



**Cinvestav**

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

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Identificación de las proteínas metiltransferasas de  
arginina (PRMTs) y análisis de su expresión durante  
el enquistamiento de *Entamoeba invadens*”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**RIGOBERTO ORTIZ HERNÁNDEZ**

**Para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Director de la Tesis:**

**Dr. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ**

**Ciudad de México**

**DICIEMBRE, 2019**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez. Asimismo, este trabajo estuvo bajo la asesoría de la Dra. Abigail Betanzos Fernández y el Dr. José Luis Rosales Encina. Durante el desarrollo de este trabajo el autor fue becario de CONACyT con número 863165.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Rigoberto Antonio Ortiz Herrera y María Leticia Alicia Hernández Méndez y mis hermanos Antonio Ortiz Hernández y Miriam Ortiz Hernández, por su amor y apoyo incondicional.

A mi amada Ale, mi compañera de vida, mi musa y mi amparo inefable.

A mi tutor, el doctor Mario Alberto Rodríguez Rodríguez porque su apoyo, dirección, vocación, comprensión y ejemplo han sido invaluableles en mi formación personal y profesional.

A mis asesores, la doctora Abigail Betanzos Fernández y el doctor José Luis Rosales Encina, por sus egregios consejos, orientaciones, correcciones y observaciones dirigidas a mi formación personal y profesional, así como a este escrito.

Al C. Carlos Vázquez Calzada y al técnico Mario Rodríguez Nieves por su apoyo técnico y su colaboración en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Christian, Ramón, Arturo, Jorge, Bety, Susana, Mariana por sus consejos, resuellos, cariño, apoyo y sinceridad.

A mis amigos Josué y Jeni por sus consejos, apoyo, orientaciones.

A mi mejor amigo Vladimir.

A mi familia, amigos y seres queridos.

Al CINVESTAV y todo el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de manutención con número 863165.

## ABREVIATURAS

*A. castellanii* *Acanthamoeba castellanii*

AcPRMT Proteínas metiltransferasas de arginina de *Acanthamoeba castellanii*

AdoHcy Adenosil-L-homocisteína

AdoMet S-adenosil-L-metionina

ADMA Di-metilación asimétrica de la arginina

ADP Difosfato de adenosina

AHA Absceso hepático amebiano

ATP Trifosfato de adenosina

BLAST Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local

*C. albicans* *Candida albicans*

CARM1 Coactivador asociado a metiltransferasa de arginina 1

PRMT Proteína metiltransferasa de arginina

DNA Ácido desoxirribonucleico

EhPRMTs Proteínas metiltransferasas de arginina de *Entamoeba histolytica*

*E. histolytica* *Entamoeba histolytica*

*E. invadens* *Entamoeba invadens*

EiPRMTs Proteínas metiltransferasas de arginina de *Entamoeba invadens*

mRNA RNA mensajero

H Histona

HMT Metiltransferasa de histonas

Hmt1 Proteína metiltransferasa de arginina 1

K Lisina

MMA Monometilación de arginina

PABP Proteína de unión a poli A

*P. falciparum* *Plasmodium falciparum*

PFGE Electroforesis en geles de campos pulsados

PKMT Metiltransferasas de lisina

R	Arginina
RBP	Proteínas de unión a RNA
Rmt1	Proteína metiltransferasa de arginina
RNA	Ácido ribonucleico
RT- PCR	Reacción de cadena de polimerasa con transcriptasa inversa
SAM	S-adenosil-L-metionina
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDMA	Di-metilación simétrica de la arginina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STIRP	Proteínas ricas en serina, treonina e isoleucina
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
δ	Delta

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ABREVIATURAS.....	II
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	X
ANTECEDENTES .....	1
ANTECEDENTES GENERALES .....	1
Cromatina.....	1
Epigénética .....	2
Modificaciones postraduccionales en las histonas .....	4
Papel de la metilación en residuos de arginina y de las PRMTs.....	7
Amibiasis .....	13
Agente causal y ciclo de vida.....	18
Patogenia.....	20
Adhesión.....	20
Citólisis .....	22
Fagocitosis.....	23
Enquistamiento .....	23
Genoma de <i>E. histolytica</i> .....	26
Regulación de la transcripción en <i>E. histolytica</i> .....	28
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	30
JUSTIFICACIÓN .....	33
HIPÓTESIS .....	34
OBJETIVOS .....	34
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares .....	34
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35

Análisis <i>in silico</i> .....	35
Cultivo de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	36
Enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	36
Extracción y cuantificación de DNA genómico.....	37
Extracción de RNA total.....	37
Electroforesis en geles de agarosa .....	38
Síntesis de DNA complementario.....	38
Diseño de iniciadores para las PRMTs de <i>E. invadens</i> .....	39
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	39
Extracción de proteínas totales de <i>E. invadens</i> .....	41
Electroforesis de proteínas .....	41
Western blot.....	42
Ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal .....	43
RESULTADOS .....	45
Identificación de las PRMTs de <i>E. invadens</i> .....	45
Identificación de dominios en EiPRMTs .....	47
Similitud de las PRMTs de <i>E. invadens</i> con las de otros organismos del género <i>Entamoeba</i> ..	52
Estructura tridimensional de las PRMTs de <i>E. invadens</i> .....	56
Análisis filogenético de las PRMTs de <i>E. invadens</i> .....	58
Expresión del transcrito de EiPRMTs, en trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	60
Expresión de los transcritos de EiPRMTs, durante el enquistamiento .....	61
Expresión y localización de las proteínas PRMTs en trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	64
Obtención de extractos totales durante el proceso de enquistamiento .....	74
Análisis de la expresión de EiPRMT5 durante el proceso de enquistamiento .....	75
Análisis de la expresión de EiPRMTA durante el proceso de enquistamiento.....	78
DISCUSIÓN.....	82
CONCLUSIÓN .....	90
PERSPECTIVAS .....	91
REFERENCIAS.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la cromatina. ....	2
Figura 2. Marcas epigenéticas y estructura de cromatina. ....	3
Figura 3. Modificaciones postraduccionales de las histonas. ....	5
Figura 4. Reacción de metilación.....	6
Figura 5. La estructura de los derivados de arginina metilados. ....	9
Figura 6. Arquitectura de dominios de nueve PRMTs de humanos.....	10
Figura 7. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> . ....	20
Figura 8. Estrategia experimental de trabajo. ....	35
Figura 9. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN_172090. ....	46
Figura 10. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN_223690. ....	48
Figura 11. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN_398100. ....	49
Figura 12. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN_497480. ....	49
Figura 13. Esquema de los dominios detectados en las proteínas EiPRMTs hipotéticas..	51
Figura 14. Alineamiento de las PRMTs de <i>E. invadens</i> .....	53
Figura 15. Estructura tridimensional de las PRMTs de <i>E. invadens</i> comparadas con cristales de proteínas descritas en la base de datos de PBD.....	57
Figura 16. Estructura tridimensional de las PRMTs de <i>E. invadens</i> comparadas con las PRMTs de <i>E. histolytica</i> . ....	58
Figura 17. Relación filogenética de las PRMTs de <i>E. invadens</i> con PRMTs de otras especies del género <i>Entamoeba</i> , y de otros organismos. ....	60
Figura 18. Análisis de la expresión de los transcritos de los genes de EiPRMTs. ....	62
Figura 19. Análisis de la expresión de los transcritos de los genes EiPRMTs durante el enquistamiento de <i>E. invadens</i> . ....	66
Figura 20. Alineamiento del extremo N-terminal de PRMT1 humana y EiPRMTs. ....	67
Figura 21. Localización de la secuencia de reconocimiento del anticuerpo anti-PRMT1 en las estructuras 3D de PRMT1, EiPRMT1a y EiPRMT1c.....	68
Figura 22. Inmunodetección de las PRMT1 en extractos proteicos totales de trofozoítos de <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i> . ....	69
Figura 23. Alineamiento de EiPRMT5 y EhPRMT5. ....	71
Figura 24. Inmunodetección de PRMT5 en extractos proteicos totales de trofozoítos de <i>E.</i> <i>invadens</i> y <i>E. histolytica</i> . ....	72
Figura 25. Inmunolocalización de PRMT5 en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. invadens</i> . .....	73
Figura 26. Alineamiento de EiPRMTA y EhPRMTA. ....	73
Figura 27. Inmunodetección de PRMTA en extractos proteicos totales de trofozoítos de <i>E.</i> <i>invadens</i> y <i>E. histolytica</i> . ....	74
Figura 28. Inmunolocalización de PRMTA en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E.</i> <i>invadens</i> .....	74
Figura 29. SDS-PAGE de los extractos proteicos totales de <i>E. invadens</i> obtenidos a diferentes tiempos de enquistamiento. ....	75
Figura 30. Expresión de EiPRMT5 durante el enquistamiento. ....	78
Figura 31. Inmunolocalización de EiPRMT5 durante la cinética de enquistamiento.....	79
Figura 32. Expresión de EiPRMTA durante el enquistamiento.....	81



Figura 33. Inmunolocalización de la EiPRMTA en la cinética de enquistamiento. .... 81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores para la amplificación de las PRMTs de <i>E. invadens</i> . ....	40
Tabla 2. Genes y proteínas de PRMTs de <i>E. invadens</i> . ....	50
Tabla 3. Porcentaje de identidad entre las PRMTs de <i>E. invadens</i> . ....	50
Tabla 4 . Identidad entre EiPRMTs y PRMTs de otras <i>Entamoebas</i> y de humano. ....	55
Tabla 5. Porcentaje de identidad entre las PRMTs de <i>E. invadens</i> y las PRMTs humanas. ....	55
Tabla 6 . Porcentaje de identidad entre las PRMTs de <i>E. invadens</i> y las PRMTs de <i>E. histolytica</i> . ...	55

## RESUMEN

**Antecedentes.** La amibiasis humana es causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*, que tiene un ciclo de vida de dos fases, el trofozoíto que es la fase invasiva y el quiste que es la etapa infectiva. El enquistamiento es un proceso esencial para su supervivencia, sin embargo, hasta el momento no se cuenta con un método eficiente para la producción de quistes *in vitro*. Por el contrario, para *E. invadens*, un parásito de reptiles, si se cuenta con metodologías para promover su enquistamiento *in vitro*, por lo que este protozoario se utiliza como modelo para estudiar la diferenciación en el género *Entamoeba*. Existen reportes previos donde se identificaron genes con expresión diferencial durante los procesos de enquistamiento de *E. invadens*, pero poco se conoce acerca del papel que desempeña la metilación de proteínas, tanto en procesos de regulación epigenética, como en las vías de señalización que controlan este evento. La metilación en residuos de arginina es catalizada por enzimas denominadas metiltransferasas de arginina (PRMTs) y se ha demostrado su participación en los procesos de diferenciación en diferentes protozoarios.

**Objetivo.** Identificar los genes codificantes de proteínas arginina metiltransferasa (PRMT's) de *E. invadens* y analizar su expresión, a nivel de mRNA y proteína, durante el proceso de enquistamiento.

**Metodología.** Por medio de análisis por BLAST en la base de datos del genoma de *E. invadens*, buscamos la presencia de genes codificantes de PRMTs en este protozoario. Posteriormente, realizamos el análisis de las secuencias de

aminoácidos de las proteínas correspondientes, así como un análisis filogenético al compararlas con PRMTs de otros organismos, incluidas las enzimas de humano y las de otras especies del género *Entamoeba*. La expresión de los genes y de sus proteínas durante el proceso de enquistamiento se llevó a cabo mediante ensayos de RT-PCR y de western blot, respectivamente. Finalmente, la localización subcelular de las proteínas durante el enquistamiento se determinó por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.

**Resultados.** Nuestro análisis identificó cuatro PRMTs en *E. invadens* (EiPRMTs), tres con homología a PRMTs de tipo I (EiPRMT1a, EiPRMT1c y EiPRMT-A) y una con homología a enzimas de tipo II (EiPRMT5). Los transcritos de los cuatro genes y las proteínas EiPRMT5 y EiPRMTA presentaron distintos niveles de expresión en diferentes tiempos del enquistamiento. Por otra parte, las proteínas EiPRMT5 y EiPRMTA también mostraron diferente localización durante el proceso de enquistamiento y se localizaron en membrana, citoplasma y núcleo.

**Conclusión.** Se detectaron cuatro PRMTs putativas en *E. invadens*, de las cuales sugerimos que al menos EiPRMT5 y EiPRMTA se expresan diferencialmente durante el enquistamiento, lo que sugiere que estas enzimas podrían tener un papel importante en la regulación de este proceso.

## ABSTRACT

**Background.** Human amebiasis is caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, which has two phases in its life cycle, the trophozoite that is the invasive phase and the cyst that is the infective stage. Encystation is an essential process for its survival, however, until now there is not an efficient method to produce cysts *in vitro*. On the contrary, for *E. invadens*, a parasite of reptiles, there are methodologies to promote its *in vitro* encystation, so this protozoan is used as a model to study the differentiation in the *Entamoeba* genus. It has been reported the identification of some genes with differential expression during the encystation processes of *E. invadens*, but little is known about the role of protein methylation in the regulation of this event, both by epigenetic mechanisms and by control some signaling pathways. Methylation in arginine residues is catalyzed by enzymes called arginine methyltransferases (PRMTs) and their participation in differentiation processes in different protozoa has been demonstrated.

**Objective.** To identify the genes coding for protein arginine methyltransferases (PRMT's) of *E. invadens* and analyze their expression, at mRNA and protein level, during the process of encystation.

**Methodology.** Through analysis by BLAST in the genome database of *E. invadens*, we search for PRMTs encoding genes in this protozoan. Subsequently, we performed the analysis of the amino acid sequences of the corresponding proteins, as well as a phylogenetic analysis where they were compared with PRMTs from other organisms, including human enzymes and those of other

species of the *Entamoeba* genus. The expression of the genes and their proteins during the encystation process was carried out by RT-PCR and western blot assays, respectively. Finally, the subcellular localization of the proteins during the encystation was determined by indirect immunofluorescence and confocal microscopy.

**Results.** Our analysis identified four PRMTs in *E. invadens* (EiPRMTs), three with homology to PRMTs of type I (EiPRMT1a, EiPRMT1c and EiPRMT-A) and one with homology to type II enzymes (EiPRMT5). The transcripts of the four genes and the EiPRMT5 and EiPRMTA proteins presented different levels of expression at different times of encystation. On the other hand, the EiPRMT5 and EiPRMTA proteins also showed different locations during the encystation process and they were located in membrane, cytoplasm and nucleus.

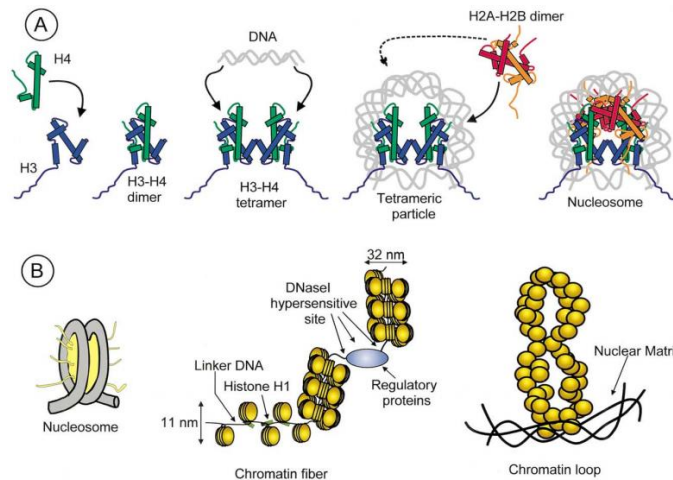
**Conclusion.** Four putative PRMTs were detected in *E. invadens*, and our results suggest that at least EiPRMT5 and EiPRMTA are differentially expressed during encystation, indicating these enzymes could play an important role in regulate this process.

# **ANTECEDENTES**

## **ANTECEDENTES GENERALES**

### **Cromatina**

La cromatina es una estructura dinámica que adapta su estado de compactación y empaquetamiento para optimizar los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA y juega un rol regulatorio fundamental en la expresión génica (1). La cromatina cuenta con una unidad básica estructural llamada nucleosoma, compuesto por 146 pb alrededor de un octámero de proteínas formado por un par de moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (2) y una molécula de histona H1 unida para condensar los nucleosomas a una fibra de 10 nm, denominada solenoide (3). El empaquetamiento de la cromatina es importante porque es un molde para la transcripción y, por tanto, para la expresión génica. Los distintos estados de compactación pueden asociarse al grado de transcripción que exhiben los genes localizados en esas zonas (4). La cromatina es en principio fuertemente represiva para la transcripción, ya que la asociación de DNA con las distintas proteínas dificulta la procesión de las diferentes RNA polimerasas (5). Por lo tanto, existe una variada cantidad de máquinas remodeladoras de la cromatina y modificadoras de histonas que permiten que se lleve a cabo la transcripción de grupos de genes o la represión de los mismos (1) (Figura 1).



**Figura 1. Estructura de la cromatina.**

A. Estructura y ensamblaje del nucleosoma. B. Organización de la fibra de cromatina. Imagen tomada de Morales V, *et. al.* 2001 (6).

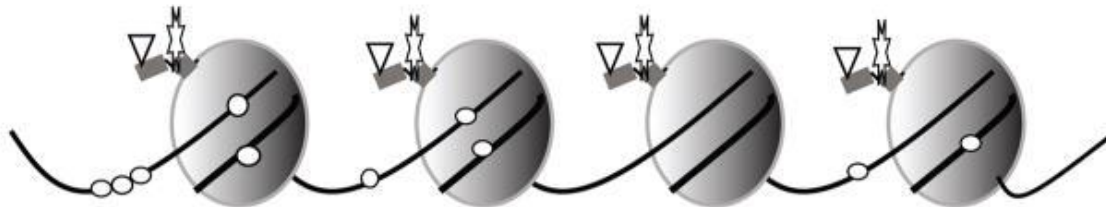
## Epigenética

La palabra *epigenética* se deriva del griego “*epi*” (en o sobre) y “*genética*” es un término derivado del griego “*gen*”. Genética es una rama de la biología que estudia la transmisión de los caracteres hereditarios de una generación a otra (7). Por lo tanto, la epigenética hace referencia al estudio de los elementos que, sin alterar el código genético, interacciona con el DNA, permitiendo la activación y/o represión transcripcional de genes (7,8). Además, los cambios epigenéticos son heredables, de manera que la información contenida puede transmitirse a la siguiente generación (9). De manera que las modificaciones químicas que ocurren en el DNA y en las proteínas reguladoras del mismo, permiten de forma controlada la expresión o represión génica bajo condiciones ambientales específicas (7). Los cambios en la estructura de la cromatina permiten el acceso al DNA de complejos transcripcionales y a las polimerasas, produciendo DNA accesible o eucromatina, o por el contrario el bloqueo del paso a estas proteínas, produciendo un DNA compacto o heterocromatina (9) (Figura 2).

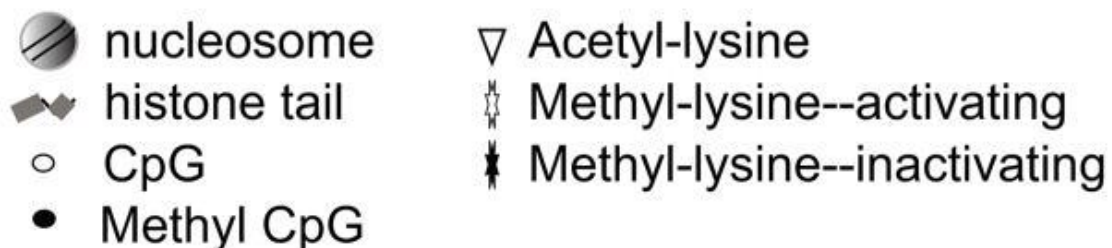
Los mecanismos epigenéticos identificados hasta el momento son básicamente los siguientes (1,7,10):

- 1) Adición de grupos metilo al DNA.
- 2) Reclutamiento de proteínas dependientes de ATP encargadas de remodelar la cromatina.
- 3) Reemplazo de las histonas canónicas por variantes especializadas.
- 4) Modificaciones postraduccionales en las histonas canónicas.

## Active Chromatin



## Inactive Chromatin



**Figura 2. Marcas epigenéticas y estructura de cromatina.**

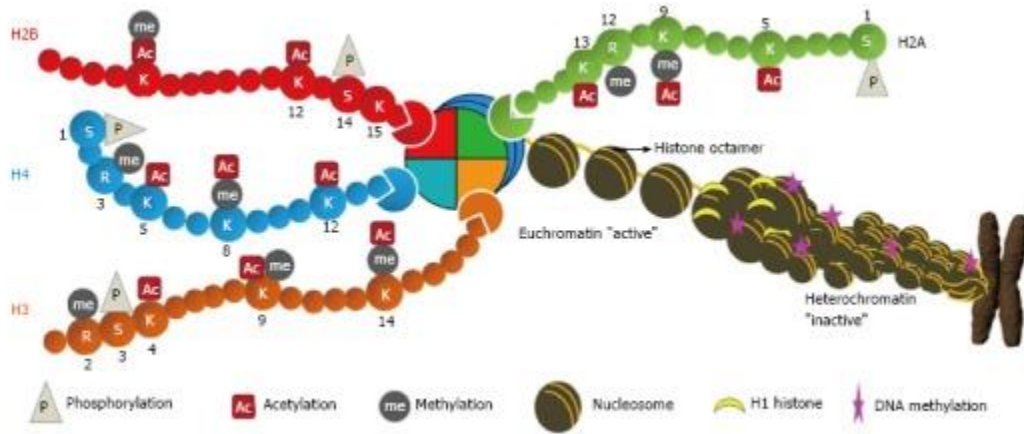
El DNA cromosómico se empaqueta alrededor de núcleos de histonas para formar nucleosomas. El espaciamento de nucleosomas en una estructura abierta que es accesible Cromatina activa o eucromatina) o no (cromatina inactiva o heterocromatina) a factores nucleares de transcripción. Imagen tomada de Handy D, *et. al.* 2011 (11).



## **Modificaciones postraduccionales en las histonas**

Los extremos N-terminal de las histonas sobresalen de la estructura globular de los nucleosomas y son regiones ricas en residuos que pueden ser blanco de modificaciones postraduccionales, tales como acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, sumoilación, desiminación y metilación, entre otras (Figura 3). Estas modificaciones, en diversas combinaciones pueden afectar positiva o negativamente el nivel de compactación de la cromatina, y por lo tanto, la transcripción génica (1,12,13). Estas modificaciones pueden tener como consecuencia: I) facilidad de que proteínas se asocien a la cromatina (factores transcripcionales, reguladores dependientes de ATP, etc); II) generación de combinaciones antagónicas o sinérgicas de diferentes modificaciones en el N-terminal de las histonas dentro de los nucleosomas; III) dinámica en la eucromatina y heterocromatina ocasionada por la abundancia de histonas modificadas en ciertos residuos específicos; y IV) modificaciones en las histonas que son heredadas por las células hijas, tras la replicación del DNA (4,5). Estos eventos permiten que la cromatina sea modificada y regulada epigenéticamente (7).

Las modificaciones en las histonas son ocasionadas por enzimas encargadas de modificar postraduccionamente el extremo N-terminal de las histonas (15,16). En particular, la metilación de las histonas es llevada a cabo por metiltransferasas (HMTs). La identificación de las enzimas que llevan a cabo esta modificación no ha sido sencilla, ya que la metilación, a diferencia de la acetilación y fosforilación,



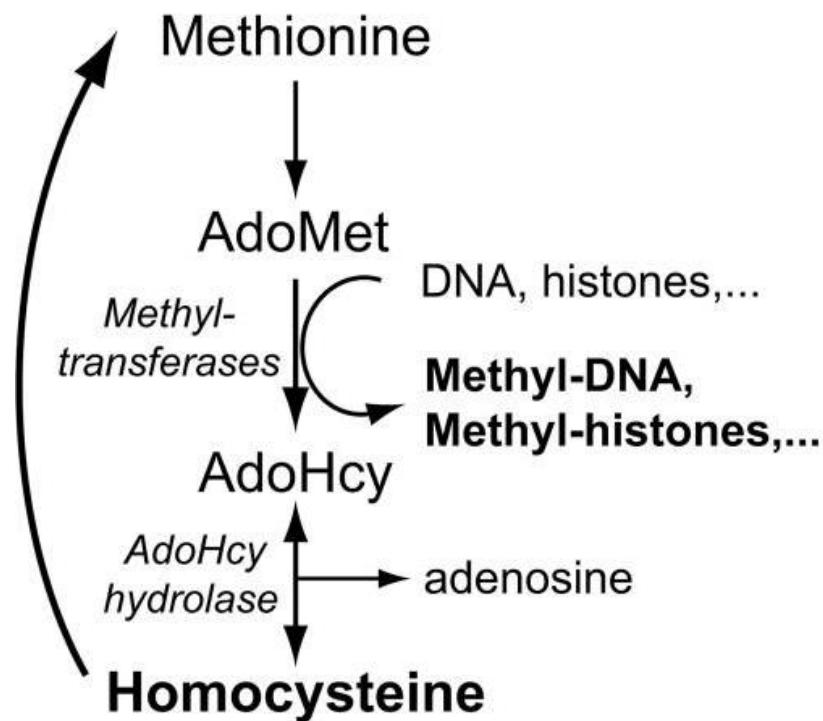
**Figura 3. Modificaciones postraduccionales de las histonas.**

Las histonas dentro del nucleosoma (dos de H2A, H2B, H3 y H4) sufren numerosas modificaciones postraduccionales en su extremo N-terminal que sobresale del nucleosoma. Estas modificaciones regulan directamente la estructura de la cromatina y, por lo tanto, los procesos celulares mediados por el DNA. La imagen indica algunas modificaciones en residuos específicos: M: metilación; A: acetilación; P: fosforilación. Imagen tomada de Khan S, *et al.* 2015 (14).

no altera las cargas de las histonas. Esta característica ha dificultado que las histonas metiladas se puedan resolver en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), además hasta hace poco no existían reactivos inmunológicos que ayudarían a su detección (4).

Las HMTs son las enzimas responsables de adicionar 1, 2 y hasta 3 grupos metilo (1me, 2me y 3me) a residuos de arginina (R) y lisina (K) en el N-terminal de las histonas, principalmente H3 y H4, y que regulan la activación o represión de la transcripción (2,17,18). Las HMTs se dividen en dos grandes familias: las específicas para residuos de arginina (PRMTs) y las que metilan residuos de lisina (PKMTs) (2,18). En general, las PKMTs están relacionadas con la actividad transcripcional, mientras que las PRMTs están involucradas con el silenciamiento y/o activación génica, dependiendo de la arginina modificada y del número de grupos metilo adicionados (19,20). Ambos tipos de enzimas transfieren los grupos

metilo, a partir del donador S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet); una coenzima que se compone de adenosina trifosfatada (ATP) y metionina (21). Las reacciones que producen, consumen y regeneran a SAM, conforman el denominado ciclo de SAM (Figura 4) (21). En la primera etapa, las metiltransferasas dependientes de SAM lo aprovechan como sustrato y producen adenosil-L-homocisteína (AdoHcy) y metilargininas o metilisinas; el AdoHcy es hidrolizado a homocisteína y adenosina, mediante la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa. La homocisteína es reciclada de nuevo a metionina por una metionina sintetasa y así, la metionina es convertida de nuevo en SAM, completándose dicho ciclo (18,21,22).



**Figura 4. Reacción de metilación.**

La S-adenosil-metionina (AdoMet) es la fuente principal de grupos metilo para cientos de transmetilasas que metilan DNA, RNA, histonas, otras proteínas y pequeñas moléculas biológicas. Después de la transferencia de grupos metilo, se forma S-adenosil-homocisteína (AdoHcy). La acumulación de AdoHcy puede inhibir las metiltransferasas. La hidrólisis de AdoHcy produce homocisteína (Hcy) y adenosina. Imagen tomada de Handy D, *et. al.* 2011 (11).

## **Papel de la metilación en residuos de arginina y de las PRMTs**

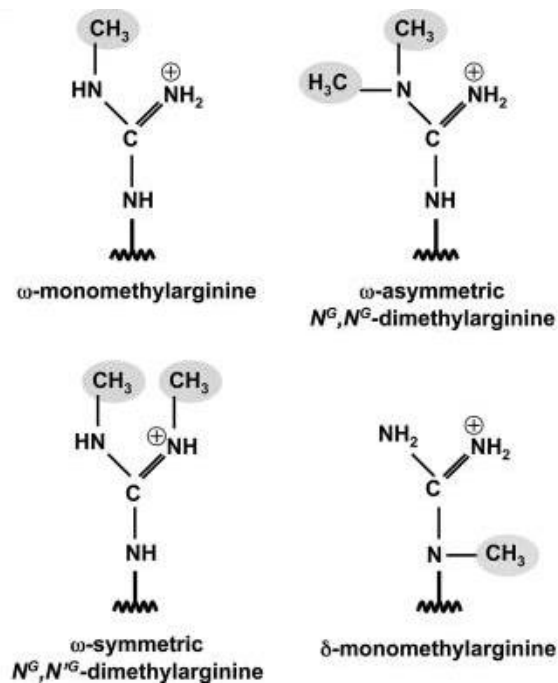
La metilación de proteínas en residuos de arginina modula múltiples vías celulares en levaduras y en los seres humanos (23). La metilación de la arginina generalmente altera la función de la proteína al influir en las interacciones proteína-proteína, las interacciones proteína-ácido nucleico y el tráfico de proteínas (23). La adición de un grupo metilo a la arginina, aunque no cambia su carga, altera la forma de la cadena lateral, lo que aumenta la hidrofobicidad y el impedimento estérico, al tiempo que elimina un posible grupo donante de hidrógeno (23). Por lo tanto, las proteínas metiladas en arginina a menudo se alteran en sus capacidades para unirse a otras proteínas o a ácidos nucleicos. Por ejemplo, la metilación de la arginina interrumpe directamente la unión de Sam68 a SH3 (24). A la inversa, se requiere la metilación en arginina de varias proteínas para su unión a las proteínas con dominio Tudor (25,26,27). Los efectos directos sobre la unión del ácido nucleico son menos comunes. Sin embargo, la metilación de arginina de varias proteínas de unión a RNA (RBPs, por sus siglas en inglés), incluidas las proteínas Rev y las nucleocápsides del VIH, produce una disminución en la unión al RNA (28,29,30). Por último, la metilación de arginina puede afectar la posterior modificación postraducciona de una proteína. Por ejemplo, la metilación de la arginina 2 de la histona 3 (H3R2) antagoniza la metilación de H3K4, y la metilación de H4R3 facilita la acetilación de H4K9 y H4K14 (31,32).

Las enzimas que catalizan la adición de grupos metilo a residuos de arginina se conocen como metiltransferasas de arginina o PRMTs (por sus siglas en inglés de

Protein arginine methyltransferases), las cuales tienen, en general, como sustrato proteínas que contienen motivos ricos en glicina y arginina (GAR) en secuencia RGG, RG o RXG (33,34). Entre los sustratos identificados de estas enzimas se incluyen histonas y proteínas no histonas, entre estas últimas se encuentran proteínas de unión al RNA heterogéneo, como la fibrilarina, nucleolina y PABPII (Poly-A Binding Protein II), proteínas de alta movilidad, p300, CBP y SRC3 (22); además, las PRMTs son co-reguladoras de un gran número de factores transcripcionales como P53, NF- $\kappa$ B, PPAPY, RUNX1 y E2F1, entre otros (12). Las PRMTs también están involucradas en el procesamiento del RNAm, incluyendo transcripción, “*splicing*”, transporte y traducción (23). Se ha demostrado que el “*splicing*” puede ser bloqueado si no hay metilación; además de que la PRMT denominada CARM1 o PRMT4 metila factores de “*splicing*” como CA150, SAP49 y Sam68, entre otros (23). La di-metilación de los residuos de arginina en posición 2 de la histona H3 y en posición 3 de la histona H4 (H3R2 me<sub>2</sub> y H4R3 me<sub>2</sub>), mediada por las enzimas PRMT6 y PRMT1, respectivamente, están ampliamente relacionadas con la actividad transcripcional y el reclutamiento de proteínas que poseen dominios PHD, cromodominio y Tudor (23). Además, la metilación de argininas por las PRMTs también está involucrada en la transducción de señales y la proliferación celular (35).

Las PRMTs se dividen en cuatro clases principales, dependiendo del tipo de metilarginina que generan (2,23). Las PRMTs de tipo I son aquellas que agregan los grupos metilo en  $\omega$ -nitrógeno de la arginina, produciendo monometilación (MMA) y/o di metilación asimétrica de la arginina (ADMA) (Figura 5). Las PRMTs

de tipo II también producen MMA en el  $\omega$ -nitrógeno de la arginina, pero el segundo metilo lo adicionan de manera simétrica (SDMA) (Figura 5). Las PRMTs de tipo III y IV solo tienen la capacidad de producir MMA (Figura 5). La forma menos común de metilarginina es la de tipo IV, en el que el átomo de nitrógeno delta ( $\delta$ ) de los residuos de arginina se modifica (Figura 5) (36,37). Hasta el momento, la metilación por las PRMTs tipo IV se ha caracterizado solo en las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* (23,33,35,37-41).



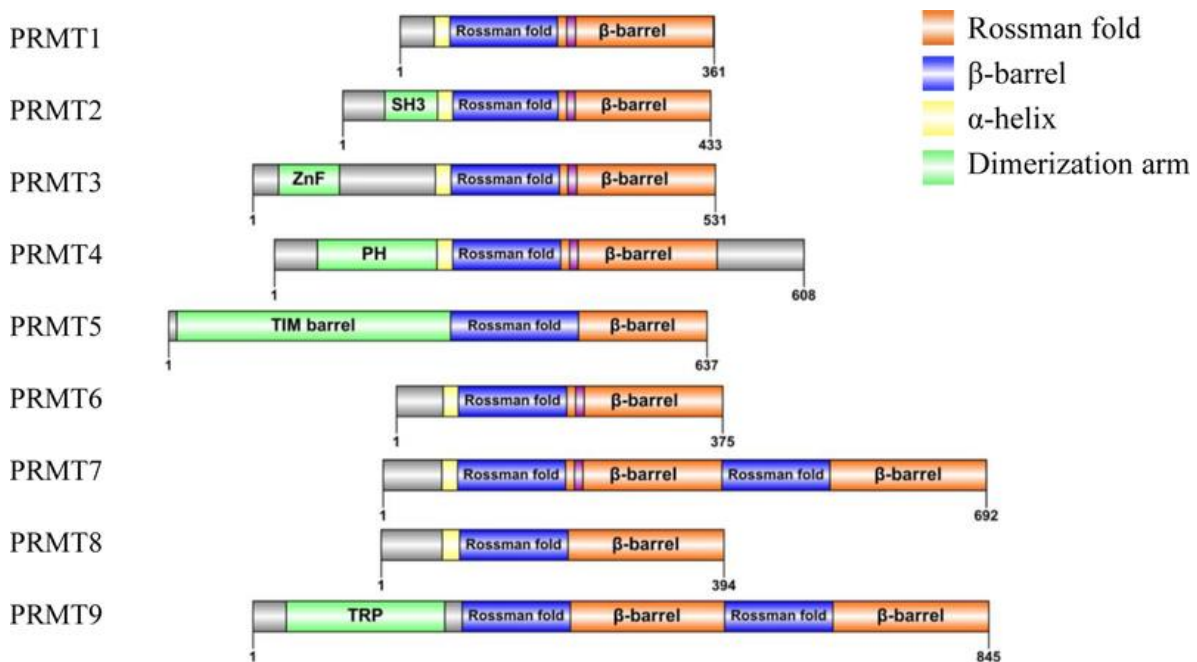
**Figura 5. La estructura de los derivados de arginina metilados.**

Existen 4 tipos de metilaciones de arginina dadas por 4 tipos de PRMT. Imagen tomada de Bachand F. 2007 (36).

La gran mayoría de las investigaciones sobre PRMTs se han centrado en tres arquetipos: las levaduras *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* y los humanos. Las levaduras unicelulares muestran la presencia de dos PRMTs de tipo I (Hmt1 en *S. cerevisiae*; Rmt1 y Rmt3 en *S. pombe*) y una PRMT de tipo II (Hsl7

en *S. cerevisiae*; Skb1 en *S. pombe*). Además, *S. pombe* también puede poseer una PRMT tipo IV, pero esto no se ha demostrado.

En humano, hasta el momento se han identificado 10 PRMTs (PRMT1-10), todas tienen motivos conservados en sus dominios catalíticos (Figura 6), aunque hasta ahora no se ha demostrado actividad de metiltransferasa en la PRMT 10 (35,42). Las demás PRMTs se han clasificado de acuerdo con la naturaleza del producto metilado que resulta de la reacción. Las PRMTs 1, 2, 3, 4, 6 y 8, pertenecen al tipo I, mientras que PRMTs 5 y 9 presentan actividad tipo II y PRMT 7 tiene actividad de tipo III (23).



**Figura 6. Arquitectura de dominios de nueve PRMTs de humanos.**

SH3, dominio SH3; ZnF, motivo de dedo de zinc; PH, dominio de homología de Pleckstrin; TPR, repetición tetratricopeptídica. Imagen tomada de Smith E *et. al.* 2018 (43).

PRMT1, PRMT3 y PRMT5 son las metiltransferasas de arginina que se conservan a lo largo de la evolución eucariótica, mientras que PRMT2, PRMT8 y PRMT9 no

parecen tener homólogos en eucariotas unicelulares (36). El análisis de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico indica que PRMT1 es la metiltransferasa responsable de la mayoría de las di-metilaciones asimétricas (ADMA) en levaduras (44), tripanosomas (45) y células humanas (46). PRMT1 se encuentra en el citoplasma y el núcleo de las células humanas y de levadura. Los estudios en *S. cerevisiae* han atribuido dos funciones principales a HMT1: la biogénesis del RNAm y la formación de heterocromatina (47-49). En humanos, se ha identificado la actividad metiltransferasa en las PRMT1 y PRMT4 (también conocida como CARM1 (por sus siglas en inglés de coactivator-associated arginine methyltransferase 1)), ambas de tipo 1 y en la PRMT5 de tipo II (36). La enzima PRMT1 metila H4R3, acción que potencia la acetilación de H4 por p300 (22). Esta misma PRMT metila en menor proporción a H2AR3 (34). PRMT4 metila H3R2, H3R17, H2R26 y varias argininas en el extremo C-terminal de la histona 3, y es reclutada junto con p300 y PRMT1, cuando p53 está unido a regiones promotoras para el reclutamiento de factores transcripcionales adicionales que facilitan la transcripción (22). PRMT5 metila H3R8 y H4R3 y se ha observado su asociación con complejos remodeladores de cromatina como SWI/SNF (50). En mamíferos, la actividad de di-metilación asimétrica de las enzimas PRMT1 y PRMT4 se ha asociado con activación de genes, mientras que la actividad de di-metilación simétrica por parte de PRMT5 se ha asociado con represión de la transcripción (22,34). Por otra parte, se ha descubierto que la enzima PRMT7, junto con PRMT5, metila H3R2 y H4R3, modificaciones involucradas en la activación y represión de la transcripción génica, respectivamente (51).



Las PRMTs varían de longitud desde los 320 a los 970 aminoácidos, pero mantienen dominios específicos altamente conservados (I, II y III) (2,37). El dominio de unión a SAM, tiene una estructura típica de “*rosman fold*” (Figura 6) de seis hojas  $\beta$  plegadas y dos pares de  $\alpha$  hélice. Además, estas enzimas poseen dos  $\alpha$  hélices en el N-terminal, que tienen la capacidad de interactuar con el AdoHcy (Figura 6) (2,37). Otro dominio de esta proteína posee forma de barril (2). El sitio activo se localiza entre los dos dominios mencionados anteriormente, es decir, en la parte central, y consta de doce residuos que conforman las asas denominadas THW y doble E, las cuales facilitan la unión a SAM (23). Cuando las PRMTs se encuentran en estado inactivo, el dominio de unión a SAM une cinco moléculas de agua en los sitios I, II y III, evitando así una posible transmetilación (23,37,51).

### **Cromatina en parásitos protozoarios**

El estudio de la cromatina en eucariontes unicelulares ha permitido comprobar que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la regulación transcripcional de estos organismos (52). La secuenciación de los genomas de *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* y *Entamoeba histolytica* reveló que estos parásitos poseen un amplio repertorio de la maquinaria necesaria para remodelar la cromatina, sugiriendo que la regulación epigenética juega un papel importante en la expresión génica de estos protozoarios (52).

*T. gondii*, *P. falciparum* y *T. brucei* cuentan con ciclos de vida complejos que incluyen a más de un huésped y pasan por diversos estadios morfológicos que requieren una estricta regulación génica, especialmente en la activación y/o

silenciamiento de genes específicos durante la diferenciación celular del parásito; durante la expresión exclusiva de algunos genes que participan en la virulencia del parásito; en la evasión de la respuesta inmune de sus hospederos; y en procesos de variación antigénica (9,52).

En general, en los metamonadas mitocondriales (*Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*), las arcamoebas (*Entamoeba sp.*), los apicomplexa (*Plasmodium sp.*, *Toxoplasma gondii*) y los cinetopláctidos (*Trypanosoma sp.*, *Leishmania sp.*), la comprensión actual de la metilación de arginina es limitada. Utilizando diversos informes publicados y las bases de datos de los genomas de estos parásitos, se ha compilado una lista de enzimas PRMTs putativas en cada grupo (37). Estos organismos albergan al menos una PRMT de tipo I, con homología a PRMT1 humano (Hs), y una PRMT de tipo II, con homología a HsPRMT5 (37). La presencia de diferentes conjuntos de genes que codifican PRMTs en estos parásitos sugiere que la metilación de arginina hace contribuciones distintas durante los ciclos de vida de estos organismos.

### **Amibiasis**

La amibiasis es una parasitosis de distribución cosmopolita y se considera como una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Es la cuarta causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios después del paludismo, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, y la tercera causa de morbilidad después del paludismo y la tricomoniasis (53,54).

Esta enfermedad es ocasionada por el parásito protozoario *E. histolytica*. Se considera que el 10% de la población general está infectada por este

microorganismo, de la cual el 90% no tienen síntomas. Se calcula que cada año ocurren 50 millones de casos sintomáticos (enfermos), de los cuales 100,000 son mortales (53,55,56).

El rango de prevalencia de la amibiasis es de 1 a 40% en América Central, América del Sur, Asia y África y de 0.2% a 10.8% en países industrializados. Por lo tanto, gran parte de la morbilidad y mortalidad ocasionadas por la infección ocurre en las regiones en desarrollo (56). En México (57), Brasil (58), Nicaragua (59) y Ecuador (60), se han observado porcentajes de infección con amibiasis de 0% a 13.8%.

En estudios seroepidemiológicos en barrios de Fortaleza, Brasil, el 25% de los individuos estudiados y el 40% de los niños de 6 a 14 años de edad fueron seropositivos (61). En Zulia, Venezuela, se observaron porcentajes de seropositividad de 4.4% a 46.6% (62,63). En un estudio longitudinal, durante 8 años en Bangladesh, el 90% de los niños estudiados se infectaron de amibiasis por lo menos una vez y alrededor del 50% mostraron evidencias serológicas del parásito alrededor de los 5 años de edad (64). En el 2006, estudios realizados por Stauffer y col. (65) en Sudáfrica y Egipto, demostraron una prevalencia de amibiasis de 15% a 70%. En México, un estudio seroepidemiológico reportó que 8.41% de la población tiene anticuerpos anti-amibianos, pero los estudios moleculares muestran cifras de infección asintomática por amibiasis de 13.8%, demostrando la elevada frecuencia de infección por este parásito. Todo esto lo convierte en uno de los problemas sanitarios de salud pública más importantes, debido a que refleja el rezago en las condiciones higiénicas de la población

(55,66). Además, en nuestro país se ha estimado una tasa de morbilidad de amibiasis intestinal entre 1,000 y 5,000 casos por cada 100,000 habitantes durante 1995 a 2006, con pocas variaciones anuales en la distribución por edad y género. Los menores de 15 años son más afectados, principalmente los niños menores de cinco años (67,68).

La amibiasis puede producir una colonización asintomática que ocurre hasta en el 90% de los casos o presentar un amplio espectro de alteraciones anatómicas de acuerdo con su localización. La amibiasis intestinal (entre 9 y 10% de los casos) puede ir desde una colitis ulcerativa, disentería, apendicitis amibiana, pasando por el megacolon tóxico, el ameboma y la peritonitis. También puede provocar una enfermedad extraintestinal que afecta otros órganos, cuya forma de presentación más frecuente es el AHA (68-70). Por esta razón, de acuerdo con las normas de la OMS emitidas en 1997, todos los portadores asintomáticos de la especie *E. histolytica* deben tratarse con anti-amibianos lumbinales, debido al riesgo sanitario que representan y a la gran posibilidad de que posteriormente manifiesten síntomas de amibiasis intestinal (68).

Los individuos con amibiasis intestinal sintomática o colitis amibiana, refieren dolor abdominal tipo cólico de varias semanas de evolución, en ocasiones tienen pérdida de peso y diarrea, que puede ser acuosa con abundante moco y poca materia fecal acompañada o no de sangre (disentería amibiana) (65). El inicio suele ser insidioso y los síntomas pueden ser muy heterogéneos, lo que dificulta el diagnóstico. Histológicamente, se pueden observar trofozoítos en la pared

intestinal y la formación de las típicas úlceras en forma de botella. El colon ascendente es la región del intestino grueso más afectada (65).

Las manifestaciones poco frecuentes (generalmente en menos del 5%) de la colitis amibiana son: colon tóxico o megacolon tóxico, colitis necrotizante, ameboma y ulceraciones perianales con o sin formación de fístulas, con una mortalidad mayor de 40% (65). Los individuos con colitis amibiana necrotizante cursan con fiebre, diarrea con alto contenido de moco y sangre, dolor abdominal intenso y signos de abdomen agudo (65). El ameboma del colon es un granuloma que puede ser único o múltiple; en general se forma como consecuencia de lesiones ulcerosas de la mucosa en el ciego o en el colon ascendente (65). El diagnóstico de amibiasis intestinal es sugerido por el cuadro clínico y epidemiológico y se confirma mediante la demostración de quistes de *E. histolytica* en las heces y los tejidos (54). El tratamiento consiste en medidas higiénico-dietéticas básicas, promoción de la salud y tratamientos antiparasitarios (54,71).

La expresión clínica extraintestinal más frecuente es el absceso hepático amebiano (AHA), debido a la diseminación hematogena de las amibas desde el colon al hígado mediante la vía vena porta, lo que explica la mayor frecuencia del absceso en el lóbulo derecho del órgano (72). En la mayoría de estos casos, no se detecta infección intestinal concomitante. Los adultos jóvenes son los más afectados y la afección se puede presentar incluso a los meses o años después de la exposición al parásito (65). Con respecto a la morbilidad por AHA, la incidencia en México es elevada, aunque en las últimas tres décadas ha disminuido en algunas áreas geográficas del país, principalmente donde los servicios públicos

(drenaje, agua potable y pavimentación de calles) y de salud han mejorado en calidad y en accesibilidad para sus habitantes (71).

En el AHA, alrededor del 80% de los pacientes tienen síntomas después de dos a cuatro semanas de la infección, aunque no existe un consenso en relación con un periodo de incubación de la enfermedad invasora propiamente dicho (65). Entre los viajeros con AHA posterior a dejar un área endémica, el 95% lo desarrollan en los primeros cinco meses (65). La mayoría de los individuos presentan fiebre y dolor en el hipocondrio derecho, con irradiación al hombro, fiebre, escalofríos, sudor, hepatomegalia sensible a la palpación y es frecuente el dolor a la palpación del hígado. Existe dolor en el hipocondrio izquierdo en 5% de los casos y puede ser indicativo de absceso del lóbulo izquierdo (65). Así mismo, puede provocar tos, estertores o ruidos respiratorios disminuidos en la base del pulmón derecho, el derrame pleural y la ictericia son raros. Si bien el sitio primario de la infección es el colon, menos de un tercio de los pacientes con AHA tienen diarrea activa (65).

Los síntomas gastrointestinales concomitantes en un AHA incluyen: náusea, vómito, distensión abdominal y estreñimiento y se manifiestan en 10% al 35% de los casos (65). Los pacientes ancianos de áreas endémicas tienen una probabilidad mayor de padecer un curso subagudo, de unos seis meses de duración, con pérdida de peso y hepatomegalia (73). Si se toma en consideración que en el AHA del 10% al 15% de los pacientes sólo manifiestan fiebre, debe tenerse en cuenta en el estudio de la fiebre de origen desconocido. Más de 80% de los pacientes tiene tos seca y quizá un tercio tenga tos productiva. La hepatomegalia se aprecia en 50% de los pacientes (65,73). Las complicaciones

del AHA incluyen infección bacteriana, ruptura del absceso hacia la cavidad pleural, pericárdica o peritoneal, choque séptico y muerte. En raras ocasiones pueden ocurrir metástasis amibianas hacia otros órganos (73).

El mejoramiento de las condiciones de vida, incluyendo viviendas adecuadas, suministro de agua potable, eliminación apropiada de las heces, higiene personal y educación sanitaria de la población, contribuyen a evitar la transmisión y adquisición de la infección. Los manipuladores de alimentos deben ser examinados, controlados regularmente y tratados en caso de estar infectados (74,75).

### **Agente causal y ciclo de vida**

*E. histolytica* es un protozoario microaerófilico, que pertenece a la familia Entamoebidae, orden Amoebida, clase Lobosea y phylum Sarcomastigophora (68). Su transmisión es por vía fecal-oral y la ingestión de los quistes es a través de bebidas y alimentos contaminados. El hombre es el único huésped conocido (68).

*E. histolytica* infecta a los seres humanos de cualquier edad, siendo aún más frecuente en niños y adultos jóvenes (76).

Este parásito consta de dos estadios consecutivos en su ciclo de vida: la forma móvil que es el trofozoíto y la forma de resistencia que consiste en el quiste. El trofozoíto es la forma invasiva, coloniza la mucosa intestinal del colon, donde se multiplica por fisión binaria, tiene un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$ , su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización y carece de mitocondrias (68). Esta forma de vida no tiene importancia desde el punto de vista de la transmisión del parásito a un huésped susceptible,

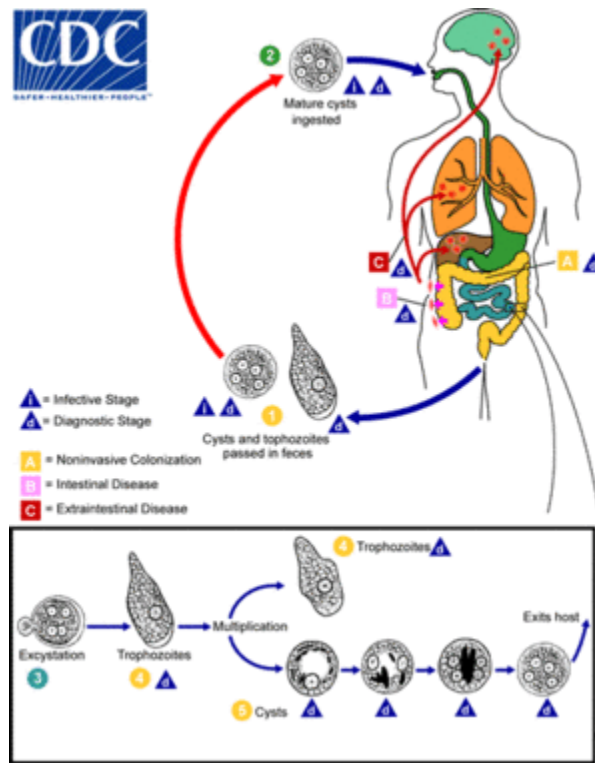
debido a que es rápidamente destruido por los fluidos del tubo gastrointestinal. No sobrevive más de algunos cuantos minutos en el medio ambiente, ya que es muy sensible a los cambios de temperatura, pH y osmolaridad (68).

Los quistes son la forma infectiva, se encuentran en las heces sólidas, son cuerpos hialinos redondos o ligeramente ovales con un diámetro de 8-20  $\mu\text{m}$ , poseen una pared rígida compuesta de quitina que protege al quiste fuera del conducto intestinal del huésped, y de 1 a 4 núcleos, dependiendo de su madurez (56,68). El quiste tetranucleado permanece viable y es infectante durante varios días en las heces, en agua dulce, agua de mar, drenaje y tierra húmeda, dependiendo de la temperatura; puede sobrevivir en la tierra hasta por ocho días a temperaturas entre 24 y 34 °C y durante más de un mes a 10 °C (56,68,70,77).

El ciclo de vida (Figura 7) se inicia con la ingestión de los quistes infecciosos, que debido a su dura cubierta no es dañado, aunque si reblandecido, por la acción de los jugos gástrico y pancreáticos. Cuando el quiste ya se encuentra en el intestino delgado (íleon terminal), sufre un proceso de desenquistamiento (Figura 7). Al romperse el quiste, el trofozoíto termina su proceso de división y da lugar a cuatro trofozoítos metaquísticos, donde los núcleos se dividen en ocho. Posteriormente, el citoplasma se divide y emergen ocho trofozoítos uninucleados que emigran al intestino grueso (Figura 7). Ahí se alimentan de bacterias y restos celulares. Los trofozoítos migran por vía hematogena al hígado u otros órganos (Figura 7) (54,68,70). Si el trofozoíto continúa avanzando por el colon, inicia su proceso de enquistamiento con la formación de un prequiste mononuclear, que posteriormente inicia un proceso de división nuclear, dando lugar a un quiste tetranucleado



(Figura 7). Cuando el proceso de formación de la pared del quiste termina, éste es expulsado con la materia fecal (Figura 7) (56). Este quiste es muy resistente, sobre todo en climas húmedos, y puede ser infectante si es ingerido (54,68,69).



**Figura 7. Ciclo de vida de *E. histolytica*.**  
Imagen tomada de la CDC.

## Patogenia

Avances en el desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad han permitido diseñar estrategias para identificar los principales mecanismos de patogenicidad que utiliza *E. histolytica* para establecer una infección, los cuales son: adhesión, citólisis y fagocitosis (78).

## Adhesión

La invasión del intestino y el daño tisular se inician después de que el parásito se establece en el lumen del intestino, preferentemente en el íleon terminal. Los

trofozoítos migran al órgano blanco, que es el intestino grueso, donde colonizan la mucosa intestinal a través de mecanismos de adherencia a las células epiteliales mediados por lectinas (76). Estas moléculas se unen a los carbohidratos existentes en la superficie de la célula epitelial intestinal, específicamente a residuos de galactosa y de N-acetil-D-galactosamina en las glicoproteínas de las células blanco (76,78). La lectina de unión a galactosa y N-acetil-D-galactosamina (lectina Gal/GalNac) es la adhesina más extensamente estudiada, su principal papel es la adhesión celular, la cual es uno de los mecanismos patógenos más importantes, dado que, si es bloqueada, el trofozoíto pierde su capacidad invasora (76-79). No se ha determinado si la lectina Gal/GalNac participa directamente en el proceso de lisis, aunque puede estar implicada en la activación de la caspasa 3 e inducir apoptosis, esto ocurre muy rápidamente después del contacto con el trofozoíto. Dicho mecanismo se ha demostrado en modelos animales experimentales de AHA y en modelos *in vitro* (79-81). Esta lectina también es parte fundamental de los mecanismos de locomoción y fagocitosis del trofozoíto (80-85). La lectina Gal/GalNac presenta similitud y reactividad antigénica cruzada con CD-59 humano, el cual es un antígeno que se encuentra en los leucocitos que participan en la inhibición del ensamblaje del complejo de ataque a la membrana C5b–C9 del complemento, por lo cual la lectina inhibe la formación del complejo de ataque a membrana (76,86).

Otras proteínas implicadas en el evento de adhesión son: el complejo EhCPADH (87) y una familia de proteínas exclusivamente expresadas en cepas virulentas llamada STIRP (del inglés Serine-Threonine-Isoleucine Rich Proteins, proteínas

ricas en serina-treonina-isoleucina) (88), entre otras. Por otro lado, el contacto de los trofozoítos amibianos con la matriz extracelular del tejido blanco desencadena una cascada de señalización dentro del parásito que resulta en el reordenamiento del citoesqueleto, facilitando su adhesión y posiblemente la invasión (54,89).

### **Citólisis**

El trofozoíto, una vez adherido a la célula blanco, continúa con un evento citolítico que puede ser mediado por diversos procesos que incluyen: I) permeabilización de la membrana plasmática por péptidos formadores de poros (ameboporos); II) inducción de muerte celular; y III) ruptura de la matriz extracelular, a través de cisteína proteasas (76,90,91).

Existen tres isoformas de ameboporos denominadas A, B, y C, de las cuales la forma C es la más activa (77,79). Los ameboporos contribuyen en la muerte celular porque producen perforaciones en la membrana de las células epiteliales, formando canales que permiten el paso de iones, agua y moléculas pequeñas, lo cual altera el equilibrio osmótico de la célula y la lleva a su lisis (77,79,86). Se ha postulado que los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la actividad de ameboporos, ya que su membrana celular posee fosfolípidos neutros que impiden la unión de estos polipéptidos (90).

Las cisteínas proteasas juegan un papel clave en la citólisis y son las proteasas más abundantes en *E. histolytica*. En la actualidad se conocen más de 50 genes distintos (54,77,92) y son muy importantes en la adquisición de nutrientes y el desarrollo del ciclo de vida, así como en la invasión del hospedero (92). Se conoce su actividad contra diversos componentes de la matriz extracelular, pero también

se ha descrito un efecto citopático directo (93). Además, se conocen sus efectos en la evasión de la inmunidad por la degradación directa de la IgA, por la disrupción de la IgG que confiere resistencia a la opsonización y a la lisis mediada por complemento, interrumpiendo la amplificación de la respuesta inmune por degradación de anafilotoxinas C3a y C5a (94).

### **Fagocitosis**

La fagocitosis puede ser de dos tipos: no específica y específica. En la no específica, los trofozoítos ingieren partículas de almidón, látex, hierro, u otras, y el contacto inicial puede estar mediado por fuerzas electrostáticas (95); La fagocitosis específica es dependiente de contacto y a través de ésta, las amibas ingieren células vivas y lisadas (96,97).

En la fagocitosis intervienen componentes del citoesqueleto, como la miosina IB y una proteína semejante a espectrina, entre otras (98), reguladores de la estructuración del citoesqueleto, tales como las GTPasas Rho y RacG (99,100) y proteasas como EhCP1, 2, 3, 5 y 112 (87,101-103). Otro proceso que está relacionado con la fagocitosis de *E. histolytica* es el mecanismo de transporte intracelular, el cual es regulado por varias proteínas, como las pequeñas GTPasas de la familia Rab (104). Dichas proteínas se han relacionado con la captura de nutrientes, degradación de microorganismos en el intestino e invasión del epitelio intestinal (104,105).

### **Enquistamiento**

Para los protozoos entéricos, la etapa de transmisión es el quiste, que puede permitir la supervivencia fuera del huésped (106). Por lo cual, el enquistamiento es

un proceso de diferenciación esencial para completar el ciclo de vida de un grupo de protozoos intestinales que incluye a *E. histolytica* (107). La mayoría de las infecciones por este parásito son diseminadas mediante quistes de pacientes asintomáticos (108). La dosis infecciosa promedio es > 1,000 organismos y una sola persona infecciosa puede pasar hasta 45 millones de quistes en sus heces por día (108).

En la actualidad, el conocimiento de la diferenciación del parásito humano *E. histolytica* se ha visto limitado por la falta de procedimientos eficientes para inducir el enquistamiento axénico en el laboratorio. Sin embargo, tales métodos han sido exitosamente desarrollados para *E. invadens*, un parásito de reptiles (109).

*E. invadens* causa amibiasis en reptiles saurianos, ofidianos y chelonianos y provoca casi el 100% de mortalidad en los reptiles infectados (107). Este parásito, al igual que *E. histolytica*, tiene un ciclo vital con dos fases: el trofozoíto y el quiste (107). Actualmente, *E. invadens* es la única especie del género *Entamoeba* que puede inducirse para diferenciarse en cultivos axénicos a la fase de quiste (110-112). Actualmente existen dos métodos comúnmente utilizados por la mayoría de los laboratorios para el eficiente enquistamiento de *E. invadens*: uno por dilución del medio de cultivo (choque hipo-osmótico) y otro por inanición de glucosa (109). Así pues, con este modelo de enquistamiento se ha permitido el análisis de algunos eventos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que acompañan la diferenciación en quistes en el género *Entamoeba* (109).

El proceso de enquistamiento de *E. invadens* implica una transformación gradual del trofozoíto móvil, acompañado por la síntesis y formación de una pared quística,

que protege a la célula enquistada de condiciones ambientales adversas fuera del huésped. Durante el proceso de enquistamiento, el nivel normalmente alto de vesículas citoplásmicas se reduce considerablemente y la pared del quiste parece depositarse en el exterior de la membrana plasmática mediante la fusión de vesículas citoplásmicas específicas que contienen diversos materiales, tales como lectinas y quitina que se secretan (107,108).

El proceso de formación de un quiste estable y resistente se basa en la secreción específica y ordenada de las proteínas de la pared del quiste. Se piensa que la pared del quiste se ensambla en tres fases, de acuerdo con el modelo “proyección y embadurnamiento” (“*wattle-and-daub*”) (113). En la etapa de fundación, la lectina Jacob es traficada a la superficie celular y se une a la lectina Gal/GalNac, expresada de forma constitutiva (113,114). Durante la etapa de “proyección” (“*wattle*”), la quitina se sintetiza y se secreta, probablemente reticulada, por los dominios de unión a quitina dispuestos en tándem en la lectina Jacob (113). Las lectinas Jacob y la quitina se observan en vesículas separadas en el enquistamiento temprano (12 h posteriores a la inducción, hpi) y comienzan a acumularse en la pared del quiste a las 24–36 hpi (113). Aunque el momento no está claro, la enzima quitinasa y las desacetilasas recortan y desacetilan la quitina extracelular (115,116). Finalmente, la lectina Jessie3, que se une a la quitina y también se puede autoagregar, solidifica la pared del quiste en la fase de embadurnamiento (“*daub*”), haciéndola impermeable a las moléculas pequeñas (113). Jessie3 se observa en vesículas a partir de las 36 hpi y se encuentra en la pared del quiste a las 72 hpi (113).

## **Genoma de *E. histolytica***

La secuencia completa del genoma de *E. histolytica* hizo posible la creación de bases de datos de este parásito (117). En el 2005 se publicó el genoma de *E. histolytica*, el cual tiene un tamaño de 23.751 Mb conteniendo 9,938 genes putativos con una longitud promedio de 1.17 kb. Además, se ha predicho que un 25% de los genes contienen al menos un intrón y 6% poseen más de un intrón (117). Este protozooario presenta un bajo contenido de G + C (22.4%) y un rico contenido en A + T (77.6%), con abundantes palíndromos y repetidos (117). El 31.8% de las proteínas predichas no tienen homólogos en otros organismos; además, se ha encontrado cierto nivel de redundancia en los genes que codifican para factores de virulencia (117-120). El genoma está compuesto por cromosomas lineales y DNA circular de diferentes tamaños (121-123).

Debido a que los cromosomas de *E. histolytica* no se condensan durante la metafase y a la variabilidad en el contenido de DNA obtenido de distintos aislados (117), el número, tamaño y estructura de los cromosomas de este parásito no están completamente definidos y diversos autores reportan números diferentes de cromosomas (117,124). En la actualidad, gracias a la técnica de separación de moléculas de DNA de alta talla molecular mediante electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE), se ha determinado parcialmente la topología del DNA del genoma de *E. histolytica* (124). Los patrones obtenidos mediante esta metodología se denominan cariotipos moleculares, debido a que la técnica permite que los cromosomas permanezcan intactos, por lo que cada una de las bandas que resultan pudiera corresponder a un cromosoma o a una molécula completa de

DNA (124). Sin embargo, a diferencia de otros organismos, los patrones de *E. histolytica* presenta bandas difusas, debido a las mezclas de moléculas circulares y lineales, lo que ha dificultado la interpretación y el establecimiento del número exacto de cromosomas en el cariotipo molecular de este parásito (124,125). Este patrón se ha adjudicado a diversas razones: a la baja condensación del DNA del parásito durante la mitosis, así como la presencia de DNA circular de diferentes tamaños y topologías, tanto en el núcleo como en un organelo citoplásmico llamado EhkO, lo que provoca que estas bandas presenten diversos barridos, dificultando así la observación de los cromosomas (124,125). Por medio de microscopía electrónica de transmisión, se observaron entre 12 y 16 estructuras electrondensas en núcleos en división, que pudieran ser cromosomas (126). Sin embargo, por estudios de videomicroscopía y tinciones específicas de DNA se propuso la existencia de 6 cromosomas y un centro organizador de microtúbulos (124). Así mismo, por medio de PFGE se lograron separar 17 bandas de DNA, de las cuales sólo 6 se sugirieron como cromosomas verdaderos, debido a que son las que hibridan con una sonda telomérica heteróloga (124).

Estos datos muestran que *E. histolytica* presenta una organización genómica compleja, por su variación en contenido, naturaleza, topología, tamaño y localización de su DNA. La poca o nula condensación de los cromosomas de *E. histolytica* durante la mitosis hace difícil la determinación del número exacto de cromosomas (120). Sin embargo, después de diversos estudios, se sugiere la existencia de un genoma haploide con 14 cromosomas (127,128).



El análisis de la base de datos del genoma de *E. histolytica* reveló que los genes que codifican para enzimas del metabolismo han sufrido, a través de la evolución, una pérdida secundaria de genes y la transferencia horizontal de genes provenientes de cepas bacterianas (129). Además, el parásito ha evolucionado para sobrevivir en un ambiente con poco oxígeno, como el intestino, por lo cual, éste es un fermentador obligado que utiliza enzimas semejantes a las de las bacterias y carece de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos y de la cadena de transportadores de electrones mitocondriales (117). La glucosa es la principal fuente de energía; sin embargo, en lugar de los típicos transportadores de glucosa en eucariontes, los de las amibas están relacionados con la familia de acarreadores de glucosa /ribosa de procariontes (117,129).

### **Regulación de la transcripción en *E. histolytica***

La transcripción es un punto de control crítico en la regulación de la expresión de genes. Mediante este mecanismo los genes son copiados a moléculas de RNA (3). Los factores que influyen en la expresión génica de *E. histolytica* no son del todo entendidos. El genoma de *E. histolytica* codifica para múltiples copias de genes que han sido implicados en funciones de virulencia, por ejemplo de 5 a 6 genes están involucrados en la codificación de las subunidades ligeras y pesadas de la lectina Gal/GalNac; más de tres genes están involucrados en la codificación de péptidos formadores de ameboporos; mientras 50 genes codifican para cisteína proteasas (117). Sin embargo, no todos los genes son expresados en los trofozoítos bajo las mismas condiciones (129). Por ejemplo, la transcripción de varios genes es alterada en respuesta a cambios en el medio ambiente y a

variaciones en los niveles de calcio (130). Por tal razón, la patogenicidad de *E. histolytica* está relacionada con la modulación de la transcripción de genes (130).

Los análisis de los promotores de varios genes de *E. histolytica* han permitido la identificación de tres elementos que tienen un importante impacto sobre la transcripción y que regulan el sitio de inicio de la transcripción: la secuencia iniciadora (Inr), una secuencia parecida a la caja TATA y un nuevo elemento llamado GAAC (70,131). Por otra parte, el estudio del promotor del gen *hgl5*, que codifica para la subunidad pesada de la lectina Gal/GalNac, permitió la identificación de cinco regiones regulatorias río arriba (URE1-URE5) (131,132). Se ha demostrado también, mediante análisis transcripcionales, que los genes *Ehpgp1* y *Ehpgp5*, que codifican para proteínas involucradas en multirresistencia a drogas, presentan en sus regiones promotoras secuencias semejantes a los sitios de unión de C/EBP y Hox, sugiriendo que estas secuencias regulatorias participan en la activación transcripcional de estos genes (133,134).

Por otro lado, son pocos los elementos trans-regulatorios de la transcripción que han sido identificados en *E. histolytica*, entre ellos se encuentran: dos proteínas de unión a la caja TATA (EhTBP y EhTRF1) (135,136); los factores de transcripción EhEBP1 y EhEBP2, que se unen a la secuencia URE4 (137); la proteína de unión a URE3 (137), la proteína de unión a URE1 (138); y una proteína homologa a p53 (139).

### **La cromatina y epigenética en *E. histolytica***

La cromatina en *E. histolytica* es empaquetada en estructuras semejantes a nucleosomas, pero con una distribución irregular (89,140). En este

microorganismo existen genes que codifican para las cuatro histonas canónicas, dos genes para H2A, dos genes para H2B, seis genes para H3 y un gen para H4 (10). Se ha encontrado que el N-terminal de estas histonas es altamente divergente en comparación con el de otros eucariontes (141). A pesar de esas diferencias, se ha demostrado que *E. histolytica*, como otros protozoarios, posee proteínas involucradas en la regulación epigenética (141-143).

## **ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

En *E. histolytica*, se ha evidenciado que la metilación de histonas promueve el silenciamiento de los genes mediante el bloqueo del reclutamiento de factores de transcripción o por el reclutamiento de proteínas de unión a grupos metilo, que a su vez, reclutan factores que potencian el estado restrictivo de la cromatina (144). Además, utilizando inhibidores contra metiltransferasas se observó que la virulencia *in vivo* de los trofozoítos se ve disminuida (145).

*E. histolytica* contiene cinco genes que codifican PRMTs (37,146). Un análisis inicial sugirió la presencia de cuatro PRMTs de tipo I que presentan mayor homología a PRMT1 (37) y que carecen de motivos distintivos de otras PRMTs de tipo I, como el dominio SH3 de PRMT2, dedos de Zn<sup>2+</sup> de PRMT3 o la señal de miristoilación N-terminal de PRMT8 (37). Además, el genoma de *E. histolytica* también contiene un gen que codifica una PRMT de tipo II semejante a PRMT5 (37). Nuestro equipo de trabajo, mediante un análisis *in silico* confirmó la presencia de cinco PRMTs hipotéticas en *E. histolytica*, de las cuales tres presentaron una relación filogenética con la familia de PRMT1, denominadas

EhPRMT1a, EhPRMT1b y EhPRMT1c, y una con relación filogenética con PRMT5 (EhPRMT5). La otra EhPRMT no presentó cercanía filogenética u homología significativa con PRMTs de otros organismos, por lo que se denominó PRMT atípica (EhPRMTA) (146). Mediante ensayos de RT-PCR se demostró la expresión de estos cinco genes; asimismo, por *western blot* se confirmó la presencia de las proteínas codificadas por estos genes en los trofozoítos amibianos (146). Además, mediante ensayos de inmunofluorescencia se localizó a EhPRMT1, EhPRMT5 y EhPRMT-A en el citoplasma y en el núcleo de los trofozoítos (146,147). Por otra parte, las proteínas recombinantes de EhPRMT1a, EhPRMT5 y EhPRMTA mostraron actividad de metiltransferasa sobre histonas comerciales de pollo (146,147) y específicamente se detectó la dimetilación de H4R3 por EhPRMT1a (146). Estos datos señalan que *E. histolytica* posee enzimas PRMTs que podrían estar involucradas en la regulación de la expresión génica y, por lo tanto, de diferentes procesos celulares, incluida la diferenciación de trofozoíto a quiste y viceversa. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si estas proteínas participan en la regulación del enquistamiento de este parásito. En otros protozoarios como *Acanthamoeba castellanii*, los niveles de expresión de PRMT1 y PRMT5 (AcPRMT1 y AcPRMT5) aumentan durante el proceso de enquistamiento. Asimismo, las proteínas AcPRMT1 y AcPRMT5 se distribuyen sobre el citoplasma, pero se localizan principalmente en el núcleo del quiste (148,149). De manera interesante, el silenciamiento de AcPRMT1 y AcPRMT5 mediante siRNAs específicos provocó que no se lograrán formar quistes maduros (148,149), sugiriendo que AcPRMT1 y AcPRMT5 desempeñan un papel crítico en la regulación del enquistamiento de *A. castellanii*. De manera similar, las PRMTs

de *Entamoeba* podrían participar en este proceso de diferenciación, indispensable para la transmisión del parásito, pero esto aún no ha sido analizado.

## JUSTIFICACIÓN

*E. histolytica* es un protozoo parásito que causa desde una infección asintomática o colitis amibiana hasta AHA e invasión a otros órganos, influyendo en la mortalidad infantil, el desarrollo y la productividad de las personas.

Durante una infección no invasiva, los individuos se convierten en portadores asintomáticos y un solo individuo infectado excreta hasta 45 millones de quistes por día. Además, en regiones con un tratamiento de agua poco confiable, una infraestructura de eliminación de desechos inadecuada y un insuficiente acceso a los medicamentos, la producción de quistes favorece en gran medida la dispersión de la amibiasis.

Por otra parte, se conoce que en algunos protozoarios parásitos la metilación por PRMTs regula diversos eventos celulares, incluidos los procesos de diferenciación.

Hasta ahora, el papel de las PRMTs en la biología de *E. histolytica* es escasamente entendido. En nuestro grupo de trabajo se han identificado cinco PRMTs, No obstante, se desconoce si estas enzimas regulan el proceso de enquistamiento. De tener participación en este evento, se podría proponer el desarrollo de terapias para el bloqueo de la transmisión de este parásito.

Desafortunadamente, en el laboratorio no se ha establecido el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*, por lo que, como modelo para el estudio de este proceso, generalmente se utiliza al parásito de reptiles *E. invadens*.

Así, la identificación y el análisis de la expresión de las PRMTs de *E. invadens* durante el enquistamiento puede proporcionar información acerca del papel de estas enzimas en la diferenciación de parásitos del género *Entamoeba* y, eventualmente, ser un blanco potencial para el desarrollo de drogas que bloqueen su actividad y, por lo tanto, la transmisión de la amibiasis.

## **HIPÓTESIS**

*E. invadens* expresa diferencialmente enzimas del tipo PRMT durante el enquistamiento, modulando este proceso de diferenciación.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar los genes y las proteínas de arginina metiltransferasa (PRMT's) de *Entamoeba invadens* y analizar su expresión durante el enquistamiento.

### **Objetivos particulares**

1. Identificar y caracterizar *in silico* las posibles PRMTs de *E. invadens*.
2. Analizar la expresión del mRNA de las PRMTs de *E. invadens* durante el enquistamiento.
3. Examinar la expresión de algunas PRMTs de *E. invadens* durante el enquistamiento.
4. Determinar la localización subcelular de algunas PRMTs de *E. invadens* durante el enquistamiento.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la realización del proyecto se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental (Figura 8).

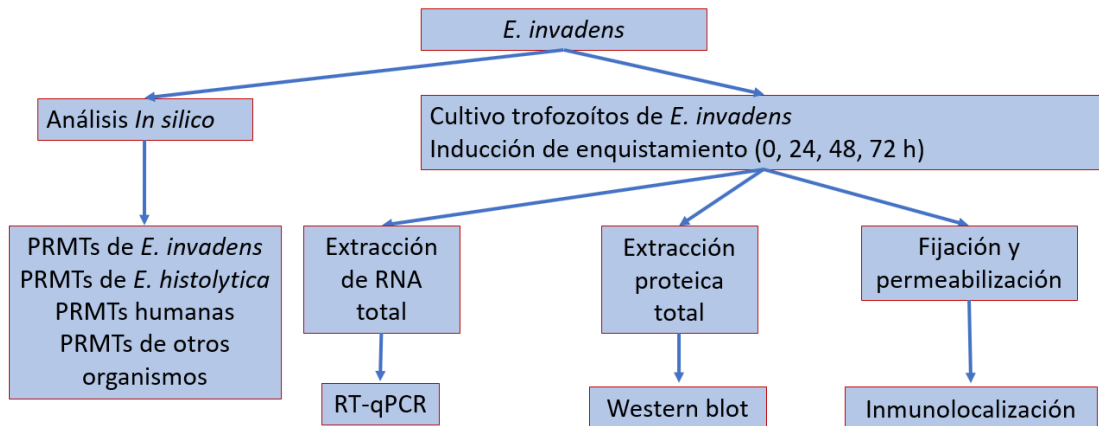


Figura 8. Estrategia experimental de trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Análisis *in silico*

La búsqueda de los genes que codifican posibles PRMTs en las diferentes especies del género *Entamoeba* se realizó en las bases de datos de Amoeba DB (<http://amoebadb.org/amoeba/>). Como sondas se utilizaron: i) la secuencia conservada de las PRMTs de *Homo sapiens*; y ii) las diferentes PRMTs de *E. histolytica*. La búsqueda de dominios en las proteínas se realizó introduciendo las secuencias de aminoácidos en diferentes programas disponibles en el internet (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; <https://prosite.expasy.org/>; <http://smart.emblheidelberg.de/smart>). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PRMTs de *E. invadens*, y de otros organismos, incluyendo las



de *E. histolytica* y las de humano se llevó a cabo mediante el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y el análisis filogenético se realizó mediante el programa MEGA X (<https://www.megasoftware.net/home>). Para obtener la estructura tridimensional de las PRMTs se utilizó el programa Chimera® (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

### **Cultivo de trofozoítos de *E. invadens***

Los trofozoítos de *E. invadens* (cepa IP-1) se cultivaron de forma axénica a temperatura de 25-26 °C en medio TYI-S-33 (150), suplementado con 10% de suero bovino adulto (Biowest) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min y con 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (KC biológica), 40 UI de penicilina/ml (Lakeside) y 57 µg/ml de estreptomycin (Lakeside). Los trofozoítos se cosecharon a partir de cultivos confluentes de aproximadamente  $5 \times 10^7$  células y se enfriaron por 10 min a 4°C con el fin de provocar el desprendimiento de las células de la pared de la caja de cultivo. Entonces, los parásitos se colectaron en tubos y se centrifugaron a 1000 xg por 5 min. El medio de cultivo se desechó y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM a un pH de 6.8) frío y estéril. Este paso se repitió dos veces más para el lavado de los trofozoítos.

### **Enquistamiento de *E. invadens***

Los trofozoítos de *E. invadens* se recolectaron durante la fase de crecimiento logarítmico ( $5 \times 10^5$  / ml), se transfirieron al medio de inducción LG (TYI sin glucosa y diluido al 47%) con 5% de suero bovino adulto (151). Finalmente, los cultivos se incubaron a 26 °C durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente, en cada tiempo se

cuantificó el número de células resistentes a Sarkosyl 0.1 % (quistes). Para ello, los cultivos se centrifugaron a 1000 xg por 10 min, se realizaron tres lavados con PBS, después, se colocó una solución de sarcosyl al 0.1%, se incubó por 30 min y finalmente, se realizó el conteo de las células en un hematocitómetro.

### **Extracción y cuantificación de DNA genómico**

La obtención de DNA genómico de *E. invadens* se realizó utilizando el *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), para lo cual,  $1 \times 10^6$  trofozoítos se centrifugaron a 13000 xg por 15 minutos para empaquetar las células y se agregaron 600  $\mu$ l del amortiguador "Cell Lysis Solution". Posteriormente, se añadieron 600  $\mu$ l del amortiguador "Nuclei Lysis Solution" y finalmente, el DNA se precipitó con 75  $\mu$ l de isopropanol y se lavó con etanol al 70%. El DNA obtenido se resuspendió en agua estéril de ampolleta y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. La integridad del DNA se corroboró por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **Extracción de RNA total**

Los trofozoítos en medio TYI-S-33 (tiempo 0), así como las células obtenidas de los cultivos sometidos al proceso de enquistamiento durante 24, 48 y 72 h (prequistes y quistes) se cosecharon y lavaron como se mencionó anteriormente y las pastillas celulares se resuspendieron en Trizol (Invitrogen,  $1 \times 10^7$  células/ml). Las mezclas se incubaron por 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó vigorosamente por 30 s y se incubó por 10 min adicionales a TA. Después, se centrifugaron a 9,000 xg por 15 min a 4 °C, la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se le adicionó 0.5 ml

de isopropanol frío para precipitar el RNA. El tubo se agitó suavemente por inversión y enseguida se incubó 10 min a TA. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 9,000 xg por 10 min a 4 °C, las pastillas hialinas, conteniendo el RNA, se lavaron con etanol al 75% y se centrifugaron a 10,000 xg durante 5 min a 4 °C. Las pastillas se secaron, se resuspendieron en 100-200 µl de agua de ampolla. Posteriormente, para eliminar una posible contaminación con DNA genómico, las muestras se incubaron a 37 °C durante 60 min con 1 µl de DNasa libre de RNasa (Ambion) (2 U/µL). A continuación, se agregó 1 µl de EDTA (50 Mm) y se incubó por 10 min a 65 °C para inactivar la reacción. Después de una centrifugación a 10,000 xg por 1 min, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La cuantificación de RNA se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. La integridad del RNA confirmó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **Electroforesis en geles de agarosa**

El análisis de la integridad del DNA y del RNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados en amortiguador TAE (40 mM tris acetato y 1 mM EDTA) y 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). A las muestras se les adicionó 1 µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 60-70 volts por 45 min. Las bandas de DNA y RNA se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV.

### **Síntesis de DNA complementario**

La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo en una mezcla que contenía 4  $\mu$ l de oligo-dT 10  $\mu$ M (Sigma) y 6  $\mu$ g de RNA. La mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min y posteriormente se añadieron 8  $\mu$ l de amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 4  $\mu$ l de dithiothreitol 0.1 M, 4  $\mu$ l de desoxirribonucleótidos (dNTP's) 200  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de transcriptasa reversa (200 U/ $\mu$ l, *SuperScript II*, Invitrogen) y agua libre de nucleasas necesaria para llevar la reacción a un volumen final de 40  $\mu$ l. La mezcla se incubó a TA durante 10 min y posteriormente a 42 °C durante 2 h. Para inactivar a la *SuperScript II*, la reacción se incubó a 70 °C por 15 min y el cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **Diseño de iniciadores para las PRMTs de *E. invadens***

Para amplificar fragmentos de los genes que codifican para las PRMTs hipotéticas de *E. invadens*, se diseñaron cebadores específicos para cada gen (Tabla 1), utilizando programas presentes en internet (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx> y <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Como control de carga se utilizó la amplificación del gen ribosomal 28S (Tabla 1).

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

La amplificación por PCR de los genes de interés se llevó a cabo usando como molde DNA genómico o cDNA. Para las reacciones se mezclaron 200-300 ng de DNA o cDNA, 300 ng de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido) (10  $\mu$ M), 300 ng de dNTP's 10 mM (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 300 ng de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 5  $\mu$ l

**Tabla 1. Cebadores para la amplificación de las PRMTs de *E. invadens*.**

Gen	Sentido	Antisentido	Tamaño del amplificado (pb)
EIN_172090	5'- TGA <sup>CT</sup> CCACGCACAGTCAAA -3'	5'- GTTCATGGGTGACGGGCATA -3'	167
EIN_223690	5'- CGCACAGAGCCTTCACAATA -3'	5'- GGCCATGCGATACTTTTGAT -3'	150
EIN_398100	5'- ACTTCATCTACGCGTTTCGCT -3'	5'- AGACGGTGATTGGTTTCGTCC -3'	135
EIN_497480	5'- AGTCAATTTCTCGGCACCGT -3'	5'- ATCCGCCGATTTCGATCTCC -3'	198
rRNA 28S	5'- GTGACGCGCATGAATGGA -3'	5'- TTCCCTTGACTGTGGTTTCACTAG -3'	74

de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 1.25 U de enzima *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y agua suficiente para alcanzar un volumen final de 50  $\mu$ l. Como control negativo se utilizaron las mismas mezclas de reacción, pero sin molde. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) de 96 pozos. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C durante 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 2 min; y un periodo de extensión a 72 °C por 12 min. Finalmente, los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, como se describió anteriormente. Para obtener datos semi-cuantitativos, cada banda de amplificación se analizó por densitometría y los datos se normalizaron con aquellos obtenidos del control de carga (rRNA). La expresión relativa de cada gen en los trofozoítos (tiempo 0) se tomó arbitrariamente como la unidad.

### **Extracción de proteínas totales de *E. invadens***

Los trofozoítos y los quistes se cosecharon como se describió anteriormente, se resuspendieron en PBS frío y estéril y se añadieron 15 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (2 mM benzamidina, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml pepstatina A, 5 µg/ml leupeptina y 10 µg/ml E-64). Posteriormente, para lisar las células, la mezcla se congeló en nitrógeno líquido por 3 min y se agitó vigorosamente por 2 min en el vórtex. Este proceso se repitió dos veces más, hasta que la muestra se descongeló por completo. Entonces, se tomó una alícuota para cuantificar la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (152) y los extractos se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE 10%) teñidos con azul de Coomassie.

### **Electroforesis de proteínas**

La separación de proteínas se llevó a cabo en SDS-PAGE al 10%. El gel separador se preparó con acrilamida 10%, Bis-acrilamida 0.9%, TrisHCl 1.5 M pH 8.8, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 0.1% y 0.15% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida 29%, Bis-acrilamida 0.9%, TrisHCl 1.5 M, pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio al 0.1% y 0.15% de TEMED. Como amortiguador de corrida se utilizó una solución de Tris 0.25 M, glicina, 1.9 M y 0.1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100-120 volts, por aproximadamente 2 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 al 0.025%, metanol 40%, ácido acético 70%, durante 10-15 min. Posteriormente, se destiñeron con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 7%, hasta que se visualizaron las bandas de proteínas.

## **Western blot**

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad). Para ello, los geles donde se separaron las proteínas se equilibraron en solución de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.190 M metanol 10% pH 8.3) por 10 min en agitación. Las unidades se montaron a manera de emparedado en el siguiente orden: ánodo, esponja, papel filtro Whatman, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman, esponja y cátodo. La cámara se cargó con la solución de transferencia fría y las proteínas se transfirieron a 350-400 mA por 1.5-2 h. Después, la cámara de electrotransferencia se desmontó y las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%) para verificar la transferencia de las proteínas. A continuación, las membranas se incubaron con solución bloqueadora (PBS-Tween 0.5%, leche 5%) por 2 h a TA y para la inmunodetección de las PRMTs se utilizaron anticuerpos comerciales heterólogos contra PRMT1 de humano (Cell Signaling) en una dilución (1:1000) o anticuerpos contra EhPRMT5 y EhPRMTA en una dilución (1:2000) y (1:4000) respectivamente (147) diluidos en BSA al 3% en PBS-Tween 0.05%. Las membranas se incubaron toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 15 min y tres lavados de 5 min con PBS-Tween 0.05%. Entonces, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch) diluido 1:10000 en solución bloqueadora al 3% en PBS-Tween 0.05%, durante 1-1.5 h a TA. Al término de la incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.05%. La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el método quimioluminiscente (ECL,

Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el resultado se guardó en el fotodocumentador Microchemi (DNR Bio-Imaging Systems). En los ensayos de western blot durante el enquistamiento, como control de carga se utilizó la inmunodetección de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) empleando un anticuerpo heterólogo contra la GAPDH de humano (Abcam). Para obtener datos semi-cuantitativos, cada banda reconocida por los anticuerpos se analizó por densitometría y los datos se normalizaron con aquellos obtenidos del control de carga (anti-GAPDH). La expresión relativa de cada proteína en los trofozoítos (tiempo 0) se tomó arbitrariamente como la unidad.

### **Ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal**

Los trofozoítos se cosecharon y lavaron con PBS, las pastillas se resuspendieron en un volumen de 2-3 ml de medio y se colocaron en cajas de 6 pozos (2 ml/pozo), a las cuales previamente se les colocaron cubreobjetos estériles que previamente fueron cubiertos con 100 µl de fibronectina humana (300 µl por pozo) y se incubaron 1 h a 24 °C para permitir la adherencia de las amibas. Después, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol al 100% por 5-10 min, se lavaron dos veces con PBS 1X y los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con suero fetal bovino al 10%, durante 1 h a 37 °C. A continuación, se agregaron los anticuerpos contra las PRMTs (PRMT1, PRMT5 y PRMTA) en una dilución (1:100) con PBS y se incubaron a 37 °C por 1 h. Después de varios lavados con PBS, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo FITC (ZyMax goat anti-rabbit IgG) por 1 h en completa oscuridad a TA, se lavaron de nuevo con PBS y posteriormente se incubaron con 4',6-diamidino-2-phenylindol



(DAPI, Sigma-Aldrich) al 0.001% por 10 min a TA para teñir los núcleos. Las muestras se montaron con 10  $\mu$ l de VECTASHIELD (VECTOR laboratorios, Inc H-1000) en portaobjetos y se examinaron por microscopía confocal en un microscopio Zeiss LSM700. Se documentaron aproximadamente 20 secciones ópticas de grosor variable y se analizaron por el programa ZEN 2012 (Zeiss).

## RESULTADOS

La metilación de los residuos de arginina por las proteínas metiltransferasas de arginina (PRMT) está involucrada en la regulación de procesos celulares fundamentales, incluida la transcripción, el procesamiento de RNA, las cascadas de transducción de señales y la respuesta al daño del DNA. Estudios recientes han proporcionado avances considerables en el desarrollo de herramientas experimentales y de identificación de las PRMTs, pero hasta el momento no se han caracterizado *in silico* y experimentalmente las PRMTs de *E. invadens*.

### Identificación de las PRMTs de *E. invadens*

Con el fin de identificar los genes y proteínas de PRMTs en el parásito *E.*

*invadens*, se realizó la búsqueda en la base de datos de AmoebaDB

(<https://amoebadb.org/amoeba/>) utilizando como sonda el dominio conservado de

N-metiltransferasa de las PRMTs de humano, así como las diferentes PRMTs de

*E. histolytica*. Mediante este análisis se detectó que el genoma de *E. invadens*

posee cuatro genes (EIN\_172090, EIN\_223690, EIN\_398100 y EIN\_497480) que

codifican para proteínas hipotéticas del tipo de las PRMTs (EiPRMTs).

La secuencia de nucleótidos EIN\_172090 no principia con el codón de inicio de la

traducción (ATG), por ende, la secuencia aún no está completa, y hasta el

momento se tiene una longitud de 800 pb (Fig. 9A), que codifica para una proteína

de 265 aminoácidos (Fig. 9B), con un peso molecular de 30.7 kDa y un punto

isoeléctrico de 8.85. Esta proteína está anotada en la base de datos como

HNRNEhPRMT5P N-metiltransferasa de arginina (Tabla 2). La secuencia

EIN\_223690 tiene una longitud de 1978 nucleótidos (Fig. 10A) y posee dos

intrones y tres exones, los cuales producen un mRNA de 1827 nucleótidos, que

codifica para una proteína N-metiltransferasa de arginina de 608 aminoácidos (Fig. 10B), con un peso molecular de 69.8 kDa y un punto isoeléctrico de 5.57 (Tabla 2). El gen EIN\_398100 tiene 1068 pb (Fig. 11A) con un intrón y dos exones, que codifican un mRNA de 999 nucleótidos y una proteína (N-metiltransferasa de arginina 1) de 332 aminoácidos (Fig. 11B), con un peso molecular de 38.2 kDa y un punto isoeléctrico de 5.10 (Tabla 2). Finalmente, el gen EIN\_497480 es de 966 pb de longitud y sin intrones (Fig. 12A), codifica para una proteína (N-metiltransferasa de arginina) de 321 aminoácidos (Fig. 12B), con un peso molecular de 37 kDa y un punto isoeléctrico de 5.22 (Tabla 2). Al comparar las secuencias de las diferentes EiPRMTs entre ellas, se encontraron identidades entre 19.60 y 42.63% (Tabla 3).

#### A

```
CGCGTGTAGTAGTTCAGTGTGGTTTTGGGAAACTTGCTTTACTTGCTAAAAAGTATAAAGCGCGTTATGTCAAAGCG
ATAGACACGCGTACGATTGCTCAGTTTTTTCGGCATGTCGTTGACGAGTAAAAGTCGATATTGTCGTTGAACAGACATC
CATCAGTGAAGTCAAAGAGAAGTACGACATTATCATCTGCGATTGGATGGGTATCAATTTGTTACTACGACTCTTTGCTCA
GTGAGATGTTGATAGCCAAAACAAAGCTGAAGAAGTGTGGAGAGATTCTACCTTCTGGTGGGAAGTGTACATCTGTGGA
GTGACTGAGATCAATTATGTGCGACGACAATATGAGTTCTGGAAGGATGTGTATGGCTTCGACATGTCGATAATGTTGAA
AGGAGTTGTTTGCACCGCTTACATCGATAACATCGATGAGTCCAAAGTGATCACATCAAAGCATCTTCTTTATGGCGTCG
ATTTAAATGACTTCGAAGAGGAGAATTTGACTCCACGCACAGTCAAATCTCTATCACACTAAAGAGACAAATGCCACTC
GTCGGGTTTTGTTACTTACTTCGACTGCGATGTGAAGAACAAGAAGATCTCATCCGCACCGGGGAAGAAGACTACGTGGAA
ACAATGCTGCTATTTATGCCCGTCACCCATGAACGGGAAGATCGATGATGTCATAACGGGTGATTTAAAATGCTTCGAA
AGAAAGGTAGATGGATGGTCCAGATTCAGTACGAGTGTAAAAAGAGGCAGTTTGAAGGGACATTTCTTATGTGTTTTAG
```

#### B

```
RVLVVQCGFGKLLAKKYKARYVKAIDTRTIAQFFRHHVDELKVDIVVEQTSISEVKEKYDIIICDWMGINLYYDSSL
EMLIAKTKLKKCGEILPSGGKCYICGVTEINYNVDEQYEFWKDVYGFDMSIMLKGVVCTAYIDNIDESKVIITSKHLLY
LNDFEENLTPRTVKFSITLKRQMPVLVGFCTYFDCDVKNKKISSAPGKKTWKQCCYLCPSPMNGKIDDVITGRFKMLRK
KGRWMMVQIQYECKRQFEGTFPVF
```

#### Figura 9. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN\_172090.

(A) Secuencia de nucleótidos. (B) Secuencia de aminoácidos.

## Identificación de dominios en EiPRMTs

Un dominio proteico puede ser funcional si es una unidad modular de la proteína que lleva a cabo una función bioquímica determinada, y estructural si se refiere a un componente estable de la estructura.

Enseguida se realizó la búsqueda de dominios funcionales presentes en las cuatro EiPRMTs putativas utilizando los programas <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, <https://prosite.expasy.org/> y <http://smart.emblheidelberg.de/smart/>. En estos análisis se encontró que EIN\_172090 tiene un dominio metiltransferasa dependiente de SAM, extendiéndose en las posiciones 1-258 aa (Figura 6).

**A**

ATGGCACAAGCTCTTCAAAAATCCCCAAGTCCCAGTGATTTACGATTTAAGCAACGAAGACATAGAATATGACAGAGTTTC  
GGATATATTACGCAGTCTCCAAACGGTAACTCCTTATTACTGTGTCCACTGAATCGACCCCCTGACACTTTGAATGAAG  
GTTTACGTTTCCAGCCTCTTTTTCTGATACCGACTTAAACACCTCAATCGTTTCCACATGTAgtttggtggttctattga  
ataaccaaacatttactattaaacgtgagtaaaagacttataataataattaataattaacatatagTATTTGGCAAGAC  
AACTACATTTGAAAGAGTGAAGAGTATCAAGACTGTATCGCGGAAGTGAGATGGGCTAACCCACATCGGTGTGTTGGAC  
TTGTAGTACCTCTTCCATCCAATATCAACATCGATTATTATAGATATGTCAGTACGATTTGCAACTTGTCAAGATGTCCC  
GTGTGGATCACAGTGCCATTGGCAGCAGATGGCTGGCAGATGTGGAACACCATCAGAAAAGGTCATTGGATATAACACAAA  
CATACGGCCGCTTTTTAAGTCTTCAAGAGAATCTCACCGTAGAGTTTGACTTACTTCAAGTGTGGCGAGCGGAAAATGTAG  
CTGGTGTATTTTTCGCAAAACAGATTGTCCAAGACAACGGAAAATTGACTCGGGAGAACGACATTTTCTCCACAATTG  
TTGGACTTTGATATTTCCATCTTTATTTCCAACCTTTGAGCCAAGCACTGAATTGGTAAAGAACACGATTGAGTATATCGA  
GTGGCTCAAAACGTCACGCACAGAGCCTTCACAATACGAGAAAAGGTATAGTCGAGTTTAGAGATACTATAGAAAAGCCTA  
TTCAACCACTTGCACACGATTTGGACTCTGTTGTGTATGAGACAATTGAAAAAGAGCCATTCAAATATCAAAAGTATCGC  
ATGGCCTTCATACTAGCACTCCACGATAAAGCTGGAGTCATCCAACAATTTAGTCCATTAACCCGTTCCGTATCATGAT  
AGCCGGTGTGTCGAGGACCCTCGTTCAAATGGTCATCGATGTATTGAACGTGAACCGTTTTGCTCACAATTGTGTGG  
TGTATGCTGTTGAGAAAATCAGAATGCTGTTGCTACTTTGTCATATCGCAAACGTACACAACACGATTGGAAAAATGTT  
GAGGTGATTGGATGTGATATGCGGAAGATGAACATGCCAATAAAGTAGATATCGTAATCAGTGAATTGTTGGGCTCTTT  
TGGGGATGACGAGTTGTGTCAGAGTGTTTAGATGCGCTTCTTCTCTTGTTTTTAAGAGTGATGGTGTACTATCCCAC  
GTACCTATTTCGAATTACATCCAACCATATCAAATAGTGTGGTTTACACGTCTTTTCTCGAGAACCAATACAGTTTCGAA  
CAACCAGTTATATGCAATCAATTCATATGCGGCATCTCTTCCACCACAAAAGTGTTCACATTTGCTCCATCCATCAGT  
CGATGATCACCAACGATTTCGTCGACTTCAAATTTGTGTCGAAAGATGGATGGGGCCTTACATGGGTTCTCTGGCACAATTA  
ATGTCGAGTTGTACAAGAACGTGAAACTAAGTACCGTCCCTGGAGAACATACCCCAGACATGTTCCAGTTGGTTCCCATTC  
TTTTTCCCTATTACGCTCCAATCGACTTAAAACGAGGTGATGTGGTCGAGTTTTTGTGTGGAGGAACGTTACTGGGCA  
TAGAGTGTGGTACGAGTGGATGGTTGTACACCTTTGATCACAAAATTTTTAACTCATCTGGGAAACATGCGATGAGCC  
TCgtttgcagccgatgaagatgaaccaacaatttctatatatttctggtttatttttactataactatagTTTGCTGTAA  
AACTGTTTCTTTGTTGAGGTTTCGTTGAGTTAATTTCAAGTTTGGAGGTCGAATGA

**B**

MAQALQNPQVPVIYDLSNEDIYDRVSDILRSLQTVTPYYCVPLNRPDNLNEGLRFQPSFSDTDFNTSIVSTCIFGKTT  
TFERVKS IQDCIAEVRWANHIGVFLVPLPSNINIDYRYVSTICNLSRCPVWITVPLAADGWQMWNTIRKVIYNTNI  
RPLLSLQENLTVFEDLLQVWRAENVAGVIFAKQIVQDNGKLTRENDIFLHNLLDFDISIFISNFEPSTELVKNITIEYIEW  
LKTSRTEPSQYEKGIVEFRDTIEKPIQPLAHDLDSDVYETIEKEPFKYQKYRMAFILLALHDKAGVIQQFSPLNPFPRIMIA  
GAGRGPLVQMVIDVLNVNRFHNCVVYAVEKNQNAVATLSYRKRQHDWKNVEVIGCDMRKMNMPNKVDIVISELLGSFG  
DDELCPCLDALLPLVLKSDGVTIPRTYSNYIQPISNSVYTSFLENQYSFEQPVICNQFNAAAFSSPQKCFTFVHPSVD  
DHQRFVDFKFSKMDGALHGFSGTFNVELYKNVKLSTVPGEHTPDMFSWFPFFFP IQPPIDLKRGDVEFLLWRNVGTGHR  
VWYEWVVTPPLITKIFNSSGKHMSLFAVKTVSLLRFRLELISSLEVE

**Figura 10. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN\_223690.**

(A) Secuencia de nucleótidos. Las secuencias en minúsculas y sombreadas corresponden a intrones. (B) Secuencia de aminoácidos.

**A**

ATGGACTCCAAGCAATTTGAACACGACCAGAAGAAGCGGACTTGGAGTATTACTGGGACTCATACAGTTCGATCAATAT  
ACACGAGCAGATGATCAAGGATTATACACGAACACATACCTACGAAAAGGCGATCAACGCGTGTGACATTAAAGGGAAAA  
TAGTGATGGACGTTGGATGTGGGCTTGGGATCTTATCCCTCTTTGCCGCACGTGCTGGAGCCAAACACGTCTATGCCATC  
GAGCGTGTGGTGTATCAGAAAAAGCGAAACAAGTCGTGAAGGATAATGGATATGAAGATGTCATTACAGTGATAAAAGG  
AAGAGTCGAAGACATAACACTTCCCTGTCGACCACGTGATGTCATTGTGAGTGAATGGATGGGGTACAATTTGTTATATG  
AATCGATGCTTGAAGTGTCTTATATGCGCGAGATAAATGGCTTGTCAAAGGTGGATTGATTTTACCAGAGAAGTGCACG  
ATGTATATTAATGCCATAGAAGATCAATGGTTCTATGATAATAAAGTGAATTTCTGGAGGAATGTGTATGGGTTTAAATAT  
GACACCGATGAGAGCTCAAGTCTTAAATGAGCCATTAGTCGAAACTTAAATTCCTCTCTATTGTGACGTCGGATGACG  
TCTTAATGgtttgtttttaatttcttaataatattaatagtaattaaatcaatattattagtttaattaactattagAAT  
ATCGATATCAATACAATGAAATATGAAGATCAATGTTTCACTACACCATTCAAATTAAGGCTTTTCAGAGAAGACTTCAT  
CTACGCGTTCGCTACTTATTTTCGAGCTCGCATTCCACAGTCGGGAGAGGTTTTAACAACATCGCCATACCAAACGGAAA  
CACATTGCGACCAATCAATGTTTTACTTGGACGAACCAATCACCGTCTCACCTGGAGAAATCATAGAGGGAGTGTATACA  
CTCAAATTCATGAGGTCAACCCAAGATTTTTGGACGCTCTATCTCATTCAAGTTTAAAGGAGTGTCCACACCGCTCA  
GGGACAAAATAATTACAAAATGCAATGA

**B**

MDSKQFEHDQKKADLEYWDSYSSINIHEQMIKDYTRHTYKAINACDIKGIKIVMDVGCGLGILSLFAARAGAKHVYAI  
ERAGVSEKAKQVVKDNGYEDVITVIKGRVEDITLTPVDHVDVIVSEWMGYNLLYESMLGSLYARDKWLKVGGLILPEKCT  
MYINAIEDQWFYDNKVNFRNVYGFNMPMRAQVLNEPLVETLNSSSIVTSDDVLMNIDINTMKYEDQCFTTFFKLAFR  
EDFIYAFATYFDVAFVQSGEVLTTSPYQTETHWHQSMFYLDPEPITVSPGEIIEGVYTLKFNEVNPFLDVSISFKFKGVF  
HTAQGQNNYKMQ

**Figura 11. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN\_398100.**

(A) Secuencia de nucleótidos. La secuencia en minúsculas y sombreada corresponde a un intrón.  
(B) Secuencia de aminoácidos.

**A**

ATGGCTGTGGAGGAGAGTGCATGGGAGATTGCAATATTATTGGATTAGTACTCGCACACGAACATTCATGAAGAGAT  
GATAAACGACGAGCATCGAACGAAGACGTATAAAGAAGCGATAGAGTATTACTGTAAAGACAAAGTAGTCTTAGATGTAG  
GATGTGGGACTGGGATCTGTGCTTGTGCTGCGCAAGCGGGAGCGAAGAAAGTGTATGCGATAGAGATGAGTGTATATA  
GCTGGGTTTGCAGCGTATATAGTTCGGCATAAATACTATGAGAAAAGTGAATCAAGTGATACAAGGTCGTGTAGAAGATAT  
AGAAGTTCCTGAGAAGGTAGATATAAATAGTTAGTGAGTGGATGGGATACAATTTATGTTTGAAGGAATGCTTTTCGAGTG  
TTTTAACAGCAAGGAGATTTCTTAAAGAAGAGAGAAAAAGCCCGTCATGTTACCTAACAAAGTGCCACCTCTTCATCTGC  
GGAATCGAAGGCAATGAGGAATATATAACAAAAAGAAAAACATTTTGCGAATTATATGGAGATATGGATTTGACAGAAAA  
TCTCCCACTGATGGAAGCAGTCATTAAGGACATTAAGGAAAATCGAGTGGTACGACGCGAACGGTCGTGGCGGATCTTA  
ACTTGGAAACTATGGTTGGAGACGAAGTCAATTTCTCGGCACCGTTTGAATTTACAGTGACAAGGAAGACGGAAATGAGT  
GGATTTTGTGTTACTTTGACTGCTTTTTTGTATCATCACTCAATCTTGACAACCTCAACCGGGACAATCAACTCACTGGAA  
ACAAACACTCTTCTTTTAAATACCTCTCAAATGGAGATGGGAGATCGAATCGGCGGAATATACGTCTGCAAAACAAA  
ACGCAACTAATCAGAGAAATCTCGACATCTCTATCAACTTCTCTAAAAATAACGTCTTGTATCAGATGAACTATTTTTTG  
AACTAA

**B**

MAVEESAMGDSQYYWISYSHTNIHEEMINDEHRTKYKEAIEYYCKDKVVLVDVGCCTGILSLFAAQAGAKKVYAIEMSDI  
AGFAAYIVRHNNYKVIQVIQGRVEDIEVPEKVDIIVSEWMGYNLLFEGMLSSVLTARRFLKEERKEPVMLPNKCHLFIC  
GIEGNEEYITKRKTFCELYGMDLLENLPLMEAVIKDIKENRVVTRTVVADLNLETMVGDEVNFSAPFEITVTRKTEMS  
GFCCYFDCFFDHHSILTTQPGQSTHWKQTLFFLKYPLKMEMGDRIGGIYVCKQATNQRNLDISINFSKNNVLYQMNYFL  
N

**Figura 12. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de EIN\_497480.**

(A) Secuencia de nucleótidos. (B) Secuencia de aminoácidos.

**Tabla 2. Genes y proteínas PRMTs de *E. invadens*.**

Gen	Nombre	Intrones	Longitud (pb)	Longitud (aa)	Peso molecular (kDa)	PI
EIN_172090	HNRNP N-metiltransferasa de arginina	No	800	265	30.7	8.85
EIN_223690	N-metiltransferasa de arginina	2	1978 1827	608	69.8	5.57
EIN_398100	N-metiltransferasa de arginina 1	1	1068 999	332	38.2	5.10
EIN_497480	N-metiltransferasa de arginina	No	966	321	37	5.22

PI: Punto isoeléctrico; aa aminoácidos.

**Tabla 3. Porcentaje de identidad entre las PRMTs de *E. invadens*.**

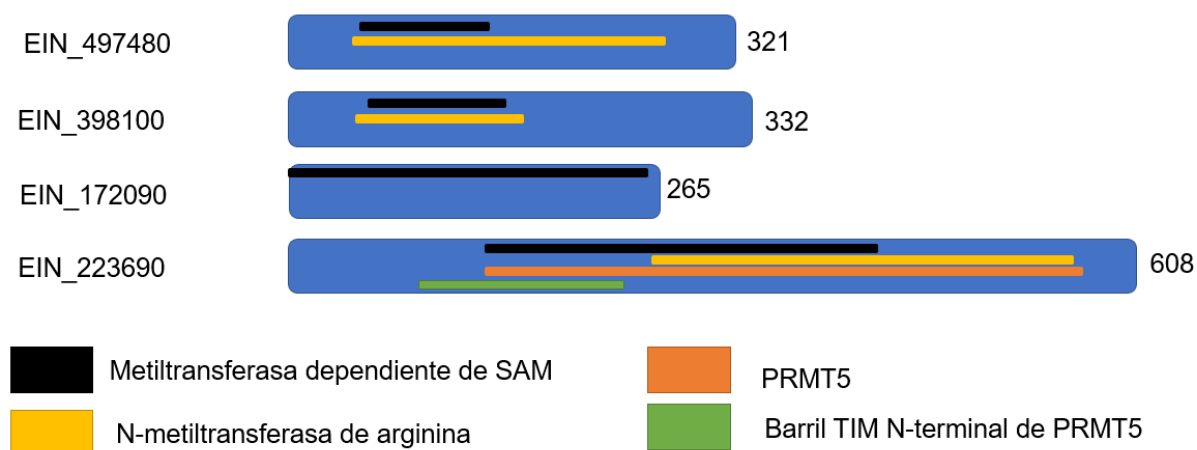
	EIN_497480	EIN_398100	EIN_172090	EIN_223690
EIN_497480	100	-----	-----	-----
EIN_398100	42.63	100	-----	-----
EIN_172090	28.29	28.03	100	-----
EIN_223690	19.60	19.74	19.67	100

EIN\_223690 cuenta con un dominio metiltransferasa dependiente de SAM, que se extiende desde la posición 142 hasta la 425; un dominio N-metiltransferasa de arginina en la posición 262-565 aa; un dominio de PRMT5 en la posición 140-569; y un dominio de barril TIM N-terminal de PRMT5, que se extiende desde la posición 92 hasta la 239 aa (Figura 13). Estos resultados sugieren fuertemente que esta EiPRMT es un ortólogo de PRMT5, es decir una enzima de tipo II.

Por otra, parte, EIN\_398100 cuenta con un dominio metiltransferasa dependiente de SAM, en la posición 56-155; un dominio N-metiltransferasa de arginina, que se

extiende desde el aminoácido 49 hasta el 168; y un dominio de metiltransferasa ribosomal L11, que comprende la posición 36-179 (Figura 13).

Finalmente, EIN\_497480 cuenta con un dominio metiltransferasa dependiente de SAM, que se extiende desde la posición 51 hasta la 144; un dominio N-metiltransferasa de arginina, en posición 45-270; y un dominio de metiltransferasa ribosomal L11, que se extiende desde el aminoácido 31 hasta el 140 (Figura 13).



**Figura 13. Esquema de los dominios detectados en las proteínas EiPRMTs hipotéticas.**

En color negro se encuentra comprendido el dominio metiltransferasa dependiente de SAM, en color amarillo el dominio N-metiltransferasa de arginina, en color naranja el dominio de PRMT5 y en color verde el dominio de barril TIM N-terminal de PRMT5.

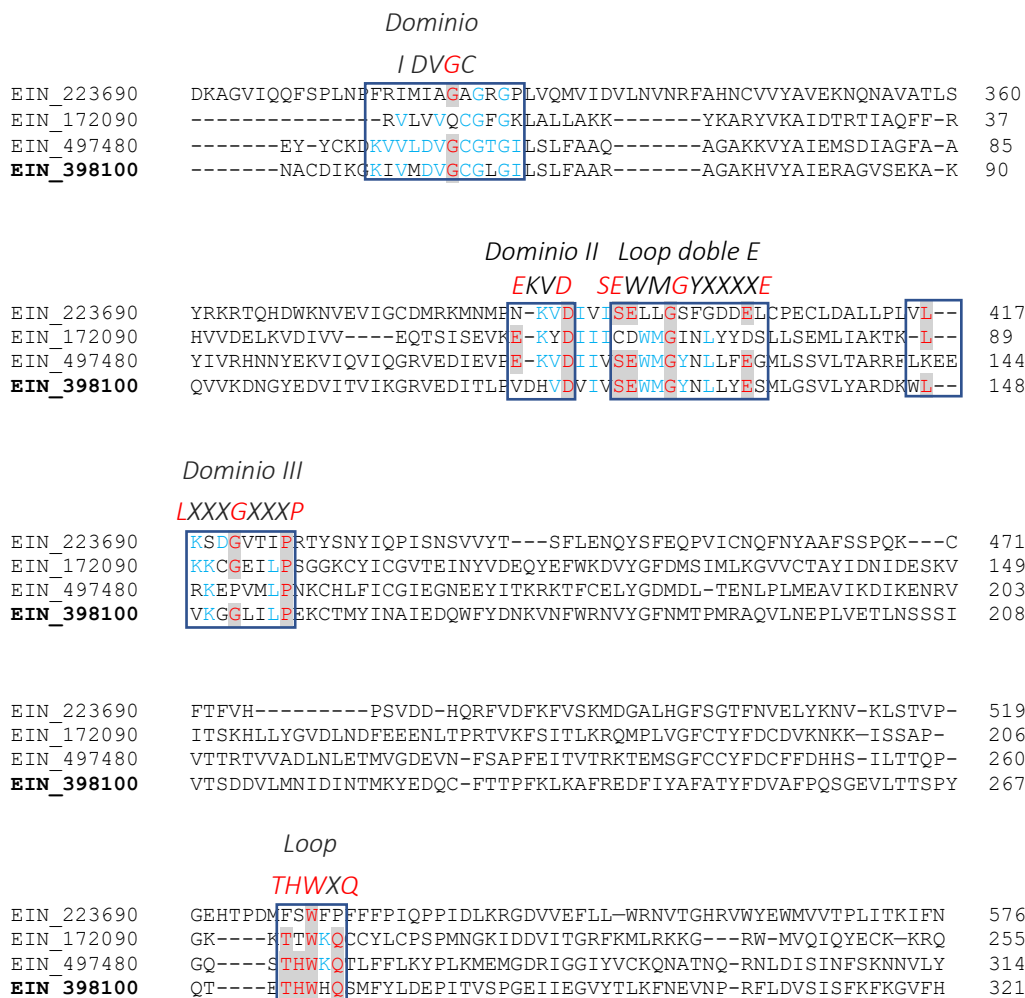
Posteriormente, con el objetivo de identificar las secuencias de aminoácidos presentes en los dominios característicos de las PRMTs (los dominios I, II, III) y las dos asas importantes (Loop doble E y Loop THW), se realizó un alineamiento entre las diferentes PRMTs de *E. invadens*. Este análisis mostró la presencia de los diferentes motivos y asas típicos de las PRMTs, con algunas diferencias. Por ejemplo, la secuencia EIN\_172090 no conserva un residuo de glicina en el dominio



I (Figura 14), en tanto que EIN\_398100 y EIN\_223690 no conservan un glutamato en el dominio II (Figura 14). EIN\_497480 no conserva una glicina y una leucina en el dominio III (Figura 14). En el asa doble E de EIN\_172090 tampoco se conservan una serina y los dos glutamatos que la flanquean (Figura 14). Finalmente, en el asa THW, la histidina de la secuencia THWxQ, típica de las enzimas tipo I, no se conserva en EIN\_172090 y esta secuencia es distinta (FSWxP) en EIN\_223690 (Figura 14), confirmando que esta última podría corresponder a una PRMT de tipo II.

### **Similitud de las PRMTs de *E. invadens* con las de otros organismos del género *Entamoeba***

Con el fin de detectar PRMTs similares en otras amibas del género *Entamoeba* se realizó una búsqueda mediante BLASTp dentro de la base de datos de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando como sondas las cuatro PRMTs de *E. invadens*. Empleando la secuencia EIN\_172090, se encontraron proteínas similares en *E. dispar* (GenBank: XP\_001735758.1), *E. histolytica* (GenBank: XP\_648825.1) y *E. nuttalli* (GenBank: XP\_008858814.1); las cuales muestran identidades con la proteína de *E. invadens* del 57 al 58% con valores de E de  $2 \times 10^{-106}$  a  $2 \times 10^{-107}$  (Tabla 4). Al analizar la similitud con las PRMTs de humano, la más cercana fue PRMT1 (GenBank: AAH19268.2), con una identidad de 31% y un valor de E de  $1 \times 10^{-23}$  (Tabla 4).



**Figura 14. Alineamiento de las PRMTs de *E. invadens*.**

Las secuencias de aminoácidos de la parte central conservada de las PRMTs de *E. invadens* se alinearon mediante el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). En cuadros se encuentran los dominios típicos de las PRMTs (dominios I, II y III y las asas doble E y THW), dentro de los cuales en rojo se encuentran los aminoácidos altamente conservados y en azul los aminoácidos constantes en la mayoría de las PRMTs. Los números a la derecha indican la posición de los residuos de aminoácidos.

La secuencia EIN\_223690 presentó mayor identidad con proteínas de *E.*

*histolytica* (GenBank: XP\_649709.1), *E. dispar* (GenBank: XP\_001739449.1) y *E.*

*nutalli* (GenBank: XP\_008860730.1), con identidades del 47% y 48% y con

valores de E de cero (Tabla 4). Por otro lado, esta EiPRMT tiene una identidad del

32% con valor de E de  $4 \times 10^{-84}$  con la proteína N-metiltransferasa de arginina 5

humana (GenBank: NP\_001269883.1) (Tabla 4).

La secuencia EIN\_398100 tuvo mayor identidad con proteínas de *E. histolytica* (GenBank: EMH77640.1), *E. nuttalli* (GenBank: XP\_008854723.1) y *E. dispar* (GenBank: XP\_001736879.1), con las cuales mostró identidades de 83 a 85% y valores de E de cero (Tabla 4). El porcentaje de identidad de esta proteína con la proteína N-metiltransferasa de arginina 1 humana (GenBank: AAH19268.2) fue de 44% y un valor de E de  $3 \times 10^{-97}$  (Tabla 4).

Finalmente, la secuencia EIN\_497480 presentó mayor identidad con proteínas de *E. histolytica* (GenBank: XP\_656637.1), *E. nuttalli* (GenBank: XP\_008859038.1) y *E. dispar* (GenBank: XP\_001736366.1), con identidades de 57 y 58% y valores de E de  $2 \times 10^{-135}$  a  $5 \times 10^{-135}$  (Tabla 4); mientras que con la proteína N-metiltransferasa de arginina 1 humana (GenBank: AAH19268.2) fue de 37%, con valor de E de  $2 \times 10^{-63}$  (Tabla 4).

En resumen, estos análisis mostraron que tres de las PRMTs de *E. invadens* (EiPRMTs) tienen relación con PRMTs humanas de tipo I, especialmente con PRMT1, y otra con las de tipo II, específicamente con PRMT5 (Tabla 5). Por otra parte, dado que las EiPRMTs presentaron alta identidad con las EhPRMTs, se decidió nombrar a las PRMTs de *E. invadens* de acuerdo con su mayor identidad con las diferentes EhPRMTs (Tabla 6). Así, la secuencia EIN\_172090 se nombró EiPRMT-A, la secuencia EIN\_497480 como EiPRMT1a, la secuencia EIN\_398100 como EiPRMT1c y la secuencia EIN\_223690 como EiPRMT5 (Tabla 6).

Tabla 4 . Identidad entre EiPRMTs y PRMTs de otras *Entamoebas* y de humano.

<i>E. invadens</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. nuttalli</i>	<i>H. sapiens</i>
EIN_172090	XP_648825.1 57% E 2 x10 <sup>-106</sup>	XP_001735758.1 58% E 2 x10 <sup>-107</sup>	XP_008858814.1 57% E 2 x10 <sup>-106</sup>	PRMT1 31% E 1 x10 <sup>-23</sup>
EIN_223690	XP_649709.1 47% E 0	XP_001739449.1 48% E 0	XP_008860730.1 47% E 0	PRMT5 32% E 4 x10 <sup>-84</sup>
EIN_398100	EMH77640.1 85% E 0	XP_001736879.1 83% E 0	XP_008854723.1 84% E 0	PRMT1 44% E 3 x10 <sup>-97</sup>
EIN_497480	XP_656637.1 57% E 2 x10 <sup>-135</sup>	XP_001736366.1 58% E 5 x10 <sup>-135</sup>	XP_008859038.1 57% E 2 x10 <sup>-135</sup>	PRMT1 37% E 2 x10 <sup>-63</sup>

Tabla 5. Porcentaje de identidad entre PRMTs de *E. invadens* y humanas.

	PRMT1 Hs	PRMT2 Hs	PRMT3 Hs	PRMT4 Hs	PRMT5 Hs	PRMT6 Hs	PRMT7 Hs	PRMT8 Hs	PRMT9 Hs
<b>EIN_497480</b>	<b>36.39</b>	29.15	33.97	31.01	19.13	34.92	22.00	36.39	14.13
<b>EIN_398100</b>	<b>43.07</b>	31.29	40.25	31.19	18.48	36.70	19.94	42.47	16.06
<b>EIN_172090</b>	<b>27.27</b>	21.29	26.64	24.62	15.23	23.85	16.60	25.00	12.09
<b>EIN_223690</b>	16.92	18.84	14.93	18.10	<b>32.98</b>	17.18	13.60	14.99	15.25

En negrita se muestra la mayor identidad

Tabla 6 . Porcentaje de identidad entre las PRMTs de *E. invadens* y las PRMTs de *E. histolytica*.

	EhPRMT1a	EhPRMT1b	EhPRMT1c	EhPRMTA	EhPRMT5
<b>EIN_497480 (EiPRMT1a)</b>	<b>57.55</b>	42.95	41.01	29.64	17.18
<b>EIN_398100 (EiPRMT1c)</b>	41.64	42.51	<b>83.73</b>	24.53	19.40
<b>EIN_172090 (EiPRMTA)</b>	27.06	28.35	27.76	<b>58.17</b>	15.77
<b>EIN_223690 (EiPRMT5)</b>	19.10	22.97	18.73	15.60	<b>46.32</b>

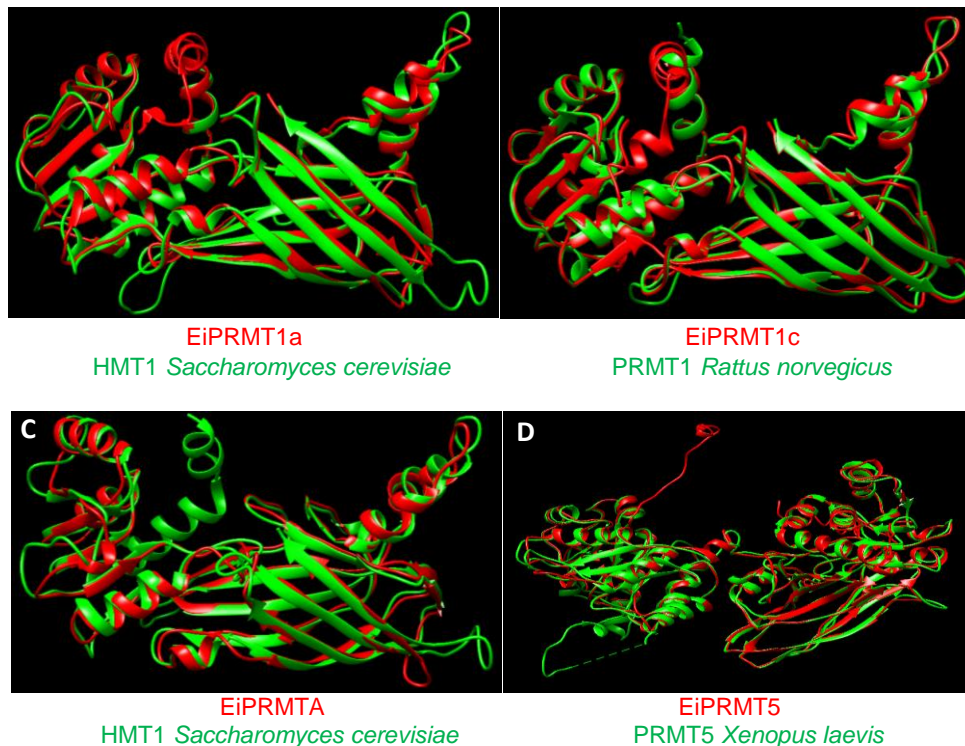
### **Estructura tridimensional de las PRMTs de *E. invadens***

Para respaldar la hipótesis de que las proteínas identificadas corresponden a PRMTs, se mandó a predecir sus estructuras 3D utilizando el programa I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) Posteriormente, mediante el programa Chimera se realizó el empalme de las estructuras predichas con la del cristal de la base de datos de Protein Data Bank (PDB) con los que guardaron mayor identidad. También se predijeron las estructuras 3D de las PRMTs de *E. histolytica* homólogas y posteriormente se realizó el empalme y la comparación de las estructuras en el programa Chimera.

Las estructuras 3D predichas mostraron que las PRMTs de *E. invadens* presentan del 30% al 44% de identidad estructural con los cristales previamente descritos en la base de datos de PDB. En la figura 15 se puede observar el alto grado de empalme entre los modelos de las EiPRMTs y los cristales de PRMTs de otros organismos. La proteína EiPRMT1a tiene una identidad estructural del 39% con el cristal de HMT1 de *S cerevisiae* (Figura 15A). La proteína EiPRMT1c tiene una identidad estructural del 44% con el cristal de PRMT1 de *Rattus norvegicus* (Figura 15B). La proteína EiPRMTA tiene una identidad estructural del 30% con el cristal de HMT1 de *S cerevisiae* (Figura 15C) y por su parte, EiPRMT5 tiene una identidad estructural del 33% con el cristal de PRMT5 de *Xenopus laevis* (Figura 15D).

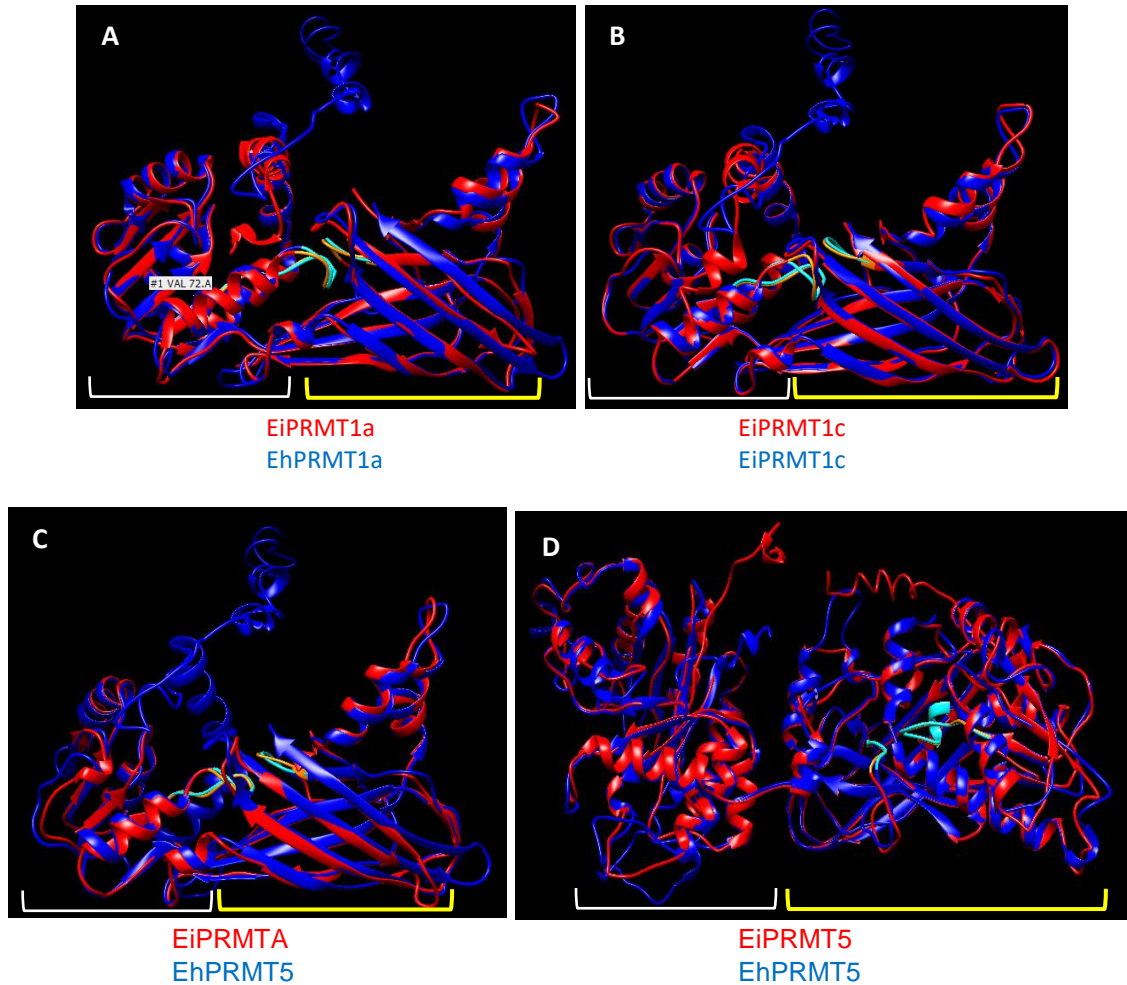
Por otra parte, las estructuras 3D predichas de EiPRMTs y las ortólogas de las EhPRMTs mostraron del 46% al 82% de identidad (Figura 16). Así, EiPRMT1a tiene una identidad estructural del 55.8% con EhPRMT1a (Figura 16A); EiPRMT1c

tiene una identidad estructural del 82.6% con EhPRMT1c (Figura 16B); EiPRMTA tiene una identidad estructural del 55.9% con EhPRMTA (Fig. 16C); y EiPRMT5 tiene una identidad estructural del 46.2% con EhPRMT5 (Figura 16D). Además, en EiPRMTs y EhPRMTs se detectaron los dominios de unión a AdoMet (DUA), la estructura en forma de barril (DFB) y el sitio catalíticamente activo, formado por las asas doble E y THW (Figura 16).



**Figura 15. Estructura tridimensional de las PRMTs de *E. invadens* comparadas con cristales de proteínas descritas en la base de datos de PDB.**

Con las secuencias de aminoácidos de las EiPRMTs, se predijo su estructura 3D mediante el programa I-tasser. Posteriormente, las estructuras predichas se empalmaron con las de mayor identidad presentes en la base de datos de PDB. En color rojo se observa la estructura de las EiPRMTs y en verde la estructura de las PRMTs con mayor identidad a cada EiPRMT.



**Figura 16. Estructura tridimensional de las PRMTs de *E. invadens* comparadas con las PRMTs de *E. histolytica*.**

Con las secuencias de aminoácidos de EiPRMTs y EhPRMTs, se predijo su estructura 3D mediante el programa I-tasser. Posteriormente, se empalmaron las estructuras predichas de las proteínas ortólogas. En color rojo se observa la estructura de las EiPRMTs y en azul la estructura de las EhPRMTs. En color naranja y cian se observa la hendidura con actividad catalítica de las PRMTs. Con el corchete blanco se indica el dominio de unión a AdoMet y con el corchete amarillo, el dominio de estructura en forma de barril.

### **Análisis filogenético de las PRMTs de *E. invadens***

Con la finalidad de conocer la relación filogenética de las EiPRMTs con las PRMTs de otras especies de *Entamoeba* (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. nuttalli*), así como con las de otros organismos, se realizó el alineamiento de las

secuencias mediante Clustal Omega y posteriormente el análisis filogenético mediante el programa MEGA X.

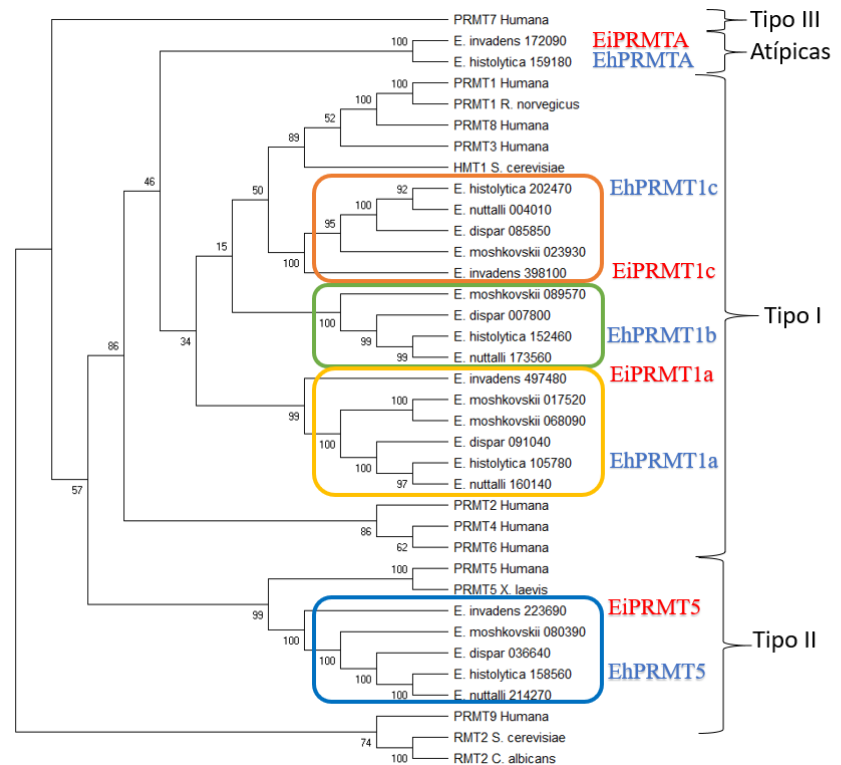
Primero, con respecto a las PRMTs de las diferentes especies del género *Entamoeba*, al igual que para *E. invadens*, en *E. dispar* y *E. nuttalli* se identificaron cuatro genes que codifican para PRMTs hipotéticas; mientras que en *E. histolytica* y *E. moshkovskii* se detectaron cinco genes (Tabla 6).

El análisis filogenético mostró que todos los integrantes del género *Entamoeba* presentan más de una PRMT de tipo I, la mayoría mostrando una relación filogenética más cercana con PRMT1 que con las otras PRMTs humanas de tipo I (Fig. 17). Además, todas las amibas del género *Entamoeba* también presentan una proteína relacionada con las PRMTs de tipo II, similar a la PRMT5 humana (Fig. 17). Al analizar la relación de las PRMTs de *E. invadens*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* con las ya reportadas para *E. histolytica*, se encontró que todas las especies tienen proteínas relacionadas a EhPRMT1a, EhPRMT1c y EhPRMT5, e incluso *E. moshkovskii* presenta dos proteínas de tipo EhPRMT1a (Fig. 17). Por otra parte, no se detectó a la proteína tipo EhPRMT1b en *E. invadens*.

Interesantemente, solo *E. invadens* y *E. histolytica* presentan una PRMT atípica (PRMTA), la cual no guarda ninguna relación directa con alguna familia de las PRMTs humanas, pero tienen una relación más cercana con PRMTs de tipo I que con las de tipo II, III o IV (Fig. 17).



## Análisis filogenético de las PRMTs de *Entamoeba*



**Figura 17. Relación filogenética de las PRMTs de *E. invadens* con PRMTs de otras especies del género *Entamoeba*, y de otros organismos.**

Las secuencias de aminoácidos de diferentes PRMTs se alinearon mediante Clustal omega y el árbol filogenético se realizó con el programa MEGA X por estimación de máxima verosimilitud y utilizando el algoritmo "Neighbor Joining". El algoritmo de verosimilitud obtenido fue de 9.05006053. Los valores de soporte se evaluaron mediante 1000 repeticiones de arranque. En este análisis las secuencias de las PRMTs se encuentran divididas por tipo de PRMT (tipos I, II III y IV). Las PRMTs de las amibas del género *Entamoeba* se presentan con su número de acceso. En las proteínas de *E. histolytica* se menciona el nombre asignado previamente (Borbolla-Vázquez et al, 20015); mientras que las EiPRMTs se nombraron por su cercanía filogenética con las EhPRMTs. Las PRMTs utilizadas fueron: humanas PRMT1 (Q99873), PRMT2 (P55345), PRMT3 (O60678), PRMT4 (Q86X55), PRMT5 (O14744), PRMT6 (Q96LA8), PRMT7 (Q9NVM4), PRMT8 (Q9NR22) PRMT9 (Q6P2P2); *Rattus norvegicus* PRMT1 (NP\_077339.1); *Xenopus laevis* PRMT5 (NP\_001084480.1); *Saccharomyces cerevisiae* HMT1 (CAA84976.1) y RMT2 (KZV12707.1); y *Candida albicans* RMT2 (AOW29511.1).

## Expresión de los transcritos de EiPRMTs, en trofozoítos de *E. invadens*

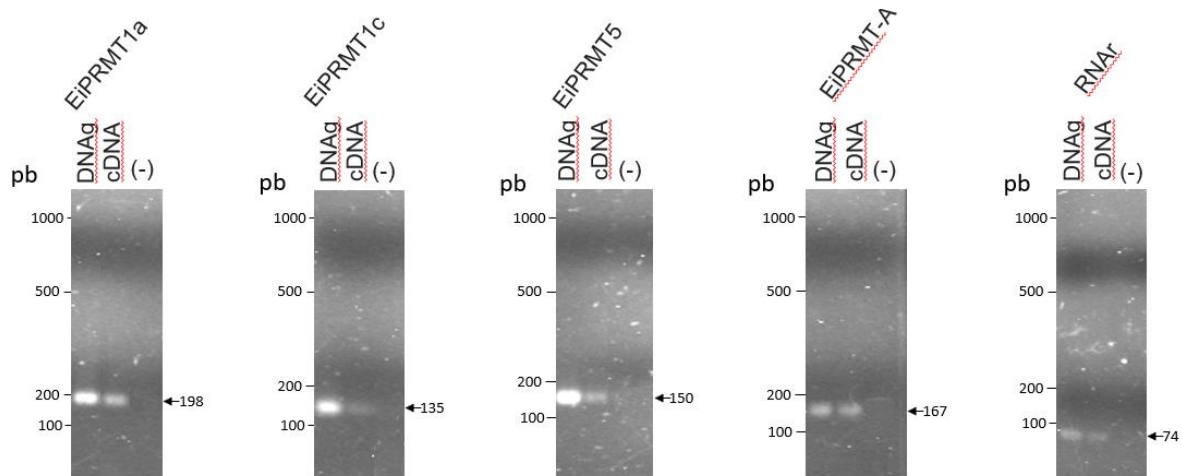
Para determinar si los cuatro genes de las EiPRMTs identificados se transcriben en los trofozoítos de *E. invadens*, se realizaron ensayos de RT-PCR. Para ello, a partir de la secuencia de cada gen se diseñaron los cebadores sentido y

antisentido, cuidando que la secuencia de amplificación no fuera mayor a 200 pb, que no abarcaran a intrones y que fueran específicos para cada gen (Tabla 1).

Posteriormente, se realizaron las reacciones de amplificación, utilizando como molde DNA genómico (usado como control positivo) o el DNA complementario de los trofozoítos de *E. invadens* y los cebadores específicos para cada gen, así como para el gen control (RNA ribosomal 28S), usado como control de carga. Entonces, los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. En estos ensayos se observó que en cada reacción solo se obtuvo un fragmento de amplificación del tamaño esperado para cada gen. Es decir, para EiPRMT1a un tamaño de 198 pb, para EiPRMT1c de 135 pb, para EiPRMT5 de 150 pb y para EiPRMTA de 167pb (Fig. 18). En las mismas condiciones se utilizaron como controles negativos reacciones que no tenían ningún molde (-), donde no se obtuvo amplificado, indicando que la amplificación fue específica (Figura 18). Estos resultados indican que todos los genes analizados se expresan en los trofozoítos de *E. invadens*.

### **Expresión de los transcritos de EiPRMTs, durante el enquistamiento**

Para investigar si los niveles de transcrito de las EiPRMTs varían durante el proceso de enquistamiento, se realizaron ensayos de RT-PCR usando el RNA aislado de trofozoítos inducidos a enquistamiento con medio sin glucosa, a los tiempos 0, 24, 48, y 72 h. En estos experimentos se realizaron las reacciones de amplificación utilizando como molde DNA genómico (usado como control positivo)



**Figura 18. Análisis de la expresión de los transcritos de los genes de EiPRMTs.**

El DNA genómico (DNAg) y el DNA complementario (cDNA) de trofozoítos de *E. invadens* y cebadores específicos para cada EiPRMT, se utilizaron para ensayos de PCR. Los productos de las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. (-) control negativo sin molde. Números a la izquierda: tamaño de los estándares. Flechas: tamaño de los amplicones en pb.

o el DNA complementario de cada tiempo de enquistamiento y los cebadores específicos para cada gen, así como para el gen control (RNA ribosomal 28S), además de una reacción sin molde (usado como control negativo). Entonces, los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio.

En los ensayos para PRMT1a se observó que en el tiempo 0 h (trofozoítos) la expresión fue notablemente menor en comparación con los otros tiempos (Fig. 19A), pero aún en los distintos tiempos de enquistamiento se observaron ligeras diferencias. A las 48 h, el transcrito fue ligeramente menor, en comparación con 24 y 72 h (Fig. 19A). Con el propósito de realizar un análisis semi-cuantitativo, las bandas de amplificación se analizaron por densitometría y los datos se normalizaron con respecto a la banda de amplificación del RNA ribosomal, la cual no mostró variaciones importantes en los tiempos analizados (Fig. 19). Así, la

expresión relativa en el tiempo 0 (trofozoítos) se tomó arbitrariamente como 1.

Mediante estos análisis encontramos que la expresión a las 24, 48 y 72 h de enquistamiento aumentó 7.8, 5.8 y 7.4 veces, respectivamente, con respecto a la expresión en trofozoítos (Fig. 19B).

En los ensayos para PRMT1c también se observó que la expresión fue notablemente menor en los trofozoítos, comparado con los otros tiempos (Fig. 19C). Al igual que para EiPRMT1a, el nivel de transcrito de EiPRMT1c a las 48 h fue menor que lo encontrado a las 24 y 72 h de enquistamiento (Fig. 19C). En el análisis semi-cuantitativo hallamos que la expresión de este gen a las 24, 48 y 72 h de enquistamiento aumentó en 17, 8 y 21 veces, respectivamente, con respecto al tiempo 0 (Fig. 19D).

Para PRMT5, nuevamente la expresión fue menor en los trofozoítos (Fig. 19E). A diferencia de las EiPRMTs anteriores, la expresión de EiPRMT5 aumentó a las 48 h con respecto a las 24 h, pero disminuyó a 72 h, en comparación a los tiempos anteriores (Fig. 19E). En el análisis semi-cuantitativo, los datos revelaron que la expresión a las 24, 48 y 72 h de enquistamiento aumentó en 3.3, 4.2 y 1.8 veces respectivamente, con respecto al tiempo 0 (Fig. 19F).

Finalmente, en los ensayos para EiPRMTA se observó que el nivel de su transcrito en los trofozoítos fue mayor que a las 24 h de enquistamiento, pero aumentó dramáticamente a las 48 h y disminuyó nuevamente a las 72 h, pero a este tiempo mostró aún mayor cantidad de transcrito que en el tiempo 0 (Fig. 19G). En el análisis semi-cuantitativo, la expresión de EiPRMTA a las 24 h disminuyó hasta

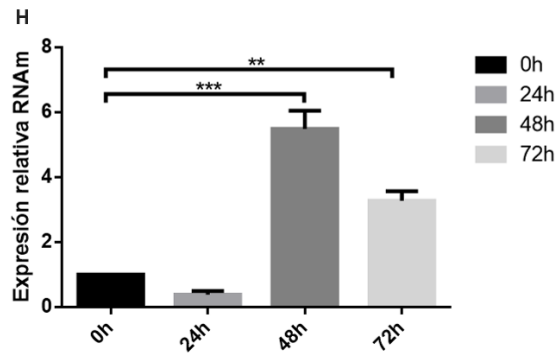
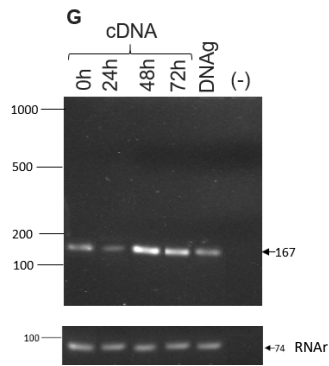
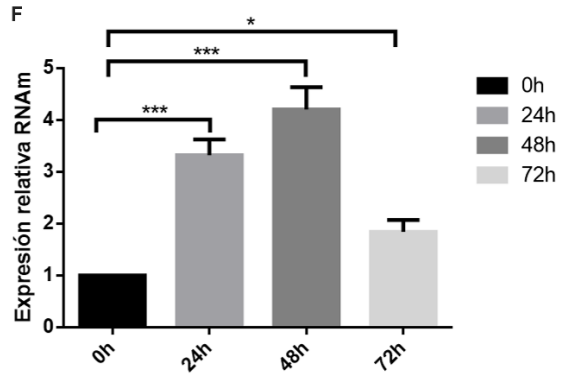
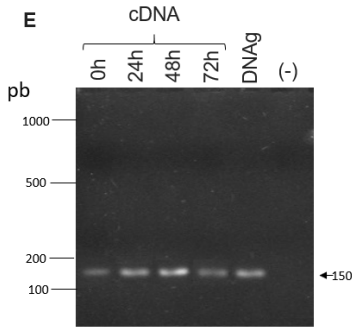
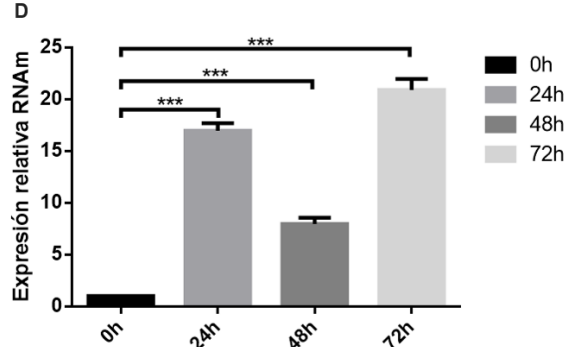
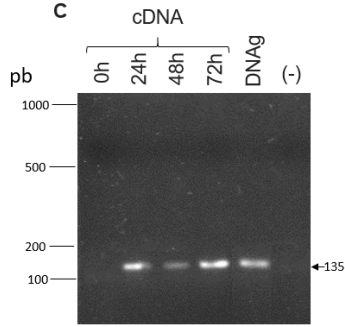
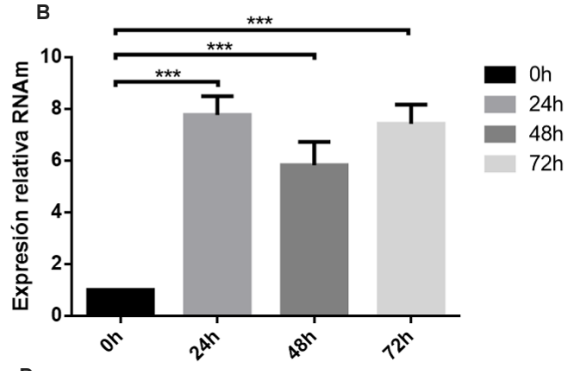
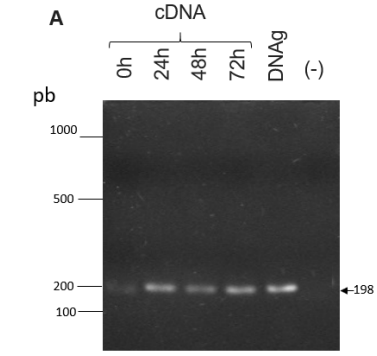
0.4 veces, mientras que a las 48 y 72 h de enquistamiento mostró un transcrito 5.5 y 3.3 veces mayor que el tiempo 0, respectivamente (Fig. 19H).

Debido a la variación en la expresión de todas las EiPRMTs a través de los diversos tiempos del enquistamiento de *E. invadens*, sugerimos que estas enzimas podrían participar en la regulación de este proceso de diferentes maneras.

### **Expresión y localización de las proteínas PRMTs en trofozoítos de *E. invadens***

Debido a la gran identidad entre las EiPRMTs y EhPRMTs, para analizar la expresión de las proteínas de *E. invadens* en los trofozoítos y en el proceso de enquistamiento se emplearon los anticuerpos previamente usados para reconocer a las EhPRMTs (147).

Así, para el análisis de EiPRMT1a y EiPRMT1c se recurrió a un anticuerpo comercial contra la PRMT1 de humano. Antes de usar este anticuerpo se comparó la secuencia del extremo N-terminal de la proteína humana que reconoce el anticuerpo, con las secuencias correspondientes de todas las EiPRMTs. En este análisis encontramos que EiPRMTa y EiPRMT1c presentan una identidad, en esta región, con la PRMT1 humana de 56.82 y 49.89%, respectivamente, con segmentos de 5 a 7 residuos consecutivos idénticos (Fig. 20), sugiriendo que este anticuerpo pudiera reconocer a esas EiPRMTs. Por otra parte, la identidad de este segmento de PRMT1 con EiPRMT5 es mucho menor (20.32%), sin segmentos idénticos superiores a dos residuos contiguos (Fig. 20), sugiriendo que el anticuerpo no puede reconocer a EiPRMT5. Con respecto a EiPRMTA, como su



**Figura 19. Análisis de la expresión de los transcritos de los genes EiPRMTs durante el enquistamiento de *E. invadens*.**

(A, C, E, G) RT-PCR. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio de los productos de PCR, usando como molde el cDNA obtenido de trofozoítos (0h) y de células presentes a los diferentes tiempos de enquistamiento (24, 48 y 72h), y cebadores específicos para EiPRMT1a (A), EiPRMTc (C), EiPRMT5 (E) y EiPRMTA (G). La amplificación del RNA ribosomal 28S, el cual fue usado como gen normalizador, se muestra debajo del gel para EiPRMTA. Como control positivo para cada gen se realizaron ensayos de PCR usando DNA genómico como molde (DNAg), mientras que reacciones en ausencia de molde (-) se utilizaron como control negativo. Números a la izquierda: tamaño de los estándares. Flechas: tamaño de los amplicones en pb. (B, D, F, H) Análisis semi-cuantitativo. Las bandas de amplificación para cada EiPRMT se analizaron por densitometría y los datos se normalizaron con respecto a los de la amplificación del gen control. La expresión relativa en los trofozoítos (0h) se tomó arbitrariamente como 1. Los resultados se indican como la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes por duplicado. (B) EiPRMT1a. (D) EiPRMT1c. (F) EiPRMT5. (H) EiPRMTA. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

secuencia N-terminal no está en la base de datos, mediante este análisis no se puede predecir si el anticuerpo anti-PRMT1 reconoce o no a esta proteína.

Asimismo, se localizó la secuencia de aminoácidos que reconoce el anticuerpo anti-PRMT1 en las estructuras tridimensionales de PRMT1 humana y en EiPRMT1a y EiPRMT1c. Los resultados mostraron que esas secuencias se encuentran expuestas en las tres proteínas (Figura 21), sugiriendo que el anticuerpo puede reconocer a las proteínas en su conformación nativa.

EiPRMT5	249	QYKKGIVEFRD	TIEKPIQPLAHD	LSVV---	YETIEKEPFKYQYRMAFILAL	DKAGV	305
PRMT1_HUMANA	50	DYY-----	FDSYAEFG	IHEEMIKDEV	RTLTYRNSMFMHNR	ELF---	87
EiPRMT1c	15	EYY-----	WDSYSSIN	IHEQMIKDY	TRHTYKAL	NACDI----	50
EiPRMT1a	11	QYY-----	WISYSHIN	IHEEMINDEH	RRTKYKEAI	EY-YC----	45

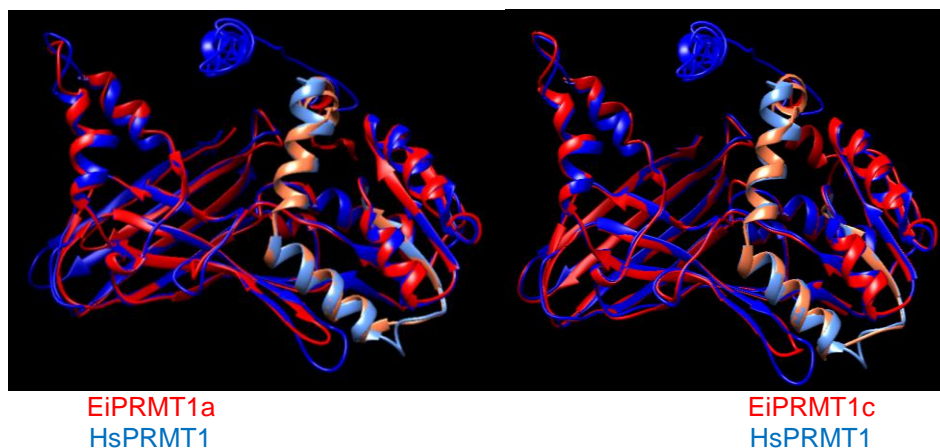
				%I	
EiPRMT5	IQQFSPLNPF	FRIMIA	CA	322	20.93
PRMT1_HUMANA	-----	KDKV	VLDVGS	97	--
EiPRMT1c	-----	KCKI	VMDVGC	60	48.89
EiPRMT1a	-----	KDKV	VLDVGC	55	56.82

**Figura 20. Alineamiento del extremo N-terminal de PRMT1 humana y EiPRMTs.**

Se realizó el alineamiento del extremo N-terminal de la PRMT1 humana, que reconoce el anticuerpo anti-PRMT1, con la región correspondiente de EiPRMT1a, EiPRMT1c y EiPRMT5, mediante el programa Clustal Omega. Los residuos sombreados son aquellos idénticos entre la PRMT1 humana y en al menos una EiPRMT.

Posteriormente, se realizaron los ensayos de western blot con el anticuerpo contra PRMT1 humana, sobre extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. histolytica* (usados como control positivo) y de *E. invadens*. En estos ensayos se observó que el anticuerpo reconoció en el extracto de los trofozoítos de *E. histolytica* una banda de 36 kDa, el cual es el peso aproximado para las tres diferentes EiPRMT1. Mientras que cuando solo se utilizó el anticuerpo secundario, no hubo reconocimiento de ninguna banda (Fig. 22). Sin embargo, tampoco se detectó





**Figura 21. Localización de la secuencia de reconocimiento del anticuerpo anti-PRMT1 en las estructuras 3D de PRMT1, EiPRMT1a y EiPRMT1c.**

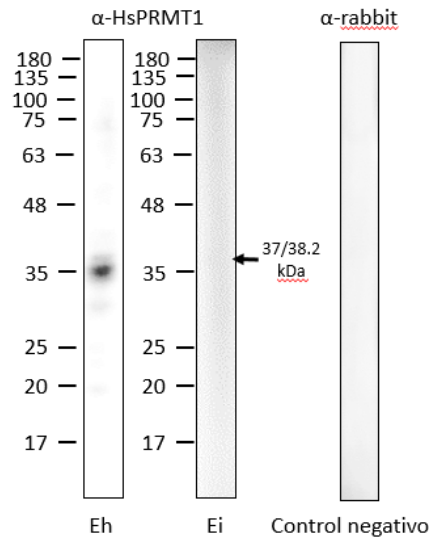
En color rojo se muestra la estructura de EiPRMT1a o EiPRMT1c y en azul la PRMT1 de humano. En colores naranja y azul cian se observa la secuencia de aminoácidos que reconoce el anticuerpo anti-PRMT1.

reconocimiento de alguna banda, en los extractos proteicos de trofozoítos de *E. invadens* (Fig. 22). Por lo cual concluimos que este anticuerpo fue incapaz de detectar las proteínas EiPRMT1a y EiPRMT1c y por el momento detuvimos el estudio de estas enzimas, hasta contar con una herramienta específica que nos permita estudiarlas.

Para el análisis de la expresión de la proteína EiPRMT5 se utilizó el anticuerpo policlonal anti-EhPRMT5 (147), ya que las proteínas PRMT5 de *E. histolytica* y *E. invadens* presentan una gran identidad en secuencia (46.32%), con varios segmentos que poseen residuos iguales (Fig. 23), y en estructura 3D (Fig. 16D).

Así, para el estudio de la expresión de la proteína EiPRMT5 se procedió a realizar ensayos de western blot usando el anticuerpo contra la proteína recombinante EhPRMT5, sobre extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. invadens* y *E. histolytica*. En esos ensayos se observó que en el extracto proteico total de trofozoítos de *E. histolytica*, el anticuerpo anti-EhPRMT5 reconoció una banda

única de 68 kDa (Fig. 24), correspondiente al peso esperado para EhPRMT5. En los extractos de *E. invadens*, el anticuerpo reconoció dos bandas de aproximadamente 40 y 100 kDa, pero no reconoció la banda esperada de 69.8



**Figura 22. Inmunodetección de las PRMT1 en extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. invadens* y *E. histolytica*.**

Los extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. histolytica* (Eh) y de *E. invadens* (Ei) se analizaron por western blot usando el anticuerpo contra la PRMT1 humana (α-HsPRMT1). Como control negativo los extractos de *E. histolytica* se incubaron solo con el anticuerpo secundario (α-rabbit). Los números a la izquierda indican los estándares de peso molecular en kDa. La flecha indica el peso esperado para las EiPRMTs.

kDa (Fig. 24), Estos datos sugieren, que las bandas detectadas pueden deberse a reconocimiento cruzado y que, por lo tanto, el anticuerpo contra EhPRMT5 no reconoce a la proteína ortóloga de *E. invadens*. Alternativamente, pudiera ser que EiPRMT5 no se expresa en los trofozoítos, o bien que la banda de 40 kDa puede corresponder a un polipéptido generado por el procesamiento proteolítico de EiPRMT5, mientras que la banda de 100 kDa pudiera deberse a un complejo de EiPRMT5 con alguna otra proteína.

Por otra parte, la localización subcelular de EiPRMT5 en los trofozoítos de *E. invadens* se determinó por ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. En estos ensayos, también se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* como control positivo. En ambas células, la enzima PRMT5 se localizó en el citoplasma con un patrón punteado, aunque también se detectó en menor medida en el núcleo (Fig. 25). De manera interesante, los trofozoítos de *E. histolytica* presentaron una mayor marca que los de *E. invadens* (Fig. 25), sugiriendo que EhPRMT5 se expresa en mayor cantidad en el parásito de humanos o que existe un menor reconocimiento del anticuerpo por la proteína heteróloga de *E. invadens*.

Finalmente, para analizar la expresión de la proteína EiPRMTA se utilizó el anticuerpo contra la proteína recombinante EhPRMTA (147), ya que ambas proteínas tienen una alta identidad en secuencia (58.17%) con varios segmentos conteniendo muchos aminoácidos iguales (Fig. 26) y demás, presentan una identidad del 55.9% en estructura 3D (Fig. 16C).

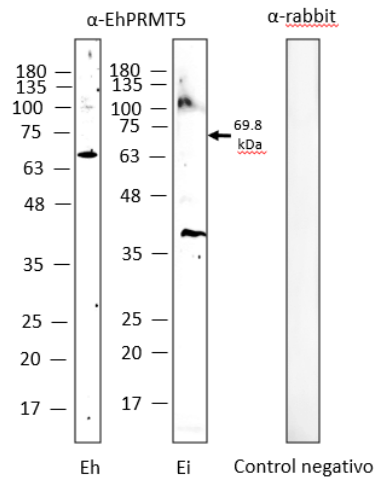
Al igual que en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Medina-Gómez, comunicación personal), en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica*, el anticuerpo anti-EhPRMTA reconoció una banda única de aproximadamente 80 kDa (Fig. 27). El peso molecular estimado para EhPRMTA es de aproximadamente 42 kDa, pero este peso solo se ha encontrado en geles de poliacrilamida con urea 8 M, (Medina-Gómez, comunicación personal), por lo que se sugiere que la banda de 80 kDa es un homodímero de EhPRMTA. En los extractos de trofozoítos de *E. invadens*, el anticuerpo reconoció fuertemente una

banda de aproximadamente 94 kDa (Fig. 27). El peso molecular esperado de EiPRMTA se desconoce, ya que, como se mencionó anteriormente, la secuencia del gen (y por lo tanto de la proteína) no está completa en la base de datos, aunque consideramos que tiene un peso molecular similar a EhPRMTA. Por esa razón, sugerimos que la banda de 94 kDa también pudiera ser un multímero de EiPRMTA. Por otra parte, el anticuerpo también reconoció bandas de aproximadamente 34 y 64 kDa (Fig.27), las cuales pudieran corresponder al

EiPRMT5	MAQALQNQVPIYDLSNEDIYDRVSDILRSLQTVTPYYCVPLNRPPDTLNEGLRFQPS	60
EhPRMT5	---MTERNKLSIGVDLSSQDFDLVDVSKKSDKILQSFISVPLSYEFDVNDQEEQFQPT	57
	:. :. : * . . : * . . : . : . * . . * . : . : * . . :	
EiPRMT5	FSDTDFNTSIVSTCIFGKTTTFERVKSIQDCIAEVRWANHIGVFGLVVPPLSNINIDYYR	120
EhPRMT5	FSDSYLDSSVSTRWFGKLSLFDCSRSLYLEELQVWNHIRLPCIIPEDESYSIEYIK	117
	* . . : . : * . . * . . : . : : . : . * . . : . : : * . . . : . * . :	
EiPRMT5	YVSTICNLSRCPVWITVPLAADGWQMNTIRKVIQYNTNIRPLLSLQENLTVEFDLLQVW	180
EhPRMT5	CINTICISITQSIVWISLLLDENTWKRWNTRKTLGYNLNIRPLLIQ-NKEIEYNLLSIW	176
	: . * . . : . : . : . * . . : * . : * . : * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . :	
EiPRMT5	RAENVAGVIFAKQIVQDNGKLTRENDIFLHNLLDFDISIFISNFPESTELVKNTIEYIEW	240
EhPRMT5	RAENVSGVVINKSLINEYGKIPRSLIEIFIQSLMDFDIAIILKGYCCHVKEMQRDVKYFEW	236
	* . . . . : . : . : . * . . : * . : * . . : . : * . . : . : . . : . : * . . :	
EiPRMT5	LKTSRTEPSQYEKGIVEFRDTIEKPIQPLAHDLDSDVYETIEKEPFKYQKYMFAFILALH	300
EhPRMT5	LKESRMKISRVEETTIPYRDQIEIPIQPLSENLESIVYESFEKEPFKYKYREAI IMAIQ	296
	* * * . : * . * . : . : * * * * . . : . : * . * . . : * . . : * . . : * . . :	
EiPRMT5	DKAGVIQQFSPLNPFIRIMIAGAGRPLVQMVIDVLNVNRFANHCVVYAVEKNQNAVATLS	360
EhPRMT5	DKSDVFSKSTPLNPFKIVIAGAGRPLIAITLEICKNFRIEHKTI IYAIEKNPNAIATLK	356
	* . . : . : . : * . . . . : * . . : . : . : . : * . : * . : . : * . * . * . * . * . * . :	
EiPRMT5	YRKRTQHDWKNVEVIGCDMRKMMPNKVDIVISELLGSFGDDELCPCELDALLPLVLKSD	420
EhPRMT5	FRKN-KEYWNNVKIIFDDMRNVHMEKQIDIVISELLGSFGDNELEPECLDCLLPQVLKDD	415
	: * . . : . : * . . : * . . : . : * . . : . : * . . : . : * . . : . : * . . : * . . * . * . * . * . :	
EiPRMT5	GVTIPRTYSNYIQPISNSVYTSFLENQYSFEQPVICNQFNAAFSPPQKCFTFVHPSVD	480
EhPRMT5	GISIPYRYTNYIQPISSALLFTKMIVEQHSFELPCVNHVHYQPLSSPQQCFRFEHPTSQ	475
	* . : * . * . : * . : * . . : . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . :	
EiPRMT5	-DHQRFVDFKFKVSKMDGALHGFSGTFNVELYKNVKLSTVPGEHPTDMFSWFPPFFPIQPP	539
EhPRMT5	INHRYITLSFPMNYDAVIHGFSGTFNVLDYKTVKLSIVPNEHSPEMYSWFPLFFPLISP	535
	: * . . : . : * . : * . . : * . . : * . . : * . . : * . . : * . . : * . . : * . . : * . . :	
EiPRMT5	IDLKRGDVVEFLLWRNVTHGRVWYEWVVTPLITKIFNSSGKHAMSLFAVKTVSLLRFRL	599
EhPRMT5	LEVKRGDILELKLWRCETKFSVWYEWLVTSVPLSRLHNAGGKYSMSLQRSH-----	586
	* . : * . . : . : * . * . : * . . : . : * . . : . : * . . : . : * . . : . : * . . : . : * . . :	
EiPRMT5	ELISSLEVE	608
EhPRMT5	-----	586

**Figura 23. Alineamiento de EiPRMT5 y EhPRMT5.**  
 Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las enzimas PRMT5 de *E. invadens* y *E. histolytica*, mediante el programa Clustal Omega. Los números a la derecha indican la posición de los residuos de aminoácidos. (\*) aminoácidos idénticos. (:) (.) cambios con aminoácidos similares.

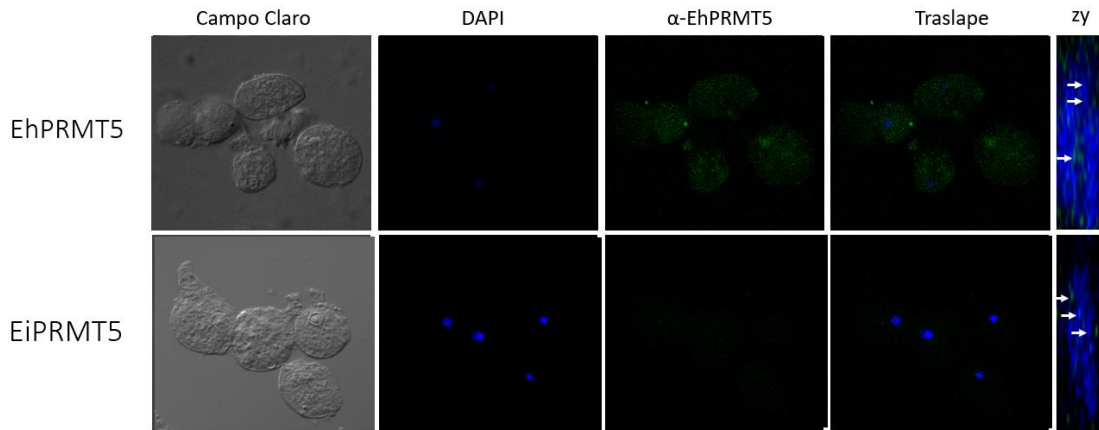
monómero y dímero de EiPRMTA, ser productos de procesamiento o reconocimiento cruzado con proteínas antigénicamente relacionadas. Cuando se usó solamente el anticuerpo secundario no hubo reconocimiento de ninguna banda en *E. invadens* (Fig. 27).



**Figura 24. Inmunodetección de PRMT5 en extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. invadens* y *E. histolytica*.**

Los extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. histolytica* (Eh) y *E. invadens* (Ei) se analizaron por western blot, usando el anticuerpo contra EhPRMT5 (α-EhPRMT5). Como control negativo los extractos de *E. invadens* se incubaron solo con el anticuerpo secundario (α-rabbit). Los números de la izquierda corresponden a los estándares de peso molecular en kDa. La flecha indica el peso esperado para EiPRMT5.

En la inmunolocalización de PRMTA se observó un abundante marcaje de la proteína, tanto en el núcleo como en el citoplasma de trofozoítos de ambas especies (Fig. 28). Nuevamente, el reconocimiento fue mayor en *E. histolytica* que en *E. invadens* (Fig. 28), lo cual puede deberse, como se mencionó para PRMT5, a una menor expresión en el parásito de reptiles o un menor reconocimiento del anticuerpo por la proteína heteróloga.

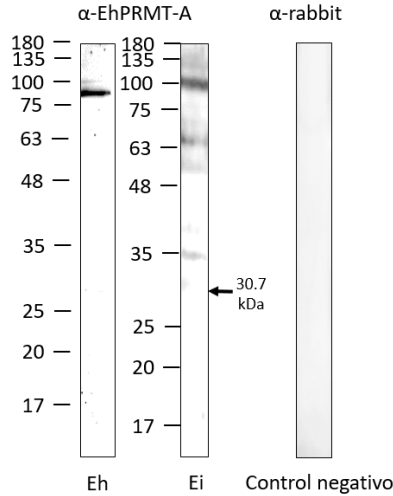


**Figura 25. Inmunolocalización de PRMT5 en los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens*.** Los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens* se permeabilizaron, se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y subsecuentemente con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran los planos xy y a la derecha planos zy para mostrar la localización nuclear de las PRMT5 (flechas).

EiPRMT-A	-----	0
EhPRMT-A	MKEMKRSLESSDNEVIQSPICIGLDDMSEELLEQFVPPRQTIIIPNKPLFLQELPIIHIN	60
EiPRMT-A	-----RVLVVQCGFGKLALLAKKYK	20
EhPRMT-A	EGMEPPWKSHEEYESLLLYSSQPYISHYKRLFKTGYVKNKTVLVIRCGFGKVALLAQKYG ***:*****:****:**	120
EiPRMT-A	ARYVKAIDTRTIAQFRHVDELKVD-IVVEQTSISEVKEKYDIIICDWMGINLYYDSLL	79
EhPRMT-A	AKKVVAIIDDRPVWKFVKVVEKMEVTGIIIVENKTAGEVRERFDIIICDWMGINLYYDSLL *: * *** * : **: **: *: * *: **: . **: *: *****	180
EiPRMT-A	SEMLIAKTKLKKCGEILPSGGKCYICGVTEINYVDEQYEFWKDVYGFDMSIMLKGVVCTA	139
EhPRMT-A	NEVIKCKRLLRNDGEIIPNIGRCYICGIGGLEYYDEKYDFWKNVYGYDMSILVKNVCTA . **: . * *: : ***: * *: *****: : *****: * *: *****: * *: *****	240
EiPRMT-A	YIDNIDESKVITSKHLLYGVDLNDFEEENLTPRTVKFSITLKRQMPLVGFCTYFDCDVKN	199
EhPRMT-A	YIDYIDESKVITNHCLLYSVNSM-TIQEIVKKTVTFKLSLKRPIPLVGFCTYFEADISN *** *****: * *: * *: : : : . **: * *: *****: * *: *	298
EiPRMT-A	KKISSAPGKKTWQCCYLCPSPMNG-KIDDVITGRFKMLRK-KGRWMVQIQYECKKRQ	256
EhPRMT-A	HRISTAPGTQTVWRQCCYLCPSPLNKCKIDDVIEGKFKMFQRETNRWVILQYNCEKRG : **: * *: * *: *****: * ***** * *: *****: : * *: * *: *****	358
EiPRMT-A	FEGTFPYVF	265
EhPRMT-A	YSGKYQYEF	367
	:. **: * *	

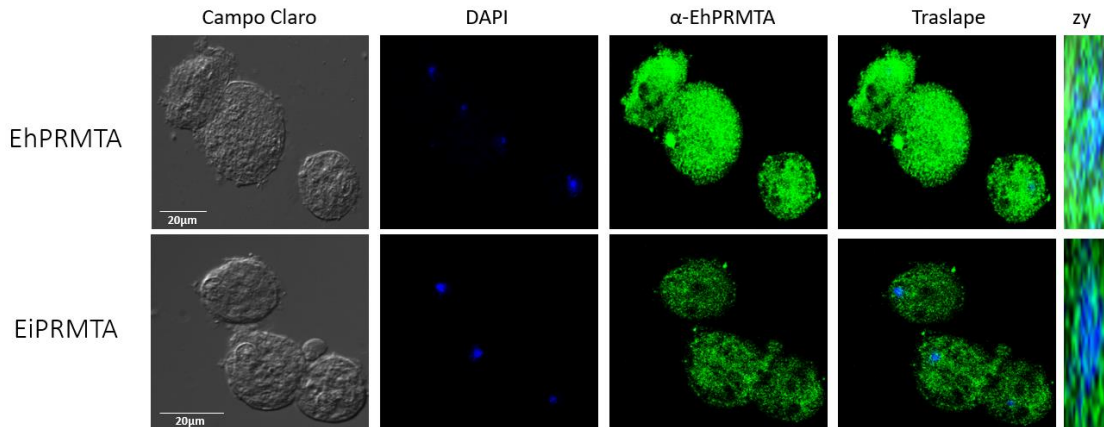
**Figura 26. Alineamiento de EiPRMTA y EhPRMTA.**

Se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de EiPRMTA y EhPRMTA, mediante el programa Clustal Omega. Los números a la derecha indican la posición de los residuos de aminoácidos. (\*) aminoácidos idénticos. (.) (.) cambios con aminoácidos similares.



**Figura 27. Inmunodetección de PRMTA en extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens*.**

Los extractos proteicos totales de trofozoítos de *E. histolytica* (Eh) y *E. invadens* (Ei) se analizaron por western blot, usando el anticuerpo contra EhPRMTA (□□EhPRMTA). Como control negativo los extractos de *E. invadens* se incubaron solo con el anticuerpo secundario (□-rabbit). Los números a la izquierda indican los estándares de peso molecular en kDa. La flecha indica el peso esperado para la secuencia incompleta de EiPRMTA.

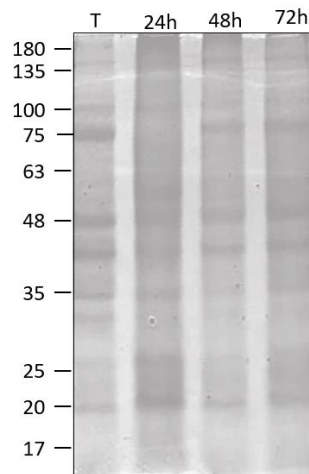


**Figura 28. Inmunolocalización de PRMTA en los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens*.**

Los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens* se permeabilizaron, se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMTA y subsecuentemente con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran los planos xy y a la derecha los planos zy, para mostrar la localización nuclear de las PRMTA.

## Obtención de extractos totales durante el proceso de enquistamiento

Para analizar la expresión de las EiPRMTs durante el proceso de enquistamiento, se obtuvieron extractos totales de trofozoítos de *E. invadens* (tiempo 0 h) y de parásitos, a diferentes tiempos de enquistamiento (24, 46 y 72 h). La integridad de las proteínas aisladas se analizó en geles de SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie. En la figura 29 se observa que en todos los tiempos se obtuvieron patrones con cantidades similares de proteínas y conteniendo bandas desde 14 kDa hasta mayores de 200 kDa, sin degradación aparente (Fig. 29).



**Figura 29. SDS-PAGE de los extractos proteicos totales de *E. invadens* obtenidos a diferentes tiempos de enquistamiento.**

Las proteínas totales de *E. invadens* obtenidas de trofozoítos (T) y de células con diferentes tiempos de enquistamiento (24, 48 y 72 h) se analizaron por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Los números a la izquierda indican los estándares de peso molecular en kDa.

### **Análisis de la expresión de EiPRMT5 durante el proceso de enquistamiento**

Para el estudio de la expresión de la proteína EiPRMT5 en el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, se realizaron ensayos de western blot utilizando el anticuerpo contra la proteína recombinante de EhPRMT5. Los resultados mostraron que, en los extractos de trofozoítos el anticuerpo reconoció claramente las bandas



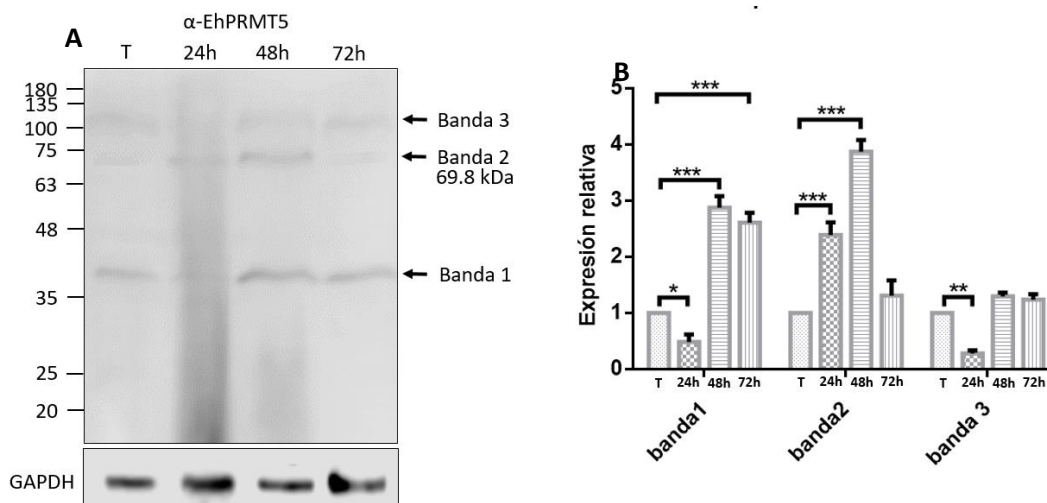
de 40 y 100 kDa, previamente detectadas (Fig. 30A). En los extractos de 24 h de enquistamiento, la detección de esas bandas fue menor; pero a tiempos posteriores, la detección de la banda de 100 kDa se incrementó incluso a niveles mayores que en los trofozoítos; mientras que, a 48 y 72 h, el reconocimiento de la banda de 40 kDa fue similar a la de los trofozoítos (Fig. 30A). De manera interesante, a las 24 h de enquistamiento se detectó débilmente una banda de 70 kDa, peso similar al esperado para EiPRMT5, la cual aumentó su reconocimiento a las 48 h y disminuyó a las 72 h (Fig. 30A). Para descartar que existiera una desigualdad en la cantidad de los extractos analizados, que pudiera explicar la diferencia en el reconocimiento de las bandas, las mismas membranas se incubaron con el anticuerpo contra la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Este anticuerpo reconoció a la banda con el peso molecular esperado con intensidad similar en todos los tiempos de enquistamiento (Fig. 30A). Con el propósito de realizar un análisis semi-cuantitativo, las bandas reconocidas por los anticuerpos se analizaron por densitometría y los datos de las bandas reconocidas por anti-EhPRMT5 se normalizaron con respecto al reconocimiento de GAPDH. La expresión relativa de cada banda en los trofozoítos se tomó arbitrariamente como 1. Así, encontramos que la banda de 40 kDa (banda 1) disminuyó 0.5 veces a las 24 h de enquistamiento, mientras que a las 48 y 72 h la expresión relativa aumentó a 2.9 y 2.6, respectivamente (Fig. 30B). El análisis densitométrico de la banda del peso esperado (banda 2) mostró una expresión muy débil en los trofozoítos, pero aumentó 2.4 veces a las 24 h y 3.9 veces a las 48 h; mientras que, a las 72 h disminuyó su expresión con respecto a las 24 y 48 h, pero con niveles mayores a la presente en los trofozoítos (1.3) (Fig. 30B). La banda de 100 kDa (banda 3), a las

24 h presentó una severa disminución (expresión relativa de 0.3), mientras que a las 48 y 72 h la expresión fue muy similar a la de los trofozoítos (1.3 y 1.2, respectivamente) (Fig. 30B). Debido a la variación en la expresión de las tres bandas reconocidas por el anticuerpo durante el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, sugerimos que EiPRMT5 podría participar en este proceso, aunque todavía desconocemos de qué manera.

En los ensayos de la inmunolocalización subcelular de la proteína EiPRMT5 durante los diversos tiempos del proceso de enquistamiento se observó poca tinción en los trofozoítos (T, tiempo 0) (Fig. 31). A las 24 h en células con forma ameboide, se detectó una intensidad de marca semejante al tiempo 0, pero en células redondeadas se observó un aumento de la intensidad de la marca y parte de ella se detectó en la periferia celular y un ligero incremento en el núcleo (Fig. 31). A las 48 h, donde la gran mayoría de las células presentaban una forma redondeada, se incrementó la intensidad de la marca, con un patrón punteado, principalmente en todo el citoplasma y en la periferia de las células, donde se apreciaron algunos cúmulos (Fig. 31). A este tiempo también se observó un aumento de la marca en el núcleo, con respecto a los tiempos de 0 y 24 h (Fig. 31). Finalmente, a las 72 h la tinción disminuyó notablemente en el citoplasma y periferia celular, pero sin llegar al nivel mostrado en el tiempo cero (T) (Fig. 31). De manera interesante, la marca aumentó de manera considerable en el núcleo (Fig. 31).

Debido a que, durante los diferentes tiempos de enquistamiento analizados, el nivel de fluorescencia es similar a la expresión relativa de la banda del peso

molecular esperado (banda 2) en los ensayos de western blot, sugerimos que este tamaño es el que corresponde a EiPRMT5. Además, debido a la diferente intensidad, así como a las diferentes localizaciones subcelulares de la proteína durante este proceso de diferenciación, sugerimos que EiPRMT5 podría tener un papel importante en el enquistamiento de *E. invadens*.



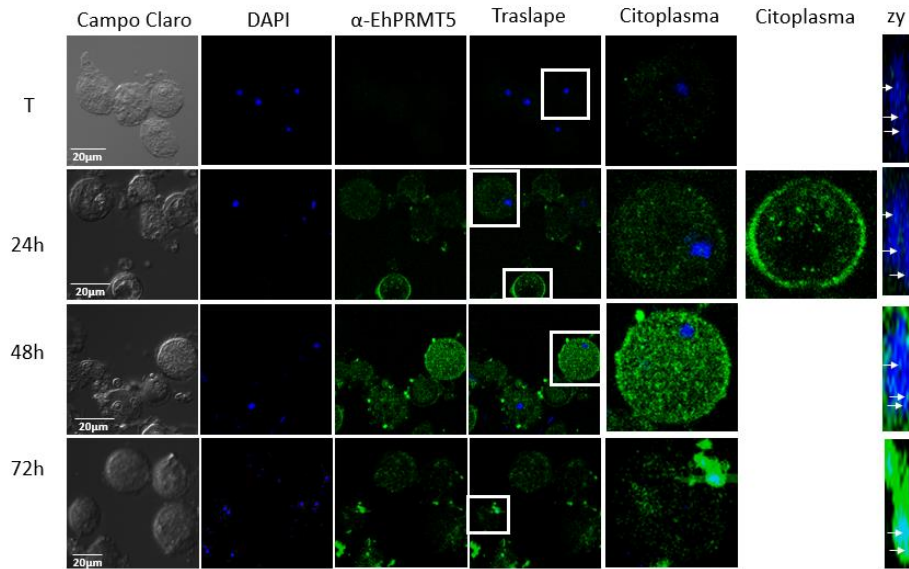
**Figura 30. Expresión de EiPRMT5 durante el enquistamiento.**

(A) Los extractos proteicos totales de trofozoítos (T) y de células a diferentes tiempos de enquistamiento (24, 48 y 72 h) se sometieron a ensayos de western blot utilizando el anticuerpo contra EhPRMT5. En la parte inferior se muestra el reconocimiento por el anticuerpo contra GAPDH de la misma membrana. Los números a la izquierda indican los estándares de peso molecular en kDa. (B) A las bandas reconocidas por los anticuerpos se les realizó un análisis densitométrico, y los datos se normalizaron con base a la banda de GAPDH. La expresión relativa en los trofozoítos se tomó arbitrariamente como 1. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### Análisis de la expresión de EiPRMTA durante el proceso de enquistamiento

A continuación, para el estudio de la expresión de la proteína EiPRMTA en el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, se realizaron ensayos de western blot

sobre extractos totales de trofozoítos (T) y durante el enquistamiento (24, 48 y 72 h), usando el anticuerpo contra EhPRMTA. En estos ensayos el anticuerpo nuevamente reconoció las tres bandas de 34, 64 y 94 kDa en los extractos de trofozoítos (Fig. 32A). En los extractos de las células

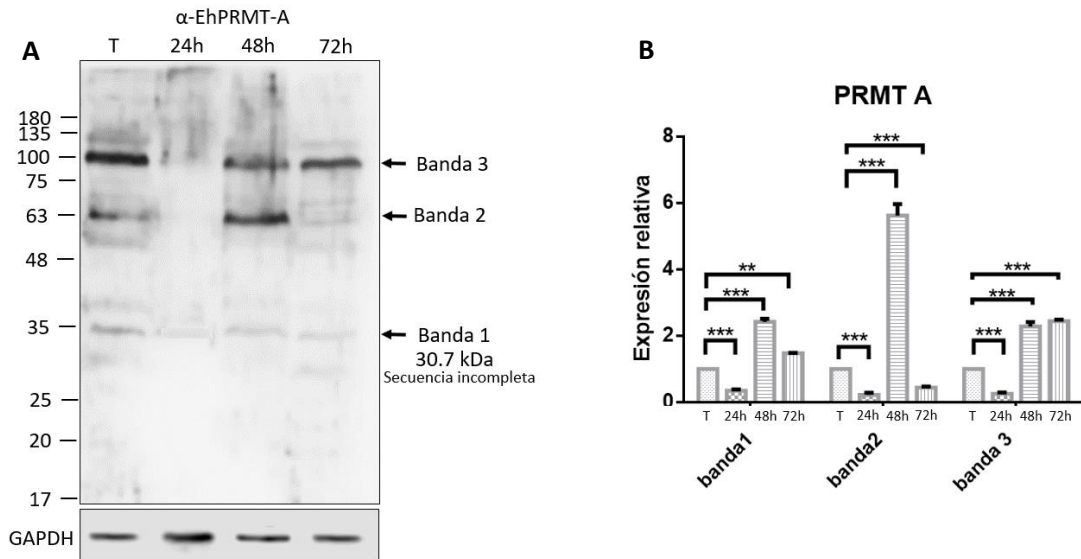


**Figura 31. Inmunolocalización de EiPRMT5 durante la cinética de enquistamiento.** Los trofozoítos de *E. invadens* fueron inducidos a enquistamiento por incubación en medio sin glucosa y a diferentes tiempos (trofozoítos, 24, 48 y 72 h). Las células se permeabilizaron con metanol, se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMT5 y subsecuentemente con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran los planos xy y a la derecha los planos zy para mostrar la localización nuclear de PRMT5 (flechas). Los recuadros en blanco muestran las células que se les realizó ampliación y se mostraron en los apartados de citoplasma.

obtenidas a las 24 h de enquistamiento, se observó una gran disminución de las tres bandas (Fig. 32A), mientras que aumentaron nuevamente a las 48 h, y las bandas 1 y 2 disminuyeron de nuevo a las 72 h de enquistamiento (Fig. 32A). Por otra parte, el reconocimiento de GAPDH fue similar en todas las muestras (Fig. 32A), indicando que la cantidad de proteínas cargadas en cada carril fue similar. En el análisis densitométrico, tomando nuevamente la expresión relativa de las

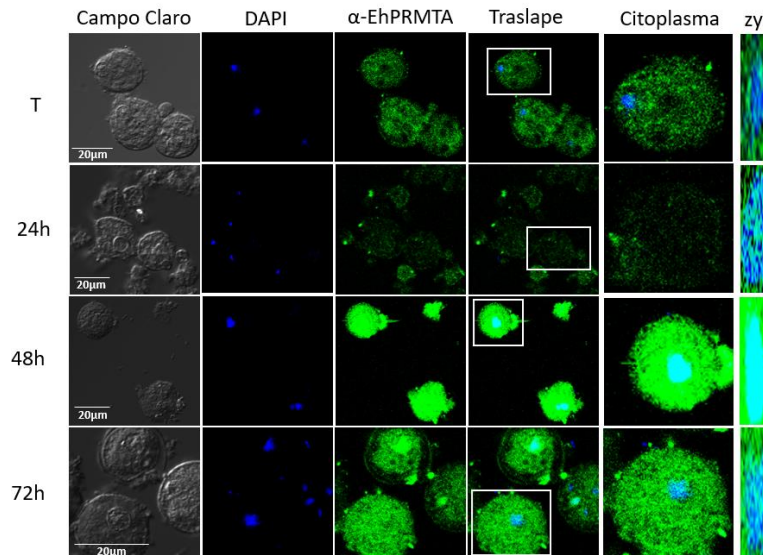
bandas de los trofozoítos como la unidad, observamos que en la banda de 35 kDa (banda 1), a las 24 h presentó una expresión relativa de 0.4, a las 48 h se detectó un aumento de 2.4 veces y a las 72 h la expresión fue de 1.5 veces, en comparación con el tiempo 0 (trofozoítos) (Fig. 32B). La banda de 65 kDa (banda 2), presentó una expresión de 0.2 veces a las 24 h, a las 48 h presentó un aumento de 5.6 veces y a las 72 h disminuyó 0.4 veces, en comparación al tiempo cero (Fig. 32B). Finalmente, la banda de 100 kDa (banda 3), a las 24 h mostró una expresión de 0.3 veces, a las 48 h aumentó 2.3 veces y a las 72 h se expresó 2.4 veces, en comparación al tiempo 0 (Figura 32B). Hasta el momento, no sabemos la relación que existe entre las tres bandas, pero debido a sus pesos moleculares, pensamos que se trata del monómero, dímero y trímero de EhPRMTA. Además, nuestro resultado indica que esta enzima presenta diferentes niveles de expresión y de organización durante el enquistamiento, por lo que sugerimos que probablemente tenga un papel regulatorio en este proceso.

En los ensayos de inmunolocalización encontramos que EiPRMTA se localizó en el núcleo y citoplasma de los trofozoítos (Fig. 33). A las 24 h, se detectó una disminución de la intensidad de la marca, con respecto al tiempo 0 (trofozoítos); aunque ésta se concentró en algunos puntos de la periferia celular y en el núcleo (Fig. 33). A las 48 h, se presentó la mayor intensidad de fluorescencia, localizándose en el citoplasma y núcleo (Fig. 33); mientras que a las 72 h la fluorescencia disminuyó con respecto a las 48 h, pero con localización similar (citoplasma y núcleo) (Fig. 33). Así, EiPRMTA presentó diversas intensidades y localizaciones durante el enquistamiento, sugiriendo que también esta PRMT pudiera ser importante en este proceso.



**Figura 32. Expresión de EiPRMTA durante el enquistamiento.**

(A) Los extractos proteicos totales de trofozoítos (T) y células a diferentes tiempos de enquistamiento (24, 48 y 72 h) se sometieron a ensayos de western blot, utilizando el anticuerpo contra EhPRMTA. En la parte inferior se muestra el reconocimiento por el anticuerpo contra GAPDH en las mismas muestras. Los números a la izquierda señalan los estándares de peso molecular en kDa. (B) A las bandas reconocidas por los anticuerpos, se les realizó un análisis densitométrico, donde los datos se normalizaron con el reconocimiento de la proteína GAPDH. La expresión relativa en los trofozoítos se tomó arbitrariamente como 1. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 33. Inmunolocalización de la EiPRMTA en la cinética de enquistamiento.**

Los trofozoítos de *E. invadens* fueron inducidos a enquistamiento por incubación en medio sin glucosa y a diferentes tiempos (trofozoítos, 24, 48 y 72 h), las células se permeabilizaron con metanol, se incubaron con el anticuerpo anti-EhPRMTA y subsecuentemente con un anticuerpo

secundario acoplado a FITC (verde). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran los planos xy y a la derecha, los planos zy indican la localización nuclear de PRMTA. Los recuadros en blanco muestran las células que se les realizó amplificación y se mostraron en los apartados de citoplasma.

## DISCUSIÓN

La metilación de arginina en histonas y en proteínas no histonas regula importantes procesos celulares que afectan el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y el desarrollo (50). Por lo tanto, las enzimas que realizan esta modificación postraduccional conocidas como PRMTs, están implicadas en el control de esos procesos. Estas enzimas están presentes en prácticamente todos los eucariotas, desde las levaduras hasta los organismos superiores, y son codificadas por diversos genes (23). El ser humano presenta 9 PRMTs, mientras que en protozoarios parásitos, tales como *T. gondii*, *T. vaginalis*, *Plasmodium sp.*, *Trypanosoma sp.* y *E. histolytica*, existe la presencia de diferente número de genes que codifican para este tipo de enzimas (37).

El ciclo de vida de *E. histolytica* implica la expresión diferencial de genes para poder realizar una conversión de las formas infecciosas (quistes) a las células invasivas (trofozoítos) y viceversa. Sin embargo, los mecanismos moleculares que están involucrados en la regulación de la diferenciación en este microorganismo están poco comprendidos. *E. histolytica* contiene cinco genes que codifican para diferentes PRMTs (147), pero su papel en diferentes eventos moleculares, incluido el enquistamiento, es desconocido. En el presente estudio, para investigar el posible papel regulador de las PRMTs en el enquistamiento, utilizamos como modelo al parásito de reptiles *E. invadens*, quien puede ser enquistado por métodos

*in vitro* a diferencia de *E. histolytica*, que hasta el momento no se ha podido inducir su enquistamiento en condiciones de laboratorio.

Mediante un análisis *in silico*, encontramos la presencia de cuatro genes que codifican PRMTs putativas en *E. invadens* (EiPRMTs). Debido a la identidad con las PRMTs de *E. histolytica*, las nombramos EiPRMT1a, EiPRMT1c, EiPRMTA y EiPRMT5. De acuerdo con un análisis filogenético, las tres primeras son enzimas de tipo I y, excepto EiPRMTA, pertenecen a la familia de PRMT1. Por otra parte, EiPRMT5 pertenece a las enzimas de tipo II y está relacionada con la familia de PRMT5. Este resultado confirma la generalización de que todos los organismos eucariontes, a excepción de *G. intestinalis*, tienen al menos una enzima de tipo I con homología a PRMT1 y una de tipo II con homología a PRMT5 (37). De manera interesante, al analizar la presencia de PRMTs en las especies de *Entamoeba* que cuentan con bases de datos de su genoma, encontramos que todas ellas presentan varias PRMTs relacionadas a PRMT1 y una correspondiente a PRMT5. Solo las especies invasivas (*E. histolytica* y *E. invadens*) contienen una PRMT atípica, lo que podría sugerir que esta enzima es importante en la regulación de algunos eventos de patogenicidad, aunque esto tendría que probarse experimentalmente.

Las PRMTs varían en su tamaño, pero presentan características importantes dentro de su grupo, manteniendo dominios específicos altamente conservados: el dominio de metiltransferasa dependiente de SAM o AdoMet, los dominios I, II y III (2,37), las asas denominadas THW y doble E, las cuales facilitan la unión a SAM, y entre estas dos asas se encuentra el sitio catalíticamente activo (23). En el análisis *in silico* de las EiPRMTs se encontró que las cuatro enzimas presentan todos esos dominios y una estructura 3D similar a PRMTs de otros organismos,



soportando la idea que las proteínas identificadas en este trabajo son PRMTs *bona fide*. Sin embargo, las secuencias de los dominios conservados presentan ligeras diferencias en algunos aminoácidos, lo que podría alterar su especificidad hacia sus proteínas blanco. De manera interesante, en EiPRMTA (al igual que en EhPRMTA) los dos glutamatos (E) que flanquean al asa doble E, son reemplazados por residuos de aspartato (D). Al respecto se ha demostrado que en la PRMT7 de *T. brucei*, el cambio de los dos residuos de E por D, inactivan a la enzima (153). Hasta el momento desconocemos si EiPRMTA tiene la capacidad de transferir grupos metilo a proteínas blanco. Aunque ensayos con la proteína recombinante EhPRMTA, han mostrado su actividad catalítica sobre histonas comerciales (147), sugiriendo que EiPRMTA podría también ser catalíticamente activa, pero esto debe ser demostrado experimentalmente. Por otra parte, la secuencia THWxQ, en el asa THW, está estrictamente conservada en las enzimas de tipo I (154). Como era de esperarse, esta secuencia se conserva en los ortólogos de PRMT1 (EiPRMT1a y EiPRMT1c), pero no en el ortólogo de PRMT5 (enzima tipo II) de *E. invadens*. Sin embargo, la histidina de esta asa tampoco se conserva en EiPRMTA (ni en EhPRMTA), lo que apoya la idea que esta enzima, aunque filogenéticamente relacionada con enzimas de tipo I, es una proteína atípica.

Durante el enquistamiento, un proceso esencial para la supervivencia del género *Entamoeba*, muchos genes son inducidos o inhibidos; además, diversas vías de señalización involucrados en el proceso deben ser activadas. La metilación de residuos de arginina es una modificación postraduccional que se

produce en proteínas citoplasmáticas y nucleares. Además, en otros organismos modula la estructura de la cromatina, la transcripción, el procesamiento del RNA, la replicación, la reparación del DNA, la biogénesis de los organelos y diversas vías de señalización (155). Por lo tanto, pensamos que las EiPRMTs podrían jugar un papel importante en el enquistamiento de *E. invadens*. Para probar esta hipótesis, inicialmente en este trabajo analizamos los niveles de expresión de las EiPRMTs, a nivel de mRNA y proteína, así como su localización subcelular durante el proceso de enquistamiento.

Los ensayos de RT-PCR mostraron que todos los genes de las EiPRMTs se expresan en los trofozoítos. Sin embargo, los niveles de los transcritos variaron en los diferentes tiempos de enquistamiento. Los transcritos de EiPRMT1a y EiPRMT1c incrementaron a las 24 h de enquistamiento, disminuyeron a las 48 h y volvieron a aumentar nuevamente a las 72 h. Dado que las dos proteínas codificadas por estos genes pertenecen a la familia PRMT1 y que su comportamiento durante el enquistamiento a nivel de transcrito fue similar, podría sugerirse que estas enzimas probablemente llevan a cabo una función redundante. Desafortunadamente, el anticuerpo contra la PRMT1 de humano no reconoció a las proteínas heterólogas de *E. invadens*, por lo que no se pudieron analizar los niveles de proteína, ni su localización subcelular en los trofozoítos o durante la cinética de enquistamiento.

A nivel de mRNA, la expresión de EiPRMT5 mostró un incremento dependiente del tiempo de enquistamiento. En cambio, a nivel de proteína EiPRMT5 incrementó gradualmente a las 24 y 48 h, pero a las 72 disminuyó, aunque no

alcanzó los valores de los trofozoítos. Estos hallazgos sugieren que la expresión de EiPRMT5 se regula tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. De manera interesante, la localización subcelular de la proteína en los trofozoítos fue diferente a la mostrada durante el enquistamiento, sufriendo una translocación desde pequeños puntos en el citoplasma de los trofozoítos hacia la periferia celular y al núcleo en las células en proceso de enquistamiento. Este resultado sugiere que EiPRMT5 probablemente participe en la regulación de la formación de la pared del quiste y en la regulación génica mediante mecanismos epigenéticos.

Con respecto a EiPRMTA, tanto a nivel de mRNA como de proteína, su expresión disminuyó drásticamente a las 24 h de enquistamiento, pero aumentó a tiempos posteriores, aunque a las 72 h fue menor que a las 48 h. Además, la proteína se acumuló de manera importante en los núcleos de las células en proceso de enquistamiento, principalmente a las 48 h. Sugiriendo que esta enzima también puede tener un papel importante en la regulación de la expresión génica, durante el enquistamiento.

Los resultados anteriores sugieren que las cuatro EiPRMTs podrían participar activamente en el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, coincidiendo con lo reportado para *A. castellanii*. En esta amiba de vida libre, los niveles de expresión de PRMT1 y PRMT5 aumentaron después de la inducción del enquistamiento (149), planteando la hipótesis de que AcPRMT1 y AcPRMT5 regulan los niveles transcripcionales de genes asociados al enquistamiento. Esto podría llevarse a cabo mediante la modificación de histonas, ya que AcPRMT1 se ha relacionado con la activación de la expresión génica; mientras que AcPRMT5

tiene un papel en la represión génica (149). Esas actividades podrían ser equivalentes a las de EiPRMT1 y EiPRMT5, aunque se requieren más evidencias experimentales para sustentar esta hipótesis.

A este respecto, estudios en otros organismos han documentado que PRMT1 cataliza la mono- y di-metilación asimétrica de H4R3. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó la PRMT1a de *E. histolytica* di-metila asimétricamente la H4R3 comercial y anticuerpos contra esta modificación inmunomarcaron proteínas nucleares. Estos hallazgos indicaron, que las histonas de este parásito sufren una modificación equivalente (H4R8), podría participar en la regulación epigenética (146). DE manera similar, EiPRMT1a (y tal vez EiPRMT1c) podría catalizar la modificación equivalente, regulando la expresión génica durante el enquistamiento de *E. invadens*.

Por otra parte, PRMT5 en otros organismos cataliza la formación de mono-metilarginina y di-metilarginina simétrica. PRMT5 de *T. gondii* puede di-metilar simétricamente a H4R3, un marcador de represión transcripcional (156). En células de hígado de rata, PRMT5 afecta negativamente la actividad del promotor de ciclina E1 y la proliferación celular, sugiriendo que la ciclina E1 es un mediador clave de la detención del ciclo celular dependiente de PRMT5 (157). De manera similar, EiPRMT5 podría participar en el enquistamiento de *E. invadens*, mediante de la represión de genes implicados en la proliferación celular.

Con respecto a EiPRMTA, como es una enzima sin relación filogenética significativa con cualquier familia de las PRMTs, por el momento no conocemos su

posible papel en la regulación epigenética. Sin embargo, debido a su gran concentración en el núcleo a las 48 h de enquistamiento, sugerimos que esta enzima también podría participar en el control epigenético durante este proceso de diferenciación. Una posibilidad podría ser que EhPRMTA funcione como una PRMT de tipo III, cuyos productos metilados pudieran servir como sustrato para que las otras metiltransferasas agreguen el segundo grupo metilo de manera asimétrica o simétrica, como ocurre en *T. brucei*, donde se sugiere que TbPRMT7 produce mono-metilargininas y actúa de manera sinérgica con las enzimas de tipo I y II (37).

Por otra parte, la localización de las EiPRMTs en el citoplasma y cerca de la periferia celular durante el enquistamiento, soportan la hipótesis de que estas enzimas también podrían metilar proteínas no histonas. En células de mamífero, PRMT5 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde participa en la metilación de múltiples proteínas histonas y no histonas (23). También en otros parásitos, como *P. falciparum*, PRMT1 y PRMT5 se han localizado tanto en el citoplasma como en el núcleo (34). En *T. gondii* PRMT5 se localizó en el citoplasma de taquizoítos, pero en la etapa de bradizoíto se localizó principalmente en el núcleo (158), sugiriendo que esta enzima puede desempeñar un papel en la conversión de taquizoíto-bradizoíto en *T. gondii* (158). Extrapolando esta información, podríamos sugerir que EiPRMT5 participa en la conversión trofozoíto-quiste en *E. invadens*.

Aunque esta tesis se realizó en *E. invadens*, parásito de reptiles y modelo de enquistamiento *in vitro* para el género *Entamoeba*, sugerimos que las PRMTs

ortólogas de *E. histolytica* tienen la misma función y, por lo tanto, también participan en el enquistamiento del parásito de humanos. Esta hipótesis abre la posibilidad para buscar, y eventualmente utilizar, fármacos que afecten la actividad de las PRMTs amibianas y así controlar la transmisión de este parásito de gran importancia en salud pública, sobre todo en los países de menor desarrollo económico.

## **CONCLUSIÓN**

En este estudio se demostró la presencia de cuatro PRMTs en *E. invadens* que durante el enquistamiento se expresan diferencialmente, y al menos dos de ellas modifican su localización subcelular, sugiriendo que estas enzimas pueden regular este proceso de diferenciación.

## **PERSPECTIVAS**

- Caracterizar la expresión y localización subcelular durante el enquistamiento de las proteínas PRMT1a y PRMT1c, mediante la obtención de anticuerpos contra estas enzimas.
- Identificar las proteínas histonas y no-histonas que son blanco de las EiPRMTs.
- Demostrar la actividad enzimática de las EiPRMTs.
- Analizar el efecto de la sobre-expresión y/o silenciamiento de las EiPRMTs en el proceso de enquistamiento.



## REFERENCIAS

1. Tovy A, Ankri S. Epigenetics in the unicellular parasite *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol.* 2010 Dec;5(12):1875–84.
2. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 2001 Sep 15;15(18):2343–60.
3. Lewin B. *Genes*. GrawHill M, editor. 2008.
4. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):41–5.
5. Vaquero A, Loyola A, Reinberg D. The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003 Apr 9;2003(14):RE4.
6. Morales V, Giamarchi C, Chailleux C, Moro F, Marsaud V, Le Ricousse S, et al. Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie.* 2001;83(11–12):1029–39.
7. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science (80- ).* 2001 Aug 10;293(5532):1074–80.
8. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun Z-W, Schmid M, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 2000 Aug 10;406(6796):593–9.
9. Croken MM, Nardelli SC, Kim K. Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends Parasitol.* 2012

May;28(5):202–13.

10. Dalmaso MC, Sullivan WJ, Angel SO. Canonical and variant histones of protozoan parasites. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jun 1;16:2086–105.
11. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 May 17;123(19):2145–56.
12. Roque Córdova A. Estudios estructurales y caracterización de la unión al DNA del dominio C-terminal de la histona H1 efecto de la fosforilación. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat Autònoma de Barcelona; 2008.
13. Recillas Targa F, Escamilla del Arenal M. Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. Vol. 28, Mensaje bioquímico. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; 1978. 173–201 p.
14. Khan SA, Reddy D, Gupta S. Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment? *World J Biol Chem*. 2015 Nov 26;6(4):333–45.
15. Grant PA. A tale of histone modifications. *Genome Biol*. 2001;2(4):REVIEWS0003.
16. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):259–72.
17. Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim*

- Biophys Sin (Shanghai). 2012 Jan 22;44(1):14–27.
18. Völkel P, Angrand P-O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*. 2007 Jan;89(1):1–20.
  19. Zhang X, Tanaka K, Yan J, Li J, Peng D, Jiang Y, et al. Regulation of estrogen receptor by histone methyltransferase SMYD2-mediated protein methylation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Oct 22;110(43):17284–9.
  20. Zhang Z, Zhang R. Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmun Rev*. 2015 Oct;14(10):854–63.
  21. Tymoczko JL, Berg JM. *Bioquímica Curso básico*. 2013.
  22. Lakowski TM, Frankel A. Kinetic analysis of human protein arginine N-methyltransferase 2: formation of monomethyl- and asymmetric dimethyl-arginine residues on histone H4. *Biochem J*. 2009 Jul 15;421(2):253–61.
  23. Bedford MT, Clarke SG. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol Cell*. 2009 Jan 16;33(1):1–13.
  24. Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB, Clarke S, Leder P, Richard S. Arginine Methylation Inhibits the Binding of Proline-rich Ligands to Src Homology 3, but Not WW, Domains. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):16030–6.
  25. Brahm H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Lührmann R. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA*. 2001 Nov;7(11):1531–42.

26. Côté J, Richard S. Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J Biol Chem.* 2005 Aug 5;280(31):28476–83.
27. Vagin V V., Wohlschlegel J, Qu J, Jonsson Z, Huang X, Chuma S, et al. Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes Dev.* 2009 Aug 1;23(15):1749–62.
28. Invernizzi CF, Xie B, Frankel FA, Feldhammer M, Roy BB, Richard S, et al. Arginine methylation of the HIV-1 nucleocapsid protein results in its diminished function. *AIDS.* 2007 Apr 23;21(7):795–805.
29. Invernizzi CF, Xie B, Richard S, Wainberg MA. PRMT6 diminishes HIV-1 Rev binding to and export of viral RNA. *Retrovirology.* 2006 Dec 18;3(1):93.
30. Rho J, Choi S, Jung C-R, Im D-S. Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Oct 1;466(1):49–57.
31. Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, et al. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev.* 2007 Dec 15;21(24):3369–80.
32. Li X, Hu X, Patel B, Zhou Z, Liang S, Ybarra R, et al. H4R3 methylation facilitates  $\gamma$ -globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and H3 acetylation. *Blood.* 2010 Mar 11;115(10):2028–37.
33. Wang Y-C, Li C. Evolutionarily conserved protein arginine methyltransferases in non-mammalian animal systems. *FEBS J.* 2012

Mar;279(6):932–45.

34. Fan Q, Miao J, Cui L, Cui L. Characterization of PRMT1 from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2009 Jul 1;421(1):107–18.
35. Horiuchi KY, Eason MM, Ferry JJ, Planck JL, Walsh CP, Smith RF, et al. Assay Development for Histone Methyltransferases. *Assay Drug Dev Technol*. 2013 May;11(4):227–36.
36. Bachand F. Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans. *Eukaryot Cell*. 2007 Jun;6(6):889–98.
37. Fisk JC, Read LK. Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell*. 2011 Aug;10(8):1013–22.
38. Lee J, Sayegh J, Daniel J, Clarke S, Bedford MT. PRMT8, a New Membrane-bound Tissue-specific Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23;280(38):32890–6.
39. McBride AE, Weiss VH, Kim HK, Hogle JM, Silver PA. Analysis of the yeast arginine methyltransferase Hmt1p/Rmt1p and its in vivo function. Cofactor binding and substrate interactions. *J Biol Chem*. 2000 Feb 4;275(5):3128–36.
40. McBride AE, Zurita-Lopez C, Regis A, Blum E, Conboy A, Elf S, et al. Protein Arginine Methylation in *Candida albicans*: Role in Nuclear Transport. *Eukaryot Cell*. 2007 Jul;6(7):1119–29.
41. Niewmierzycka A, Clarke S. S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine

- methyltransferase. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):814–24.
42. Wei H, Mundade R, Lange K, Lu T. Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle*. 2014 Jan 2;13(1):32–41.
  43. Smith E, Zhou W, Shindiapina P, Sif S, Li C, Baiocchi RA. Recent advances in targeting protein arginine methyltransferase enzymes in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(6):527–45.
  44. Gary JD, Lin WJ, Yang MC, Herschman HR, Clarke S. The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12585–94.
  45. Pelletier M, Pasternack DA, Read LK. In vitro and in vivo analysis of the major type I protein arginine methyltransferase from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Dec;144(2):206–17.
  46. Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(13):4859–69.
  47. Bachand F, Silver PA. PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J*. 2004 Jul 7;23(13):2641–50.
  48. Ghaemmaghami S, Huh W-K, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, et al. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003 Oct 16;425(6959):737–41.

49. Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):16935–45.
50. Karkhanis V, Hu Y-J, Baiocchi RA, Imbalzano AN, Sif S. Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development. *Trends Biochem Sci.* 2011 Dec;36(12):633–41.
51. Cura V, Troffer-Charlier N, Lambert M-A, Bonnefond L, Cavarelli J. Cloning, expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of mouse protein arginine methyltransferase 7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun.* 2014 Jan 1;70(1):80–6.
52. Hakimi M-A, Deitsch KW. Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Curr Opin Microbiol.* 2007 Aug;10(4):357–62.
53. Petri WA, Haque R, Lyerly D, Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today.* 2000 Aug;16(8):320–1.
54. Stanley SL. Amoebiasis. *Lancet.* 2003 Mar 22;361(9362):1025–34.
55. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* 8(2):228–38.
56. Tanyuksel M, Petri WA. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Oct;16(4):713–29.

57. Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, et al. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jul;73(1):87–91.
58. Braga LL, Mendonca Y, Paiva CA, Sales A, Cavalcante AL, Mann BJ. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct;36(10):3044–5.
59. Leiva B, Lebbad M, Winiacka-Krusnell J, Altamirano I, Tellez A, Linder E. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A Microscopic, Triage Parasite Panel and PCR Study. *Arch Med Res.* 2006 May;37(4):529–34.
60. Levecke B, Dreesen L, Barrionuevo-Samaniego M, Ortiz WB, Praet N, Brandt J, et al. Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Dec 1;105(12):737–9.
61. Braga LL, Lima AA, Sears CL, Newman RD, Wuhib T, Paiva CA, et al. Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Dec;55(6):693–7.
62. Chacín-Bonilla L, Bonpart D. A seroepidemiological study of amebiasis in adults in Maracaibo, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 Nov;30(6):1201–5.
63. Chacin Bonilla L, Chacin-Martinez E, Espinoza E, Cardenas B. A



- seroepidemiological study of amebiasis in children of low socioeconomic level in Maracaibo, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 1982 Nov;31(6):1103–6.
64. Petri Jr WA, Mondal D, Peterson KM, Duggal P, Haque R. Association of malnutrition with amebiasis. *Nutr Rev.* 2009 Nov;67:S207–15.
65. Stauffer W, Abd-Alla M, Ravdin JI. Prevalence and Incidence of *Entamoeba histolytica* Infection in South Africa and Egypt. *Arch Med Res.* 2006 Feb;37(2):265–8.
66. Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, et al. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Apr;50(4):412–9.
67. Secretaria de salud. Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad. Secretaria de Salud, México DF. 2000. 15–32 p.
68. Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. 2007.
69. Gómez JC, Al Revisión ET, Tema DE, César Gómez J, Cortés JA, Cuervo SI, et al. Amebiasis intestinal. 2007.
70. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA. Amebiasis. *N Engl J Med.* 2003 Apr 17;348(16):1565–73.
71. Fernández Retana J. Estudio molecular y funcional del factor de corte del pre-mRNA, EhCF Im25 de entamoeba histolytica. 2008;
72. Salles JM, Moraes LA, Salles MC. Hepatic amebiasis. *Braz J Infect Dis.*

2003 Apr;7(2):96–110.

73. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species. Clin Microbiol Rev. 2007 Jul 1;20(3):511–32.
74. Beaver PC, Jung RC CE. Parasitología Clínica. Salvat E, editor. Barcelona, España; 1986. 882 p.
75. Botero DA RM. Parasitosis humana. Ltda P, editor. Bogotá Colombia; 1992. 418 p.
76. Stanley SL, Reed SL. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. Entamoeba histolytica: parasite-host interactions. Am J Physiol Liver Physiol. 2001 Jun;280(6):G1049–54.
77. Petri WA. Pathogenesis of amebiasis. Curr Opin Microbiol. 2002 Aug;5(4):443–7.
78. Frederick JR, Petri WA. Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba in parasite virulence and differentiation. Glycobiology. 2005 Dec 1;15(12):53R-59R.
79. Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. Trends Parasitol. 2004 Jan;20(1):23–6.
80. Ackers JP, Mirelman D. Progress in research on Entamoeba histolytica pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2006 Aug;9(4):367–73.
81. LEIPPE M, BRUHN H, HECHT O, GROTZINGER J. Ancient weapons: the

three-dimensional structure of amoebapore A. Trends Parasitol. 2005 Jan;21(1):5–7.

82. Marion S, Guillén N. Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. Int J Parasitol. 2006 Feb;36(2):131–9.
83. Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA. The Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, Function, and Regulation by Signaling Pathways. Arch Med Res. 2006 Feb;37(2):234–43.
84. Beck DL, Boettner DR, Dragulev B, Ready K, Nozaki T, Petri WA. Identification and Gene Expression Analysis of a Large Family of Transmembrane Kinases Related to the Gal/GalNAc Lectin in *Entamoeba histolytica*. Eukaryot Cell. 2005 Apr;4(4):722–32.
85. Tavares P, Rigotherier M-C, Khun H, Roux P, Huerre M, Guillén N. Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. Infect Immun. 2005 Mar;73(3):1771–8.
86. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clin Microbiol Rev. 2000 Apr;13(2):318–31.
87. García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocádiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, González-Robles A, et al. *Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. Mol Microbiol. 1999 Aug;33(3):556–68.

88. Singh RS, Walia AK, Kanwar JR, Kennedy JF. Amoebiasis vaccine development: A snapshot on *E. histolytica* with emphasis on perspectives of Gal/GalNAc lectin. *Int J Biol Macromol*. 2016 Oct;91:258–68.
89. Meza I. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol Today*. 2000 Jan;16(1):23–8.
90. Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today*. 1997 May;13(5):178–83.
91. Boettner DR, Petri WA. *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;289:175–84.
92. Ocadiz R, Orozco E, Carrillo E, Quintas LI, Ortega-López J, García-Pérez RM, et al. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol*. 2004 Sep 20;7(2):221–32.
93. Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Jun 13;103(24):9298–303.
94. Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Apr;13(2):196–206.
95. Bailey GB, Gilmour JR, Mccoomer NE, Bailey GB, Nudelman ED, Day DB, et al. Roles of Target Cell Membrane Carbohydrate and Lipid in *Entamoeba histolytica* Interaction with Mammalian Cells. Vol. 58, *INFECTION AND*

IMMUNITY. 1990.

96. Arroyo R, Orozco E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol*. 1987 Mar;23(2):151–8.
97. Orozco E, Rodriguez MA, Murphy CF, Salata RA, Petri WA, Smith RD, et al. *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity and lectin activity of avirulent mutants. *Exp Parasitol*. 1987 Apr;63(2):157–65.
98. Marion S, Tavares P, Arhets P, Guillén N. Signal transduction through the Gal-GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 May;135(1):31–8.
99. Godbold GD, Mann BJ. Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Brazilian J Med Biol Res*. 1998 Aug;31(8):1049–58.
100. Guillén N, Carlier M-F, Brugerolle G, Tardieux I, Ausseil J. Cytoskeletal actin and its associated proteins. Some examples in Protista. *Parasite*. 1998 Jun 19;5(2):107–17.
101. Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol*. 1998 May;28(4):777–85.
102. Ocadiz-Ruiz R, Fonseca W, Linford AS, Yoshino TP, Orozco E, Rodríguez MA. The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the

other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence.

Parasitology. 2016 Jan 2;143(01):50–9.

103. Olivos-García A, Tello E, Nequiz-Avendaño M, González-Canto A, López-Vancell R, García de León MC, et al. Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. Parasitology. 2004 Jul;129(Pt 1):19–25.
104. Rodríguez MA, Orozco E. Characterization of the EhRabB recombinant protein of *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 2000;31(4 Suppl):S171-2.
105. Nozaki T, Nakada-Tsukui K. Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res. 2006 Feb 22;98(3):179–83.
106. Ehrenkaufer GM, Weedall GD, Williams D, Lorenzi HA, Caler E, Hall N, et al. The genome and transcriptome of the enteric parasite *Entamoeba invadens*, a model for encystation. Genome Biol. 2013 Jul 26;14(7):R77.
107. Segovia-Gamboa NC, Chávez-Munguía B, Medina-Flores Y, Cázares-Raga FE, Hernández-Ramírez VI, Martínez-Palomo A, et al. *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. Exp Parasitol. 2010 Jun 1;125(2):63–9.
108. Herman E, Siegesmund MA, Bottery MJ, van Aerle R, Shather MM, Caler E, et al. Membrane Trafficking Modulation during *Entamoeba* Encystation. Sci Rep. 2017 Dec 9;7(1):12854.
109. López-Romero E, Villagómez-Castro JC. Encystation in *Entamoeba invadens*. Parasitol Today. 1993 Jun 1;9(6):225–7.

110. Coppi A, Eichinger D. Regulation of *Entamoeba invadens* encystation and gene expression with galactose and N-acetylglucosamine. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Jul 30;102(1):67–77.
111. Coppi A, Merali S, Eichinger D. The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8083–90.
112. Eichinger D. A Role for a Galactose Lectin and Its Ligands During Encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 2001 Jan 1;48(1):17–21.
113. Chatterjee A, Ghosh SK, Jang K, Bullitt E, Moore L, Robbins PW, et al. Evidence for a “Wattle and Daub” Model of the Cyst Wall of *Entamoeba*. Johnson PJ, editor. *PLoS Pathog.* 2009 Jul 3;5(7):e1000498.
114. Frisardi M, Ghosh SK, Field J, Van Dellen K, Rogers R, Robbins P, et al. The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4217–24.
115. Das S, Van Dellen K, Bulik D, Magnelli P, Cui J, Head J, et al. The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitosan (deacetylated chitin). *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Jul;148(1):86–92.
116. de la Vega H, Specht CA, Semino CE, Robbins PW, Eichinger D, Caplivski D, et al. Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997 Apr;85(2):139–47.
117. Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UCM, Samuelson J, Amedeo P, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* 2005

Feb 24;433(7028):865–8.

118. Davis PH, Schulze J, Stanley SL. Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 Jan;151(1):118–28.
119. Tolstrup J, Krause E, Tannich E, Bruchhaus I. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*. 2007 Feb 11;134(02):289.
120. Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*. 2000 Apr 10;30(4):401–10.
121. Dhar SK, Choudhury NR, Bhattacharaya A, Bhattacharya S. A multitude of circular DNAs exist in the nucleus of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 Mar;70(1–2):203–6.
122. Lioutas C, Schmetz C, Tannich E. Identification of Various Circular DNA Molecules in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. 1995 Mar;80(2):349–52.
123. Orozco E, Gharaibeh R, Riverón AM, Delgadillo DM, Mercado M, Sánchez T, et al. A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol Gen Genet*. 1997 Apr 16;254(3):250–7.
124. Riveron AM, Lopez-Canovas L, Baez-Camargo M, Flores E, Perez-Perez G, Luna-Arias JP, et al. Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *Eur Biophys J*. 2000;29(1):48–56.



125. Báez-Camargo M, Riverón AM, Delgadillo DM, Flores E, Sánchez T, Garcia-Rivera G, et al. *Entamoeba histolytica*: gene linkage groups and relevant features of its karyotype. *Mol Gen Genet*. 1996 Dec 13;253(3):289–96.
126. Márquez-Monter H, Becker I, Carrillo-Farga J. Mitosis and polykaryon formation of *Entamoeba histolytica* in axenic cultures. *Arch Invest Med (Mex)*. 1990;21 Suppl 1:69–73.
127. Willhoeft U, Tannich E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1999 Mar 15;99(1):41–53.
128. Willhoeft U, Buß H, Tannich E. Analysis of cDNA Expressed Sequence Tags from *Entamoeba histolytica*: Identification of two Highly Abundant Polyadenylated Transcripts with no Overt Open Reading Frames. *Protist*. 1999 Mar;150(1):61–70.
129. López R. Análisis de la expresión del RNAm de los genes que forman la maquinaria ESCRT en *entamoeba histolytica* y caracterización funcional de la proteína EhVps4. CINVESTAV; 2010.
130. Ramakrishnan G, Ragland BD, Purdy JE, Mann BJ. Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*. 1996 Jan;19(1):91–100.
131. Purdy JE, Pho LT, Mann BJ, Petri WA. Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Jun;78(1–2):91–103.

132. Pearson RJ, Singh U. Approaches to characterizing *Entamoeba histolytica* transcriptional regulation. *Cell Microbiol.* 2010 Dec;12(12):1681–90.
133. Gómez C, Guillermo Pérez D, López-Bayghen E, Orozco E. Transcriptional Analysis of the EhPgp1 Promoter of *Entamoeba histolytica* Multidrug-resistant Mutant. 1998.
134. Pérez DG, Gómez C, López-Bayghen E, Tannich E, Orozco E. Transcriptional analysis of the EhPgp5 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7285–92.
135. Castañon-Sanchez CA, Luna-Arias JP, de Dios-Bravo MG, Herrera-Aguirre ME, Olivares-Trejo JJ, Orozco E, et al. *Entamoeba histolytica*: A unicellular organism containing two active genes encoding for members of the TBP family. *Protein Expr Purif.* 2010 Mar;70(1):48–59.
136. Luna-Arias JP, Hernandez-Rivas R, de Dios-Bravo G, Garcia J, Mendoza L, Orozco E. The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. *Microbiology.* 1999 Jan 1;145(1):33–40.
137. Gilchrist CA, Holm CF, Hughes MA, Schaenman JM, Mann BJ, Petri WA. Identification and Characterization of an *Entamoeba histolytica* Upstream Regulatory Element 3 Sequence-specific DNA-binding Protein Containing EF-hand Motifs. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276(15):11838–43.
138. Calixto-Gálvez M, Romero-Díaz M, García-Muñoz A, Salas-Casas A, Pais-Morales J, Galván IJ, et al. Identification of a polypeptide containing Tudor

and staphylococcal nuclease-like domains as the sequence-specific binding protein to the upstream regulatory element 1 of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol.* 2011 Jun;41(7):775–82.

139. Mendoza L, Orozco E, Rodríguez MA, García-Rivera G, Sánchez T, García E, et al. Ehp53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumour suppressor p53. *Microbiology.* 2003 Apr 1;149(4):885–93.
140. Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Mar;45(1):121–30.
141. Ramakrishnan G, Gilchrist CA, Musa H, Torok MS, Grant PA, Mann BJ, et al. Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Dec;138(2):205–16.
142. Lozano-Amado D, Herrera-Solorio AM, Valdés J, Alemán-Lazarini L, Almaraz-Barrera M de J, Luna-Rivera E, et al. Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vectors.* 2016 Dec 14;9(1):19.
143. Binder M, Ortner S, Plaimauer B, Födinger M, Wiedermann G, Scheiner O, et al. Sequence and organization of an unusual histone H4 gene in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 May;71(2):243–7.
144. Ali IKM, Mondal U, Roy S, Haque R, Petri WA, Clark CG, et al. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba*

- histolytica. J Clin Microbiol. 2007 Feb;45(2):285–9.
145. Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S. Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 2;32(1):287–97.
146. Borbolla-Vázquez J, Orozco E, Betanzos A, Rodríguez MA. *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. Parasit Vectors. 2015 Apr 10;8:219.
147. Medina-Gómez C. Caracterización de las proteínas metil-transferasas de arginina PRMT-5 y PRMT-A de *Entamoeba histolytica*. CINVESTAV; 2015.
148. Moon E-K, Hong Y, Chung D-I, Goo Y-K, Kong H-H. Identification of Protein Arginine Methyltransferase 5 as a Regulator for Encystation of *Acanthamoeba*. Korean J Parasitol. 2016 Apr;54(2):133–8.
149. Moon E-K, Kong H-H, Hong Y, Lee H-A, Quan F-S. Identification and Characterization of Protein Arginine Methyltransferase 1 in *Acanthamoeba castellanii*. Korean J Parasitol. 2017 Apr;55(2):109–14.
150. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978;72(4):431–2.
151. Sanchez L, Enea V, Eichinger D. Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. Mol Biochem Parasitol. 1994 Sep;67(1):125–35.

152. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72(1–2):248–54.
153. Jain K, Warmack RA, Debler EW, Hadjikyriacou A, Stavropoulos P, Clarke SG. Protein Arginine Methyltransferase Product Specificity Is Mediated by Distinct Active-site Architectures. *J Biol Chem.* 2016;291(35):18299–308.
154. Zhang X, Zhou L, Cheng X. Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J.* 2000 Jul 17;19(14):3509–19.
155. Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Dec;1764(12):1890–903.
156. Wysocka J, Allis CD, Coonrod S. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:344–55.
157. Fabrizio E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee J-H, et al. Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* 2002 Jul;3(7):641–5.
158. Liu M, Li F-X, Li C-Y, Li X-C, Chen L-F, Wu K, et al. Characterization of protein arginine methyltransferase of TgPRMT5 in *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 2019 May 8;12(1):221.