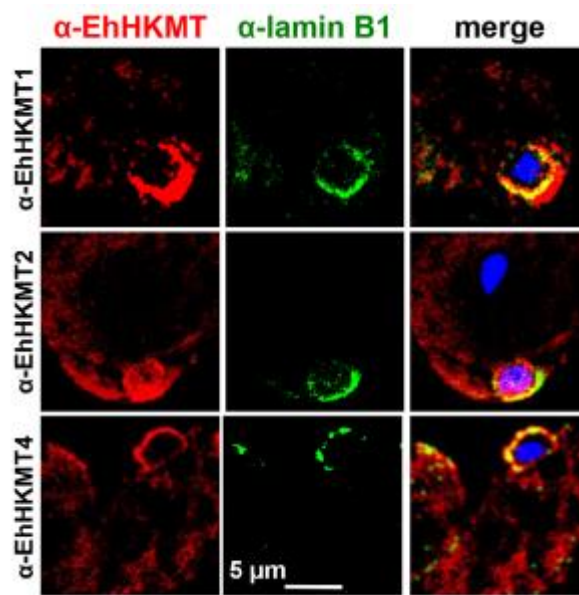


Figura 5. Localización subcelular de EhHKMT1, EhHKMT2 y EhHKMT4. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se detectó la localización subcelular de cada una de las metiltransferasas (rojo) y de la proteína lamina B1 como marcador de la membrana nuclear interna (verde) (Tomado de Borbolla-Vázquez *et al*, 2016)

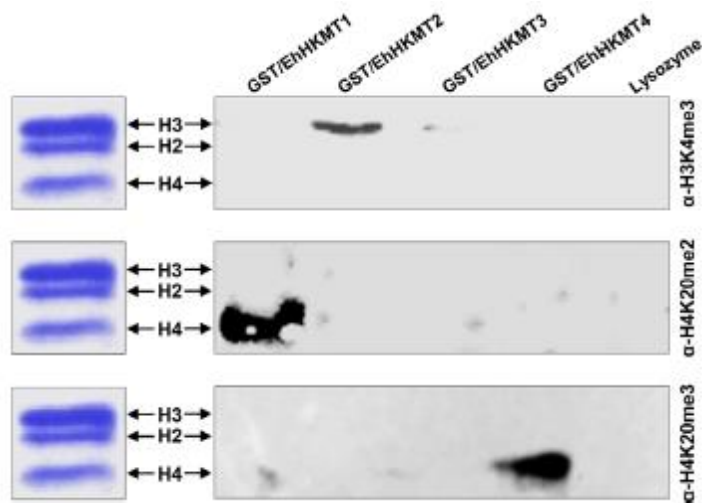


Figura 6. Reconocimiento de marcas epigenéticas sobre histonas comerciales catalizadas por las EhHKMTs. Utilizando metiltransferasas de lisina recombinantes y AdoMet como sustrato sobre histonas comerciales. Utilizando anticuerpos específicos se encontró que EhHKMT1 cataliza la dimetilación de la lisina 20 de la histona 4, EhHKMT2 cataliza la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 y EhHKMT4 cataliza la trimetilación de la lisina 20 de la histona 4 (tomado de Borbolla-Vazquez *et al*, 2016)

Adicionalmente, se encontró que EhHKMT2 y EhHKMT4 se relocalizaron hacia las vacuolas fagocíticas después de 20 min de fagocitosis (figura 7). Además, se hizo un experimento de co-localización de estas dos metiltransferasas con EhCPADH, proteína que también es reclutada a los 20 min de fagocitosis alrededor de los fagosomas y se observó que, en efecto, estas enzimas co-localizan, lo que sugiere que estas enzimas están involucradas en la formación de fagosomas (figura 8) (Borbolla-Vázquez, *et al*, 2016).

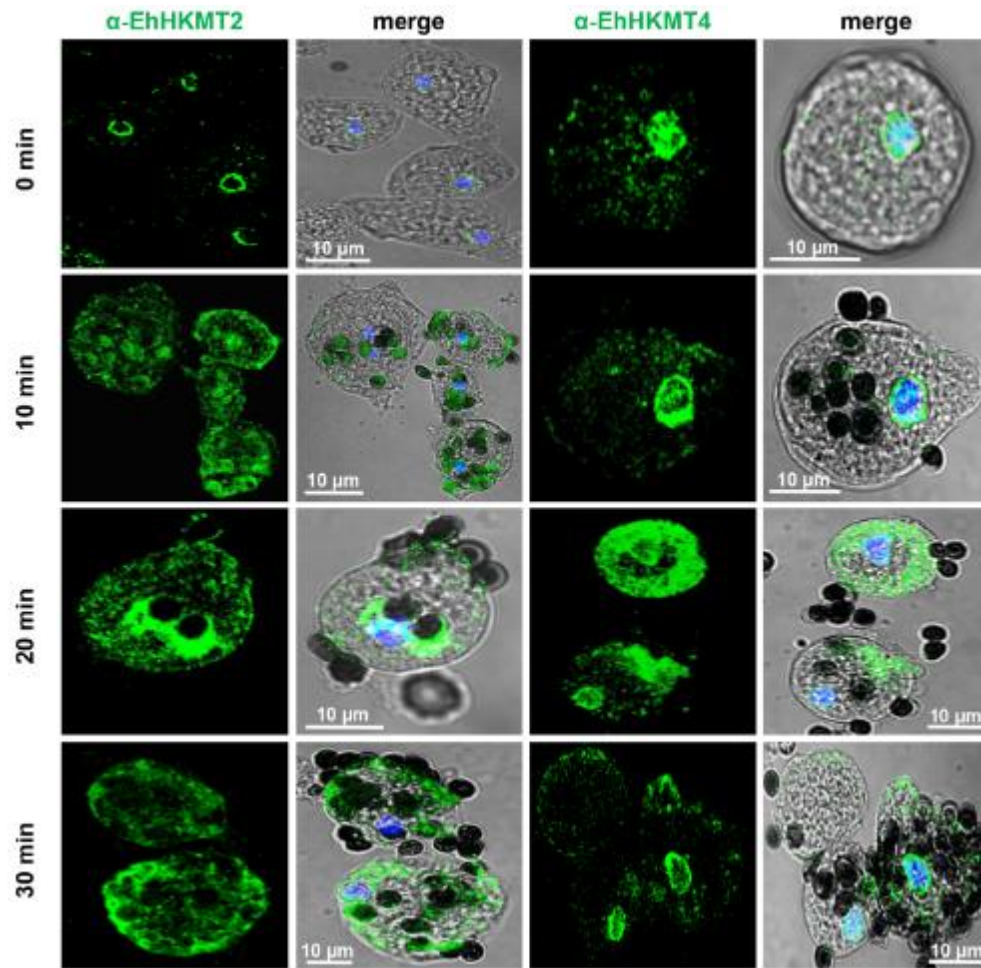


Figura 7. Localización de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis. Se observa que durante la eritrofagocitosis, tanto EhHKMT2 como EhHKMT4 se relocalizan alrededor de vacuolas que contienen eritrocitos en su interior (modificado de Borbolla-Vázquez *et al*, 2016)

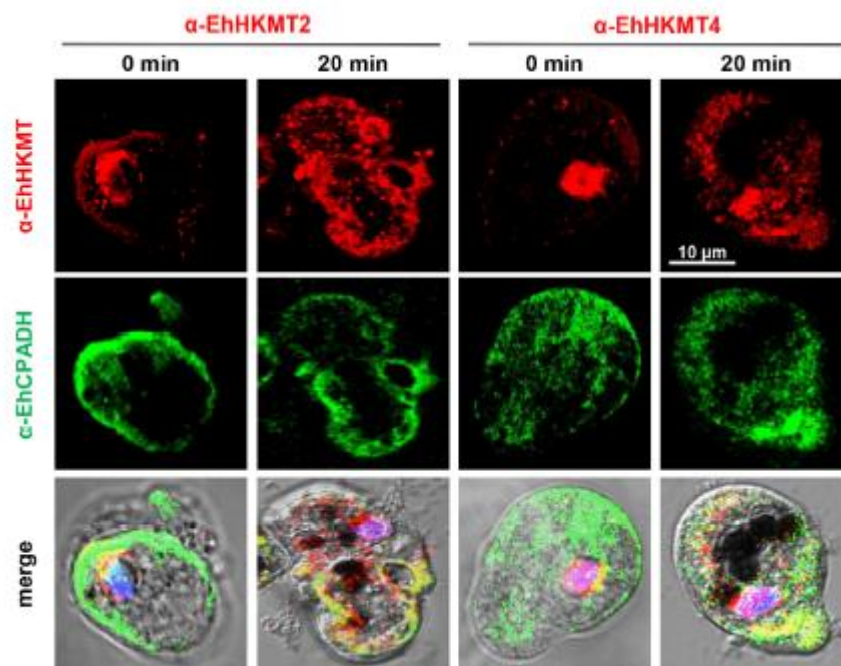


Figura 8. Asociación de EhHKMT2 y EhHKMT4 con el complejo EhCPADH. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se detectó a la proteína EhhKMT2 o EhHKMT4 (rojo) y al complejo EhCPADH (verde), y se observa que ambas proteínas colocalizan a los 20 min de eritrofagocitosis.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que las histonas de *E. histolytica* tienen marcas epigenéticas que incluyen la metilación de lisinas y, por otra parte, sugieren que la metilación de lisinas de proteínas citoplásmicas es importante para la fagocitosis, un evento de patogenicidad de este parásito. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado el papel de esas modificaciones, mediadas por las HKMTs, en la biología de este microorganismo.

JUSTIFICACIÓN

E. histolytica posee cuatro metiltransferasas de lisina, de las cuales al menos tres se localizan en el núcleo y citoplasma y dos de ellas, EhHKMT2 y EhHKMT4, se encuentran presentes en vacuolas que contienen eritrocitos fagocitados; además se sugiere que su expresión aumenta durante la fagocitosis (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016), sin embargo esto no se ha comprobado.

Por lo tanto, resulta de nuestro interés medir la expresión de estas proteínas durante la eritrofagocitosis, ya que se sugiere que estas enzimas están involucradas en dicho proceso patogénico.

HIPÓTESIS

Las metiltransferasas de lisina EhHKMT2 y EhHKMT4 incrementan su expresión y/o se relocalizan durante la eritrofagocitosis.

OBJETIVO GENERAL

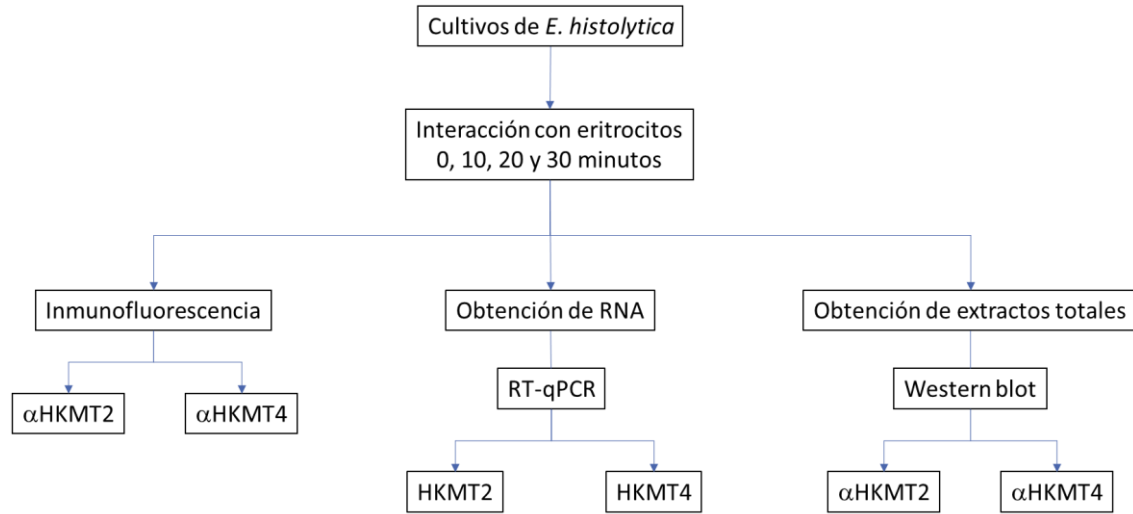
Evaluar los niveles de expresión de las metiltransferasas de lisina EhHKMT2 y EhHKMT4 y su localización durante la eritrofagocitosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

Durante la eritrofagocitosis:

1. Confirmar la localización subcelular de las metiltransferasas de lisina EhHKMT2 y EhHKMT4.
2. Evaluar la transcripción de las metiltransferasas EhHKMT2 y EhHKMT4.
3. Analizar la expresión a nivel de proteína de las metiltransferasas EhHKMT2 y EhHKMT 4.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

- **Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica***

Trofozoítos de la clona A, cepa HM1: IMSS (Orozco et al., 1983) se cultivaron de forma axénica a 37 °C en medio TYI-33 suplementado con suero bovino al 15 % (TYI-S-33) inactivado a 56 °C durante 30 min, 3% de mezcla de vitaminas de Diamon (KC Biologica), 40 UI de penicilina/ml (Lakeside) y 57 µg/ml de estreptomicina (Lakeside). Los trofozoítos se cosecharon a partir de cultivos confluentes, los cuales se incubaron durante 10 min a 4 °C con para desprender las células de la caja de cultivo. Después, los parásitos se colectaron en tubos y se centrifugaron a 500 x g por 5 min. Una vez centrifugado, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 10 mM a un pH de 6.8) frío y estéril. Este paso se repitió dos veces más para lavar los trofozoítos.

- **Eritrofagocitosis**

Se obtuvo una muestra de sangre humana (tipo 0 Rh (+)) por punción venosa utilizando como anticoagulante la solución de Alsever (ácido cítrico 0.55 %, citrato de sodio 0.8%, NaCl 0.42%, glucosa 0.1 M, pH 6.1). La muestra se centrifugó a 500 x g por 10 min y se eliminó el sobrenadante que contenía las células blancas; la pastilla con los eritrocitos se lavó dos veces con la misma solución y los eritrocitos se resuspendieron en medio TYI sin suero a una concentración de 1x10⁸ células/ml. Posteriormente, los eritrocitos se pusieron en contacto con una suspensión de trofozoítos en medio TYI sin suero, a una proporción de 1:50 (trofozoítos: eritrocitos) y se incubaron a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Transcurrido el tiempo, las muestras se incubaron con agua destilada durante 10 minutos a 4°C para lisar a los eritrocitos que no fueron ingeridos; los trofozoítos se recuperaron por centrifugación a 500 x g durante 5 min a 4°C, y se lavaron tres veces con PBS.

- **Obtención de RNA total**

Una vez que se llevó a cabo la eritrofagocitosis, a la pastilla celular se le adicionaron 200 μ l de Trizol (Invitrogen) por cada millón de amibas y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente; posteriormente, se le adicionaron 30 μ l de cloroformo y se mezcló vigorosamente, se incubó por 3 min más a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 x g durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se recuperó la fase orgánica (superior) en un tubo limpio y se le adicionaron 75 μ l de isopropanol, el cual se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min; esta mezcla se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla que contiene el RNA se lavó dos veces con 500 μ l de etanol al 70% (disuelto en agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0.01%). Finalmente, la pastilla se secó y se resuspendió en 30 μ l de agua de ampollita y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm (Thermo Scientific NanoDrop 2000c). Para corroborar la integridad del RNA, este se analizó en geles de agarosa al 1.5% preparados con amortiguador TAE (Tris acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8). A la muestra de RNA se le adicionó amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 70 V durante 40 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 mg/ml durante 10 min y se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV (UVP, USA). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

- **Diseño de iniciadores**

Para llevar a cabo la RT-qPCR de *Ehhkmt2*, se utilizaron los iniciadores diseñados por la Dra. Borbolla en su tesis de doctorado (Borbolla V., 2016a), mientras que para amplificar el gen *Ehhkmt4*, se diseñaron iniciadores (tabla 1) con ayuda del programa Primer3, disponible en internet (www.bioinfo.ut.ee/primer3) y se analizaron con el programa Oligo Analyzer 3.1 disponible también en línea (www.idtdna.com/calc/analyzer). Como control de carga, se utilizaron iniciadores que correspondientes al gen que codifica para la proteína ribosomal S2 de la

subunidad 40S. Los iniciadores se diseñaron para cada gen con un tamaño menor a 25^o pares de bases.

Tabla 1. Iniciadores para RT-qPCR.

Gen		Iniciador (secuencia)	Región	Tamaño
<i>Ehhkmt2</i>	S	5´- TGGGCAAATCCTGATCG -3´	363-597	235 bp
	As	5´- AACAGTGTGCCACCCATA -3´		
<i>Ehhkmt4</i>	S	5´- AAGAGCAAAAAGCACCGTTT -3´	92-251	160 bp
	As	5´- TCTGAGGTATTTTCTCCTGCAA -3´		
s2	S	5´- ATTCGGAAATAGAAGAGGAGG -3´		104 bp
	AS	5´- ACTATTCTCCAAGCTTGGT -3´		

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR de punto final de los genes de interés se realizó utilizando DNA genómico amibiano como molde y los iniciadores previamente descritos. Se utilizaron 300 ng de DNA genómico, 10 μ M de oligonucleótidos, 10 mM dNTP's (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5 μ l de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 1 U de enzima Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 50 μ l. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de reacción, pero sin DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems), bajo las condiciones que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para PCR de punto final.

Temperatura inicial	94 °C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	60 °C \pm 2 °C	45 seg	35 ciclos
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4 °C	∞	

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa (RT-qPCR) se utilizó el kit KAPA SYBR FAST One Step qRT-PCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems), el cual utiliza RNA como molde. La reacción se llevó a cabo de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante, el cual se describe brevemente. Se utilizaron 100 ng de RNA, 5 µl del amortiguador qPCR Master Mix, 10 mM de cada iniciador, 0.4 µl de amortiguador KAPA RT Mix y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 10 µl. Como control negativo, se utilizó la misma mezcla de reacción sin RNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador (StepOnePlus Real-Time PCR System) bajo las condiciones que se especifican en la tabla 3. Los datos obtenidos se analizaron con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, (Livak & Schmittgen, 2001) para calcular la expresión relativa de los genes.

Tabla 3. Condiciones para RT-qPCR

Activación de la enzima	42 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C	3 seg	40 ciclos
Alineamiento	60 °C	30 seg	
	95 °C	15 seg	1 ciclo
Curva de disociación	60 °C	1 min	1 ciclo
	95°C	15 seg	1 ciclo

- **Extracción de proteínas totales de *E. histolytica***

Tras la eritrofagocitosis, a la pastilla de trofozoítos se le añadió 100 µl de amortiguador de lisis (Tris 10 mM, NaCl 50 mM, iodoacetamida 300 mM, NEM 300 mM, TLCK 300 mM, PMSF 100 mM). Para lisar a las células, la muestra se sometió a tres ciclos de congelación/descongelación con nitrógeno líquido seguido de agitación con vórtex, respectivamente. Posteriormente, la concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

- **Electroforesis de proteínas**

La separación de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12%. El gel separador se preparó con acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris HCl 1.5 M pH 8.8, SDS al 0.1 %, persulfato de amonio al 0.1% y TEMED 0.15%. El gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris HCl 1.5 M pH 6.8, SDS al 0.1 %, persulfato de amonio al 0.1 % y TEMED 0.15%. Como amortiguador de corrida se utilizó una solución con Tris 0.25 M, glicina 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 volts, por aproximadamente 1.5 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-450 al 0.025%, metanol 40% y ácido acético 70%. Posteriormente, se destiñó con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7%, hasta que se visualizaron las bandas de proteínas.

- **Western blot**

Los geles de proteínas separadas por electroforesis, se equilibraron con solución de transferencia (Tris 0.25 M, glicina 1.9 M, metanol 20%) durante 10 min en agitación; después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad) de la siguiente manera: ánodo, esponja, papel filtro Whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman, esponja y cátodo. A la cámara se le añadió solución de transferencia fría y se colocó en un baño de hielo para transferir las proteínas a 250 mA por 2 h. Pasado este tiempo, se desmontó la cámara de electrotransferencia y la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%) para verificar

la transferencia. A continuación, la membrana se incubó con solución bloqueadora (leche al 3% en PBS-Tween 0.5%) toda la noche a 4°C en agitación. Para la inmunodetección de EhHKMT2 o EhHKMT4, se utilizaron anticuerpos realizados en contra de los péptidos específicos (Borbolla-Vázquez, 2016) a una dilución de 1:500. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación. Posteriormente se realizaron cinco lavados de 10 min, con PBS-Tween 0.5 %. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1:10000 en leche al 3% en PBS-Tween 0.5 %. Al término de la incubación se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 0.5 %, como se describió anteriormente. La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el método quimioluminiscente (ECL, Amersham) con el protocolo recomendado por el fabricante.

- **Microscopía confocal.**

Los trofozoítos se desprendieron de la caja de cultivo, se lavaron y se resuspendieron en medio TYI sin suero como se describió anteriormente. La suspensión de trofozoítos se colocó en cubreobjetos estériles (2×10^5 trofozoítos/cubreobjetos) y se incubó 1 h a 37°C para permitir la adherencia de los trofozoítos al vidrio. Posteriormente, se adicionó la suspensión de eritrocitos como se describió anteriormente. Pasado el tiempo de interacción, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol absoluto frío durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Para bloquear los sitios de unión inespecíficos, las laminillas se incubaron con suero fetal bovino al 10% en PBS durante 1h a 37°C. A continuación, se agregó el anticuerpo primario (α EhHKMT2 o α EhHKMT4) a una dilución de 1:100 y se incubó durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario se lavó tres veces con PBS y después se incubó el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich) durante 1.5 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se lavó tres veces con PBS y los cubreobjetos se montaron con solución de montaje DABCO-PVA (DABCO 2.5%, PVA 10%, glicerol 5% y Tris 25 mM pH 8.7) con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), en portaobjetos. Las muestras se examinaron por microscopía confocal en un microscopio Carl Zeiss LSM 700. Aproximadamente 20

secciones ópticas de grosor variable fueron documentadas y analizadas con el software ZEN 2009 software (Carl Zeiss).

- **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se graficaron con el programa GraphPad Prism V 5.01 y los valores representan la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat 3.5, y se empleó la prueba ANOVA de una vía, donde la significancia fue de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

- **Localización de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la fagocitosis.**

La metilación de residuos de lisina en histonas es un fenómeno que se ha estudiado ampliamente en los últimos años como un mecanismo de control epigenético en diversos organismos (Bannister *et al*, 2002; Croken *et al*, 2012; Allis & Jenuwein, 2016). Esta modificación postraduccional es llevada a cabo por metiltransferasas de lisina (KMTs). Sin embargo, se ha observado que estas enzimas además de tener la capacidad de metilar histonas, pueden llevar a cabo la metilación de otras proteínas, lo cual se ha observado que está relacionado con la transducción de señales y migración celular (Su *et al*, 2005; Hamamoto *et al*, 2015; Vermillion *et al*, 2014) y por lo tanto, es posible encontrarlas no sólo en el núcleo metilando histonas, sino en el citoplasma metilando proteínas en respuesta a ciertos estímulos.

En 2016, mediante ensayos de inmunofluorescencia, Borbolla-Vázquez y col., demostraron que en trofozoítos de *E. histolytica*, EhHKMT2 y EhHKMT4 se encuentran localizadas tanto en el núcleo como en el citoplasma en condiciones basales. Además, evaluaron la localización de estas proteínas durante la fagocitosis, que es uno de los principales mecanismos de patogenicidad de la amiba, observando que en general ambas proteínas se relocalizan durante dicho evento alrededor de vacuolas que contienen eritrocitos fagocitados. En el presente trabajo estos resultados se corroboraron y adicionalmente se logró observar con mayor detalle la localización de dichas proteínas.

En condiciones basales, es decir aquellas amibas que no tuvieron interacción con eritrocitos, EhHKMT2 se encontró en pequeños puntos dispersos en el citoplasma y en la periferia del núcleo (figura 9); adicionalmente, se observó que esta proteína se concentró hacia los pseudópodos o prolongaciones citoplásmicas (figura 10). A los 10, 20 y 30 min de interacción de las amibas con los eritrocitos, el patrón de localización fue diferente a la condición basal, pero similar entre ellos; lo que se puede resaltar es que la proteína ya no se encontró dispersa en el citoplasma, sino que se relocalizó hacia regiones cercanas a la membrana plasmática, así como en

bocas fagocíticas (figura 9); también se observó a la proteína alrededor de eritrocitos fagocitados, en concordancia con lo reportado por Borbolla-Vázquez (2016) (figura 9).

Por otro lado, en el caso de EhHKMT4, lo que se observó en condiciones basales es que la proteína se detectó en el citoplasma, sin ninguna localización específica; y a diferencia de lo que ya se había reportado anteriormente, no se observó alrededor de los núcleos (figura 11). Sin embargo, después de la interacción con los eritrocitos, a los 10, 20 y 30 min, se observó que la proteína se relocaliza alrededor y dentro del núcleo (figura 12), cercana a la membrana plasmática, y alrededor de eritrocitos fagocitados (figura 11), como ya se había reportado.

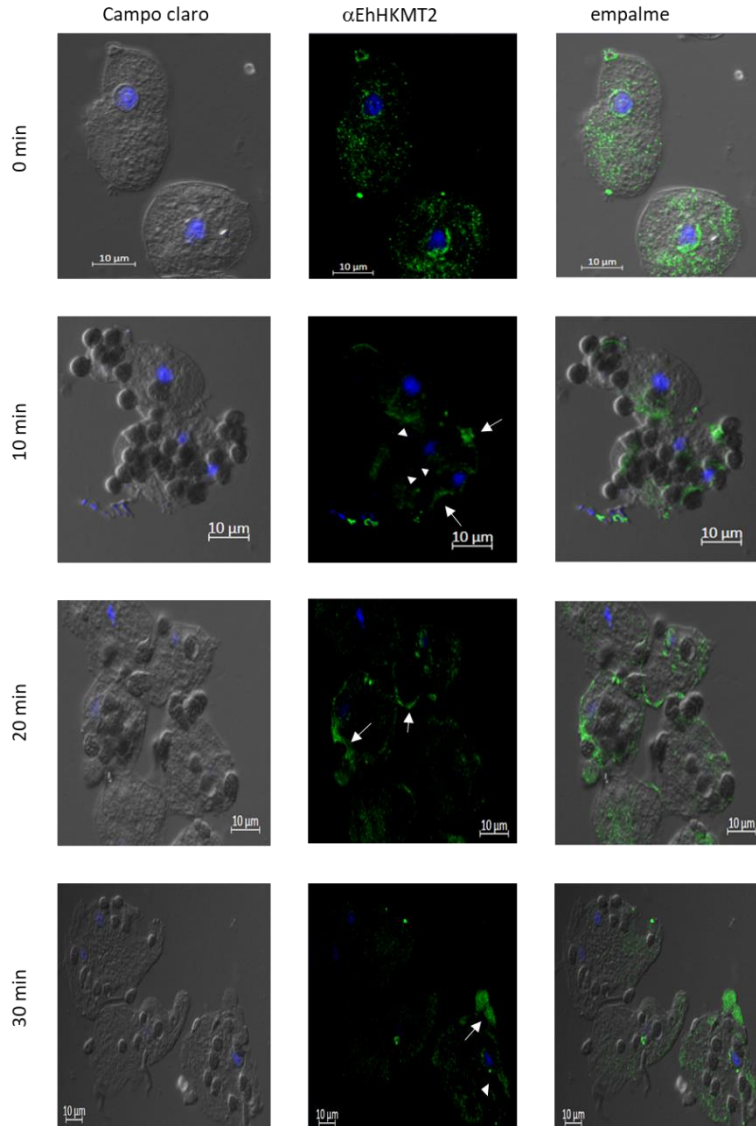


Figura 9. Localización subcelular de EhHKMT2 durante la eritrofagocitosis. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Posteriormente, las células se fijaron e incubaron con α -EhHKMT 2, después con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), para finalmente ser analizadas por microscopía confocal. La imagen muestra un solo corte de la porción media de los trofozoítos. Las flechas indican la localización en membrana y bocas fagocíticas, mientras que las cabezas de flecha indican la localización alrededor de los eritrocitos ingeridos.

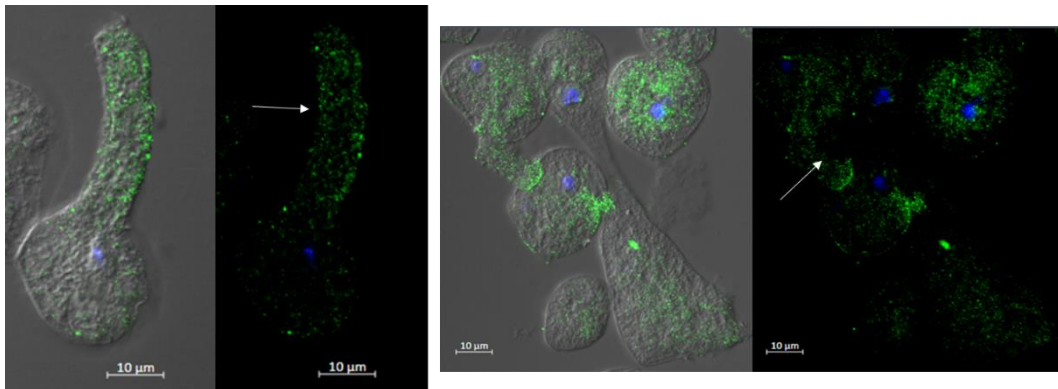


Figura 10. EhHKMT2 se localiza en prolongaciones citoplásmicas. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Posteriormente, las células se fijaron e incubaron con α -EhHKMT 2, después con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), para finalmente ser analizadas por microscopia confocal. La imagen muestra un solo corte de la porción media de los trofozoítos.

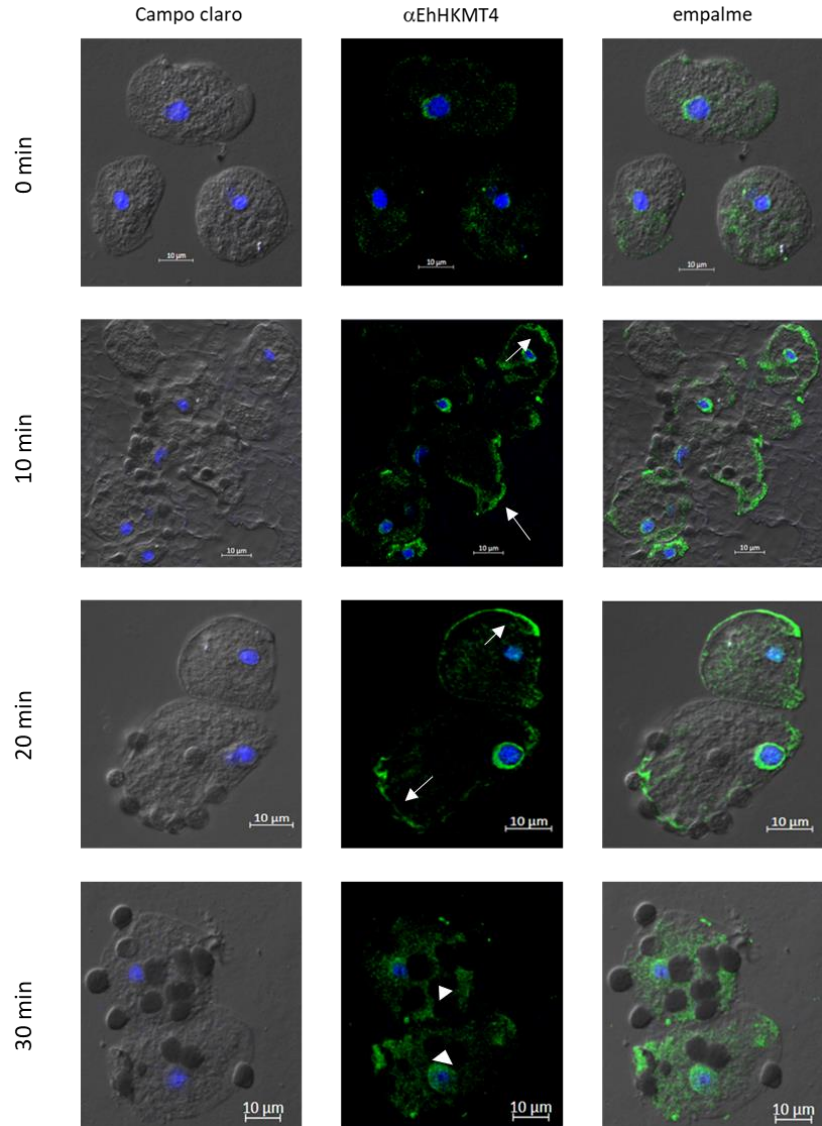


Figura 11. Localización subcelular de EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Posteriormente, las células se fijaron e incubaron con α -EhHKMT 4, después con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), para finalmente ser analizadas por microscopía confocal. La imagen muestra un solo corte de la porción media de los trofozoítos. Las flechas indican la localización en membrana y bocas fagocíticas, mientras que las cabezas de flecha indican la localización alrededor de los eritrocitos fagocitados.

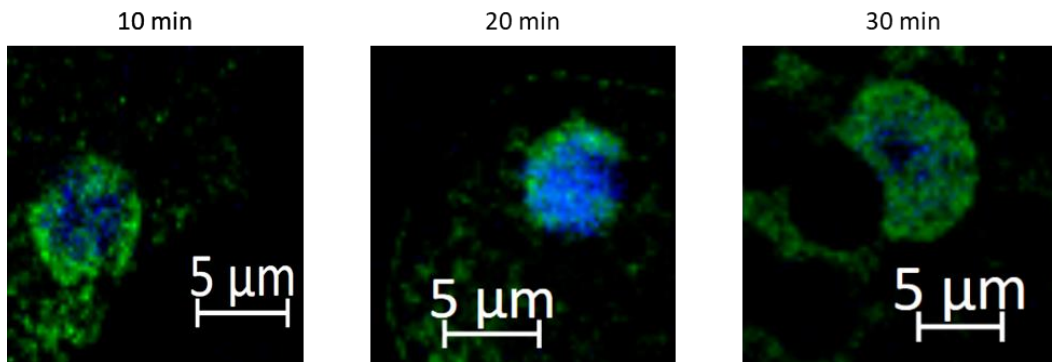


Figura 12. EhHKMT4 se localiza en el núcleo durante la eritrofagocitosis. Los trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con eritrocitos a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Posteriormente, las células se fijaron e incubaron con α -EhHKMT 4, después con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul), para finalmente ser analizadas por microscopía confocal. La imagen muestra un solo corte de la porción media de los trofozoítos.

- **Nivel de transcripción de *Ehhkm2* y *Ehhkmt4* durante la eritrofagocitosis**

Los cambios en la localización de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis son un indicio de que ambas proteínas están relacionadas con este evento, ya sea de manera directa o indirecta. Por lo tanto, es posible que haya cambios en la expresión de la proteína durante este proceso, ya sea a nivel de transcripción y/o de traducción.

Para evaluar los niveles de transcripción se llevaron a cabo ensayos de RT-qPCR, para lo cual se diseñó un par de iniciadores específicos para cada gen (*Ehhkmt2* y *Ehhkmt4*) y se utilizó un par de iniciadores que reconocen el gen de la proteína ribosomal S2, como control interno (tabla 1). Antes de llevar a cabo la RT-qPCR, se estandarizaron las condiciones de temperatura a la cual amplifica cada par de oligonucleótidos, utilizando DNA genómico como molde, y usando una T_m cercana a 60 °C, debido a que es la temperatura óptima a la cual amplifica la polimerasa del kit. En la figura 13 se puede observar la obtención de una sola banda del tamaño esperado (230 pares de bases para *Ehhkmt2* y 160 pares de bases para *Ehhkmt4*) a diferentes temperaturas, incluyendo a 60 °C.

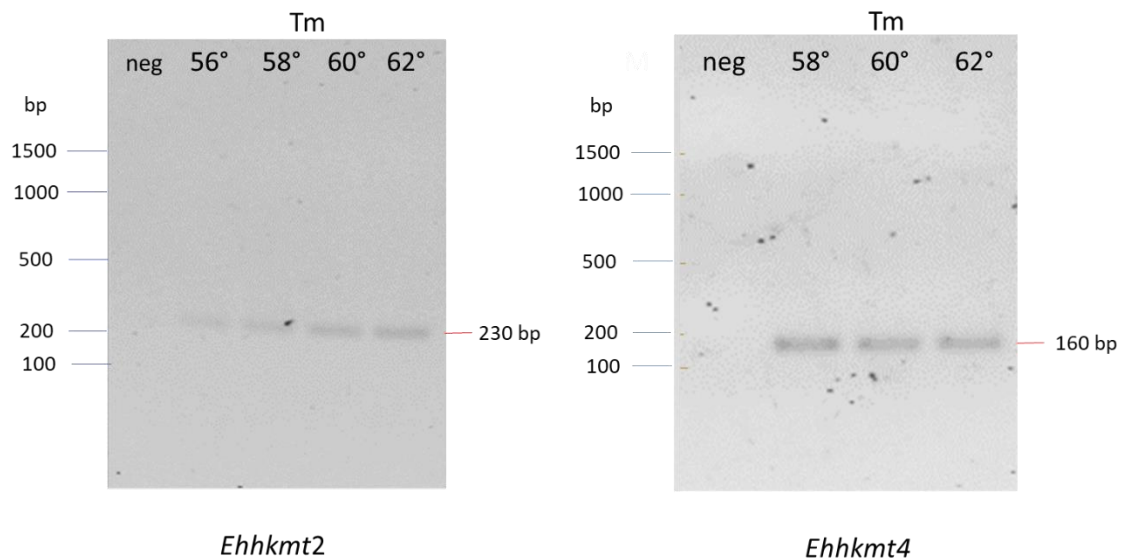


Figura 13. *Ehhkmt2* y *Ehhkmt4* amplifica a 60 °C. A partir de DNA genómico se realizaron ensayos de PCR de punto final con los iniciadores específicos para EhHKMT2 (izquierda) y EhHKMT4 (derecha). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1.5%. Como control negativo se usó la mezcla de reacción sin DNA molde. A la derecha se muestra el tamaño del amplificado para cada gen.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de amplificación y se observó que sólo se obtenía una banda del tamaño esperado, se obtuvo RNA total de trofozoítos amibianos a los diferentes tiempos de eritrofagocitosis y se llevó a cabo la RT-qPCR. Para cuantificar el nivel relativo de mRNA, se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001), para el cual se utilizó como control al gen de la proteína S2 de la subunidad ribosomal 40S, el cual es un gen constitutivo, es decir que no cambia su expresión durante la fagocitosis, y que además presenta eficiencia similar de amplificación a la de los genes *Ehhkmt2* y *Ehhkmt4* (datos no mostrados) (Marone *et al*, 2001). En la figura 14 se observa que durante la eritrofagocitosis, el nivel de mRNA de *Ehhkmt2* incrementó más de 2 veces desde los primeros 10 min de interacción y el incremento se mantuvo hasta los 30 min; por el contrario, en el caso de *Ehhkmt4* (figura 15), los niveles de mRNA no presentaron ningún cambio significativo durante la eritrofagocitosis.

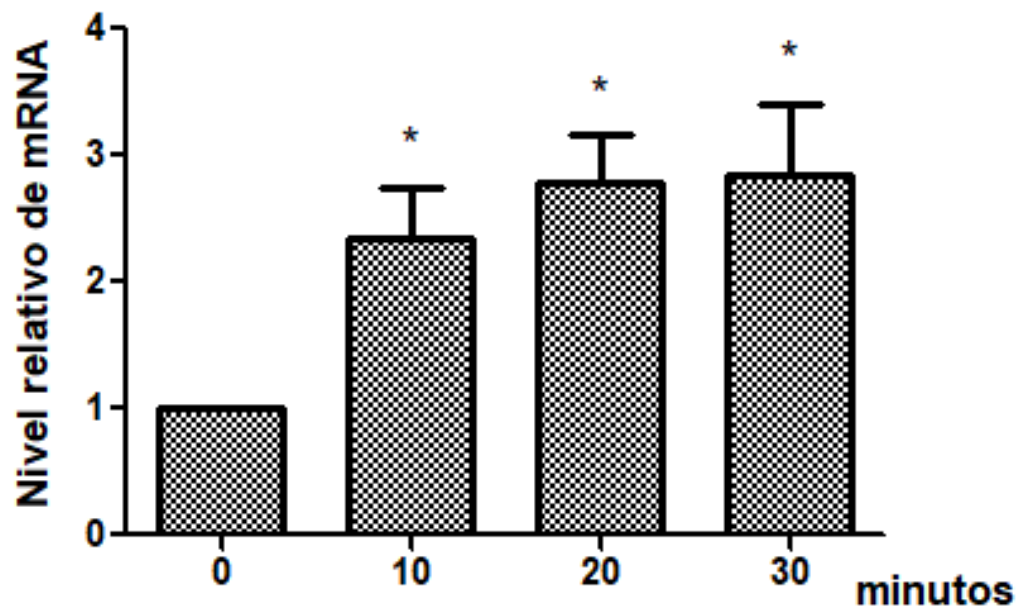


Figura 14. Incremento en el nivel de transcrito de *Ehhkmt2* durante la eritrofagocitosis. Se obtuvo el RNA total de trofozoítos de *E. histolytica* a los 0, 10, 20 y 30 min de eritrofagocitosis y se llevó a cabo la RT-qPCR para la amplificación del transcrito *Ehhkmt2*. Como control se utilizó al gen constitutivo de la proteína S2 de la subunidad ribosomal 40S. La desviación estándar corresponde al análisis de 6 réplicas independientes (* $P < 0.05$).

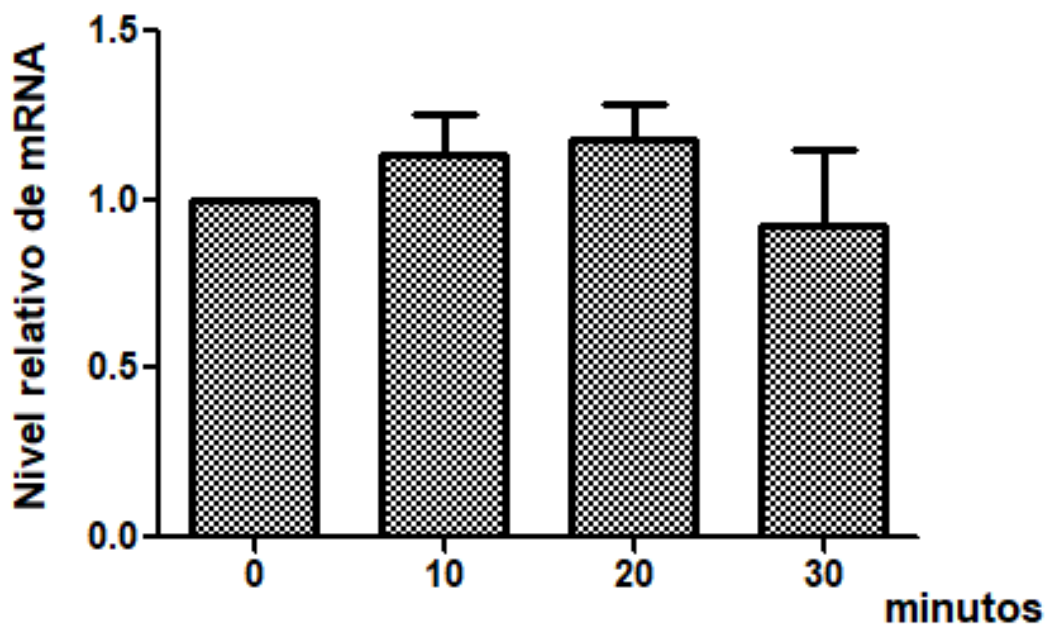


Figura 15. El nivel de transcrito de *Ehhkmt4* se mantiene durante la eritrofagocitosis. Se obtuvo el RNA total de trofozoítos de *E. histolytica* a los 0, 10, 20 y 30 min de eritrofagocitosis y se llevó a cabo la RT-qPCR para la amplificación del transcrito de *Ehhkmt4*. Como control se utilizó al gen constitutivo de la proteína S2 de la subunidad ribosomal 40S. La desviación estándar corresponde al análisis de 6 réplicas independientes.

- **Niveles de expresión de proteína de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis.**

Una vez que se evaluaron los niveles de transcripción de los dos genes de interés, se procedió a evaluar los niveles de proteína, ya que se sabe que estos no necesariamente correlacionan (Kendrick, 2014; Vogel & Marcotte, 2015). Para ello, se obtuvieron extractos totales de proteínas de trofozoítos después de la interacción con los eritrocitos, los cuales se corrieron en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se hizo con los anticuerpos específicos α HKMT2 y α HKMT4 obtenidos por Borbolla-Vazquez y col. (2016). Como control de carga se utilizaron anticuerpos contra actina, que es una proteína constitutiva. Los análisis se hicieron por triplicado. En la figura 16 se muestra el resultado obtenido. En estos ensayos se detectó el reconocimiento de una banda de 49 kDa para EhHKMT2 y de 51 kDa para EhHKMT4 (Figura 16 panel a1 y b1 respectivamente). Tras hacer el análisis densitométrico de las bandas reconocidas por los anticuerpos, se observó que, a diferencia de los niveles de RNA, la proteína EhHKMT2 redujo su expresión en aproximadamente un 50% a los 10 min de interacción con los eritrocitos y conforme transcurrió el tiempo de interacción, el nivel de la proteína siguió disminuyendo, donde a los 30 minutos la expresión de la proteína se redujo a menos del 50% (Figura 16 panel a2); mientras que los niveles de la proteína EhHKMT4, al igual que los de su RNA, se mantuvieron constantes durante todos los tiempos de eritrofagocitosis analizados (Figura 16 panel b2).

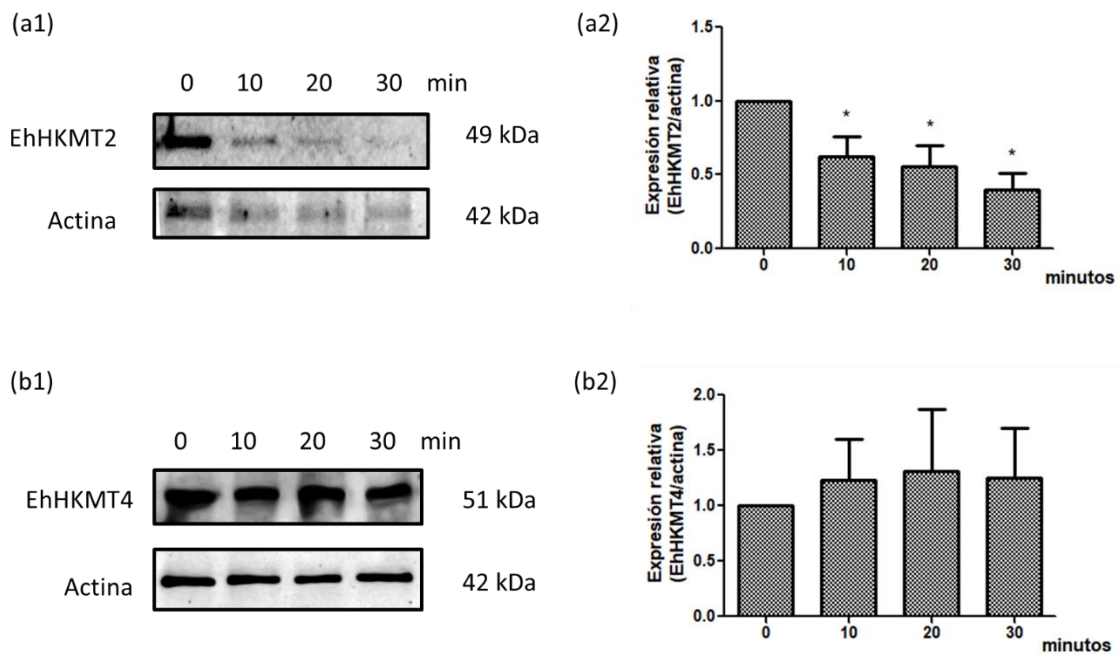


Figura 16. Expresión de EhHKMT2 y EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis. A partir de extractos totales de proteínas se realizaron ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra EhHKMT2 (panel a) o EhHKMT4 (panel b). La desviación estándar corresponde al análisis de cuatro experimentos independientes (*P < 0.05).

DISCUSIÓN

La epigenética se define como los cambios hereditarios en un organismo que alteran los niveles de expresión genética, sin alterar la secuencia de DNA, es decir, cambios en el fenotipo sin alterar el genotipo (Croken *et al*, 2012; Allis & Jenuwein, 2016). Los mecanismos mediante los cuales ocurren estos cambios epigenéticos se pueden agrupar en general en dos grandes grupos: la regulación epigenética basada en RNA y la regulación epigenética mediante la modificación de la estructura de la cromatina, siendo este último el más común en los eucariontes (Croken *et al*, 2012). Los cambios en la estructura de la cromatina, modifican la compactación del DNA y por lo tanto, la accesibilidad de los complejos de transcripción y las polimerasas (Bannister *et al*, 2002; Croken, 2012). Uno de los mecanismos por los cuales se puede alterar la estructura de la cromatina, es por las modificaciones postraduccionales (PTMs) de las histonas, que son proteínas básicas que forman un octámero alrededor del cual se enrolla el DNA (Croken *et al*, 2012). El extremo amino terminal, también conocido como “cola de las histonas”, es una región con una gran cantidad de aminoácidos básicos que se encuentra fuera del nucleosoma, lo cual lo vuelve un sitio accesible para interacciones proteína-proteína y un blanco para modificaciones pos-traduccionales (Rice & Allis, 2001; Bannister *et al*, 2002; Croken *et al*, 2012; Chen *et al*, 2014). Entre las PTMs que pueden modificar a las histonas, se encuentran la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, citrunilación, sumoilación, biotinilación, ADP-ribosilación, entre otras; siendo las primeras dos las que mejor se han estudiado (Arzate-Mejía *et al*, 2011; Leinhart & Brown, 2011; Chen *et al*, 2014).

La metilación de histonas ocurre tanto en residuos de arginina por parte de las proteínas de la familia PRMT (Paik *et al*, 2007; Borbolla-Vázquez *et al*, 2015), como en residuos de lisina por parte de las proteínas de la familia de las HKMT (metiltransferasas de lisina) que poseen un dominio SET característico (Paik *et al*, 2007; Borbolla-Vázquez *et al*, 2016), aunque se han descrito metiltransferasas que carecen del dominio SET, las cuales poseen un dominio DOT1 (Völker & Angrand, 2006).

Sin embargo, no sólo las histonas se metilan, se ha observado que esta PTM se encuentra en otras proteínas en diferentes organismos (Paik & Kim, 1971) y estas PTMs pueden ser llevadas a cabo también por las HKMTs (Zhang *et al*, 2012; Cao *et al*, 2013). Además, se ha relacionado a la metilación de proteínas con la regulación de diferentes eventos celulares (Lanouette *et al*, 2014).

En todos los organismos eucariontes, se ha encontrado la presencia de proteínas con dominio SET (Dillon *et al*, 2005). En el caso de *E. histolytica* se describió la presencia de cuatro metiltransferasas de lisina, que se denominan EHKMT1, 2, 3 y 4, las cuales poseen actividad enzimática de metiltransferasas de lisina sobre histonas comerciales (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016). Estas proteínas se expresan en condiciones basales y al menos tres de ellas se encuentran localizadas tanto en el citoplasma como en la región perinuclear (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016); adicionalmente se observó que dos de ellas (EhHKMT2 y EhHKMT4) se relocalizan durante la eritrofagocitosis, indicando que éstas podrían participar en dicho proceso.

Es por ello, que en este trabajo, se realizó la inmunolocalización tanto de EhHKMT2 como de EhHKMT4, a distintos tiempos durante la eritrofagocitosis. En condiciones basales, tanto EhHKMT2 como EhHKMT4 se encuentran dispersas en el citoplasma, así como en la región perinuclear. Adicionalmente, se observó que EhHKMT2 se encuentra en proyecciones citoplásmicas de la amiba. Por su parte, durante los tiempos evaluados de eritrofagocitosis, ambas proteínas se relocalizan hacia la membrana citoplásmica, bocas fagocíticas y alrededor de vacuolas que contienen eritrocitos fagocitados. Este cambio de localización durante la fagocitosis es un indicio de que ambas proteínas pueden participar de manera directa o indirecta en este proceso. Debido a que la eritrofagocitosis es un evento que abarca muchos eventos moleculares que van desde el reconocimiento de ligandos por moléculas de adhesión, vías de señalización, movilización del citoesqueleto y formación de vacuolas fagocíticas (Bhattacharya & Bhattacharya, 2015), es posible que la participación de las metiltransferasas esté involucrada en cualquiera de estos procesos. Interesantemente, en un análisis *in silico* del interactoma realizado con HKMTs de humano (*Homo sapiens*) homólogas a las HKMTs de *E. histolytica*, se

encontró que estas pueden interactuar, entre otras proteínas, con la actinina (Hernández-Acatitla, 2017), que es una proteína de unión a actina y a varias proteínas asociadas al citoesqueleto (Sjöblom *et al*, 2008). Adicionalmente existen más evidencias en otros sistemas de la metilación de proteínas del citoesqueleto y la participación de diferentes metiltransferasas con la estructuración del citoesqueleto; por ejemplo, se ha observado que en *Acanthamoeba castellanii* la actina se encuentra dimetilada (Weihing & Korn, 1970). Por otro lado, se ha observado que en linfocitos T existe un complejo citosólico de Eh2, que es una metiltransferasa, que regula la polimerización de actina y se ha relacionado con la activación de este tipo de células (Su *et al*, 2005). Otros estudios han demostrado que en humano, la tubulina, que es una proteína del citoesqueleto, se encuentra metilada por SETD2 (Park *et al*, 2005). Finalmente en otro estudio se demostró que Smyd2 metila a la proteína chaperona Hsp90, la cual a su vez forma un complejo con la titina en el sarcómero (Donlin *et al*, 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes y la consideración de la gran actividad del citoesqueleto de actina en los sitios de unión a la célula blanco que se va a fagocitar (Bailey *et al*, 1985), es posible que EhHKMT2 y 4 participen en este evento metilando a algunas proteínas del citoesqueleto o que estén relacionado con éste.

En el caso de EhHKMT2, llama la atención la localización de dicha proteína en los pseudópodos o extensiones citoplásmicas en condiciones basales. En algunos trabajos se ha relacionado a las metiltransferasas de lisina con la migración celular o motilidad; por ejemplo, se encontró que el factor de alargamiento 1- α 1 (EF1 α 1) se une a la actina de las células neurales de la cresta, el cual debe estar metilado, para promover la migración celular, otro de los eventos en los que participa el citoesqueleto de actina (Vermillion *et al*, 2014). En otro trabajo, se encontró que en *T. gondii*, la ausencia de AKMT, que es una metiltransferasa de lisina, inhibe la motilidad del parásito; sin embargo, aún se desconoce el blanco para dicha enzima (Heaslip *et al*, 2011; Sivagurunathan *et al*, 2013).

De manera particular, se observó que EhHKMT4 se concentra alrededor y dentro del núcleo durante la eritrofagocitosis, lo cual sugiere que esta proteína también

puede estar regulando la expresión de diversos genes durante este proceso. Previamente se reportó que EhHKMT4 lleva a cabo la trimetilación de lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3) en ensayos donde se utilizó como sustrato histonas comerciales (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016), donde en otros sistemas esta modificación se relaciona con el silenciamiento de genes (Dillon *et al*, 2005). Por lo tanto, es posible sugerir que durante la fagocitosis la migración de EhHKMT4 al núcleo está relacionada con el silenciamiento transcripcional durante este proceso, aunque falta determinar que genes son blanco de esta metiltransferasa.

Una vez que se determinó la localización de estas proteínas durante la eritrofagocitosis, se quiso medir la expresión de las mismas durante el mismo evento. Lo que se encontró es que la expresión a nivel de mRNA de *Ehhkmt2* aumenta más de 2.5 veces a los 30 min; sin embargo, la proteína disminuye a menos del 50%. En varios estudios se ha observado que la concentración de mRNA en comparación con la de la proteína respectiva, no necesariamente son similares (Kendrick, 2014); esto se debe a que entre la transcripción y la traducción existen mecanismos que regulan la expresión genética, como son el procesamiento y degradación del mRNA, así como la localización, modificación y destrucción programada de las proteínas (vida media) (Vogel & Marcotte, 2015). Esto sugiere que durante la fagocitosis debe haber algún estímulo que desencadene la transcripción del gen *Ehhkmt2*; sin embargo, también debe existir algún mecanismo de regulación que no permita que se traduzca dicho RNA, por lo tanto se observa un decaimiento en la concentración de la proteína.

Por otro lado, para el caso de EhHKMT4, tanto los niveles de mRNA como los de proteína, se mantienen constantes durante la eritrofagocitosis. En conjunto con la localización, entonces, se puede decir que el estímulo de la célula blanco sólo induce cambios en la localización celular, pero no cambios en la expresión del gen y por lo tanto, no se desencadenan mecanismos de regulación adicionales.

A pesar de que ambas proteínas se localizan alrededor de los eritrocitos ingeridos durante la eritrofagocitosis, sugiriendo su participación en la formación y/o maduración de las vacuolas fagocíticas, no fue posible determinar si las dos

metiltransferasas colocalizan y por lo tanto, si tienen una función diferente en este proceso o si tienen un papel redundante. Sin embargo las vías de señalización que estimulan su expresión son diferentes para cada una de ellas; por lo que es posible que ambas proteínas tengan distintas funciones durante este evento. Además nuestros resultados de inmunolocalización sugieren que EhHKMT2 parece estar involucrada en la migración, mientras que EhHKMT4 puede tener un papel en la regulación de la transcripción durante la eritrofagocitosis.

CONCLUSIONES

- En condiciones basales, EhHKMT2 y EhHKMT4 se encuentran dispersas en el citoplasma y alrededor del núcleo; adicionalmente EhHKMT2 se encuentra en pseudópodos y/o prolongaciones citoplásmicas.
- Durante la eritrofagocitosis, EhHKMT2 y EhHKMT4 se relocalizan hacia la membrana citoplasmática, bocas fagocíticas y vacuolas que contienen eritrocitos fagocitados. Además, EhHKMT4 se concentra en el núcleo y la región perinuclear.
- Durante la eritrofagocitosis, se incrementa la expresión de EhHKMT2 a nivel de transcrito, mientras que el nivel de proteína disminuye.
- La expresión del RNA y de la proteína EhHKMT4 se mantienen constantes durante la eritrofagocitosis.

PERSPECTIVAS

- Analizar con qué proteínas citoplásmicas interactúa cada una de las HKMTs durante la eritrofagocitosis.
- Identificar los genes blanco de EhHKMT4 durante la eritrofagocitosis.
- Silenciar la expresión de ambas proteínas o bloquear su actividad mediante el uso de inhibidores, para confirmar su papel en la eritrofagocitosis.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Ali I.K.M., Clark C.G. & Petro W. A. (2008). Molecular epidemiology of Amebiasis. *Infection, genetics and evolution*, 8 (5): 698-707.
2. Allis C.D. & Jenuwein T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Natural reviews. Genetics*, 17(8): 487-500
3. Ankri S., Stolarsky T. & Mirelman D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteases de onot affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolythic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular microbiology*, 28 (4) : 777-785.
4. Arzate-Mejía R.G., Valle-García D. & Recillas-Targa F. (2011). Signaling epigenetics: Novel insights on cell signaling and epigenetics regulation. *Life*, 63 (10): 881-895.
5. Asociación de Médicos de Sanidad Exterior (2012). Amebiasis. Epidemiología y situación mundial. [Internet]. Consultado en agosto de 2016. Disponible en: http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=148:amebiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50
6. Bailey G.B., Day D.B. & Gasque J.W. (1985). Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *Journal of experimental medicine*, 162 (2): 546-558
7. Bannister A.J., Schneider R. & Kouzarides T. (2002) Histone methylation: Dinamic or static. *Cell*, 109: 801-806
8. Barrios-Ceballos M.P., Martínez-Gallardo N.A., Anaya-Velázquez F., Mirelman D. & Padilla-Vaca F. (2005). A novel protease form *Entamoeba histolytica* homologous to members of the family S28 of serine proteases. *Experimental parasitology*, 110 (3) : 270-275

9. Beck, D.B., Oda, H., Shen S.S. & Reinberg D. (2012). PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes and development*, 26: 325-337.
10. Bhattacharya S. & Bhattacharya A. (2015). Phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. En Nozaki T. & Bhattacharya A. (eds), Amebiasis. Biology and pathogenesis of Entamoeba. Springer, Japon, pp 189-206.
11. BioRad (2006). Real-time PCR. Applications guide. *Bio-Rad Laboratorios, Inc* (#1709799)
12. Boethner D. R., Huston C. D., Linford A. S., Buss S. N., Houpt E., Sherman N. E. & Petri W.A. Jr. (2008). *Entamoeba histolytica* phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family. *PLOS Pathogens*, 4 (1): e8
13. Borbolla-Vázquez J. Orozco E., Medina-Gómez C., Martínez-Higuera A. Javier-Reyna R., Chavez B., Betanzos A. & Rodríguez M.A. (2016). Identification and characterization of lysine methyltransferases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology*, 101 (2) : 351-365
14. Borbolla-Vázquez J., Orozco E., Betanzos A. & Rodríguez M. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1^a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasites and vectors*, 8: 219
15. Botero D. & Restrepo M. (2012) Parasitosis humanas. 5^a Edición, Corporación para Investigaciones Biológicas
16. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7(72), 248-254.
17. Bruchhaus I. & Matthiesen J. (2015). Cystein peptidase in pathogenesis. En Nozaki T. & Bhattacharya A. (eds), Amebiasis. Biology and pathogenesis of Entamoeba. Springer, Japon, pp 447-458

18. Buss S. N., Hamano S., Vidrich A., Evans C., Zhang Y., Crasta O.R., Sobral B.W., Gilchrist C.A. & Petri W.A. Jr. (2010). Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. *International journal of parasitology*, 40 (7): 833-843.
19. Cao X., Arnaudo A.M. & García B.A. (2013). Large-scale global identification of protein lysine methylation *in vivo*. *Epigenetics*, 8 (5): 477-485
20. CDC (2013). Amebiasis. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>
21. Chadee K., Petri W.A., Innes D.J., Ravdin J.I. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Journal of clinical investigation*, 80: 1245-1254. (sin bajar)
22. Chen R., Kang R., Fan X.G. & Tang D. (2014). Release and activity of histone in diseases. *Cell death and disease*, 14 (5): e 1370
23. Cornick S., Moreau F. & Chadee K. (2016). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 evokes mucin exocytosis from colonic goblet cells via $\alpha 3$ integrin. *PLOS pathogens*, 12 (4): (sin bajar).
24. Croken M. M., Nardelly, S.C. & Kim K. (2012). Chromatin modifications, epigenetics and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends in parasitology*, 8 (5): 202-213.
25. Dillon S.C., Zhang, X., Trievel R.C. & Cheng X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology*, 6 (8): 227.
26. Dixon S.E., Stilger K.L., Elias E.V., Naguleswaran A. & Sullivan Jr W.J. (2010). A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 173 (1): 1-9.
27. Donlin L.T., Andresen C., Just S., Rudensky E., Pappas C.T., Kruger M., Jacobs E.Y., Unger A., Zieseniss A., Dobenecker M.W., Voelkel T., Chait B.T., Gregorio C.C., Rottbauer W., Tharakhovsky A. & Linke W.A. (2012).

- Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes and development*, 26: 114-119.
28. Espinosa-Cantellano M. & Martínez-Palomo A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clinical microbiology reviews*, 13 (2): 318-331.
29. Faust D.M. & Guillen N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection*, 14: 1428-1441.
30. Flisser A. & Perez-Tamayo R. (2006). Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos. Pp 321-335.
31. García-Rivera G., Rodríguez M.A., Ocádiz R., Martínez-López M.C., Arroyo R., González-Robles A. & Orozco E. (2000). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular microbiology*, 33 (3): 556-568.
32. Giaccia A.J. (2016). A new chromatin-cytoskeleton link in cancer. *Molecular cancer research*, 14 (12): 1173-1175.
33. Gómez J.C., Cortes J.A., Cuervo S.I. & Lopez M.C. (2007). Amebiasis intestinal. *Infectio*, 11 (1): 36-45.
34. Hamamoto R., Saloura V. & Nakamura Y. (2015). Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer*, 15 : 110-124.
35. Heaslip A. Nishi M., Stein B. & Hu K. (2011). The motility of a human parasite, *Toxoplasma gondii*, is regulated by a novel lysine methyltransferase. *PLOS pathogens*, 7 (9): e1002201
36. Hernández-Acatitla E.A. (2017). Análisis de la dimetilación de lisinas en proteínas de *Entamoeba histolytica* en condiciones basales y en la fagocitosis. Tesis de Maestría. CINVESTAV

37. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html → www.epidemiología.salud.gob.mx
38. Huang, J. & Berger S.L. (2008). The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Current opinion in genetics and development*, 18: 152-158
39. Huston C.D. (2004). Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends in parasitology*, 20 (1): 23-26
40. Huston C.D., Boettner D.R., Miller-Sims V. & Petri W.A. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, 71 (2): 964-972.
41. ITIS (nd). Integrated Taxonomic Information System. *Entamoeba histolytica*. Taxonomic serial: 43907. Consultado en julio de 2016 en http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=43907
42. Jain R., Santi-Rocca J., Padhan N., Bhattacharya S., Guillen N. & Bhattacharya A. (2008). Calcium-binding protein 1 of *Entamoeba histolytica* transiently associates with phagocytic cups in a calcium-independent manner. *Cellular microbiology*, 10 (6): 1373-1389,
43. Kendrick (2014). A gene's mRNA level does not usually predict its protein level. *Kendrick Labs, Inc.*
44. Lanouette S., Mongeon V., Figeys D. & Couture J.F. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular systems biology*, 10 (724) : 1-26
45. Leinhardt K. & Brown M. (2011) SET/MYND lysine methyltransferases regulate gene transcription and protein activity. *Genes*, 2: 210-218
46. Livak K. J. & Schmittgen T. D. (2001) Analysis of Relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25 (4): 402-408.

47. Marone M., Mozzetti S., De Ritis D., Pierelli L. & Scambia G. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* 3 (1):19-25
48. Martinez-Palomo A. Gonzales-Robles A. Chavez B. Orozco E. Fernandez-Castelo S. & Cervantes A. (1985). Structural bases of the cytolytic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of protozoology* 32 (1): 166-175
49. Moncada D., Keller K. & Chadee K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alters its protective function. *Infection and immunity*, 71 (2): 838-844.
50. Mortimer L. & Chadee K. (2015) Innate host defenses in the gut. En Nozaki T. & Bhattacharya A. (eds), Amebiasis. Biology and pathogenesis of *Entamoeba*. Springer, Japon, pp 433-445
51. Okada M. & Nozaki T. (2006). New insights onto molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Archives of medical research*, 37: 244-252.
52. Okada M., Huston C.D., Mann B.J., Petri W.A. Jr, Kita K. & Nozaki T. (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell*, 4 (4): 827-831.
53. Organización Mundial de la Salud (1996). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias – Segunda edición. Organización Mundial de la Salud, Ginebra [versión electrónica]. Consultado en septiembre de 2016. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.1.1.html>
54. Orozco E., Guarneros G., Martínez-Palomo A. & Sánchez T. (1983). *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as virulence factor. *Journal of experimental Medicine*, 158: 1511-1521.

55. Paik W.K. & Kim S. (1971). Protein methylation. *Science*, 174 (4005) : 114-119
56. Paik W.K., Paik D.C. & Kim S. (2007). Historical review: the field of protein methylation. *Trends in biochemical sciences*, 32 (3): 146-152
57. Park Y., Powell R.T., Tripathi D.N., Dere R., Ho T.H., Blasius T.L., Chiang Y., Davis I.J., Fahey C.C., Hacker K.E., Verhey K.J., Bedford M.T., Jonasch E., Rathmell W.K. & Walker C.L. (2016). Dual chromatin and cytoskeletal remodeling by SET2. *Cell*, 166 (4) : 950-962.
58. Pérez-Toledo K., Rojas-Meza A.P., Mancio-Silva L., Hernández-Cuevas N.A., Delgadillo D.M., Vargas M., Martínez-Calvillo S., Schert A. & Hernandez-Rivas R. (2009). *Plasmodium falciparum* heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of *var* genes. *Nucleic acids research*, 37 (8): 2596-2065.
59. Qian C. & Zhou M. (2006) SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cellular and molecular life sciences*, 63: 2755-2763
60. Ravdin J.I., Moreau F., Sullivan J.A., Petri W.A. Jr & Mandell G.L. (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, 56 (6) : 1502-1512
61. Recillas F. & Escamilla M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje bioquímico UNAM*, 28: 171-201.
62. Rice J.C. & Allis D. (2001). Code of silence. *Nature*, 414 (6861): 258-261.
63. Samie A., ElBakri A & AbuOdeh R. (2012). Amoebiasis in the tropics: Epidemiology and pathogenesis. *Current topics in tropical medicine*. Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed), InTec.
64. Sautel C.F., Cannella D., Bastien, O., Kieffer, S., Alderbert D., Garin J., Tardieux I., Belrhali H. & Hamkimi M. (2007). SET-8 mediated methylations

- of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in Apicomplexan genomes. *Molecular and cellular biology*, 27 (16): 5711-5724.
65. Schubert H.L., Blumenthal R.M. & Cheng X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical sciences*, 28 (6): 329-335
66. Schulte W & Scholze H. (1989). Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *The journal of protozoology*, 36 (6) : 538-543
67. Shamsuzzaman S.M & Hashiguchi Y. (2002). Thoracic amebiasis. *Clinics in chest medicine*, 23 (2): 479-492.
68. Shinkai Y. (2007). Regulation and function of H2K9 methylation. *Chromatin and disease*. 337-350.
69. Sivagurunathan S., Heaslip A., Liu J. & Hu K. (2013). Identification of functional modules of AKMT, a novel lysine methyltransferase regulating the motility of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 189: 43-53
70. Sjöblom B., Salmazo A. & Djinic-Carugo K. (2008). Alpha actinin structure and regulation. *Cellular and molecular life sciences*, 65 (17) : 6288-6701
71. Stanley S.L. & Reed S. (2001). Microbes and microbial toxins. Paradigms for microbial mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 280: G1049-G1054.
72. Stanley S.L. (2001). Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in parasitology*, 17 (6): 280-285.
73. Stanley S.L. (2003). Amoebiasis. *The lancet*, 361: 1025-1034
74. Su I., Dobenecker M.W., Dickinson E., Oser M., Basavaraj A., Marqueron R., Viale A., Reinberg D., Wülfing C. & Tarakhovsky A. (2005). Polycomb group

- protein Ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell*, 121: 425-436.
75. Tanyuksel M. & Petri W. A. (2003) Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews*, 16 (4): 713-729.
76. Teixeira J.E., Heron, B.T. & Huston C.D. (2008). C1q- and collectin-dependent phagocytosis of apoptotic host cells by the intestinal protozoan *Entamoeba histolytica*. *Journal of infectious disease*, 198 (7) : 1062-1070.
77. Teixeira J.E., Sateriale A., Bessoff K.E. & Huston C.D. (2012). Control of *Entamoeba histolytica* adherence involves metallosurface protease 1, an M family surface metalloprotease with homology to leishmanolysin. *Infection and immunity*, 80 (6) : 2165-2176
78. Torres-Guerrero H., Peattie D.A. & Meza I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 45:121-130.
79. Upcroft, J.A., Campbell, R.W., Benakli, K., Upcroft P. & Vanelle P. (1999). Efficacy of new 5-nitroimidazoles against Metronidazole-susceptible and – resistant *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (1): 73-76.
80. Vázquez, J., Franco E., Reyes G. & Meza I. (1995). Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell motility and the cytoskeleton*, 37: 37-45
81. Vermillion K. L., Lidberg K. A. & Gamill L. S. (2014). Cytoplasmic protein methylation is essential for neural crest migration. *The journal of cell biology*, 204 (1): 95-109
82. Vogel C. & Marcotte E. M. (2015). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics*, 13 (4): 227-232
83. Völker P. & Angrand P.O. (2006). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*, 89: 1-20.

84. Volz J.C., Bártfai R., Petter M., Langer C., Josling G.A., Tsuboi T., Schwach F., Baum J., Rayner J.C., Stunnenberg H.G., Duffy M.F. & Cowman A.F. (2012). PfSET10, a *Plasmodium falciparum* methyltransferase, maintains the active *var* gene in a poised state during parasite division. *Cell host and microbe*, 11: 7-18.
85. Walsh JA. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. *Reviews of infectious diseases*, 8: 228-238
86. Weihing R.R. & Korn E.D. (1970). e-N-Dimethyllysine in amoeba actin. *Nature*, 227 (1263) : 1263-1264
87. World Health Organization (1997). Amoebiasis. *Weekly Epidemiological Record*, 72 : 97-100
88. Wu S. & Rice C. (2011). A new regulator of the cell cycle. The PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell cycle*, 10 (1): 68-72.
89. Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A & Gómez A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis. State of the art. *Infection, genetics and evolution*, 9: 1023-1032
90. Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A. & Gómez A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, genetics and evolution*, 9: 1023- 1032.
91. Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A., Gomez A., Ramiro M., Cerritos R., González E., Hernandez E. & Partida O., (2011). Novelthies on Amoebiasis: A neglected tropical disease. *Journal of global infectious disease*. 3 (2): 166 - 174.
92. Zhang X., Wen H. & Shi X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 44 (1): 14-27

