



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Modificaciones post – traduccionales de las histonas,  
arquitectura nuclear y desacetilasas, que participan en el  
enquistamiento de *Entamoeba invadens*”**

Tesis que presenta  
**M. en C. Daniela Lozano Amado**

Para obtener el Grado de  
**Doctora en Ciencias**

En la especialidad de  
**Biomedicina Molecular**

Directora de Tesis  
**Dra. Rosaura Hernández Rivas**

**Ciudad de México.**

**Diciembre, 2018.**

# **ASESORES**

**Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía**

Investigador Titular

Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV – IPN.

**Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda**

Investigador Titular

Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV – IPN.

**Dr. Jesús Valdés Flores**

Investigador Titular

Departamento de Bioquímica  
CINVESTAV – IPN

**Dra. Laurence Annie Marchat Marchau**

Profesora Titular del Programa Institucional de Biomedicina  
Molecular, Doctorado en Biotecnología de la Escuela  
Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico  
Nacional.

**Dr. Julio César Carrero Sánchez**

Investigador Titular del Departamento de Inmunología del  
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad  
Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Rosaura Hernández Rivas.

Durante la realización de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 280911.

La autora de este trabajo fue beneficiaria de la Beca Tesis de Posgrado Primera Promoción 2018 otorgada por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) con número de folio 18BTD0082.

## DEDICATORIAS

A Dios por iluminar mi camino, por ponerme a prueba a mi misma y de esta manera demostrarme que tan capaz soy. Por brindarme la inteligencia, sabiduría y paciencia para lograr esta meta que ha sido una de las mejores experiencias en mi vida profesional y personal.

A mis papás Verónica y Rigoberto, por siempre creer en mi y apoyarme en cada paso que he dado en mi vida. Se que en los últimos años hemos estado lejos en distancia, pero sabemos que estamos unidos por el corazón. Gracias infinitas por hacer de mi una persona de bien, integra, con valores y que siempre lucha por lo que quiere lograr. Gracias por sentirse orgullosos de mi, yo me siento aún más orgullosa de ustedes por todo lo que han hecho por mi y por mis hermanos. Los amo infinitamente.

A mis hermanos Nazareli y Cristobal, gracias por estar siempre ahí y darme ánimos para poder seguir adelante. Espero que estos logros míos sean una motivación para ustedes y logren absolutamente todo lo que se propongan, los límites únicamente los ponemos nosotros. Gracias por recibirme con mucho cariño en casa cada vez que voy a Acapulco y pasar momentos increíbles, los amo.

A mi gran amigo Leonardo Josué. Gracias por mantener esa amistad por más de 6 años, por impulsarme a ser mejor cada día. Gracias por no dejarme sola, por estar siempre en los mejores y en los peores momentos de mi vida, por siempre darme tu apoyo, tus ánimos y cuando es necesario también regaños. Sabemos que este camino de la ciencia no ha sido fácil, pero me has enseñado a no dejarme vencer por muy difícil que se vea el panorama. Gracias por hacer mis días más alegres, por compartir los fines de semana conmigo y hacer que la vida sea más amena con todas las experiencias vividas. Gracias por tu cariño y amor, demostrados muy a tu manera. Y estoy segura de que estos lazos tan fuertes que hemos formado a lo largo del tiempo muy difícilmente podrán romperse. Gracias por formar una parte fundamental de mi vida, te quiero mucho gordito!

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas, una de las personas más increíbles y motivadoras que la vida ha puesto en mi camino. Primero agradezco que me haya aceptado en su grupo de trabajo durante 5 años y medio, por ser una excelente tutora y hacer que mi formación profesional sea muy sólida. Gracias por creer en mi y en mi capacidad para lograr las cosas. Gracias por contagiarme esa pasión por la ciencia, por motivarme a seguir en este camino y sacar la mejor versión de mi en muchos sentidos. Y lo que más agradezco es la amistad y la confianza tan increíble que me ha brindado, realmente aprecio infinitamente las muestras de cariño y aprecio que ha tenido conmigo, las largas pláticas con situaciones buenas y algunas difíciles, pero siempre motivándonos una a la otra. Usted, además de ser la mejor tutora que pude tener para mi formación profesional, es una de mis mejores amigas en la vida, a la cual quiero y aprecio muchísimo.....gracias por todo.

A mi comité de asesores: Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, Dr. Jesús Valdés Flores, Dra. Laurence Annie Marchat Marchau y Dr. Julio César Carrero Sánchez. Gracias por los comentarios recibidos durante la realización de este trabajo, su asistencia a los correspondientes seminarios y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al Colegio de Profesores del Departamento de Biomedicina Molecular, por sus críticas y aportaciones realizadas en los seminarios, las cuales retroalimentaron la realización de este proyecto.

Al Dr. José Juan López – Rubio, quien amablemente me recibió en su laboratorio en la Universidad de Montpellier, Francia, en donde realicé una estancia de investigación. Gracias por el apoyo brindado en todo momento, los conocimientos adquiridos y las gratas palabras hacia mi una vez que finalizó esta experiencia, la cual sin duda me hizo crecer en muchos sentidos.

A la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del CINVESTAV por las facilidades otorgadas para el uso del equipo Bioruptor Pico durante el desarrollo del presente proyecto.

Al técnico Jose Luis Gómez Brito por su apoyo en el laboratorio con la limpieza de material, preparación de soluciones y de medios de cultivo, indispensables para la realización de este proyecto.

A la secretaria de la Coordinación Académica, María de Jesús Maqueda Villegas por su apoyo en los trámites académicos realizados a lo largo del Doctorado, atendiéndonos siempre con un trato amable y cordial.

A mis ex – compañeros de laboratorio: Gaby, Marce y Miguel, con quienes compartí gratos momentos dentro y fuera del laboratorio y a quienes les guardo un cariño especial por todas las experiencias compartidas.

A mis amigos: Pedro, Isabel y Lissuly, con quienes además de formar un gran equipo de trabajo, se han convertido en amigos que aprecio mucho y hemos compartido gratas experiencias que siempre tendré en mi memoria. Gracias por brindarme su amistad y cariño, son geniales personas.

A mis compañeros de laboratorio Iván, Roxana y David, con quienes he compartido buenos momentos y espero que sigamos manteniendo comunicación durante mucho tiempo.

A mis amigos del CINVESTAV: Juan Carlos, Diana, Alejandro y Javier, con quienes he mantenido una amistad desde que inicié mis estudios de Maestría y a pesar del tiempo y la distancia, así como las ocupaciones de cada uno, tratamos de estar en contacto en la medida de lo posible. Gracias por estos años de amistad, los quiero.

A mi mejor amiga Mimi, quien ha estado conmigo durante casi 10 años y con quien he vivido experiencias inolvidables que me han sacado de la rutina y las he disfrutado enormemente. A pesar de que nuestras ocupaciones hacen que a veces no estemos en contacto constante, sabemos que siempre contamos una con la otra y los reencuentros después de meses de no vernos siempre han sido geniales. Gracias amiguita por todo tu apoyo y cariño.

A todas las personas que de una u otra manera han estado acompañándome a lo largo de este tiempo, que me han brindado su amistad, que han convivido conmigo de múltiples maneras y que siempre tienen un trato amable hacia mi, lo agradezco infinitamente.

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Importancia de la amibiasis en salud pública y manifestaciones clínicas. ....	1
1.2. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .....	1
1.3. Características de trofozoítos y quistes .....	2
1.3.1. Trofozoíto .....	2
1.3.1.1 Mecanismo de invasión del trofozoíto de <i>E. histolytica</i> .....	4
1.3.2. Quiste .....	5
1.3.2.1. Principales componentes de la pared del quiste .....	7
1.3.2.2. Mecanismo propuesto para la formación del quiste .....	7
1.3.2.3. Estímulos que inducen el enquistamiento de <i>Entamoeba</i> .....	10
1.3.2.4. Rutas metabólicas involucradas en la formación del quiste .....	12
1.4 La cromatina como reguladora de la expresión de genes.....	14
1.5. Modificaciones post – traduccionales de las histonas .....	15
1.5.1. Acetilación .....	16
1.5.2. Desacetilación .....	18
1.6. Proteínas efectoras: lectores de las marcas epigenéticas .....	21
1.7. Código de histonas.....	22
1.8. Arquitectura nuclear .....	24
<b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	26
2.1. Genoma de <i>E. histolytica</i> y su organización en cromatina .....	26
2.2. Control epigenético en la expresión de genes de <i>Entamoeba</i> .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	33
5.1. Objetivo General.....	33
5.2. Objetivos Particulares.....	33
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
6.1. Cultivo celular de trofozoítos de <i>E. invadens</i> . ....	34
6.2 Cultivo celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	34
6.3 Inducción de enquistamiento <i>in vitro</i> de <i>E. invadens</i> . ....	34
6.4 Purificación de quistes por gradiente de Percoll. ....	35

6.5 Tinción con calcofluor blanco.....	35
6.6 Obtención de DNA genómico de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	36
6.7 Extracción de RNA de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	36
6.8 Extracción de RNA de quistes de <i>E. invadens</i> .....	37
6.9 Eliminación del DNA remanente en el RNA obtenido mediante tratamiento con DNAasa I. ....	37
6.10 PCR utilizando RNA tratado con DNAasa I para verificar la eliminación del DNA genómico. ....	38
6.11 Integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa.....	38
6.12 Síntesis de cDNA a partir de RNA obtenido de trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> .....	39
6.13 PCR semicuantitativa para los genes identificados que codifican para las HDACs de la clase III o Sirtuinas en <i>E. invadens</i> .....	39
6.14 PCR de tiempo real utilizando SYBR Green. ....	40
6.15 Obtención de extractos protéicos totales a partir de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	40
6.16 Obtención de extractos protéicos totales a partir de quistes de <i>E. invadens</i> .....	41
6.17 Extracción de histonas a partir de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. invadens</i> .....	41
6.18 Extracción de histonas a partir de quistes de <i>E. invadens</i> .....	42
6.19 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para histonas. ....	43
6.20 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para los extractos totales. ....	43
6.21 Western Blot (WB). ....	44
6.22 Recuperación de las bandas del gel SDS–PAGE para su análisis por LC– MS/MS. ....	45
6.23 Análisis por LC–MS/MS.....	45
6.24 Inmunofluorescencia en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. invadens</i> .....	46
6.25 Inmunofluorescencia en quistes de <i>E. invadens</i> .....	46
6.26 Evaluación de la viabilidad de trofozoítos de <i>E. invadens</i> tratadas con diferentes concentraciones de Tricostatina A (TSA) mediante azul de tripano. ....	47



6.27 Evaluación de la viabilidad de trofozoítos de <i>E. invadens</i> tratadas con diferentes concentraciones de Tricostatina A (TSA) mediante ensayos de MTT.....	48
6.28 Inducción del enquistamiento de trofozoítos de <i>E. invadens</i> en presencia de TSA. ....	49
6.29 Amplificación por PCR de los insertos EiSirDC HindIII/KpnI y EiSirDC BamHI/EcoRI. ....	49
6.30 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. ....	50
6.31 Digestión de los insertos EiSirDC-HindIII/KpnI y EiSirDC BamHI/EcoRI con enzimas de restricción. ....	50
6.32 Obtención del DNA plasmídico mediante Miniprep. ....	51
6.33 Digestión de los plásmidos pL4440 con HindIII y KpnI y pGEX6P1 con BamHI y EcoRI. ....	52
6.34 Clonación de los insertos EiSirDC-HindIII/KpnI y EiSirDC BamHI / EcoRI en los vectores pL4440 y pGEX6P1. ....	52
6.35 Transformación de células químicamente competentes. ....	52
6.36 PCR de Colonia.....	53
6.37 Digestión de los plásmidos obtenidos mediante Miniprep de las colonias seleccionadas por PCR para los vectores pL4440 EiSirDC y pGEX6P1 EiSirDC.....	53
6.38 Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EiSirDC.....	54
6.39 Inducción y purificación del dsRNA para EiSirDC y GFP. ....	55
6.40 Modelado por homología .....	57
6.41 Docking molecular .....	58
<b>7. RESULTADOS</b> .....	58
7.1 Inducción del enquistamiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	59
7.2 Obtención e identificación de las histonas en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> .....	59
7.3 Identificación de modificaciones post – traduccionales de las histonas en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> . ....	61
7.4 Arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> .....	63
7.5 Identificación de modificaciones post – traduccionales de las histonas en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	70

7.6	Localización de marcas epigenéticas de activación y represión transcripcional en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	73
7.7	Identificación y localización de dos cuerpos nucleares: nucléolo y <i>speckles</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	76
7.8	Identificación y localización de la proteína EiHDAC3 en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> .....	83
7.9	Impacto de la acetilación de la histona H4 en el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	88
7.10	Identificación y expresión de genes que codifican para HDACs de la clase III o sirtuinas. ....	93
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>103</b>
8.1	Identificación de PTMs en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i> .....	103
8.2	Arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i> .....	108
8.3	Participación de la acetilación de histonas en el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	116
8.4	Papel de las sirtuinas en el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	120
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>121</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>122</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>123</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>137</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Modelo de “wattle and daub” propuesto para la formación de la pared del quiste de <i>Entamoeba</i> . .....	9
<b>Figura 3.</b> Vía de síntesis de la quitina propuesta para <i>E. invadens</i> .....	10
<b>Figura 4:</b> Niveles de compactación de la cromatina en células eucariontes. ....	15
<b>Figura 5:</b> Modificaciones post – traduccionales descritas para las histonas H2A, H2B, H3 y H4. ....	16
<b>Figura 6:</b> Comunicación en <i>cis</i> y en <i>trans</i> de las modificaciones post – traduccionales de las histonas. ....	23
<b>Figura 7:</b> Alineamiento de A) histona H3 y B) histona H4 de <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i> con <i>Homo sapiens</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	27
<b>Figura 8.</b> Quistes de <i>E. invadens</i> teñidos con calcofluor blanco. ....	59
<b>Figura 9.</b> Extracción ácida de proteínas totales básicas de trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> e identificación de las histonas H3 y H4 mediante WB. ....	60
<b>Figura 10.</b> La histona H4 de <i>E. invadens</i> conserva residuos clásicos de modificaciones post – traduccionales. ....	61
<b>Figura 11.</b> Los trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> presentan las mismas modificaciones post – traduccionales en el extremo NH <sub>2</sub> de la histona H4 .....	63
<b>Figura 12.</b> La histona H4 pan – acetilada se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región de la periferia nuclear en trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	65
<b>Figura 13.</b> La histona H4 pan – acetilada se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región central del núcleo en quistes de <i>E. invadens</i> . ....	66
<b>Figura 14.</b> Comparación de la localización de la histona H4 pan – acetilada dentro del núcleo de trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> . ....	67
<b>Figura 15.</b> La H4R3me1 se encuentra distribuida en todo el núcleo y en la periferia nuclear en trofozoítos de <i>E. invadens</i> . ....	68
<b>Figura 16.</b> La H4R3me1 se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región central del núcleo en quistes de <i>E. invadens</i> . ....	69
<b>Figura 17.</b> Comparación de la localización de las marcas de activación transcripcional como son la histona H4 pan – acetilada y H4R3me1 dentro del núcleo de trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> . ....	70

<b>Figura 18.</b> La histona H4 de <i>E. histolytica</i> conserva residuos clásicos de modificaciones post – traduccionales. ....	71
<b>Figura 19.</b> Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 están presentes en proteínas nucleares básicas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	72
<b>Figura 20.</b> Identificación de modificaciones post – traduccionales de la histona H4 de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> . ....	73
<b>Figura 21.</b> Localización nuclear de marcas epigenéticas de activación y represión transcripcional en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	75
<b>Figura 22.</b> El nucléolo en <i>E. histolytica</i> se encuentra localizado en la periferia nuclear...	78
<b>Figura 23.</b> El nucléolo y los <i>speckles</i> están presentes en el núcleo de <i>E. histolytica</i> .....	81
<b>Figura 24.</b> <i>E. invadens</i> posee dos genes que codifican para una HDAC de la Clase I. ...	84
<b>Figura 25.</b> Las HDACs de la clase I identificadas en <i>E. invadens</i> son ortólogos de la proteína HDAC3 de <i>H. sapiens</i> .....	84
<b>Figura 26.</b> Las HDACs de la clase I identificadas en <i>E. invadens</i> adquieren la estructura terciaria similar a la reportada para HDAC3 de humano.....	85
<b>Figura 27.</b> EiHDAC3 se expresa más en la etapa de quiste respecto a la etapa de trofozoíto en <i>E. invadens</i> .....	86
<b>Figura 28.</b> La proteína EiHDAC3 se localiza en la región central del núcleo en trofozoítos de <i>E. invadens</i> .. .....	87
<b>Figura 29.</b> Docking molecular para identificar las interacciones de las dos EiHDAC3 con la TSA. ....	90
<b>Figura 30.</b> La TSA no afecta la viabilidad celular ni la actividad metabólica de trofozoítos de <i>E. invadens</i> .....	90
<b>Figura 31.</b> TSA induce hiperacetilación de la histona H4 en trofozoítos de <i>E. invadens</i> ..	90
<b>Figura 32.</b> La hiperacetilación de la histona H4 impacta en el enquistamiento de <i>E. invadens</i> . ....	91
<b>Figura 33.</b> El bloqueo de la actividad de EiHDAC3 disminuye la expresión de genes involucrados en la vía de formación de la pared del quiste y la síntesis de quitina... ..	92
<b>Figura 34.</b> Expresión a nivel de mRNA de los genes identificados <i>in silico</i> que codifican para sirtuinas en trofozoítos y quistes de 24 h en <i>E. invadens</i> .....	95
<b>Figura 35.</b> <i>EiSir2</i> y <i>EiSir4</i> aumentan sus niveles de expresión a nivel de mRNA a lo largo del enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	95

<b>Figura 36.</b> Obtención del vector pL4440 EiSirDC.....	96
<b>Figura 37.</b> Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del plásmido pL4440 EiSirDC.....	97
<b>Figura 38.</b> Digestión del vector pL4440 GFP.....	98
<b>Figura 39.</b> Purificación del dsRNA para GFP y EiSirDC.....	99
<b>Figura 40.</b> Obtención del vector pGEX6P1-EiSirDC.....	100
<b>Figura 41.</b> Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del plásmido pGEX6P1 EiSirDC.	101
<b>Figura 42.</b> Inducción y purificación de la proteína recombinante GST–EiSirDC .....	102
<b>Figura 43.</b> Modelo propuesto para la arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de <i>E. invadens</i> .....	116
<b>Figura 44.</b> Modelo propuesto para el papel de la acetilación en el enquistamiento de <i>E. invadens</i> .....	119

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Diferentes clases de modificaciones post – traduccionales que ocurren sobre el extremo NH <sub>2</sub> de las histonas .....	17
<b>Tabla II.</b> Modificaciones post-traduccionales de las histonas y los dominios que las reconocen. ....	22
<b>Tabla III.</b> Genes identificados in silico en la base de datos Amoeba DB que codifican para HDACs de la clase III o sirtuinas .....	93
<b>Tabla IV:</b> Lista de oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR. ....	137

## RESUMEN

La amibiasis intestinal en humanos es ocasionada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Esta parasitosis afecta anualmente alrededor de 50 millones de personas en el mundo, y de éstas 40,000 a 100,000 mueren cada año. La infección inicia por la ingestión de quistes que se encuentran en el agua o alimentos contaminados, siendo éstos la fase infectiva del parásito. Una vez dentro del hospedero, ocurre el proceso de desenquistamiento para dar origen a los trofozoítos, que constituyen la fase infectiva. Se sabe que el parásito alterna entre dos fases de vida, tanto el enquistamiento así como el desenquistamiento son procesos esenciales que son finamente regulados por cambios en la expresión de genes. Debido a que el quiste es la fase de transmisión de la enfermedad, es que el proceso que conlleva a su formación ha sido objeto de diferentes estudios que han permitido dilucidar algunos de los mecanismos celulares que participan, utilizando como modelo de estudio a *E. invadens*, debido a que no existe un modelo eficiente de enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*. Sin embargo, los mecanismos moleculares han sido poco estudiados, aunque algunos estudios han sugerido que las modificaciones post – traduccionales (PTMs) de las histonas podrían ser uno de los mecanismos moleculares involucrados en regular el proceso de enquistamiento. Sin embargo, se desconoce qué histona o histonas y en qué residuos pueden ocurrir estas acetilaciones u otras PTMs y de qué manera la acetilación y desacetilación de las histonas, a través de las HDACs, podrían participar en la regulación de la expresión de genes implicados en el enquistamiento.

En este trabajo, se realizó la identificación de PTMs asociadas a activación transcripcional que ocurren en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 tanto en la etapa de trofozoítos como quistes de *E. invadens* como son: la histona H4 pan-acetilada (K5, K8, K12 y K16) y H4R3me1. Nuestros resultados de Western blot indican que, estas PTMs no fueron diferenciales entre cada fase del parásito. Sin embargo, para saber si existía una ubicación diferencial de estas marcas en el núcleo que permitiera regular de manera fase específica la expresión de genes, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia. Nuestros datos muestran que para los trofozoítos las marcas de activación tanto la acetilación de la histona H4 (K5, K8, K12 y K16) así como la de la monometilación de la arginina 3 de la histona H4 se distribuyen en todo el núcleo. Por su parte, en los quistes, estas mismas marcas de activación se localizaron en todo el núcleo excepto en la región central, sugiriendo que existe una localización diferencial entre ambas fases del parásito. Además, se demostró

que para la fase de trofozoítos las marcas de activación y de represión transcripcional colocalizan, sugiriendo que el núcleo de trofozoítos no está compartimentalizado. En contraste, en el caso de los quistes se determinó que las marcas de activación se localizan en la periferia nuclear mientras que en la mayoría de los eucariontes éstas ocupan la parte central del núcleo lo que sugiere que en los quistes de *E. invadens* la arquitectura nuclear es inversa.

Para averiguar cuál es el papel de la acetilación en el enquistamiento de *E. invadens*, se utilizó un inhibidor de las HDACs de la clase I y II como es la Tricostatina A (TSA) y se observó una disminución en el porcentaje de enquistamiento en las células tratadas con TSA en comparación con las no tratadas con este inhibidor. Además, mediante ensayos RT-qPCR se demostró que existe una desregulación de genes asociados a la formación de la pared del quiste tales como Jacob 1 y 2, Jessie 3a y 3b, quitinasa 1, 2 y 3 así como genes que participan en la vía de síntesis de quitina como son la glucosamina 6 fosfato N – acetiltransferasa (GNA) y las quitina sintasa 1 y 2. Estos resultados sugieren que la acetilación y la desacetilación de las histonas juega un papel importante en regular la expresión de genes que participan en el enquistamiento de *E. invadens*. Además, estos datos indican que una EiHDAC3 – like, la cual es la única HDAC de la clase I presente en este parásito, podría ser la responsable de regular los genes del enquistamiento. Estos hallazgos nos permiten proponer a HDAC3 – like como un potencial blanco para el desarrollo de una epidroga que podría bloquear el enquistamiento e impactar en la transmisión de *E. histolytica*.



## ABSTRACT

The intestinal amoebiasis in humans is produced by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The amoebiasis annually affects around 50 million people worldwide and 40,000 to 100,000 die each year. The infection begins with the consumption of cysts found in contaminated water or food, which is the infective stage of this parasite. Once inside the host, the process of excystation occurs to give rise to the trophozoites, which constitute the infective stage. It is known that the parasite alternates between two stages of life, both encystation as well as excystation are essential processes that are finely regulated by changes in the expression of genes. Because the cyst is the transmission stage of the disease, it has been subject to different studies to elucidate the cellular mechanisms involved in this process using *E. invadens* as a study model because there is not yet an efficient *in vitro* encystation model of *E. histolytica*. However, molecular mechanisms that control the encystation have been little studied, although some studies have suggested that histones post-translational modifications (PTMs) such as histone acetylation could be one of the molecular mechanisms implicated in this process. However, it is unknown what histone or histones and in what residues these acetylations occur and how the histones acetylation and deacetylation [through of the Histone Deacetylases (HDACs)], could be participated in the regulation of the genes involved in the encystation.

In this work, we identified PTMs associated with transcriptional activation that occur in the NH<sub>2</sub>-terminus of histone H4 in trophozoites and cysts of *E. invadens* such as: pan-acetylated histone H4 (K5, K8, K12 and K16) and H4R3me1. Our Western blot results indicate that, these PTMs were not differential between each stage of the parasite. However, in order to know whether there is a differential location of these marks in the nucleus that allow to regulate the expression of genes in a specific stage, immunofluorescence assays were carried out. Our data showed that in trophozoites, the activation marks such as histone H4 acetylation (K5, K8, K12 and K16) as well as monomethylation of arginine 3 of histone H4, are distributed throughout the nucleus. On the other hand, in the cysts, these marks of activation were distributed throughout the nucleus except in the central region, suggesting that those marks have a differential localization between both stages of the parasite. In addition our findings suggests that in trophozoite stage the activation and transcriptional repression marks co-localize, suggesting that trophozoites nucleus is not compartmentalized. In contrast, in the cysts, the activation marks are located in the nuclear

periphery whereas in the majority of the eukaryotes they are located in the central part of the nucleus, which suggests that in the cysts of *E. invadens* the nuclear architecture is inverse.

To know whether histone acetylation plays a role in the encystation of *E. invadens*, Trichostatin A (TSA), an inhibitor of class I and II HDACs was used. We found that TSA decreased the percentage of encystation in about 60%. RT-qPCR assays showed that H4 histone hyperacetylation reduced the expression of genes implicated in the cyst wall formation such as: Jacob 1 and 2, Jessie 3a and 3b, chitinase 1, 2 and 3. As well as genes involved in the chitin synthesis pathway such as glucosamine 6 phosphate N-acetyltransferase (GNA) and chitin synthase 1 and 2. These results suggest that acetylation and deacetylation of histones control the expression of genes that participate in the encystation of *E. invadens*. Furthermore, these results suggest that an EiHDAC3 - like, (which is the only class I HDAC present in this parasite) could be responsible for regulating the encystation genes. These findings allow us to propose HDAC3 - like as a potential target for the development of an epi-drug that could block encystation and impact in the transmission of *E. histolytica*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia de la amibiasis en salud pública y manifestaciones clínicas.

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario responsable de la disentería amibiana, la colitis amibiana y la amibiasis extraintestinal invasiva en humanos. La Organización Mundial de la Salud estima que esta parasitosis afecta anualmente alrededor de 50 millones de personas en el mundo, de las cuales 40,000 a 100,000 mueren cada año (WHO/PAHO, 1997). Esta parasitosis es más frecuente en países subdesarrollados con condiciones sanitarias pobres y con una alta densidad de población, por lo que se considera la tercera parasitosis más importante después de la malaria y la esquistosomiasis (WHO/PAHO, 1997). La alta prevalencia de la infección se debe a su forma de transmisión que ocurre a través del consumo de alimentos o de agua contaminada con materia fecal que contiene a los quistes, los cuales son la forma infectiva del parásito. Las regiones principalmente afectadas por la amibiasis son: México, América Central y del Sur, India y África. (WHO/PAHO, 1997). En México, la amibiasis es una de las veinte principales causas de enfermedad. De acuerdo con la distribución geográfica, los estados del sur y sureste del país son los que presentan una tasa de incidencia de 500 casos por cada 100,000 habitantes. Los intervalos de edad en los cuales se encuentran dichas tasas de incidencia son individuos menores de 14 años y mayores de 50 años, afectando de igual manera a ambos sexos (SSA, 2012; Ximénez C, 2006).

## 1.2 Ciclo biológico de *E. histolytica*.

*E. histolytica* tiene un ciclo de vida simple que alterna entre dos etapas: el quiste que constituye la etapa infectiva y el trofozoíto que es la etapa invasiva. Como se observa en la figura 1, la infección en el humano por *E. histolytica* inicia por la ingestión de quistes cuadrinucleados que se encuentran en el agua o alimentos contaminados (Haque R., *et al.*, 2003). Una vez que el quiste llega al tracto gastrointestinal, éste se expone a diversas condiciones, como son: el pH ácido del estómago, cambios osmóticos, enzimas digestivas, lipasas, sales biliares y lípidos provenientes de la dieta del hospedero (Eichinger D, 2001a; Makioka A, *et al.*, 2006; Mitra BN, *et al.*, 2010). Se sugiere que estas condiciones, a través de interacciones hidrofóbicas podrían incrementar la permeabilidad de la pared del quiste, lo que ocasiona la liberación de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ , que alteran el equilibrio osmótico del quiste (Mitra BN, *et al.*, 2010). Finalmente, el quiste llega al íleon en donde ocurre el proceso de desenquistamiento, que consiste en la división del quiste cuadrinucleado que dará origen a ocho trofozoítos, que constituyen la forma invasiva de este parásito. Los trofozoítos a

través de la lectina específica galactosa/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc), se unen a la mucosa del colon, lo que puede conducir a la colonización asintomática (90% de las infecciones), a la colitis amebiana (en 10% de los individuos infectados) o la amibiasis extraintestinal invasiva, principalmente absceso hepático, que ocurre en el 10% de las personas con amebiasis extraintestinal invasiva, y con menos frecuencia el pulmón, cerebro, bazo y riñón (Haque R, *et al.*, 2003; Stanley SL Jr, 2003).

Alternativamente, bajo ciertas condiciones que aún no han sido determinadas con claridad, los trofozoítos se enquistan nuevamente y salen al ambiente a través de las heces y de esta manera contaminan nuevamente agua y alimentos, iniciándose nuevamente el ciclo biológico (Figura 1). (Eichinger D, 2001a; Haque R, *et al.*, 2003).

### **1.3 Características de trofozoítos y quistes.**

Como ya lo mencionamos, las dos entidades biológicas importantes en la infección por *E. histolytica* son el trofozoíto y el quiste, por lo que a continuación se describirán las características más relevantes de cada uno de ellos.

#### **1.3.1 Trofozoíto.**

El trofozoíto, es la fase invasiva de *E. histolytica* y mide entre 20–40  $\mu\text{m}$ , es polimórfico, lo cual se debe a la fluidez de su citoplasma, a la plasticidad de su membrana plasmática y a la capacidad de restructuración de su citoesqueleto. Estas características no solo le permiten moverse y desplazarse eficientemente formando proyecciones del citoplasma llamadas pseudópodos, sino que también son determinantes para su nutrición ya que participan en la captura de alimento mediante fagocitosis y pinocitosis (Chávez–Munguía B. y González– Robles A, 2013).

Los trofozoítos presentan un núcleo esférico que mide de 4 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. A diferencia de otras células eucariontes, el DNA ribosomal se localiza en la periferia nuclear, mientras que el DNA genómico se localiza en la posición central y aparentemente no se condensa para formar cromosomas típicos. Dentro del núcleo es frecuente observar un número variable de pequeñas esferas, denominadas esférulas nucleares, las cuales miden de 0.2–0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y al microscopio se observan refringentes, pero hasta la fecha se desconoce su función (Chávez–Munguía B. y González– Robles A, 2013).

En lo que respecta al citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica*, este presenta numerosas vacuolas limitadas por una membrana que poseen características moleculares

muy específicas para su función en el transporte de sustancias durante la fagocitosis y la pinocitosis, así como para la fusión de varias vacuolas a la membrana plasmática. También se encuentran abundantes gránulos de glucógeno y numerosos agregados en forma de bastón formados por ribosomas dispuestos helicoidalmente en donde se realiza la síntesis de las proteínas (Chávez–Munguía B. y González–Robles A, 2013).

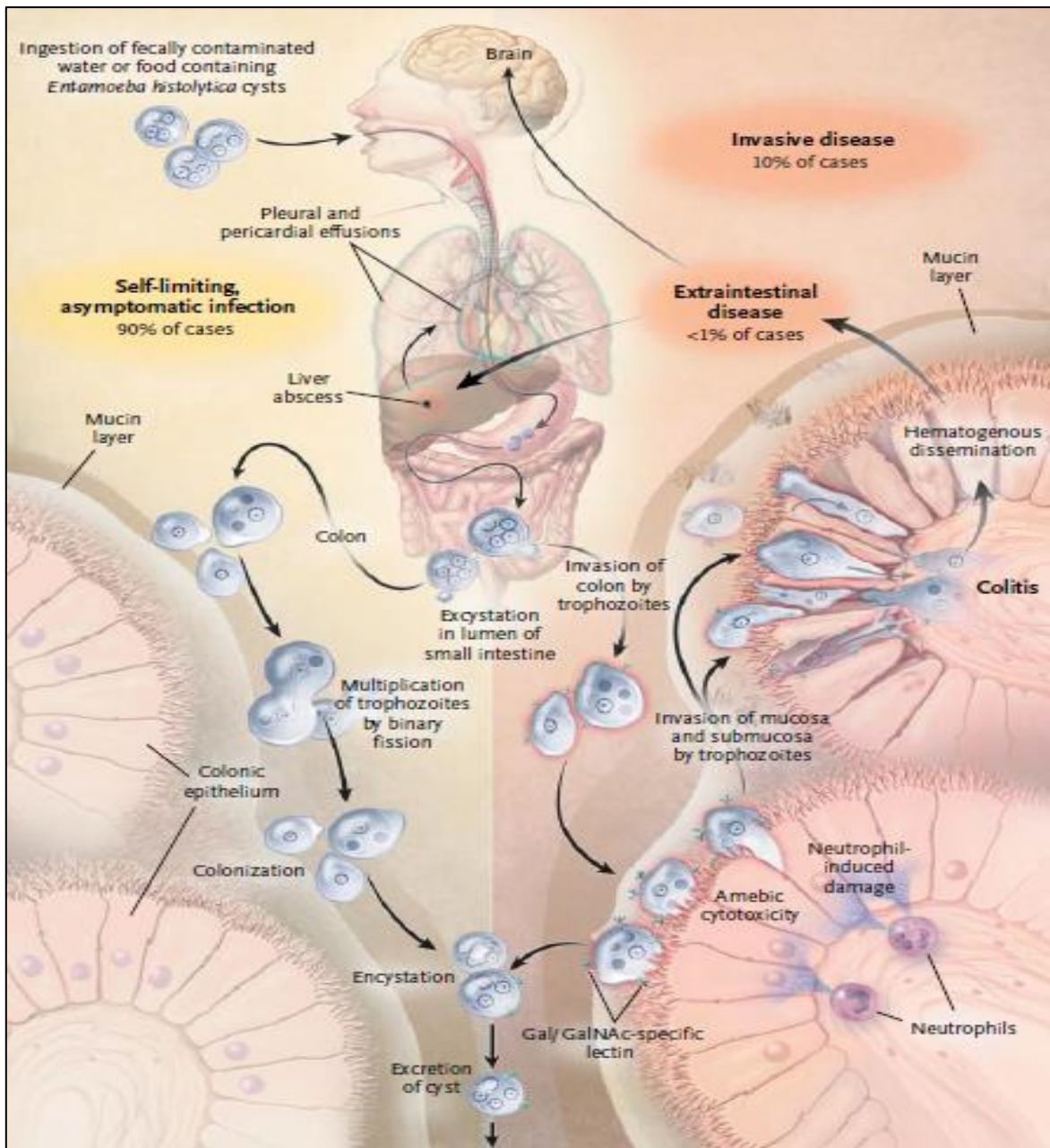


Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica* (Tomado de Haque R, *et al.*, 2003).

Respecto al citoesqueleto de este parásito, se han identificado los genes que codifican para las diferentes formas de la tubulina, miosina II, cadenas regulatorias y esenciales de miosina II, proteínas de los filamentos intermedios así como para la actina, las cuales están directamente relacionadas con la capacidad motriz e invasiva de los trofozoítos (Meza I, *et al.*, 2006).

#### **1.3.1.1 Mecanismo de invasión del trofozoíto de *E. histolytica*.**

El proceso de invasión que es llevado a cabo por los trofozoítos de *E. histolytica* es uno de los más elaborados entre los patógenos intestinales. La capa de mucina que recubre el epitelio del colon es el principal obstáculo para invadirlo, por lo que *E. histolytica* posee sofisticados mecanismos para penetrarla.

El primer paso para la invasión intestinal es el contacto y adhesión a las células del hospedero. En la adhesión participan moléculas especializadas de parásito llamadas adhesinas. La más estudiada es la lectina galactosa/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc), la cual se une a los residuos galactosa-N-acetil-D-galactosamina de las glicoproteínas de las células. (Haque R, *et al.*, 2003). La proteína nativa está compuesta por un heterodímero con un peso molecular de 260 kDa, formado por una cadena pesada (170 kDa) unida por un enlace disulfuro a la cadena ligera (35/31 kDa). La subunidad pesada de la Gal/GalNAc se compone de una pequeña cola citoplasmática, una parte anclada a la membrana y un gran dominio N-terminal extracelular rico en cisteína. La región citoplasmática tiene una gran identidad con secuencias de  $\beta$ 2-integrina, lo que aparentemente le concede un papel en la señalización de la actividad adhesiva de las lectinas. Por otro lado, la región rica en cisteína es esencial para la adherencia y la resistencia al complemento e incluye el sitio de unión al ligando de la lectina Gal/GalNAc. La subunidad ligera tiene dos isoformas, una de 35 kDa y otra de 31 kDa; esta última incluye la molécula de anclaje de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Mann BJ, 2002). Se han descrito otras moléculas en las amibas que están implicadas en la adherencia, y aunque menos estudiadas, también son importantes. Entre ellas están la lectina de 220 kDa que se une a la N-acetilglucosamina (Rosales-Encina JL. *et al.*, 1987) y la adhesina de 112 kDa, que posee actividad enzimática de cistein-proteasa, por lo que podría también participar en la degradación de moléculas durante la invasión a los tejidos (García-Rivera G, *et al.*, 1999).

Una vez que el trofozoíto se adhiere a la capa mucosa de las células epiteliales, se desencadena la secreción de una serie de proteínas entre las que se encuentran cistein-proteasas, que son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular, como

colágena, elastina, fibrinógeno, y laminina. También se secreta la proteína ameboporo, la cual constituye una familia de péptidos pequeños (5–30 kDa) contenidos en vesículas del citoplasma de las amibas que forman canales iónicos entre los fosfolípidos de la membrana celular del hospedero, lo que permite el paso de iones principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ , agua y moléculas pequeñas lo que altera el equilibrio osmótico de la célula del hospedero llevándola a su lisis. Por otra parte, la lisis celular también puede ser producida por la inducción de la apoptosis a través de la vía de las caspasas (Huston CD. *et al.*, 2000; Raiston K. y Petri WA Jr., 2011).

Las células caliciformes encargadas de la producción de la mucina agotan su capacidad de responder a la mucina destruida por los trofozoítos. Además *Entamoeba* secreta otras enzimas como la N-acetilglucosaminidasa que provoca la ruptura entre las células epiteliales para alcanzar el torrente sanguíneo lo que les permite, por una parte, fagocitar a los eritrocitos, lo que les asegura su fuente de hierro que es indispensable para su sobrevivencia, y por otro lado su diseminación a otros órganos como hígado o pulmón, para producir absceso hepático o pulmonar (Haque R. *et al.*, 2003; Stanley SL Jr. 2003; Olivos–García A. *et al.*, 2011).

Sin embargo, cuando las condiciones del medio ambiente no son muy propicias, el trofozoíto empieza a cambiar de forma; deja de emitir pseudópodos, se pierde la forma ameboide y se hace esférico, al tiempo que aparece una pared gruesa llamada pared quística (Petri WA Jr y Mann BJ., 1993). También es expulsado hacia el exterior todo el contenido de las vacuolas y empieza a formar material de reserva como vacuolas de glucógeno y barras cromatóides. El cambio de trofozoíto concluye con la formación de un quiste.

### **1.3.2 Quiste.**

El quiste es la fase infectiva de *E. histolytica* y presenta una estructura esférica que mide de 10–20  $\mu\text{m}$ . Durante el proceso de enquistamiento de la amiba se forma la pared del quiste, la cual le permite resistir el jugo gástrico, así como factores ambientales externos: temperatura, osmolaridad, desecación y concentraciones habituales de cloro en el agua. Se estima que el quiste sobrevive en un ambiente húmedo cuando la temperatura oscila entre 28–34°C durante una semana, y hasta un mes, si la temperatura es de 10°C (Romero–Cabello R. y Becerril–Flores MA. 2004; Campos JM. *et al.*, 2011).

La pared del quiste es una capa fibrosa que mide de 120–150  $\mu\text{m}$  de espesor y cuyo principal componente es la quitina, un polímero de carbohidratos formado por unidades de N–acetil–D glucosamina. Tradicionalmente se consideró a la pared quística como una estructura impermeable que mantenía aislado al quiste del medio exterior. Sin embargo, cuando los quistes son tratados con una solución que contiene rojo de rutenio, el cual es un colorante denso a los electrones, la pared se observa oscura debido al paso del colorante al interior, a diferencia de lo que se aprecia en los quistes no tratados con el colorante. Este hecho demuestra que la pared del quiste es permeable al agua y a partículas muy pequeñas, lo que les permite mantener el mínimo de humedad e intercambio selectivo necesario para su supervivencia (Chávez–Munguía B. y Martínez–Palomo A. 2011).

En el citoplasma del quiste se observan de 1 a 4 núcleos dependiendo de su grado de madurez. La población de vacuolas es notablemente menor que en los trofozoítos. Destacan también uno o varios agregados de polirribosomas dispuestos ordenadamente y de apariencia cristaloides, denominados cuerpos cromatoides. Estos agregados no están limitados por una membrana y por su tamaño no son fácilmente visibles al microscopio óptico (Chávez–Munguía B. y Martínez–Palomo A. 2011).

Como ya se mencionó la pared del quiste le confiere resistencia y es el vehículo para infectar nuevos hospederos, es por ello que las proteínas que lo constituyen han sido objeto de amplio estudio. De esta manera en el 2012 mediante estudios de proteómica realizados por Ali y cols., se identificaron 417 proteínas únicas aisladas de quistes provenientes de personas infectadas por *E. histolytica*. De estas, solo 195 fueron exclusivas de dicha etapa. De las 195 proteínas identificadas, 77 tienen función desconocida, mientras que el resto de las proteínas (118 restantes) incluyen proteínas cinasas, GTPasas, proteínas de recubrimiento y/o tráfico vesicular, de reparación del DNA y algunas otras relacionadas a la transcripción/traducción. Cabe destacar que entre las proteínas identificadas se encuentran 4 proteínas específicas de la pared quística: Jacob, Jessie, quitinasa y quitina sintasa. Por lo que estas han sido objeto de amplio estudio con el propósito de entender los mecanismos que regulan la expresión de cada una de ellas, así como su participación en la formación del quiste (Ali IK. *et al.*, 2012).

Debido a que el quiste constituye la etapa infectiva, es que resulta de gran interés para el diseño de alguna droga o vacuna que inhiba su formación y en consecuencia, la



diseminación de la enfermedad, es por ello que de aquí en adelante nos enfocaremos a hablar más ampliamente de esta fase del ciclo de vida de *E. histolytica*.

### **1.3.2.1 Principales componentes de la pared del quiste**

A partir de 1978, año en el que Diamond LS., describió el medio TYI-S-33 para el cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica* se ha avanzado en el conocimiento de la biología celular y molecular de los trofozoítos, pero no así para los quistes y su proceso de formación (Diamond LS. *et al.*, 1978).

*E. histolytica* no se enquista fácilmente en cultivos axénicos, mientras que *Entamoeba invadens*, un patógeno de reptiles, se enquista fácilmente *in vitro*, además que en los reptiles este parásito desarrolla un ciclo de vida similar al de *E. histolytica* en el humano, por lo que se ha utilizado como modelo de estudio para investigar los probables mecanismos celulares y moleculares que desencadenan la formación del quiste (Eichinger D., 1997).

Estudios de difracción de rayos X y de unión a lectinas, muestran que la quitina es el principal componente de la pared quística de *E. histolytica* y de *E. invadens* (Arroyo-Begovich A., *et al.*, 1980, 1982). Asimismo, mediante espectrometría de masas realizada a partir del aislamiento de la pared del quiste de *E. invadens*, se ha identificado que, además de quitina, también contiene 3 familias de lectinas, que son la quitinasa, y las proteínas Jessie y Jacob, las cuales se caracterizan por contener uno o más dominios de unión a quitina (CBD's) ricos en Cys que son exclusivos de *Entamoeba* y que sólo se expresan durante la etapa de enquistamiento de *E. invadens* (Frisardi M., *et al.*, 2000; Van Dellen KL. *et al.*, 2002). También posee dos enzimas más que son la quitina sintasa, (encargada de la síntesis de quitina) y quitina desacetilasa (encargada de las modificaciones de la quitina generando quitosan); todas ellas, junto con la quitinasa, comparten un ancestro común con las enzimas de *Saccharomyces* (de la Vega H., *et al.*, 1997; Van Dellen KL., *et al.*, 2006, Das S. *et al.*, 2006; Dey T. *et al.*, 2009).

### **1.3.2.2 Mecanismo propuesto para la formación del quiste.**

En base al conocimiento de los diferentes componentes de la pared del quiste, en el 2009 el grupo de Chatterjee y cols., propuso un modelo conocido como “*wattle and daub*”, en donde se sugiere que la pared del quiste se forma en tres fases: “fundación”, “*wattle*” y “*daub*”.

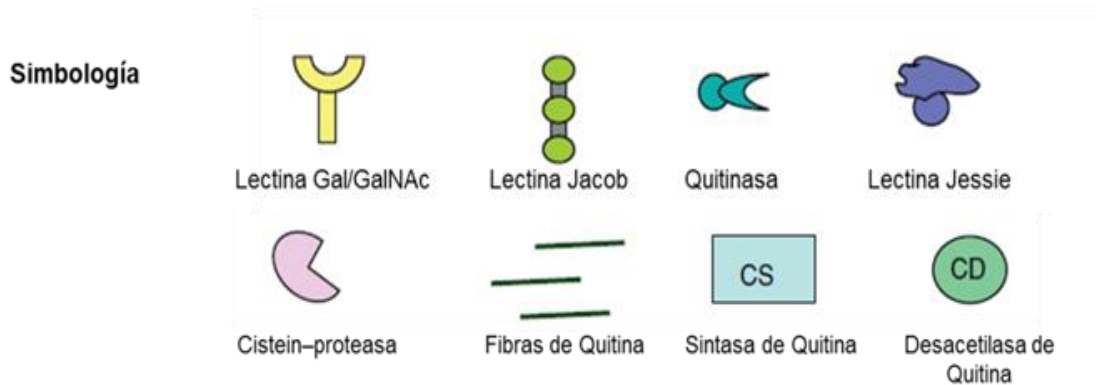
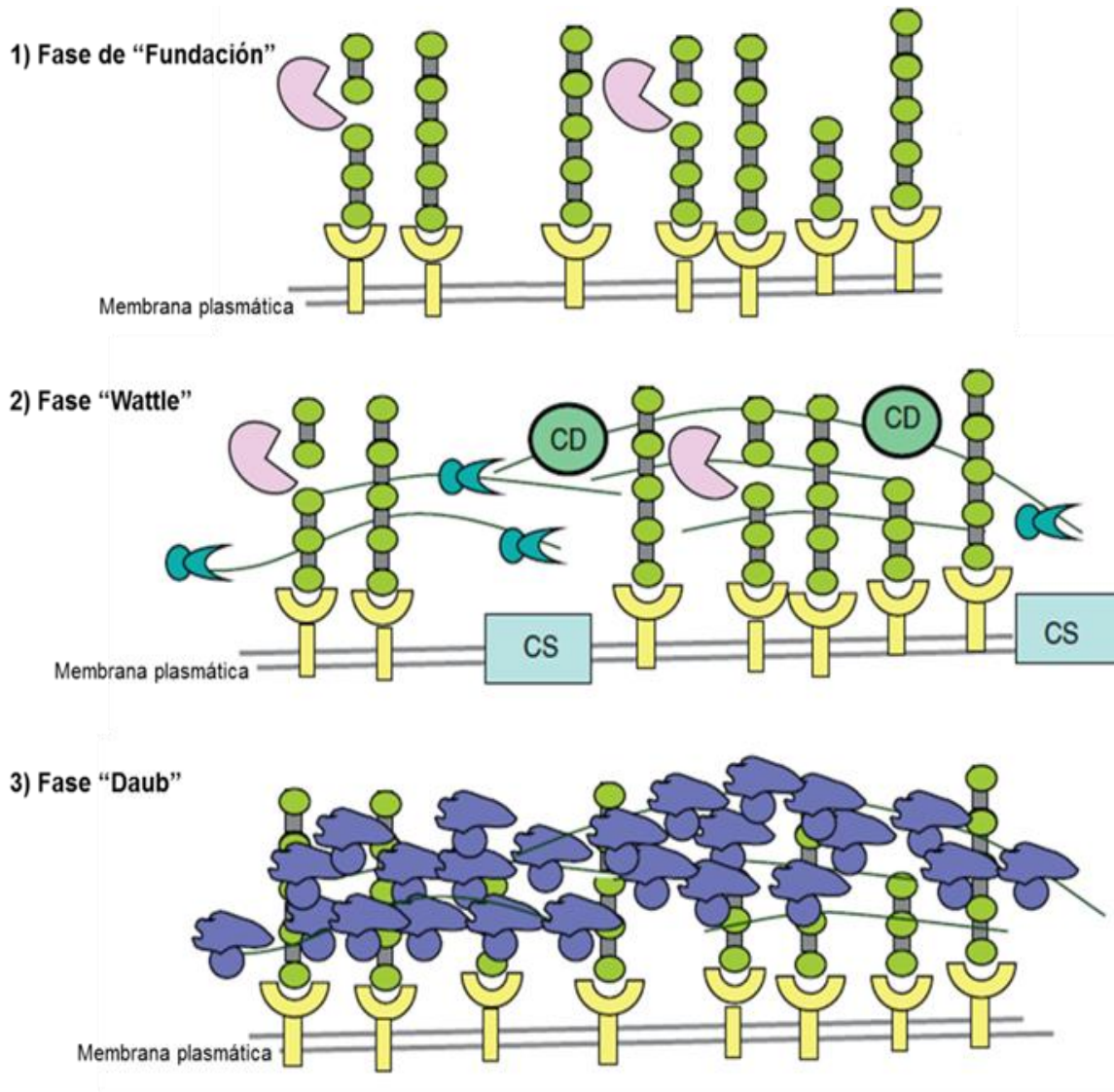
Durante la fase de “fundación”, las lectinas Jacob, se unen a la superficie de la membrana plasmática de la ameba a través de las lectinas Gal/GalNAc expresadas constitutivamente (Figura 2, inciso 1).

En la fase “wattle”, las fibras de quitina recién sintetizadas que están localizadas en pequeñas vesículas, se movilizan a la membrana plasmática y se entrecruzan con las lectinas Jacob que son sintetizadas en la etapa temprana del enquistamiento en vesículas distintas a las que contienen a la quitina (Figura 2, inciso 2).

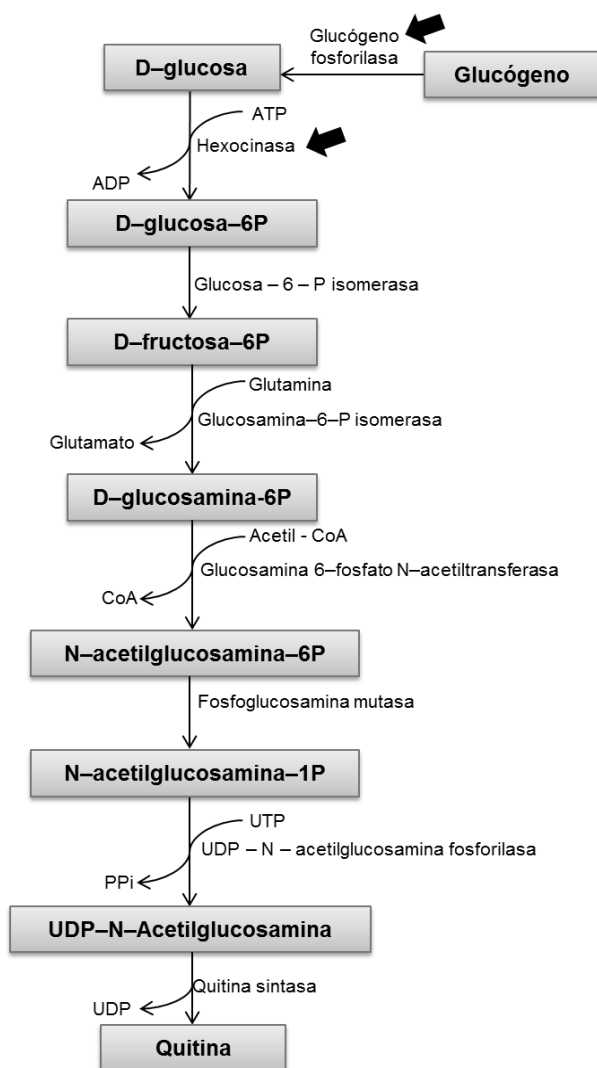
En la fase “daub”, las lectinas Jessie que son sintetizadas en etapa tardía del enquistamiento, se unen a las fibras de quitina a través del dominio “daub” promoviendo su auto-agregación. Una vez que ocurre esta auto-agregación la pared se vuelve impermeable al paso de moléculas (Figura 2, inciso 3).

La formación de la pared del quiste es un proceso complejo que implica múltiples reacciones acopladas en una vía enzimática tanto en *E. histolytica* como en *E. invadens*. Se conoce que el glucógeno almacenado es el principal recurso de glucosa, tanto en el trofozoíto como en el quiste, y la degradación del glucógeno es uno de los principales recursos de glucosa para producir energía, así como para la síntesis de quitina durante el enquistamiento de *Entamoeba* (Samanta SK. y Ghosh SK., 2012). La síntesis de quitina a partir de glucógeno inicia con la participación de la enzima glucógeno fosforilasa, la cual actúa hidrolizando al glucógeno lo que permite la generación de moléculas de D-glucosa, la cual posteriormente es sustrato para la enzima hexocinasa, la cual transfiere un grupo fosfato para convertirla en D-glucosa-6-fosfato. Esta molécula es transformada a D-fructosa-6-fosfato por la enzima Glucosa – 6-fosfato– isomerasa o Gln6Pi. Esta reacción enzimática limita la tasa de síntesis de la quitina pues ha sido demostrado mediante el uso de un siRNA dirigido contra Gln6Pi que la cantidad de quitina producida en las células en donde Gln6Pi es silenciada se reduce de un 62 – 64% en comparación con las células control (Aguilar – Díaz, H. *et al.*, 2012; Samanta SK, y Ghosh SK., 2012), lo que indica que la enzima Gln-6-Pi es clave para la biosíntesis de quitina en *Entamoeba*. La cascada enzimática continúa con la actividad secuencial de cuatro enzimas más, de las cuales la UDP-GlcNAc pirofosforilasa es la enzima limitante de la velocidad regulada alostéricamente por la glucosamina-6-fosfato. Finalmente, la vía se completa con la polimerización de GlnNAc y la formación de

quitina por la actividad de una sintasa de quitina de la familia  $\beta$ -glucosil-transferasa (Aguilar-Díaz H. *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Modelo de "wattle and daub" propuesto para la formación de la pared del quiste de *Entamoeba*. (Tomado de Chatterjee A. *et al.*, 2009; Samuelson J. y Robbins P., 2011)



**Figura 3.** Vía de síntesis de quitina propuesta para *E. invadens*. (Tomado de Samanta SK. y Ghosh SK., 2012).

### 1.3.2.3 Estímulos que inducen el enquistamiento de *Entamoeba*.

En algunos protozoarios el enquistamiento *in vitro* se logra por la exposición de cultivos axénicos a condiciones que mimetizan los factores del microambiente que disparan este proceso. Sin embargo, en el caso de *E. histolytica* es difícil la transformación a quistes por estos tratamientos por lo que la mayoría de las investigaciones encaminadas a dilucidar los probables mecanismos que desencadenan este proceso se han realizado en el parásito de reptil *E. invadens*, en donde el enquistamiento *in vitro* puede ser inducido mediante choque osmótico (Bailey GB. y Rengypian S., 1980), la eliminación de las fuentes de carbono como la glucosa en el medio de cultivo (Vázquezdelara-Cisneros LG. y Arroyo-Begovich A., 1984) o la combinación de ambas condiciones (Avron B. *et al.*, 1986). Sin embargo, los altos niveles de formación de quistes requieren de la adición de 5% de suero y de la glicoproteína mucina, que actúa como un ligando para la lectina de membrana de

*Entamoeba* y estimula la agregación de los trofozoítos (Eichinger D., 2001b). Este fenómeno ocurre de manera dosis–específica, ya que altas concentraciones de mucina pueden inhibir la agregación y enquistamiento. También se ha observado que se puede prescindir del requerimiento de mucina mediante el tratamiento con agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos como las catecolaminas: epinefrina y norepinefrina; aunque la función de estas moléculas en la regulación del enquistamiento aún no ha sido establecida (Coppi A. *et al.*, 2002; Jeelani G. *et al.*, 2012).

Información sobre las vías de transducción de señales que conducen a la activación de los genes relacionados con el enquistamiento es escasa. Hasta ahora, solo la transducción de la señal derivada de la activación de la lectina Gal– $\beta$ 1 y el receptor adrenérgico de catecolaminas se han asociado con el enquistamiento de *E. invadens*. Este parásito expresa una lectina similar a la de *E. histolytica* en su superficie. Aunque se presume que la lectina Gal/GalNAc posee funciones de señalización transmembranal debido a que cuenta con una secuencia de  $\beta$ 2–integrina en el dominio citoplásmico de su subunidad pesada, moléculas de señalización río abajo de la lectina Gal/GalNAc no han sido dilucidadas. Sin embargo, los estudios de enquistamiento con el receptor de catecolaminas usando agonistas y antagonistas además del ligando para Gal/GalNAc, sugiere la participación de la adenilato ciclasa y AMPc como segundos mensajeros que participan en esta señalización. Este estudio también sugiere una interacción funcional entre los dos receptores (lectina Gal/GalNAc y catecolaminas), ya que en un modelo de inducción del enquistamiento, ellos observaron que la depleción de la capa de *mucus*, conduce a una concentración crítica de la mucina lo que conlleva a que se forme un “cluster” de la lectina Gal/GalNAc sobre la superficie del trofozoíto. Este “clustering” de la lectina y la subsecuente unión de la catecolamina (epinefrina) por el trofozoíto sugiere que dispara el proceso de enquistamiento (Eichinger D. 2001b; Coppi A. *et al.*, 2002).

En lo que respecta al enquistamiento en *E. histolytica*, a través de diversos intentos de enquistamiento se han logrado obtener estructuras denominadas “cyst–like” que se semejan en algunas características a las de los quistes excretados en las heces de humanos infectados. Algunos de ellos se han obtenido a partir de trofozoítos expuestos a cationes divalentes como  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Ca^{2+}$ ; los quistes obtenidos bajo estas condiciones presentan una morfología uninucleada y además expresan la sintasa de quitina y altos niveles de GlcNAc (Campos–Góngora E. *et al.*, 2000; Said–Fernández S. *et al.*, 2001).

Estructuras “cyst-like” con 2–3 núcleos se han obtenido mediante co-cultivos de *E. histolytica* con enterobacterias (*E. coli* y *Enterococcus faecalis*), en conjunto con una alta tensión de CO<sub>2</sub> en un medio que contiene histamina (Barrón–González MP., *et al.*, 2008). Recientemente, la inducción de “cyst-like” que poseen de 2 a 4 núcleos, positivos a quitina y resistentes a detergentes, se logró mediante la exposición de trofozoítos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y trazas de cationes divalentes (Aguilar–Díaz H. *et al.*, 2010). Sin embargo, cómo estos estímulos permiten el encendido de genes implicados en el enquistamiento de *Entamoeba* continúa siendo una pregunta sin resolver.

#### **1.3.2.4 Rutas metabólicas involucradas en la formación del quiste.**

Además del metabolismo de la glucosa para la síntesis de quitina, un análisis del perfil metabólico de los quistes de *E. invadens* realizado por Jeelani y cols., 2012, permitió la identificación de más de 100 metabolitos intermedios entre los que se incluyen aminoácidos, nucleótidos, precursores biosintéticos e intermediarios del metabolismo del carbono, lo que sugiere que existen otras rutas metabólicas que se encuentran activas durante el enquistamiento. En este trabajo se encontró que durante el enquistamiento de *E. invadens* existe una disminución de las reservas de todos los aminoácidos, excepto alanina, lo que sugiere que, cuando la glucosa es empleada para la síntesis de quitina, varios aminoácidos pueden ser utilizados como un recurso alternativo de fuentes de carbono. Además, la expresión de la enzima aspartato aminotransferasa (ASAT) incrementó hasta 400 veces durante el enquistamiento, lo que indica que la asparagina así como el aspartato podrían ser usados como recurso de fuentes de carbono cuando la glucosa no está disponible. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que se ha reportado que estos aminoácidos, además de la arginina, son empleados como fuentes de carbono por otros protistas en condiciones anaeróbicas (Zuo X. y Coombs GH., 1995; Jeelani G. *et al.*, 2012).

Consistente con la disminución de los intermedios glucolíticos y de aminoácidos, el contenido de energía de la célula se reduce drásticamente durante el enquistamiento de *E. invadens*, ya que se observó una disminución en los niveles de nucleótidos (ATP, GTP, UTP, CTP). La reducción de los niveles de nucleótidos fue consistente con lo previamente observado en *Escherichia coli* en donde las reservas de nucleótidos disminuyen continuamente a medida que las células se movilizan de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento (Buckstein MH. *et al.*, 2008; Jeelani G. *et al.*, 2012).

Otra ruta metabólica que se encuentra disminuida durante el enquistamiento de *E. invadens* es la de las poliaminas, las cuales desempeñan funciones importantes en la estabilización de las membranas celulares, crecimiento y diferenciación celular, así como en la adaptación a condiciones de estrés tales como: temperatura, osmolaridad y pH (Jeelani G. *et al.*, 2012). En este trabajo observaron que los niveles de poliaminas alifáticas como putrescina, espermidina y espermina, se encuentran disminuidos, lo que sugiere que éstas son utilizadas por *E. invadens* durante el enquistamiento.

Un resultado inesperado fue el incremento en los niveles de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en las etapas tardías del enquistamiento de *E. invadens* (aproximadamente 48 a 120 h). Este incremento de GABA correlacionó con la disminución de aminoácidos, específicamente glutamato que es blanco de la enzima glutamato descarboxilasa y que genera como producto final GABA. Por otra parte, GABA puede ser sintetizado por otra vía alterna que implica el uso de N-acetilputrescina, lo que también correlaciona con la disminución de los niveles de esta poliamina durante el enquistamiento, aunque aún se desconoce el papel que juega GABA durante este proceso (Jeelani G. *et al.*, 2012).

Por otra parte, se sabe que las aminas biogénicas juegan un papel importante en la fisiología normal de los mamíferos, así como en la proliferación y diferenciación celular. Este grupo de investigadores observaron que los niveles de cadaverina, isoamilamina e isobutilamina se incrementan en la etapa temprana del enquistamiento (0.5–8 h) y disminuyen a medida que va ocurriendo la formación del quiste, lo que sugiere que estas moléculas juegan un papel importante al principio del enquistamiento de *E. invadens*. También se ha sugerido que el enquistamiento es inducido por CO<sub>2</sub>, por lo tanto, es probable que el CO<sub>2</sub> liberado durante la formación de aminas biógenas, participe en el proceso de la inducción del enquistamiento (Jeelani G. *et al.*, 2012).

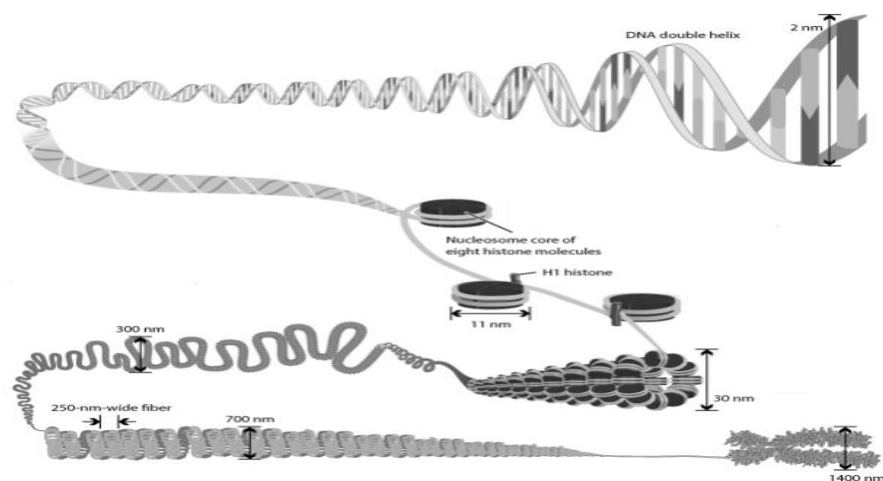
Si bien hasta aquí se ha presentado un panorama de las rutas metabólicas, estímulos y mecanismos celulares que se sugieren disparan el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, Sin embargo, hasta la fecha se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes implicados en este proceso, pero existen algunos datos que sugieren que mecanismos epigenéticos como modificación de las histonas podrían participar en regular el enquistamiento de este protozoario; pero antes trataremos de explicar de qué manera la cromatina regula la expresión de genes.

#### 1.4 La cromatina como reguladora de la expresión de genes.

Las células eucariontes han desarrollado un eficiente mecanismo de empaquetamiento que le permite acomodar grandes cantidades de información genética contenida en el DNA (el cual tiene un tamaño aproximado de 2 m de largo) dentro del núcleo cuyo diámetro es de 6  $\mu\text{m}$ . Es por esta razón que el DNA debe organizarse en diferentes niveles de compactación entre los que se encuentra inicialmente la fibra de 10 nm cuya unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, el cual está constituido por dímeros de las cuatro proteínas básicas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) formando el *core* nucleosomal sobre el cual se asocian aproximadamente 146 pares de bases de DNA. El segundo nivel de compactación lo constituye la fibra de 30 nm o solenoide que está compuesta por grupos de nucleosomas empaquetados uno sobre otro adoptando disposiciones regulares gracias a la acción de la histona H1 o histona *linker* la cual se une al DNA que se localiza entre nucleosomas adyacentes. La fibra de 30 nm a su vez se encuentra anclada a la matriz nuclear formando bucles con un tamaño promedio de entre 50-100 Kpb de DNA. Después estos bucles se pliegan y súper enrollan alcanzando un índice de condensación de  $1.2 \times 10^4$  con respecto al DNA desnudo. Finalmente, continúa aumentando el empaquetamiento hasta obtener los cromosomas que se observan en la metafase, siendo éste el máximo nivel de compactación que puede alcanzar el DNA (Figura 4) (Annunziato, A., 2008; Kalverda B. *et al.*, 2008; Glatt, S. *et al.*, 2011).

Si bien este empaquetamiento soluciona el problema de espacio dentro del núcleo, el grado de compactación que tiene el DNA se convierte en un impedimento para que se lleven a cabo los procesos de replicación, reparación y transcripción del DNA ya que la compactación no deja accesibles las secuencias de DNA que deben ser reconocidas por factores en *trans* para que se lleven a cabo estos procesos. Por esto, la célula ha desarrollado una serie de mecanismos epigenéticos que permiten a la cromatina adquirir una naturaleza dinámica que le permite pasar de un estado muy compacto (heterocromatina) a un estado más relajado (eucromatina) y de esta manera regular la expresión de genes. Los elementos que participan en esta regulación son básicamente seis: 1) la metilación del DNA, 2) las modificaciones post – traduccionales de las histonas, 3) variantes de histonas, 4) el posicionamiento de los nucleosomas por complejos remodeladores de la cromatina ATP–dependientes, 5) la arquitectura nuclear y 6) los RNA no codificantes. A continuación, se describirán 2 de estos mecanismos que son las modificaciones post–traduccionales de las histonas, específicamente de la acetilación/desacetilación de histonas, así como la arquitectura nuclear.





**Figura 4:** Niveles de compactación de la cromatina en células eucariotas. (Tomado de Annunziato, A., 2008).

### 1.5 Modificaciones post-traduccionales de las histonas.

Las histonas se caracterizan por tener un elevado contenido de aminoácidos básicos, lo que les permite una buena interacción con la carga negativa del DNA. Cada histona está constituida por un extremo carboxilo (COOH) terminal a través del cual se llevan a cabo las interacciones histona–histona e histona–DNA, y por un extremo NH<sub>2</sub> terminal de un tamaño de 25–40 residuos, rico en lisinas que sale del nucleosoma. Estos extremos NH<sub>2</sub> son sensibles a proteasas y comprenden entre el 25 – 30% de la masa individual de las histonas, proporcionando una superficie susceptible para interactuar con otras proteínas como es el caso de los complejos modificadores de las histonas, los cuales incluyen enzimas que pueden adicionar o remover residuos específicos entre los que se encuentran: fosforilación de serinas (S), treoninas (T) y tirosinas (Y), metilación y deiminación de argininas (R), isomerización de prolinas, glicosilación de serinas (S) y treoninas (T), metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP ribosilación, crotonilación de lisinas (K), entre otras (Rothbart, SB. y Strahl BD., 2014). Se ha demostrado que estas modificaciones post-traduccionales (PTMs) sobre el extremo NH<sub>2</sub> terminal las histonas, son importantes ya que influyen en los contactos histona–histona e histona DNA y por lo tanto en los niveles de compactación y descompactación de DNA (Strahl BD. y Allis CD. 2000; Huang, H *et al.*, 2014).

Hasta el momento, al menos 100 PTMs han sido identificadas en una posición única en las 4 histonas (Tabla I y Figura 5). Esta gran cantidad de modificaciones originan un enorme potencial de respuestas confiriéndole a la cromatina propiedades dinámicas. Sin embargo, es importante recordar que no todas estas PTMs se encontrarán presentes ni en el mismo residuo, ni en la misma histona al mismo tiempo, ya que se ha visto que el tiempo de aparición dependerá de las condiciones de la célula (Rothbart, S., Strahl B., 2014; Huang,

H., *et al.*, 2014). Sin embargo, de todas las modificaciones post – traduccionales, me concentraré para fines de este trabajo en la acetilación y desacetilación de las histonas.

### 1.5.1 Acetilación

Esta PTM es la más estudiada, ya que ha sido demostrada su clara relación con la actividad transcripcional. La adición de grupos acetilo en el extremo NH<sub>2</sub> de las histonas conduce a la neutralización de la carga positiva de las histonas debilitando su interacción con el DNA, lo que conduce a que el DNA ahora quede más accesible para que se unan sus proteínas blanco. Las proteínas encargadas de llevar a cabo la acetilación han sido denominadas acetil-transferasa de histonas o HATs (por sus siglas en inglés), las cuales transfieren el grupo acetilo de la acetil-coenzima A que funge como grupo donador, hacia las lisinas ubicadas en los extremos NH<sub>2</sub>-terminal de las cuatro histonas (Bannister, A., Kouzarides, T., 2011).

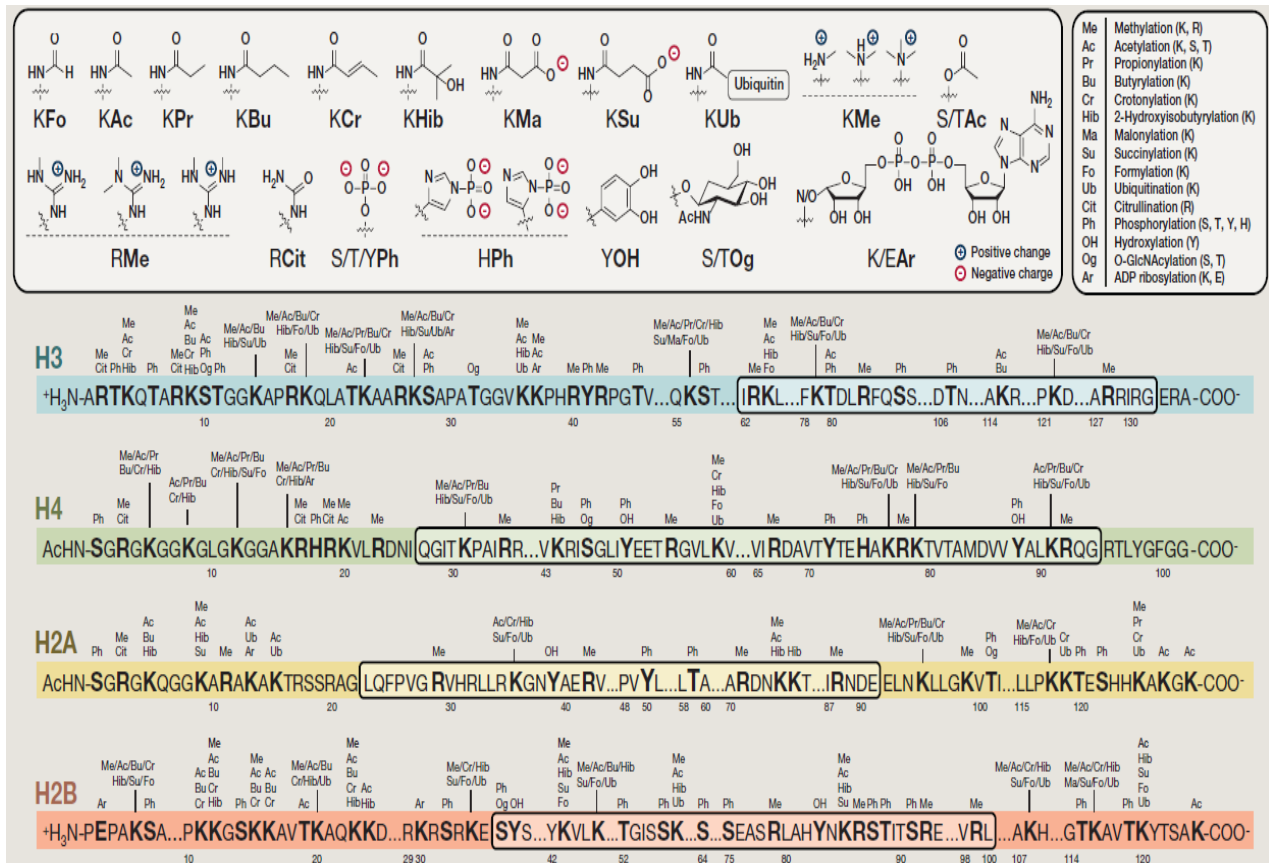


Figura 5: Modificaciones post – traduccionales descritas para las histonas H2A, H2B, H3 y H4. (Tomado de Huang, H. *et al.*, 2014)

**Tabla I.** Diferentes clases de modificaciones post – traduccionales que ocurren sobre el extremo NH<sub>2</sub> de las histonas.

Modificación post – traduccional	Residuos susceptibles de modificación	Funciones que regulan
Acetilación	Lisinas (K-ac)	Transcripción, reparación, replicación, condensación
Metilación	Lisinas (K-me1, K-me2, K-me3)	Transcripción, reparación
	Argininas (R-me1, R-me2a, R-me2s)	Transcripción
Fosforilación	Serinas (S-ph), Treoninas (T-ph), Tirocinas (Y-ph)	Transcripción, reparación, condensación
Ubiquitinación	Lisinas (K-ub)	Transcripción, reparación
Sumoilación	Lisinas (K-su)	Transcripción
ADP ribosilación	Lisinas (K-ADPr), Ácido glutámico	Transcripción, reparación
Crotonilación	Lisinas (K-cr)	Transcripción
Deiminación	Argininas (R-cit)	Transcripción
Glicosilación	Serinas (S-OGlcNAC), Treoninas (T-OGlcNAC)	Transcripción
Isomerización	Prolina (P-cis, P-trans)	Transcripción

Las HATs pueden ser clasificadas de acuerdo con la especificidad por su sustrato ya sea por acetilar a las histonas libres o histonas que se encuentran formando parte del nucleosoma, o bien por su localización celular. Estas últimas han sido agrupadas en dos familias: las HATs tipo A y HATs tipo B. Las HATs tipo B se localizan en el citoplasma y presentan homología con Hat1 de *S. cerevisiae* y son las encargadas de acetilar a las histonas recién sintetizadas en el citoplasma en las lisinas 5 y 12 de la histona H4 (H4K5ac, H4K12ac), este patrón de acetilación en esta histona es importante para su deposición en el nucleosoma. En lo que respecta a las HATs tipo A son las más diversas y pueden ser clasificadas dependiendo de la homología que presenten en su secuencia en al menos tres familias: las Gcn5/PCAF, las MYST y las CBP/p300. Si bien todos los miembros de estas familias son capaces de acetilar histonas organizadas en nucleosomas, cada una de ellas tiene preferencia por diferentes sustratos y contiene dominios característicos. En el caso de las HATs que pertenecen a la familia Gcn5 contienen un bromodominio en su extremo COOH-terminal que les permite asociarse a lisinas acetiladas. Mientras que el dominio HAT responsable de la acetilación se encuentra hacia el extremo NH<sub>2</sub> terminal y está constituido por aproximadamente 160 residuos, siendo la lisina 14 de la histona H3 (H4K14) así como la lisina 8 y 16 de la histona H4 (H4K8, H4K16) sus residuos blancos. Por otro lado, la familia MYST contiene un cromodominio en su extremo NH<sub>2</sub> terminal que reconoce lisinas metiladas y tienen preferencia por acetilar a la histona H4. La familia CBP/p300 si bien durante mucho tiempo se pensó que no presentaba especificidad por algún sustrato, recientemente se ha identificado que son capaces de acetilar a las histonas H3 y H4 en un contexto nucleosomal. Esta familia contiene un dominio catalítico de aproximadamente 500 aa, un bromo dominio localizado en la región NH<sub>2</sub> terminal y tres dominios ricos en cisteínas,

los cuales se sugiere podría facilitar las interacciones proteína-proteína (Biel M. *et al.*, 2005; Marmorstein R. y Zhou MM. 2014; Salah Ud-Din AI. *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la acetilación de las histonas ha sido asociada con activación transcripcional. Sin embargo, para que las HATs participen en este proceso requieren además de su actividad enzimática la capacidad de interactuar de manera específica con otras proteínas constituyendo complejos multiprotéicos que permiten incrementar su actividad enzimática para modificar la estructura de la cromatina y así permitir la expresión de genes que anteriormente estaban reprimidos.

### **1.5.2 Desacetilación.**

De manera contraria a la acetilación, la desacetilación es llevada a cabo por desacetilasas de histonas o HDACs; esta modificación favorece la represión transcripcional al remover los grupos acetilo de los extremos NH<sub>2</sub> terminal de las histonas permitiendo el reestablecimiento de la carga positiva de las histonas y por consiguiente las interacciones entre las histonas y el DNA, lo que resulta en la compactación de la cromatina, por lo que se dice que la desacetilación está asociada con represión transcripcional. En general, las HDACs presentan una baja especificidad por un substrato y una sola enzima es capaz de desacetilar múltiples residuos dentro de una histona (Bannister A. y Kouzarides T., 2011).

Hasta la fecha se han identificado 4 clases de HDACs (New M. *et al.*, 2012; Seto E y Yoshida M., 2014). Las HDACs de la clase I presentan un solo dominio catalítico el cual se encuentra en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína y están constituidas por aproximadamente 380-500 aa. Este grupo incluye a las proteínas HDAC 1, 2, 3 y 8, de las cuales la HDAC 3 no sólo se ha encontrado en el núcleo sino también en citoplasma. Las HDACs de la clase II incluyen a las HDAC 4, 5, 6 y 7. Estas proteínas son más grandes (1000-1215 aa) y su dominio catalítico se encuentra hacia el extremo COOH-terminal. La HDAC 6 es la única HDAC con dos dominios catalíticos uno hacia el extremo NH<sub>2</sub>-terminal y otro en el COOH-terminal, lo que sugiere una función distinta a la de los miembros de esta familia (Hassig CA, Schreiber SL, 1997; de Ruijter AJ. *et al.*, 2003; New M. *et al.*, 2012; Seto E. y Yoshida M., 2014).

Otro grupo de HDAC denominadas sirtuinas por presentar homología con el Complejo Proteico Reguladores de la Información Silenciada – 2 (Sir2) en levadura, han sido descubiertas recientemente. Originalmente fueron descritas como deacetilasas de histonas

que requieren como cofactor enzimático a nicotinamida adenina dinucleotido (NAD<sup>+</sup>), por lo que son consideradas HDACs de la clase III en eucariontes. Además de la actividad enzimática de HDAC, estas proteínas poseen actividad de ADP – ribosil transferasa. Debido a la utilización de NAD<sup>+</sup> como cofactor. Además, su regulación está dada bajo condiciones de estrés, también se ha sugerido que podrían participar como sensores del metabolismo y balance de energía que permite coordinar y mantener la integridad del genoma (Bosch–Presegué L. y Vaquero, A., 2014). Estas sirtuinas se encuentran presentes desde bacterias hasta organismos evolucionados con un alto grado de conservación del dominio catalítico el cual está constituido por aproximadamente 260 aa entre las diferentes especies en donde han sido identificadas (Frye RA, 2000).

Las sirtuinas se han clasificado en 5 clases (I, II, III, IV y U) basadas en un análisis filogenético a partir de las 60 sirtuinas identificadas en diferentes organismos (Frye RA, 2000). En humanos, se han descrito 7 sirtuinas (SIRT1 – 7) las cuales presentan una variabilidad en tamaño que va de 300-750 aa y el dominio de actividad catalítica se encuentra hacia el extremo NH<sub>2</sub> terminal. Además, todas ellas muestran una localización celular diferente: SIRT1 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma, SIRT2 se localiza preferentemente en el citoplasma, aunque también se encuentra en el núcleo en la fase G2/M del ciclo celular. SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se localizan en la mitocondria, SIRT6 es principalmente nuclear y SIRT7 se localiza en el nucléolo (Houtkooper, R., *et al*, 2012; Bosch – Presegué L. y Vaquero, A., 2014; Seto E y Yoshida M., 2014)

Debido a su diversa localización dentro de la célula, se sabe que las sirtuinas tiene múltiples blancos tanto histónicos como no histónicos. En el caso de los sustratos histónicos identificados en humanos, se sabe que cada sirtuina ha desarrollado una especificidad por ciertas marcas de acetilación. Respecto a SIRT1, posee una fuerte actividad de desacetilasa *in vitro* sobre la H4K16ac y H3K9ac, dos marcas altamente conservadas en eucariontes. Ensayos de RNAi para SIRT1 mostraron que en estos organismos se observa un incremento en la acetilación, así como la pérdida de marcas de heterocromatina tales como H3K9me2 y H4K20me1, por lo que esto sugiere que SIRT1 coordina la formación de heterocromatina y por lo tanto promueve el silenciamiento de genes (Vaquero A. *et al.*, 2004; Bosch-Presegué L, Vaquero A., 2015).

En el caso de SIRT2, esta proteína específicamente desacetila H4K16ac y aunque en este caso no participa en la formación de heterocromatina, si es importante para el control del

ciclo celular, pues la desacetilación de H4K16ac es un prerrequisito para que ocurra la mitosis (Vaquero A., *et al.*, 2006). Para SIRT6 se ha visto que también lleva a cabo la desacetilación de H3K9ac la cual es importante para el mantenimiento de la estructura de los telómeros y la reparación del daño al DNA (Michishita E., *et al.*, 2008; McCord RA. *et al.*, 2009). Respecto a SIRT7, se sabe que es la responsable de la desacetilación de H3K18ac en las regiones promotoras de genes supresores de tumores generando estados de represión transcripción que conllevan a la estabilización del fenotipo de las células cancerosas (Barber, MF., *et al* 2012).

También se han identificado como blanco de las sirtuinas a la histona H2A, como es el caso de SIRT1 que en cáncer de próstata participa en la degradación de la variante de histonas H2A.Z quien está asociada a activación transcripcional, lo que sugiere que las sirtuinas pueden regular la formación del core de histonas (Baptista T. *et al.*, 2013).

Las sirtuinas también actúan sobre sustratos no histónicos, entre los que se han encontrado diferentes factores de transcripción, proteínas implicadas en el ciclo celular, así como HATs. En el caso de SIRT1 se ha encontrado que es la responsable de la desacetilación de FOXO, una familia de factores de transcripción involucrados en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación, longevidad y apoptosis (Motta MC *et al.*, 2004). Respecto a SIRT2 se ha encontrado asociada a los microtúbulos y se sugiere que controla el ciclo celular a través de la acetilación de la  $\alpha$  – tubulina (North BJ. *et al.*, 2003; Dam S y Lohia A., 2010). Para el caso de SIRT6, se conoce su actividad de ADP – ribosilasa sobre PARP1 bajo condiciones de estrés oxidativo y estimula a esta proteína para participar en la reparación del DNA (Mao Z. *et al.*, 2011). Respecto a SIRT7, se sabe que regula la expresión del DNA ribosomal activando la transcripción mediada por la RNA Polimerasa I aunque el sustrato sobre el cual actúa aun es desconocido (Ford E. *et al.*, 2006; Houtkooper HR *et al.*, 2012).

Además, ha sido demostrado que las sirtuinas pueden cooperar en la regulación de la cromatina actuando como antagonistas de algunas enzimas como HATs. Por ejemplo, SIRT1 actúa como regulador de p300 que es un activador co-transcripcional el cual se requiere para procesos celulares de crecimiento, diferenciación y sobrevivencia. También, las sirtuinas han sido asociadas a la regulación de la HATs de la familia MYST, teniendo SIRT1 como sustrato a MOF y TIP60, lo que conduce a la activación de los mecanismos de reparación del DNA bajo condiciones de estrés (Wang J. y Chen J., 2010; Lu L. *et al.*, 2011).

En el caso de las HDAC de la clase IV, solo se ha identificado a la HDAC11 y se sabe muy poco sobre esta proteína, pero ha sido implicada en la regulación del sistema inmune participando en la expresión de IL -10, así como en la expresión de OX40L en el linfoma de Hodgkin (New M. *et al.*, 2012; Seto E y Yoshida M., 2014).

Los complejos HDAC al igual que las HATs no se unen directamente al DNA, éstos son reclutados a su sitio blanco de manera específica al unirse con una proteína represora a través de su dominio corepresor, o bien en el caso de las HATs a través de su dominio de activación. El reclutamiento de una proteína con actividad HDAC hacia un promotor o secuencia regulatoria puede resultar en la desacetilación local, lo que conduce a un silenciamiento transcripcional del gen. Sin embargo, aún no se define si esta desacetilación de histonas conduce a la represión del gen por prevenir, de manera específica, el ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción o por inducir una estructura de alto orden de la cromatina (fibra de 30 nm) que es incompatible con la transcripción (Wu C. *et al.*, 2007).

#### **1.6 Proteínas efectoras: lectores de las marcas epigenéticas.**

La adición de diferentes modificaciones químicas en los extremos NH<sub>2</sub> terminal de las histonas por complejos proteicos denominados escritores hacen sugerir que estas modificaciones deben proveer sitios de unión y reconocimiento los cuales podrían ser reconocidos por moléculas efectoras (denominadas lectores) que facilitan el reclutamiento o estabilización de estos complejos proteicos cambiando el estado de activación o represión transcripcional de la cromatina. Estas proteínas efectoras o lectoras se clasifican en varios subgrupos de acuerdo a los dominios que identifican o que leen (Falkenberg KJ y Johnstone RW, 2014). Por ejemplo, las lisinas acetiladas son identificadas por proteínas que contienen bromodominio. La metilación es reconocida a través de proteínas con cromodominios que incluyen por ejemplo a la superfamilia Royal y las proteínas con dominios PHD (homeodominios de plantas). Las proteínas con repetidos WD40 que reconocen a las argininas de la histona H3 no modificadas, y por último las proteínas con el dominio 14-3-3 que identifican serinas fosforiladas (de la Cruz X. *et al.*, 2005; Taverna SD. *et al.*, 2007).

**Tabla II.** Modificaciones post-traduccionales de las histonas y los dominios que las reconocen.

Molécula lectora	Modificación post – traduccional de las histonas
PHD	Lisinas no modificadas
Bromodominios	Lisinas acetiladas (K-ac)
Cromodominios	H3K9me2/3, H3K27me2/3
Doble cromodominio	H3K4me1/2/3
Cromo barril	H3K36me2/3
Tudor	Rme2s
Doble tándem Tudor	H4K20me1/2, H3K9me3, H3K9 me1/2, H3K79me
Dedos PHD	H3K4me3, H3K9me3, H3K36me3
Repetidos WD40	H3R2/K4me2/3, (R, Sph, Tph)
Proteínas 14-3-3	H3S10ph, H3S28ph
BRCT	H2AXS139ph (Sph, Tph)

Además de las enzimas que introducen las modificaciones en las histonas (escritoras) como las acetiltransferasas de histonas (HAT), metiltransferasas de histonas (HMT), cinasas, ubiquitin ligasas, entre otras y de las proteínas que reconocen estas marcas a través de sus diferentes dominios (lectoras), también existen proteínas capaces de eliminar estas modificaciones denominadas borradores; algunos ejemplos de esto son las desacetilasas de histonas (HDAC) o desmetilasas de histonas (HDMT). De esta manera, la adición de grupos químicos a los extremos NH<sub>2</sub>-terminal de las histonas, la lectura de estas modificaciones y la eliminación de estas marcas es lo que le confiere esta naturaleza dinámica a la cromatina que promueve la generación de genes transcripcionalmente activos (eucromatina) o bien conduce a la compactación de la cromatina y a la generación de dominios de DNA transcripcionalmente inactivos (heterocromatina).

### 1.7 Código de histonas.

¿Pero cómo se comunican estas proteínas escritoras, lectoras y borradoras? En el 2000, Strahl y Allis propusieron que las distintas modificaciones que ocurren en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de las histonas conforman un código que está constituido por una gran cantidad de enzimas que agregan o remueven grupos químicos, lo cual influye en el grado de compactación de la cromatina, lo que a su vez le permite controlar la expresión de genes.

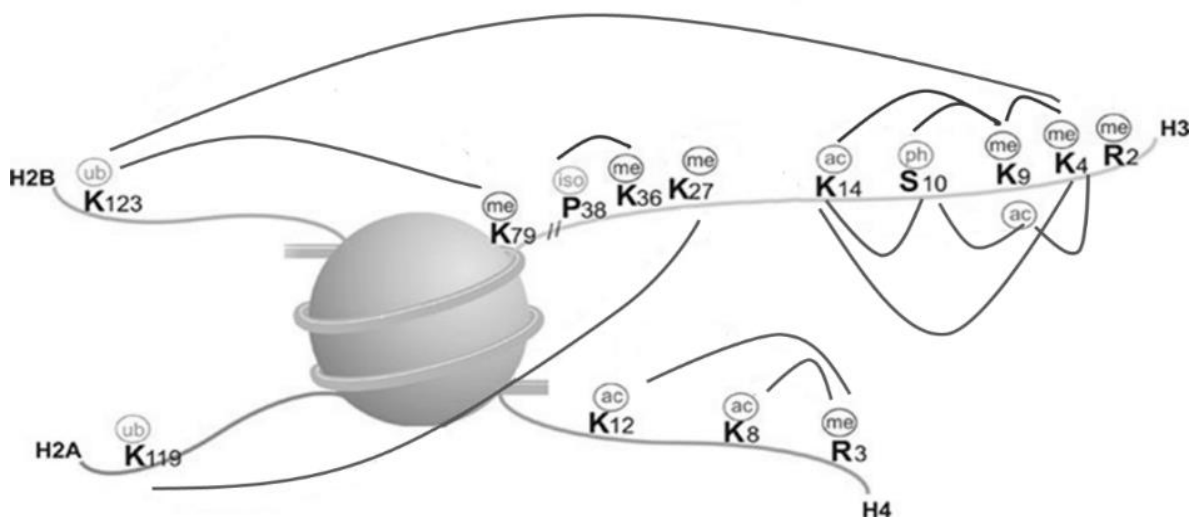
Las distintas modificaciones presentes en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de las histonas pueden generar interacciones sinérgicas o antagónicas, por lo que esto nos indica que existe una comunicación entre ellas. Esta comunicación se da entre modificaciones que se encuentran adyacentes en la misma cola de histonas por lo que se denominan comunicación en *cis*. Sin embargo, también se ha descubierto que las interacciones pueden darse entre



modificaciones localizadas en distintas colas de histonas y se conoce como comunicación en *trans* (Strahl BD y Allis CD., 2000).

Existen varios ejemplos de las comunicaciones en *cis*, uno de ellos es, que si la histona H3 se encuentra fosforilada en la S10 (H3S10ph), acetilada en la K9 (H3K9ac) y en la K14 (H3K14ac), estas modificaciones se sinergizan ocasionando actividad transcripcional. Otro ejemplo también se observa en la fosforilación de la S10, la cual impide la trimetilación de la K9 (H3K9me3), En el caso de la histona H4, la monometilación de la arginina 3 (H4R3me) favorece la acetilación de los residuos de lisina 5, 8, 12 y 16 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac) (Strahl BD y Allis CD., 2000; Bannister A. y Kouzarides T., 2011).

En lo que respecta a las comunicaciones en *trans* dos ejemplos están relacionados con la histona H2B ubiquitinada. La ubiquitinación de la lisina 123 (H2BK123ub) es un prerequisite para la metilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me). También la presencia de la H2BK123ub se requiere para la metilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79me). Otro ejemplo de comunicación en *trans* es la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) que promueve la ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub) (Bannister A. y Kouzarides T., 2011). De esta manera la combinación de diferentes modificaciones es lo que determina el encendido y apagado de genes; y todo esto en conjunto es lo que constituye el código de histonas.



**Figura 6:** Comunicación en *cis* y en *trans* de las modificaciones post – traduccionales de las histonas. (Tomado y modificado de Bannister, A., y Kouzarides, T., 2011).

## 1.8 Arquitectura nuclear

En 1928 Emil Heitz, basándose en observaciones histológicas, definió dos regiones teñidas diferencialmente en los cromosomas. A aquellas regiones que se teñían fuertemente las denominó heterocromatina; mientras que las regiones que se teñían menos fuerte las llamo eucromatina. Él propuso que las regiones de eucromatina eran genéticamente activas y que las regiones de heterocromatina eran genéticamente pasivas. En 1929 nuevamente Emil Heitz describió que las regiones de heterocromatina no contenían genes o que mostraban genes transcripcionalmente inactivos, lo que sugería que la heterocromatina sólo realizaba un papel estructural (Heitz E., 1928). Gracias al mejoramiento de los métodos de tinción y a la utilización de la microscopía electrónica, se logró identificar dos tipos de heterocromatina: una constitutiva y otra facultativa. Una de las características de la heterocromatina constitutiva es que se encuentra en regiones de DNA constituidas por secuencias repetitivas, además de contener nucleosomas hipoacetilados y trimetilados en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3). Esta cromatina también se encuentra asociada con otros factores como la metil transferasa de histonas *Su(var)3-9*, y la proteína no histónica HP1 localizada principalmente en las regiones centroméricas y teloméricas. Mientras que la heterocromatina facultativa que consiste en regiones de DNA que contienen genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento dependiendo de la etapa del desarrollo y del tipo celular, se encuentra asociada a la presencia de la metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me). Tanto la heterocromatina facultativa como la heterocromatina constitutiva se encuentran típicamente en la región perinuclear con excepción de las áreas ocupadas por los poros nucleares. En lo que respecta a la eucromatina ésta presenta una menor condensación en comparación con la heterocromatina, además de que en estas regiones se localizan la mayoría de los genes que son activos transcripcionalmente y las marcas características de este tipo de cromatina son la acetilación de la lisina 9 de la histona H3, (H3K9ac) y la di y tri metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2/3) (Fedorova E y Zink D., 2008).

Durante muchas décadas se discutió si los cromosomas se encontraban distribuidos de manera aleatoria en el interior del núcleo o como entidades individuales. Finalmente, mediante el desarrollo de la técnica de hibridación *in situ* de sondas de DNA marcadas con un fluorocromo (*FISH*) se demostró que los cromosomas no se distribuyen en todo el núcleo durante la interfase, sino que se encuentran muy bien organizados y que ocupan lugares bien definidos dentro del núcleo llamados territorios cromosomales (CTs) (Cremer T. y Cremer C., 2001).

Se sabe que los territorios cromosomales tienen una naturaleza dinámica, que les permite tener interacciones intra e intercromosomales con regiones que se encuentran espacialmente alejadas. Es decir, genes relacionados entre sí pueden ser dinámicamente repositionados mediante la formación de asas o *loops* hacia sitios activos de transcripción, lo que conlleva a su activación transcripcional (Schneider R. y Grosschedl R., 2007).

Además de la existencia de territorios cromosomales dentro de núcleo, se ha descrito la existencia de discretos organelos no membranosos conocidos como cuerpos nucleares. Estas estructuras se encuentran compartimentalizadas dentro del núcleo y generan distintos sitios que confieren un intercambio libre en el nucleoplasma, lo que genera una diversa variedad y disponibilidad de factores que permiten hacer más eficientes muchos procesos biológicos de la célula, como son la transcripción y la traducción. Por una parte, pueden desempeñarse como sitios de almacenamiento y modificación de RNA y proteínas, mientras que también pueden funcionar como centros para regular la expresión mediante el reclutamiento de *loci* de genes. Entre los cuerpos nucleares que han sido descritos se encuentran el nucléolo, los cuerpos de Cajal, *speckles*, *paraspeckles*, cuerpos PLM entre otros (Spector DL., 2006; Mao YS. *et al.*, 2011).

En resumen, los cromosomas no estén distribuidos de manera aleatoria dentro del núcleo, si no que cada uno ocupa un sitio definido dentro del núcleo, que constituyen los territorios cromosomales, y que la disposición espacial de los cromosomas tiene importancia en la regulación de la expresión de genes. Además, la acumulación de proteínas represoras en periferia nuclear conduce a generar un ambiente transcripcionalmente represivo, mientras que, una cromatina más relajada rica en genes transcripcionalmente activos (eucromatina) reside predominantemente en el interior del núcleo. Esto nos sugiere que dentro del núcleo existen regiones represivas para la transcripción, como la región perinuclear, y regiones centrales del núcleo asociadas con activación transcripcional (Lanctot C. *et al*, 2007; Zimmer C. y Fabre E., 2011), y que el reposicionamiento de un cromosoma hacia el interior o hacia la periferia del núcleo participa de manera importante en el control de la expresión de genes.

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Si bien, ya se mencionó anteriormente que las modificaciones post – traduccionales de las histonas así como la arquitectura nuclear participan en regular la expresión de genes en organismos eucariontes, a continuación se mencionarán algunos datos experimentales que sugieren que las modificaciones post – traduccionales de las histonas podrían participar en el enquistamiento de *Entamoeba*. Por lo que enseguida se describirá como se encuentra organizado el genoma de este parásito y cómo la expresión de sus genes puede ser regulada a nivel epigenético.

### 2.1 Genoma de *E. histolytica* y su organización en cromatina.

El tamaño estimado del genoma de *E. histolytica* es de aproximadamente 24 millones de pares de bases (Mbp), el cual se encuentra distribuido en 888 scaffolds. Estos 24 Mbp codifican para 9,938 genes con un tamaño promedio de 1.17 kb y de estos, tan solo el 25% contiene intrones. Las secuencias intrónicas en *E. histolytica* son relativamente cortas (46 a 115 pb), y contienen los dinucleótidos GU y AG que son los sitios donador y aceptor del “splicing”, respectivamente. Además, el genoma posee un alto contenido de adeninas y timidinas (A/T) constituyendo aproximadamente un 77.6% del genoma (Bhattacharya A. *et al.*, 2000; Loftus B. *et al.*, 2005).

En cuanto al número y tamaño de los cromosomas que lo componen, aún no se han determinado con exactitud, pero se ha sugerido que posee hasta 14 cromosomas, cuyo tamaño oscila entre 0.3 hasta 2.2 Mbp con una posible ploidía de 4N. Debido a que no se ha demostrado la presencia de telómeros en los cromosomas de este parásito, se sugiere que estos son circulares (Willhoeft U. y Tannich E., 1999; Loftus B. *et al.*, 2005). Además, existen evidencias experimentales que sustentan que los cromosomas de *E. histolytica* están organizados en cromatina, la cual está constituida por la unidad básica que es el nucleosoma, como lo demuestra el trabajo realizado por Torres–Guerrero y cols., 1991, en donde se observó una estructura de “collar de perlas” conocida como fibra de 10 nm. Este resultado sugiere que la cromatina de este parásito posee estructuras tipo nucleosomas, las cuales no difieren con las de otros eucariontes. Sin embargo, las regiones internucleosomales aparentemente son de longitud irregular, en comparación con las descritas en otros protozoarios (Torres–Guerrero H. *et al.*, 1991).

El genoma de *E. histolytica* contiene genes que codifican para las cuatro histonas que conforman el core nucleosomal. Sin embargo, como se puede observar en los

alineamientos que se muestran en la figura 7, los extremos NH<sub>2</sub> terminales de las histonas H3 y H4 son divergentes respecto a la secuencia descrita para otros eucariontes. (Födinger M. *et al.*, 1992; Binder M. *et al.*, 1995; Byers J. *et al.*, 2005; Huguenin M. *et al.*, 2010). A pesar de ello, ambas histonas conservan la característica de ser altamente básicas al contener en su secuencia varios residuos de Lys (K), que son blancos potenciales para modificaciones post-traduccionales como son la metilación y la acetilación (Ramakrishnan G. *et al.*, 2004; Byers J. y Eichinger D., 2008; Huguenin M. *et al.*, 2010).

```

A) H3E.histolytica    MARTKGHIERPS--NKSAAVK--NVAFKAAKMLS KDSTKKK--RAHPGAVALTEIKVL 54
H3E.invadens       MARTKGRIERTTSAKAATKAVKNVNVAFKAAKMLS KDATKKK--RAHPGAVALTEIKVL 58
H3H.sapiens        MARTKQTARKST---GGKAPRK-QLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRY 55
H3S.cerevisiae     MARTKQTARKST---GGKAPRK-QLASKAARKSAPSTGGVKKPHRYKPGTVALREIRRF 55
                    ***** .:.: . ** : :* ***:* . . ** * :***:*** **

H3E.histolytica    QRSTELLRRKAPFQALVREIAQVSKSDLRFQSAAISALQEAEAYLVGLFEDTNLCAIHA 114
H3E.invadens       QRSTELLRRKAPFQHLVRDIAQNNKSDLRFQSAAISALQEAEAYLVGLFEDTNLCAIHA 118
H3H.sapiens        QKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEAEAYLVGLFEDTNLCAIHA 115
H3S.cerevisiae     QKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAIGALQESVEAYLVGLFEDTNLAAIHA 115
                    *:****:* ** ** **:* ** *:*****:*: ***: ***: *****.*****.***

H3E.histolytica    KRVTIMPKDMQLARRIRGERT 135
H3E.invadens       KRVTIMPKDMQLARRIRGERT 139
H3H.sapiens        KRVTIMPKDIQLARRIRGERA 136
H3S.cerevisiae     KRVTIQKKDIKLARRLRGE-- 134
                    **:** **:*:****:*

B) H4E.histolytica    MATDTGSGRGKGGKGVTLGKSGKAKASKGGKRIRTKT-QQDALKGITKPAIRRLARRGG 59
H4E.invadens       MATDTGSGRGKGGKGVTLGKSGKAKASKGGKRIRTKPGQQDALKGITKPAIRRLARRGG 60
H4H.sapiens        ----MSGRGKGGK--LGK--GAK-----RHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGG 43
H4S.cerevisiae     ----MSGRGKGGK--LGK--GAK-----RHRKILRDNIQGITKPAIRRLARRGG 43
                    ***** *** ** * : * :*****

H4E.histolytica    VKRINGAVYDETRNLKQFLEQVIRDSVTYTEHAKRRTVTAMDVVYALKRQGRITLYGYS- 118
H4E.invadens       VKRINGLVYEETRNVLKQFLEQVIRDSVTYTEHGKRRVTAMDVVYALKRQGRITLYGYA- 119
H4H.sapiens        VKRISGLIYEETRGVLKVFLENVIRDAVTYTEHAKRRTVTAMDVVYALKRQGRITLYGFGG 103
H4S.cerevisiae     VKRISGLIYEEVRAVLKSFLESVIRDSVTYTEHAKRRTVTSLDVVYALKRQGRITLYGFGG 103
                    ***** :*:.* ** * **:*:*****.***:****:*****:*****:..

```

**Figura 7:** Alineamiento de A) histona H3 y B) histona H4 de *E. invadens* y *E. histolytica* con *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En el caso de las histonas H3 y H4, los residuos de K son blancos para la acetilación que se sugiere es catalizada por las histonas acetiltransferasas (HAT), y su desacetilación, se sugiere es llevada a cabo por las desacetiladas de histonas (HDACs) (Byers J. *et al.*, 2005). Hasta ahora, el análisis del genoma de *E. histolytica* ha revelado la presencia de dos enzimas HAT pertenecientes a las familias GNAT y MYST, una HDAC de la clase I y 4 genes para una HDAC de la clase III (Ramakrishnan G. *et al.*, 2004; Dam S. y Lohia A. 2010).

Respecto a la histona H3, se sugiere que los residuos de K son blancos para la di y tri metilación, lo cual se ha correlacionado con actividad transcripcional (Huguenin M. *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha identificado la presencia de la H3K27me<sub>2</sub>, la cual se ha encontrado que favorece la deposición de proteínas de la maquinaria del RNA de interferencia como Argonauta, lo que conlleva al silenciamiento de genes (Foda BM. y Singh U., 2015).

Actualmente, existe evidencia directa de la actividad de enzimas histona metiltransferasa de lisina (HKMTs), ya que mediante un análisis *in silico* se identificó que existen 4 genes que podrían codificar para estas enzimas EhHKMT1, 2, 3 y 4 y se demostró que todos los genes son expresados en trofozoítos de *E. histolytica* y mediante ensayos enzimáticos utilizando como sustrato histonas comerciales, se determinó que todas ellas son capaces de transferir grupos metilo (Borbolla-Vázquez J. *et al.*, 2016)

En el caso de las metiltransferasas de arginina (PRMTs) se sabe que existen dos genes que pudieran codificar para estas enzimas y hasta la fecha solo una de ellas fue recientemente caracterizada e identificada como un ortólogo de PRMT1 de humano y al expresar la proteína recombinante del parásito, ésta tuvo actividad de metiltransferasa sobre la arginina 3 de la histona H4 de pollo, lo que sugiere que esta es la enzima responsable de realizar la dimetilación de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3me2) en *E. histolytica* (Borbolla-Vázquez J. *et al.*, 2015).

Respecto a la metilación del DNA, *E. histolytica* expresa la DNA metiltransferasa EhMeth, que es homóloga a la DNMT2 humana (Tovy A. y Ankri S., 2010). Se ha demostrado que esta enzima es responsable de la metilación de varios elementos del DNA del parásito, entre los que se encuentran el DNA ribosomal (Fisher O. *et al.*, 2004), S/MAR (scaffold/matrix attachment regions) (Banerjee S. *et al.*, 2005), LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) (Lavi T. *et al.*, 2006), y proteínas de choque térmico hsp 70 y 100 (Bernes S. *et al.*, 2005). También se ha identificado una proteína específica de *E. histolytica* denominada EhMLBP (Lavi T. *et al.*, 2008), que se une preferencialmente al DNA metilado.

En el caso de *E. invadens*, se sabe que su genoma está constituido por 22 MB que codifican aproximadamente para 11,549 genes, de los cuales un 35% contiene intrones, y similar a lo identificado en *E. histolytica*, el genoma posee un alto contenido de adeninas y timidinas (A/T) constituyendo aproximadamente un 70% del genoma (Ehrenkauf G., *et al.*, 2013). Si bien hasta la fecha no se ha determinado que el genoma de este parásito se organice en cromatina, contiene los genes que codifican para las histonas que conforman el core nucleosomal, lo que sugiere que de manera similar a lo observado en *E. histolytica*, el genoma de *E. invadens* se organiza en cromatina.

## 2.2 Control epigenético en la expresión de genes de *Entamoeba*.

Como se describió en el apartado anterior, *E. histolytica* cuenta con genes que codifican para proteínas que metilan el DNA, acetilan y desacetilan a las histonas, lo que hace suponer que la expresión de genes en este parásito podría ser modulada por varios mecanismos epigenéticos entre los que se encuentran las modificaciones de las histonas como la metilación y la acetilación (Singh U. y Ehrenkauf GM., 2009).

Respecto a la metilación de histonas, el trabajo realizado en el 2010 por Hughenin y cols, sugiere que la H3K4me2/me3 (marca epigenética asociada con actividad transcripcional), participa en regular la actividad transcripcional de genes importantes para el parásito como: *ap-a* (ameboporo), *cpA5* (cistein proteasa) e *IgI1* (subunidad 35 kDa de la lectina Gal/GalNAc). Estos autores, mediante ensayos tipo CHIP utilizando anticuerpos específicos para la H3K4me2/me3, así como para la histona H3, encontraron que la metilación de la lisina 4 de la histona H3 estaba disminuida cuando estos genes estaban silenciados transcripcionalmente. Mientras que, los niveles de la histona H3 fueron consistentemente más elevados en los genes silenciados. Lo que sugería que este incremento en la histona H3 se debe a que estos genes tienen una mayor densidad de nucleosomas y por lo tanto más histona H3. Si esto era cierto, entonces mediante ensayos de nucleasa micrococcal deberían de encontrar que los genes silenciados presentaban una organización de nucleosomas ordenada y regular (cromatina cerrada o heterocromatina); mientras que cuando estos genes se expresaban, la estructura de la cromatina era más laxa y no se observaba un patrón ordenado y regular de nucleosomas (eucromatina). Estos autores encontraron que efectivamente la cromatina de los genes *ap-a* y *cpA5* era más compacta cuando estos se encontraban silenciados y se encontraba menos compacta o relajada cuando los genes se encontraban transcripcionalmente activos. Estos resultados sugieren que la arquitectura de la cromatina asociada a modificaciones postraduccionales modula la actividad de genes de virulencia en *E. histolytica*. Un punto importante que destacar del trabajo anterior es que debido a la divergencia que existe entre la secuencia del extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H3 de *Entamoeba* con respecto a la del humano, los autores generaron sus propios anticuerpos para llevar a cabo este trabajo (Hughenin M. *et al.*, 2010).

Por otra parte, también existen evidencias experimentales que sustentan que la acetilación y la desacetilación de histonas también participan en el enquistamiento de este parásito. Una de estas evidencias es el estudio realizado en el 2005 por Byers y cols., quienes

utilizando trofozoítos de este protozoario que fueron tratados con ácidos grasos de cadena corta (SCFA) tales como acetato, propionato y butirato, (los cuales son productos del metabolismo de la flora bacteriana localizada en el colon), observaron mediante geles AUT (Ácido acético/Urea/Triton) que se producía un estado de hipoacetilación y que esto conllevó a la inhibición del enquistamiento del parásito de manera dependiente de la concentración, lo que apoya la idea que la expresión de los genes que participan durante el proceso de enquistamiento de *E. invadens* está influenciada por la acetilación y desacetilación de las histonas (Byers J. *et al.*, 2005).

Recientemente, se han realizado varios trabajos sobre los perfiles de expresión de genes importantes para el enquistamiento ligados a modificaciones de histonas. En el 2007 Ehrenkaufner y cols., utilizaron trofozoítos de la cepa 200:NIH de *E. histolytica*, y los incubaron a diferentes concentraciones de SCFA y TSA con el propósito de identificar qué genes eran inducidos bajo estas condiciones. En el caso de los trofozoítos expuestos a SCFA, se observaron cambios mínimos en la expresión de genes (11 de 9,435 genes analizados). Mientras, que el tratamiento con TSA, a una concentración de 150 nM, produjo diferencias significativas en 163 genes, de los cuales 122 fueron regulados positivamente y 41 fueron regulados negativamente. Entre estos genes destacan algunos que están relacionados con estrés y virulencia como son la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), cistein–proteasas y lectina Gal/GaINAc. Pero de manera más importante se encontró que existe un traslape entre genes inducidos por TSA y genes específicos de quiste (73 de 122 genes regulados positivamente, así como 15 de los 41 genes regulados negativamente). Estos datos nuevamente sugieren que modificaciones de las histonas (de manera específica la acetilación de las histonas), es uno de los mecanismos que regula la expresión de genes implicados en la formación del quiste en *Entamoeba* (Ehrenkaufner GM. *et al.*, 2007).

Una evidencia adicional fue obtenida en el 2013 por el grupo del Dr. Tomoyoshi Nozaki quién publicó el transcriptoma durante el enquistamiento de *E. invadens*; él identificó un total de 1,528 genes expresados diferencialmente que codifican principalmente para transportadores, proteínas de citoesqueleto, tráfico vesicular, factores de transcripción, componentes del proteosoma, biosíntesis de quitina, metabolismo y cistein proteasas (De Cádiz AE. *et al.*, 2013). Sin embargo, al hacer una búsqueda más exhaustiva, se encontró un gen que codifica para una HDAC de la clase III, es decir una sirtuina, mostró un incremento en su expresión a lo largo del enquistamiento. Si consideramos que el



enquistamiento es un proceso que se da ante una condición de estrés por baja de nutrientes y que las sirtuinas han emergido como factores clave en la detección y la coordinación de las respuestas de estrés dirigidas a la cromatina, no es de extrañarnos que conforme se lleva a cabo el proceso de enquistamiento los niveles de estas proteínas incrementen, por lo que una mayor actividad de estas proteínas durante el enquistamiento podría conducir a una mayor desacetilación de genes y una menor actividad transcripcional lo cual repercutiría directamente en regular la expresión de genes durante el enquistamiento.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El enquistamiento en *E. histolytica* y *E. invadens* es un proceso en el cual ocurren una serie de cambios en la expresión de genes que permiten la adaptación y sobrevivencia del parásito bajo condiciones de estrés. Existen evidencias experimentales que apoyan la idea de que modificaciones post – traduccionales de las histonas, tales como la acetilación y desacetilación, están involucradas en el proceso de enquistamiento de *E. invadens*. Entre las proteínas que podrían participar en regular los estados de acetilación y desacetilación de las histonas, así como de otros sustratos no histónicos que sean importantes durante el enquistamiento, se encuentran las desacetilasas de histonas (HDACs). Por ello resulta interesante conocer si las modificaciones post – traduccionales de las histonas y su localización dentro del núcleo, se modifican en las fases de trofozoíto y quiste de *E. invadens* y saber si las desacetilasas de histonas están regulando la expresión de genes durante el proceso de enquistamiento de este parásito.

### **4. HIPÓTESIS**

En *E. invadens* existen marcas epigenéticas estadio–específicas a nivel de modificaciones post–traduccionales de las histonas entre las fases de trofozoíto y quiste, así como enzimas que eliminan estas modificaciones post-traduccionales (HDACs) implicadas en el enquistamiento de este parásito.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Determinar si las modificaciones post – traduccionales de las histonas y las HDACs están implicadas en el enquistamiento de *E. invadens*.

### 5.2 Objetivos Particulares

1. Determinar si existen modificaciones post–traduccionales diferenciales en las histonas durante la etapa de trofozoíto en comparación con la etapa de quiste de *E. invadens*.
2. Establecer si existe algún cambio en la posición de estas marcas en el núcleo de ambas fases de *E. invadens*.
3. Estudiar la participación de las HDACs de la clase I y II en el enquistamiento de *E. invadens*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Trofozoítos de la cepa *E. invadens* IP-1 se cultivaron en condiciones axénicas en tubos de 16 x 125 mm utilizando el medio LYI-S-2 (el cual contiene por litro 25 g de extracto de levadura, 5 g de extracto digerido de hígado, 10g de glucosa, 1 g de NaCl, 0.6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de L-cisteína-HCl, 200 mg de ácido ascórbico y 22.8 mg de citrato férrico de amonio) suplementando con una mezcla de suero bovino adulto al 10%, vitaminas de Diamond al 2.5 % y una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina al 1% (Diamond LS. *et al.* 1978)

### 6.2 Cultivo celular de trofozoítos de *E. histolytica*.

Trofozoítos de la cepa *E. histolytica* HM1: IMSS se cultivaron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 (el cual contiene por litro 30 g Bacto Peptona, 10 g de glucosa, 2 g de NaCl, 0.6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g de L-cisteína-HCl, 200 mg de ácido ascórbico y 22.8 mg de citrato férrico de amonio) suplementando con una mezcla de suero bovino adulto al 10%, vitaminas de Diamond al 2.5 % y una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina al 1% (Diamond LS. *et al.* 1978).

Para realizar los pases tanto de *E. invadens* como de *E. histolytica*, una vez que los tubos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se incubaron en hielo durante 5 a 10 min con la finalidad de despegar las células de las paredes del tubo, se agitaron suavemente y el inóculo deseado se sembró en tubos que contenían el medio de cultivo correspondiente para cada especie de *Entamoeba*.

### 6.3 Inducción de enquistamiento *in vitro* de *E. invadens*.

El enquistamiento *in vitro* de los trofozoítos de *E. invadens* se realizó de acuerdo con el protocolo reportado por Sánchez L. *et al.*, 1994. Brevemente, trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se colocaron en hielo por 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez colectadas las células, se realizaron dos lavados con medio LG (TYI-S-33 sin glucosa) y posteriormente la pastilla de células fue resuspendida en una mezcla de suero bovino adulto y vitaminas 2.5% con una densidad celular de  $1 \times 10^7$  trofozoítos/mL de mezcla. Finalmente, a un tubo que contenía 14.25 mL de medio LG diluido al 47% con H<sub>2</sub>O bidestilada se le adicionaron 0.75 mL de la mezcla de

trofozoítos para tener una proporción de  $5 \times 10^5$  células/mL y se incubaron a 26°C durante 24, 48 o 72 h.

#### **6.4 Purificación de quistes por gradiente de Percoll.**

La purificación de quistes se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Avron B. *et al.*, 1986. Brevemente, una vez transcurrido el tiempo de inducción del enquistamiento, se cosecharon las células por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y a la pastilla se le realizaron 3 lavados con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de sarcosil al 0.1% (preparado con PBS 1X) con la finalidad de lisar a los trofozoítos y se incubó durante 1 h a 4°C en agitación constante. Después de esto las células se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 min a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente las células se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y los quistes resistentes a estos tratamientos se purificaron utilizando un gradiente de Percoll. Para ello se preparó una solución stock de Percoll a una osmolaridad de 230 mOsm/Kg –  $\text{H}_2\text{O}$  mezclando 1 parte de PBS 10X con 9 partes del reactivo comercial (GE Healthcare 17-0891-02). A partir de esta solución stock, que corresponde al 100%, se realizó un gradiente discontinuo de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70% de Percoll, haciendo diluciones con NaCl al 0.15 M. Posteriormente se colocó sobre la parte superior del gradiente  $1 \times 10^6$  células resuspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y se dejó a 4°C durante toda la noche. Finalmente, se recuperó la fracción correspondiente a los quistes la cual se encontró entre las interfases 30 y 40% del gradiente, y los quistes recuperados se lavaron 3 veces con PBS 1X y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

#### **6.5 Tinción con calcofluor blanco.**

Para corroborar que la fracción recuperada correspondía a los quistes, se realizó una tinción con calcofluor blanco, el cual es un compuesto que se caracteriza por unirse a la quitina que forma la pared del quiste. Brevemente, se tomó una alícuota de los quistes la cual se fijó con *p*-formaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y finalmente se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de esta muestra la cual fue colocada en un cubreobjetos recubierto con poly L–lisina y se dejó secar al aire. Finalmente se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de calcofluor blanco MR2 (Sigma) y 5  $\mu\text{L}$  de KOH al 10% y se incubó durante 1 min

protegiéndolo de la luz y se realizó en montaje en un portaobjeto para la observación de los quistes por epifluorescencia utilizando el microscopio marca Olympus BX60.

### **6.6 Obtención de DNA genómico de trofozoítos de *E. invadens*.**

Para extraer DNA genómico, esto se realizó utilizando el kit QIAamp DNA (QIAGEN). Para ello, se utilizaron  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *E. invadens* los cuales se colocaron en hielo durante 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a 4°C. El botón de parásitos se lavó 2 veces con PBS 1X frío y la pastilla obtenida se le adicionaron 20  $\mu$ L de Proteinasa K (20mg/mL) y 200  $\mu$ L del buffer AL. Toda esta muestra se mezcló por vortexeo durante 15 segundos y se incubó a 65°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo la muestra se centrifugó brevemente a máxima velocidad y se le adicionaron 100  $\mu$ L de etanol absoluto y se mezcló por vortexeo durante 15 segundos. La muestra fue transferida a la columna proporcionada en el kit para que el DNA se adhiriera a la resina de sílica. Esta columna se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Este paso se repitió 3 veces con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de DNA. Una vez que el DNA quedó adherido a la columna y con el propósito de eliminar contaminantes y trazas de etanol, a la columna se le adicionaron 500  $\mu$ L de buffer AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se realizó un último lavado añadiendo 500  $\mu$ L de buffer AW2 y la columna se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Para realizar la elución del DNA genómico, la columna fue transferida a un tubo nuevo y se le adicionaron 200  $\mu$ L de buffer AE y se incubó a 65°C durante 3 min. Finalmente, la columna fue centrifugada a 8,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y se recuperó el DNA eluido. Se realizaron otras dos eluciones con 75 y 35  $\mu$ L de buffer AE respectivamente. Las muestras obtenidas de cada elución fueron cuantificadas y almacenadas a -20°C hasta su uso.

### **6.7 Extracción de RNA de trofozoítos de *E. invadens*.**

Brevemente,  $5 \times 10^6$  trofozoítos se colocaron en hielo por 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente la pastilla fue lavada dos veces con PBS 1X preparado con H<sub>2</sub>O DEPC. La pastilla fue resuspendida en 500  $\mu$ L de TRIzol (Invitrogen) y se le adicionaron 100  $\mu$ L de cloroformo frío; esta muestra se vortexeo durante 30 segundos y se dejó incubando por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 12,000 xg durante 30 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo a la cual se le adicionaron 250  $\mu$ L de isopropanol frío y se dejó precipitando a 4°C toda la noche. Al día siguiente la muestra fue centrifugada a 12,000

yg durante 30 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida fue lavada 2 veces con etanol al 70% preparado con H<sub>2</sub>O DEPC y se centrifugó a 12,000 yg durante 10 min a 4°C. Finalmente la pastilla de RNA se dejó secar al aire y fue resuspendida en 100 µL de H<sub>2</sub>O DEPC, se cuantificó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### **6.8 Extracción de RNA de quistes de *E. invadens*.**

En el caso de quistes, se colectaron 1x10<sup>7</sup> células a 24, 48 y 72 h post – enquistamiento las cuales se seleccionaron mediante lisis con sarcosil 0.1% (preparado con PBS 1X en H<sub>2</sub>O DEPC) y se incubó durante 1 h a 4°C en agitación constante. La muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4°C y se lavó 2 veces con PBS1X (preparado en H<sub>2</sub>O DEPC). Posteriormente la pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>O DEPC y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación constante. La muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida fue resuspendida en 700 µL de QIAzol (Invitrogen) y se realizaron 5 ciclos de congelación en N<sub>2</sub> líquido durante 2 min y descongelación de 1 – 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 140 µL de cloroformo y se vortexeo durante 30 segundos y se dejó incubando por 3 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12,000 yg durante 30 min a 4°C. Se colectó la fase acuosa en un tubo nuevo y se adicionaron 525 µL de etanol absoluto (equivalente a 1.5 volúmenes) y se mezclaron por pipeteo suave. Esta muestra fue transferida a una columna para purificación de RNA contenida en el kit RNeasy Mini (Qiagen) y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron a la columna 500 µL de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el líquido obtenido y a la columna se le adicionaron nuevamente 500 µL de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Se descartó el líquido y la columna se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente para eliminar las trazas de etanol. Para realizar la elución, la columna se colocó en un tubo *Eppendorf* de 1.5 mL nuevo y se le adicionaron 30 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, la columna se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y el RNA obtenido fue cuantificado y almacenado a -80°C hasta su uso.

### **6.9 Eliminación del DNA remanente en el RNA obtenido mediante tratamiento con DNAasa I.**

Para eliminar las trazas de DNA presentes en el RNA extraído tanto de trofozoítos como de quistes, se realizó un tratamiento con DNAasa I (Thermo Scientific) de la siguiente manera:

al equivalente a 10 µg de RNA se le adicionaron 2.5 µL de Buffer 10X para la enzima DNAasa I y 2 µL de la enzima DNAasa I (1U/µL) y la muestra se llevó a un volumen final de 25 µL con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente se dio un segundo tratamiento adicionando 1 µL de la enzima e incubando durante 30 min a 37°C. La inactivación de la enzima se realizó adicionando 0.2 volúmenes de buffer de inactivación e incubando durante 2 min a temperatura ambiente agitando ocasionalmente. Finalmente, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que contenía al RNA purificado, el cual fue cuantificado y almacenado a -80°C hasta el momento de su uso.

#### **6.10 PCR utilizando RNA tratado con DNAasa I para verificar la eliminación del DNA genómico.**

Para verificar que con el tratamiento con DNAasa I se eliminó el DNA genómico remanente en las muestras de RNA y de esta manera la amplificación de los genes de interés ya sea mediante PCR de tiempo real o de punto final fuera exclusivamente del cDNA sintetizado a partir del RNA, se realizó una PCR utilizando como templado el RNA tratado con DNAasa I, para lo cual se emplearon unos oligonucleótidos previamente reportados que permiten la amplificación de un gen constitutivo presente en trofozoítos y quistes de *E. invadens*. Para ello, se realizó una mezcla de reacción que contenía: 1.25 µL del buffer 10X, 2µL de la mezcla de los cuatro dNTPs (2.5 mM de cada uno), 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1.25 µL del oligonucleótido sentido EIN\_327460 FWD 10 pmol, 1.25 µL del oligonucleótido antisentido EIN\_327460 RVS 10 pmol, 0.5 µL de Taq Polimerasa (AmpliTaq Applied Biosystems), 200 ng de RNA tratado con DNAasa I y H<sub>2</sub>O DEPC para un volumen final de reacción de 12.5 µL.

Las condiciones empleadas para la amplificación de los insertos fueron: 1 ciclo de desnaturalización del DNA y activación de la enzima a 94°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de amplificación constituidos por 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos, y finalmente un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

#### **6.11 Integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa.**

Para evaluar la integridad del RNA obtenido tanto de trofozoítos como de quistes, se migró el equivalente a 3 µg de RNA tratado con DNAasa I. Para ello se prepararon 30 mL de un gel de agarosa al 1.2% al que se le adicionaron 150 µL de una solución de isotiocianato de



guanidina a una concentración de 1M, para obtener una concentración final de 5mM. Las muestras fueron mezcladas volumen a volumen con formamida y se incubaron a 65°C durante 5 min. Posteriormente las muestras fueron cargadas y migradas a 100 V durante 30 min y transcurrido este tiempo se realizó la tinción con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL durante 15 min en agitación. Finalmente, el gel fue lavado con H<sub>2</sub>O DEPC durante 5 min en agitación para su posterior visualización en un transiluminador.

### **6.12 Síntesis de cDNA a partir de RNA obtenido de trofozoítos y quistes de *E. invadens*.**

Para realizar la síntesis del cDNA, se utilizó el equivalente a 1.5 µg de RNA tratado con DNAasa I y se realizó una mezcla de reacción que contenía 1.5 µL de oligo dT 0.5 µg/µL (Thermo Fisher), 1 µL de una mezcla que contenía los 4 dNTPs (10 mM) y el RNA. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 min y transcurrido este tiempo se colocó inmediatamente en hielo. A la muestra se le adicionaron 2.5 µL de DTT 0.1 M, 5 µL de Buffer 5X para la enzima SuperScript II (Thermo Fisher) y se llevó a un volumen de 25 µL y se incubó a 42°C durante 5 min. Posteriormente se adicionó 1 µL de la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) y se incubó durante 42 °C durante 90 min, seguido de un ciclo de 70°C durante 5 min y el cDNA obtenido fue cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso.

### **6.13 PCR semicuantitativa para los genes identificados que codifican para las HDACs de la clase III o Sirtuinas en *E. invadens*.**

Se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos para los 6 genes que fueron identificados *in silico* en base al dominio catalítico que pudieran codificar para las sirtuinas. Con el propósito de saber si existía una expresión diferencial entre trofozoítos y quistes de *E. invadens*, se realizaron ensayos de RT – PCR semicuantitativa a 25 ciclos utilizando como templado cDNA obtenido de trofozoítos y de quistes de 24 h. Se realizó una mezcla de reacción constituida por: 1.25 µL del buffer 10X, 2µL de la mezcla de los cuatro dNTPs (2.5 mM de cada uno), 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.25 µL de los oligonucleótidos sentido (10 pmol), 1.25 µL del oligonucleótido antisentido (10 pmol), 0.25 µL de Taq Polimerasa (Invitrogene), 100 ng de cDNA de trofozoítos y quistes de 24 h y H<sub>2</sub>O a un volumen final de 12.5 µL. Las condiciones empleadas para la amplificación los genes fueron: 1 ciclo de activación de la enzima y desnaturalización del DNA a 94°C durante 10 min, seguido por 25 ciclos de amplificación constituidos por 94°C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 68°C durante 1 min, y finalmente un ciclo de 5 min a 72°C. Como gen

constitutivo se utilizó un gen que codifica para una proteína hipotética (EIN\_327460) el cual ya había sido reportado por Suresh S, *et al.*, 2016, el cual se amplificó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

#### **6.14 PCR de tiempo real utilizando SYBR Green.**

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real utilizando como templado el cDNA de trofozoítos y quistes de 24, 48 y 72 h post – enquistamiento de *E. invadens*. Para ello se realizó la mezcla de reacción constituida por: 5  $\mu$ L de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 4367659), 1  $\mu$ L de oligonucleótido sentido (10 pmol), 1  $\mu$ L de oligonucleótido antisentido (10 pmol), 100 ng del cDNA correspondiente y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para completar un volumen final de 10  $\mu$ L. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el equipo StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación de la enzima y desnaturalización del DNA a 94°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de amplificación constituidos por 94°C durante 30 segundos y 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 min, y finalmente un ciclo de 5 min a 72°C. El análisis de los datos se realizó utilizando el método de  $\Delta\Delta$ Ct (Livak KJ, Schmittgen TD, 2001) y se normalizaron utilizando el gen constitutivo previamente reportado por Suresh S., *et al.*, 2016. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la tabla IV.

#### **6.15 Obtención de extractos protéicos totales a partir de trofozoítos de *E. invadens*.**

Brevemente,  $1 \times 10^6$  trofozoítos se colocaron en hielo durante 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a 4°C. La pastilla de parásitos se lavó 2 veces con PBS 1X pH 6.8 frío y posteriormente fue resuspendida en 100  $\mu$ L de M-PER “*Mammalian Protein Extraction Reagent*” (Thermo Fisher Scientific) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete* 1X (Roche), 20mM NEM, 1mM PMSF y 2mM Iodoacetamida) y se incubaron por 10 min a 4°C a 50 rpm en un agitador rotatorio. Posteriormente la muestra fue sonicada utilizando el equipo Bioruptor® Pico (Diagenode) bajo los siguientes parámetros: 15 ciclos de 30 segundo ON y 30 segundos OFF. Una vez concluida la sonicación, la muestra fue centrifugada a 14,800 rpm durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### **6.16 Obtención de extractos protéicos totales a partir de quistes de *E. invadens*.**

Brevemente,  $1 \times 10^7$  quistes previamente purificados fueron resuspendidos en 100  $\mu$ L de M-PER “*Mammalian Protein Extraction Reagent*” (Thermo Fisher Scientific) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete 1X* (Roche), 20mM NEM, 1mM PMSF y 2mM Iodoacetamida) y se realizaron 10 ciclos de congelación en N<sub>2</sub> líquido durante 2 min y descongelación de 1 – 2 min a temperatura ambiente con la finalidad de fracturar la pared del quiste. Posteriormente la muestra fue sonicada utilizando el equipo Bioruptor® Pico (Diagenode) bajo los siguientes parámetros: 15 ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos OFF. Una vez concluida la sonicación, la muestra fue centrifugada a 14,800 rpm durante 1 h a 4°C. El sobrenadante, que contiene el extracto total, se colectó en un tubo nuevo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### **6.17 Extracción de histonas a partir de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens*.**

A partir de los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens*, se realizó la extracción de histonas de acuerdo con el protocolo descrito por Byers J. *et al.*, 2005. Aproximadamente  $2 \times 10^7$  trofozoítos se colocaron en hielo durante 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a 4°C. El botón de parásitos se lavó 2 veces con PBS 1X frío y la pastilla obtenida fue resuspendida en 1mL de buffer de lisis (10 mM Tris pH 6.5, 27 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1% Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM sucrosa) al cual se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete 1X* (Roche), 20mM NEM, 1mM PMSF y 2mM Iodoacetamida) y se incubó durante 10 min a 4°C. Posteriormente la muestra se transfirió a un homogenizador previamente enfriado a -20°C y se aplicaron golpes con la ayuda del mazo con la finalidad de lisar a las células. La lisis se monitoreo mediante observación en el microscopio hasta obtener aproximadamente el 90% de los trofozoítos lisados. La muestra se transfirió a tubos *Eppendorf* de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante, que corresponde al extracto citoplásmico se almacenó a -80°C. Por otra parte, la pastilla obtenida (la cual contiene a los núcleos) fue resuspendida en 333 $\mu$ L de buffer de extracción (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0 y 0.1 mM EGTA pH 8.0) al cual se le adicionaron inhibidores de proteasas. La purificación de los núcleos se realizó mediante un colchón de sacarosa a una concentración de 0.34 M resuspendido en buffer de extracción con inhibidores de proteasas. La muestra fue centrifugada a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C y la pastilla obtenida, la cual corresponde a los núcleos, se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer de resuspensión Tris – EDTA (28.5 mM

Tris pH 6.5, 37 mM EDTA) que contenía HCl a una concentración final de 0.4 N, e inhibidores de proteasas. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación orbital, con la finalidad de extraer la mayor cantidad posible de histonas. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,800 rpm durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que contiene a las proteínas nucleares básicas. A este sobrenadante se le adicionaron 8 volúmenes de acetona grado HPLC fría (mantenida al menos una noche a -20°C), se mezcló por inversión y se almacenó a -20°C toda la noche con el propósito de precipitar y concentrar a las proteínas. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,800 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla que contenía a las proteínas básicas entre ellas a las histonas, se lavó 2 veces con 500 µL de acetona grado HPCL fría y se dejó secar al aire. Posteriormente se resuspendió en aproximadamente 30 a 50 µL de Tris-HCl 1M pH 8.8 más inhibidores de proteasas (*Complete 1X* (Roche) y las muestras fueron utilizadas inmediatamente o bien, almacenadas a - 20°C hasta su uso.

#### **6.18 Extracción de histonas a partir de quistes de *E. invadens*.**

En el caso de la extracción de histonas de quistes de *E. invadens* el protocolo se modificó debido a la presencia de la pared de quitina, por esta razón fue necesario realizar ciclos de congelación y descongelación, así como de sonicación. Brevemente,  $1 \times 10^7$  quistes fueron resuspendidos en 400 µL de buffer de lisis (10 mM Tris pH 6.5, 27 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 1% Triton X-100, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 mM de sacarosa) al cual se le adicionó inhibidores de proteasas (*Complete 1X* (Roche), 20mM NEM, 1mM PMSF y 2mM Iodoacetamida). Hecho lo anterior se procedió a realizar 10 ciclos de congelación en  $\text{N}_2$  líquido durante 5 min y descongelación de 1 – 2 min a temperatura ambiente con la finalidad de fractura la pared del quiste Posteriormente la muestra fue sonicada utilizando el equipo Bioruptor® Pico (Diagenode) bajo los siguientes parámetros: 20 ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos OFF.

Una vez concluida la sonicación, a la muestra se adicionó HCl a una concentración final de 0.4 N y se incubó en agitación orbital durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que contiene a las proteínas nucleares básicas. A este sobrenadante se le adicionaron 8 volúmenes de acetona fría, se mezclaron por inversión y almacenaron a -20°C toda la noche con el propósito de precipitar y concentrar a las proteínas. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla que contiene a las proteínas totales básicas, se lavó 2 veces 500 µL con acetona fría y se dejó secar al aire. Finalmente, el botón se resuspendió en aproximadamente 30 a 50 µL de Tris-HCl 1M

pH 8.8 más inhibidores de proteasas y las muestras fueron utilizadas inmediatamente o bien, almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.19 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para histonas.**

Las histonas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes en donde el detergente aniónico dodecil sulfato de amonio (SDS) es rutinariamente empleado para este fin, ya que asegura la disociación de las proteínas en sus subunidades. El gel de poliacrilamida se realizó de acuerdo al protocolo descrito por UK Laemmli, 1970. Los vidrios (10x8 cm) y los separadores (0.75 mm) empleados para hacer el gel, se ensamblaron según las instrucciones del fabricante (Hoefer Amersham Biosciences). En el molde se vació primero el gel resolutivo el cual tenía la siguiente composición: acrilamida-bis acrilamida al 18 %, Tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio (PSA) 0.05%, N,N,N,N-tetrametiletilenediamina (TEMED). Al gel resolutivo se le agregó isopropanol con el propósito de aplanar la superficie del gel. Una vez que el gel había polimerizado, el isopropanol fue eliminado y lavado con agua bidestilada. Posteriormente, se vertió el gel concentrador (sobre el gel resolutivo) el cual contenía: acrilamida-bis acrilamida al 4 %, Tris 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1%, PSA 0.05% y TEMED 0.005% y se colocó inmediatamente el peine para formar los pozos, el gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se colocó en la cámara de electroforesis (Hoefer, Amersham Biosciences) con buffer de corrida 1X (14.4 g de glicina, 3 g de Tris-base, 10 mL de SDS al 10 % y el volumen necesario de agua bidestilada para 1L). Las muestras se prepararon agregando buffer Laemmli 4X (2 mL de Tris 1M pH 6.8, 4 mL de SDS 10%, 400  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol, 4 mL de glicerol) a una concentración final de 1X y se hirvieron a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 min para posteriormente centrifugarlas a 14,000 rpm durante 3 min. Estas muestras, se cargaron en el gel y se migró a 120V por aproximadamente 3 h. Finalizada la corrida, el gel se fijó y tiñó con azul brillante de Coomassie (metanol: ácido acético glacial: agua en una proporción 50:10:40 v/v) por 1 h. Posteriormente, el gel se destiñó utilizando una solución de destinción que contenía: ácido acético al 7% y metanol al 25%; o bien el gel una vez finalizada la corrida fue utilizado para los ensayos de Western Blot.

### **6.20 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para los extractos totales.**

Los extractos totales de trofozoítos y quistes de *E. invadens* se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes. El gel de poliacrilamida fue

preparado de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente, con la diferencia de que el gel resolutivo tuvo una concentración de acrilamida-bis acrilamida al 12%. Se cargaron 20  $\mu$ L de cada extracto en el gel y éste se corrió a 120V por aproximadamente 1h 30 min y una vez finalizada la corrida fue utilizado para los ensayos de Western Blot.

### **6.21 Western Blot (WB).**

Al concluir la migración electroforética, se prepararon los materiales para realizar la transferencia de proteínas del gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo con el protocolo descrito por Towbin H. *et al.*, 1979. Para ello, en el armazón de plástico de la cámara de transferencia se armó un sándwich constituido por: una esponja, seguidas de tres piezas de papel filtro *Whatman*, el gel que contenía a las proteínas de interés, la membrana de nitrocelulosa, nuevamente tres piezas de papel *Whatman* y una esponja. Una vez armado el sándwich, éste fue colocado en el interior de la cámara de transferencia, a la cual se adicionó el buffer de transferencia (200 mL de metanol, 3 g de Tris-base, 14.4 g de glicina en 1 L). La cámara fue sumergida en hielo durante todo el proceso de transferencia la cual se realizó durante 2 h a 120 volts y 400 mAmp. Posteriormente, se analizó la eficiencia de la transferencia al teñir la membrana con Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 2%). Una vez que se verificó que las proteínas se habían transferido a la membrana, se procedió a bloquearla con una solución al 5% de leche en PBS-Tween-20 al 0.05%, durante 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Después, la membrana fue incubada con los siguientes anticuerpos primarios: Histona H3 COOH (Abcam ab1791) 1:150,000; Histona H4 COOH (Santa Cruz sc-8658-R) 1:2,000; Histona H4 pan-acetilada (Millipore 06-866) 1:4,000, Histona H4K12ac (Abcam ab61238) 1:2,000; Histona H4K20me3 (Millipore 07-463) 1:500, HDAC3 (Active Motif 40968) 1:1000, Lámina B1 (Abcam ab16048) 1:5,000; Histona H4R3me1 (Abcam ab17339) 1:500, Fibrilarina 1:3,000 y PRP6 1:500 (estos últimos proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía). Todos ellos fueron diluidos en una solución de leche al 2% en PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante.

Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces con PBS 1X – Tween 20 al 0.05% durante 10 min a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-Fc de conejo acoplado a HRP (Horse Radish Peroxidase) en la misma solución a una dilución de 1:7,500 durante 2 h a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo la membrana se lavó 3 veces con PBS 1X – Tween 20 al 0.05% durante 10 min a temperatura ambiente y agitación constante Para

identificar la interacción del anticuerpo con las proteínas de interés, la membrana se incubó con una mezcla volumen a volumen de los reactivos proporcionados por el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34095 Thermo Scientific) y se reveló en el equipo ChemiDoc™ MP System de BioRad.

### **6.22 Recuperación de las bandas del gel SDS–PAGE para su análisis por LC–MS/MS.**

Para corroborar que realmente en la preparación obtenida mediante extracción ácida se encontraban contenidas las histonas, los extractos nuevamente se migraron en geles SDS-PAGE al 18 % por duplicado. Uno de estos geles fue teñido con Coomassie, mientras que el otro fue transferido y analizado mediante WB utilizando los anticuerpos dirigidos contra el extremo COOH–terminal de las histonas H3 y H4 y revelado mediante autoradiografía. Las placas autoradiográficas fueron utilizadas como regla para delimitar el rango en el cual se encontraban contenidas las histonas en el gel que había sido teñido con Coomassie, por lo que los fragmentos fueron cortados y enviados para su análisis por LC–MS/MS.

### **6.23 Análisis por LC–MS/MS.**

Para el análisis por espectrofotometría de masas (LC-MS/MS), a las secciones de interés del gel se les realizó una reducción con DTT 10 mM y alquilación con yodoacetamida 55 mM, para posteriormente ser digeridas proteolíticamente con tripsina de grado de secuenciación (preparada en un buffer de bicarbonato de amonio 50 mM) durante la noche a 37°C. Los péptidos digeridos se analizaron mediante LCMS / MS en un espectrómetro de masas orbitrap de Thermo Scientific Exactive Plus junto con un EASY-nLC II nano UHPLC y una fuente de nanoespray Proxeon. La masa de los péptidos presentes se midió usando el MALDI-ToF MS lo que generó una huella de masa peptídica. El primer paso para su identificación consistió en utilizar la información de la huella de la masa peptídica para compararla con el banco de datos de *Entamoeba* (<http://amoebadb.org/amoeba/showApplication.do>). La huella de la masa peptídica que está en la base de datos es teórica ya que se basa en el número de sitios de corte que la proteína puede sufrir por la tripsina, la cual dependerá de su estructura primaria. El mejor apareamiento permitió predecir de qué proteína se trataba y el gen que la codifica.

#### **6.24 Inmunofluorescencia en trofozoítos de *E. histolytica* y *E. invadens*.**

Aproximadamente 300,000 trofozoítos de *E. histolytica* y de *E. invadens* fueron crecidos en placas de 6 pozos donde se colocaron cubreobjetos estériles con 8 mL de medio TYI-S33 o LYI-S-2 dependiendo de la cepa, hasta que el cultivo alcanzó una confluencia del 80 al 90%. Esto con la finalidad de que las células se adhieran y crezcan sobre el vidrio para que no se desprendieran fácilmente durante el proceso de la inmunofluorescencia. Una vez alcanzada esta confluencia, se retiró el medio y las células se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 6.8. Los trofozoítos fueron permeabilizados por la adición de una mezcla fría de MeOH:Acetona en una proporción 1:1 y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se retiró y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se realizó el bloqueo con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 2% en PBS 1X durante 1 hora a 37°C. Se retiró la solución de BSA y se colocaron 50 µL del anticuerpo primario (Histona H4 pan-acetilada 1:500, H4R3me1 1:50, HDAC3 1:50, Lamina B1 1:50) todos diluidos en una solución de BSA al 1% en PBS 1X. Para evitar la evaporación y garantizar la distribución homogénea del anticuerpo, la región en donde se encontraba la muestra se cubrió con papel parafilm y se incubaron durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y los cubreobjetos se lavaron 3 veces por aspiración suave con PBS 1X. Posteriormente se colocaron 50 µL del anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit IgG (A11036 Invitrogen) o Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (A11008 Invitrogen) en una dilución 1:200 con BSA al 1% en PBS 1X y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados por aspiración suave con PBS 1X y un lavado final con H<sub>2</sub>O MilliQ y al cubreobjetos se le agregó el medio de montaje Vectashield con DAPI y fue colocada sobre un portaobjetos evitando la formación de burbujas. Finalmente, la laminilla se selló con barniz y la preparación se observó mediante microscopía confocal.

#### **6.25 Inmunofluorescencia en quistes de *E. invadens*.**

A diferencia del protocolo previamente descrito para trofozoítos, en el caso de los quistes el proceso se realizó en suspensión. Brevemente,  $5 \times 10^6$  quistes fueron fijados con 500 µL de *p*-formaldehído (PFA) al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación constante y suave. Posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Los quistes fijados fueron resuspendidos en 200 µL de PBS 1X y se realizaron 2 ciclos de congelación en N<sub>2</sub> líquido durante 2 min y descongelación a temperatura ambiente durante 1 a 2 min para fracturar la



pared del quiste y permitir el acceso de los anticuerpos. Posteriormente se realizó la permeabilización de los quistes con 500 µL de Tritón X-100 al 0.5% durante 5 min con rotación suave y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Posteriormente se realizó el bloqueo utilizando BSA al 2% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación suave y constante. La muestra se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y la pastilla obtenida fue resuspendida en 50 µL de anticuerpo primario (Histona H4 pan-acetilada 1:500, H4R3me1 1:50, HDAC3 1:50 todos diluidos en una solución de BSA al 1% en PBS 1X y se incubaron durante toda la noche a 4°C con rotación suave y constante. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente; se recuperó el anticuerpo primario y la pastilla fue lavada 3 veces con PBS 1X incubando la muestra durante 3 min a temperatura ambiente con rotación suave y constante. Posteriormente se colocaron 50 µL del anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit IgG (A11036 Invitrogen) o Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (A11008 Invitrogen) en una dilución 1:200 con BSA al 1% en PBS 1X y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación constante y suave protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X incubando la muestra durante 3 min a temperatura ambiente con rotación suave y constante y se realizó un lavado final con H<sub>2</sub>O MilliQ y la pastilla fue resuspendida en 50 µL de PBS 1X. Se tomaron 25 µL de la muestra y se colocaron en un cubreobjetos recubierto con Poly L – lisina para permitir la adhesión de los quistes y se dejó secar al aire por 5 min. Posteriormente al cubreobjetos se le agregó el medio de montaje Vectashield con DAPI y fue colocado sobre un portaobjetos evitando la formación de burbujas. Finalmente, la laminilla se selló con barniz y la preparación se observó mediante microscopía confocal.

#### **6.26 Evaluación de la viabilidad de trofozoítos de *E. invadens* tratados con diferentes concentraciones de Tricostatina A (TSA) mediante azul de tripano.**

Para conocer la dosis en la cual la Tricostatina A no era tóxica para los trofozoítos, se realizó una curva con diferentes concentraciones de TSA durante 24 h. Brevemente, trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se colocaron en hielo por 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad. Una vez colectadas las células, se realizó el conteo utilizando la cámara de Neubauer con la finalidad de cultivar 100,000 trofozoítos en tubos de vidrio con 5 mL de medio LYI-S-2. Una vez que se colocaron las células, se dejaron reposar durante 2 h a 25°C para permitir que las células se adhieran al vidrio y posteriormente se les adicionó Tricostatina A (T8552 Sigma – Aldrich, stock 66 µM en Etanol absoluto) a las

concentraciones de 50, 100, 150 y 200 nM, así como 45 µL de etanol absoluto que fue el vehículo en donde se resuspendió el TSA. Las células se mantuvieron por 24 h a 25°C y transcurrido este tiempo, los tubos se colocaron en hielo por 5 min y se cosecharon por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X y se evaluó la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul de tripano, para lo cual la pastilla fue resuspendida en PBS 1X y a partir de ella se realizó una dilución 1:1 con azul de tripano al 0.4% (preparado en PBS 1X) y se contaron en la cámara de Neubauer un total de 200 células en diferentes campos en donde se obtuvo el porcentaje de células que captaron el colorante (células muertas) y células no teñidas (células vivas).

#### **6.27 Evaluación de la viabilidad de trofozoítos de *E. invadens* tratados con diferentes concentraciones de Tricostatina A (TSA) mediante ensayos de MTT.**

Con la finalidad de corroborar que los trofozoítos de *E. invadens* tratados con TSA fueran metabólicamente activos, se realizó un ensayo de MTT, el cual involucra la conversión del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a un compuesto insoluble conocido como formazan, el cual es posteriormente solubilizado y su concentración se determina por la lectura de la absorbancia a 570 nm. Brevemente, en placas de 12 pozos se cultivaron 25,000 trofozoítos en cada pozo llevándolo a un volumen final de 5 mL con medio LYI-S-2. Una vez que se colocaron las células, se dejaron reposar durante 2 h a 25°C para permitir que las células se adhieran a la placa. Posteriormente se les adicionó TSA a las siguientes concentraciones de 50, 100, 150 y 200 nM, así como etanol absoluto que fue el vehículo en donde se resuspendió el TSA. Las células se mantuvieron por 24 h a 25°C y transcurrido este tiempo se les retiraron 4.7 mL de medio y se mantuvo la monocapa de células con 300 µL de medio y se les adicionó 15 µL del stock del reactivo MTT (V13154 Invitrogen) cuya concentración fue de 5 mg/mL. La placa fue incubada durante 4 h a temperatura ambiente cubierto de la luz y transcurrido este tiempo para lizar a las células se adicionaron a cada pozo 300 µL de la solución que contenía 0.1% de SDS y 0.01 M de HCl. Posteriormente, la placa fue incubada a 37°C de 12 a 14 h y después de este tiempo se colectó el sobrenadante de cada pozo en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 1 min. Finalmente 200 µL del sobrenadante fueron colocados en placas de 96 pozos con fondo plano y la absorbancia de cada muestra fue medida mediante un espectrofotómetro a 570 nm.

### **6.28 Inducción del enquistamiento de trofozoítos de *E. invadens* en presencia de TSA.**

Se realizó la inducción del enquistamiento como se describió en la sección 6.3 y se adicionó el TSA a una concentración de 200 nM y como control se adicionó etanol absoluto. Las células fueron incubadas durante 24 h y después de este tiempo las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas 2 veces con PBS 1X. Se tomó una alícuota de las células tratadas y no tratadas con TSA para realizar la tinción con calcofluor blanco como se describió en la sección 6.5. Ambas muestras teñidas fueron observadas mediante microscopia confocal y se tomaron fotografías diferentes campos para realizar un conteo de 500 células en donde se obtuvo el porcentaje de células positivas a la tinción con calcofluor. El resto de cada muestra se empleó para la extracción de RNA total, tratamiento con DNAasa I, PCR utilizando RNA tratado con DNAasa I, integridad del RNA y síntesis de cDNA como se describió anteriormente en las secciones 6.8, 6.9, 6.10 y 6.11 y 6.12.

### **6.29 Amplificación por PCR de los insertos EiSirDC HindIII/KpnI y EiSirDC BamHI/EcoRI.**

Para generar la construcción del dsRNA para el dominio catalítico de EiSir2, así como la proteína recombinante dirigida a esta misma región, se diseñaron un par de oligonucleótidos que amplificaran los 531 pb que corresponden a esta región del gen. Para ello, cada inserto de interés fue amplificado por PCR cuya mezcla contenía: 1.25 µL del buffer 10X, 2µL de la mezcla de los cuatro dNTPs (2.5 mM de cada uno), 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1.25 µL del oligonucleótido sentido EiSirDC HindIII o EiSirDC BamHI 10 pmol, 1.25 µL del oligonucleótido antisentido EiSirDC con el sitio de restricción KpnI y EiSirDC con el sitio de restricción EcoRI, 0.5 µL de Taq Polimerasa (AmpliTaq Applied Biosystems), 100 ng de DNA genómico de trofozoítos de *E. invadens* y H<sub>2</sub>O para un volumen final de reacción de 12.5 µL.

Las condiciones empleadas para la amplificación de los insertos fueron: 1 ciclo de desnaturalización del DNA y activación de la enzima a 94°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de amplificación constituidos por 94°C durante 30 segundos, 65.5°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 min, y finalmente un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

### 6.30 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Las bandas del DNA de interés se recuperaron del gel de agarosa utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN). Para ello, se cortó el fragmento del gel de agarosa que contenía la banda de interés y se colocó en un tubo *Eppendorf* nuevo. El fragmento fue pesado y por cada 100 mg de agarosa se adicionaron 300  $\mu$ l de buffer QG. La mezcla (agarosa – buffer QG), se incubó a 65°C durante 10 min con el propósito de solubilizar la agarosa. Transcurrido este tiempo, la mezcla fue colocada en una columna para que el DNA soluble se adheriera a la resina de sílica. Esta columna se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Este paso se repitió tres veces con la finalidad de recuperar la mayor parte del DNA. Una vez que el DNA quedó adherido a la sílica de la columna, las sustancias contaminantes (agarosa y sales) fueron eliminadas a través de un lavado con 750  $\mu$ l de la solución PE. La columna se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue desechado y nuevamente la columna se centrifugó bajo las mismas condiciones para eliminar trazas de etanol provenientes de la solución PE. Para realizar la elución del DNA, la columna se colocó en un tubo *Eppendorf* nuevo y se adicionaron 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (la cual fue previamente incubada a 65°C) y finalmente para, la columna se incubó a 65 °C durante 3 min para posteriormente ser centrifugada a 12,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente con el propósito de recuperar el DNA. Este paso de elución se realizó una segunda vez empleando 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Este DNA purificado fue cuantificado y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

### 6.31 Digestión de los insertos EiSirDC-HindIII/KpnI y EiSirDC BamHI/EcoRI con enzimas de restricción.

Con la finalidad de que los fragmentos tanto de EiSirDC-*HindIII/KpnI* y EiSirDC *BamHI/EcoRI* fueran clonados en los vectores pL4440 y pGEX6P1 respectivamente, se realizó la digestión de los fragmentos purificados con las enzimas *HindIII* y *KpnI* para clonar en el vector pL4440 y con *BamHI* y *EcoRI* para clonar en el vector pGEX6P1, para ello, las muestras se prepararon de la siguiente manera:

<b>EiSirDC HindIII/KpnI</b>		<b>EiSirDC BamHI/EcoRI</b>	
DNA purificado (1 a 3 $\mu$ g)	X $\mu$ L	DNA purificado (1 a 3 $\mu$ g)	X $\mu$ L
Buffer NEB2 10X	5 $\mu$ L	Buffer NEB2 10X	5 $\mu$ L
HindIII (20U/ $\mu$ L)	1.5 $\mu$ L	BamHI (20U/ $\mu$ L)	1.5 $\mu$ L
KpnI (10 U/ $\mu$ L)	1.5 $\mu$ L	EcoRI (20 U/ $\mu$ L)	1.5 $\mu$ L
BSA 100X	0.5 $\mu$ L	BSA 100X	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	X $\mu$ L	H <sub>2</sub> O	X $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>	<b>Volumen final</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>

Estas muestras se incubaron durante 2 h a 37°C y posteriormente el DNA digerido fue purificado utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), siguiendo el protocolo previamente descrito. Los fragmentos digeridos y purificados fueron cuantificados y almacenados a -20°C hasta el momento de su uso.

### **6.32 Obtención del DNA plasmídico mediante Miniprep.**

Todos los plásmidos obtenidos en este trabajo fueron purificados siguiendo las instrucciones recomendadas por el kit *GenElute Plasmid Miniprep* (Sigma – Aldrich). Para ello, la colonia bacteriana que contenía el plásmido de interés fue inoculada en 10 mL de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se dejó crecer toda una noche a 37°C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente, los 10 mL de cultivo se centrifugaron a 4,000 rpm durante 30 min a 4°C. El botón fue resuspendido por pipeteo en 200 µL de buffer de resuspensión suplementado con RNAsa A y posteriormente se adicionaron 200 µL de buffer de lisis, se mezcló por inversión 6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 4 min. Inmediatamente se le adicionaron 350 µL del buffer de neutralización y se mezcló por inversión 6 veces para después centrifugar a 14,800 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en un tubo *Eppendorf* nuevo y se colocó en una columna proporcionada en el kit, la cual había sido previamente equilibrada con 500 µL de solución de preparación de la columna y centrifugada a 12,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. La columna que contenía el sobrenadante fue centrifugada a 12,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente; este paso se realizó 3 veces con el propósito de recuperar la mayor cantidad posible de DNA. Una vez que el DNA quedó adherido a la columna, esta fue lavada con 500 µL de la solución de lavado opcional, centrifugando a 13,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se desechó.

La columna fue lavada nuevamente con 750 µL de solución de lavado que contiene etanol y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y la columna se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 3 min para eliminar las trazas de etanol. Finalmente, para realizar la elución, la columna se colocó en un tubo *Eppendorf* nuevo y se le adicionaron 50 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (la cual previamente fue incubada a 65°C), se incubó a 65 °C durante 3 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Se realizó una segunda elución con 25 µL de H<sub>2</sub>O a 65°C. El DNA obtenido fue cuantificado y se migraron entre 100 y 200 ng de DNA en un gel de agarosa al 0.8% con el propósito de verificar la integridad del DNA, después de lo cual el plásmido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

### 6.33 Digestión de los plásmidos pL4440 con *HindIII* y *KpnI* y pGEX6P1 con *BamHI* y *EcoRI*.

Con la finalidad de que los insertos digeridos sean ligados a los plásmidos, se realizó la digestión de los plásmidos pL4440 con *HindIII* y *KpnI* y pGEX6P1 con *BamHI* y *EcoRI* de la siguiente manera.

<b>pL4440 <i>HindIII/KpnI</i></b>		<b>pGEX6P1 <i>BamHI/EcoRI</i></b>	
Plásmido (5 µg)	X µL	Plásmido (5 µg)	X µL
Buffer NEB2 10X	5 µL	Buffer NEB2 10X	5 µL
<i>HindIII</i> (20U/µL)	1.5 µL	<i>BamHI</i> (20U/µL)	1.5 µL
<i>KpnI</i> (10 U/µL)	1.5 µL	<i>EcoRI</i> (20 U/µL)	1.5 µL
BSA 100X	0.5 µL	BSA 100X	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	X µL	H <sub>2</sub> O	X µL
<b>Volumen final</b>	<b>50 µL</b>	<b>Volumen final</b>	<b>50 µL</b>

Estas muestras se incubaron durante 2 h a 37°C y posteriormente los plásmidos digeridos fueron migrados en geles de 0.8 % para recuperar cada plásmido linearizado y cada uno fue cortado del gel y purificado utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), siguiendo el protocolo previamente descrito. Los plásmidos digeridos y purificados fueron cuantificados y almacenados a -20°C hasta su uso.

### 6.34 Clonación de los insertos EiSirDC-*HindIII/KpnI* y EiSirDC *BamHI / EcoRI* en los vectores pL4440 y pGEX6P1.

Una vez que se contaba tanto con los plásmidos y los insertos digeridos, ambos productos fueron empleados en una reacción de ligación para obtener los vectores pL44440 – EiSirDC y pGEX6P1 – EiSirDC. Para la reacción de ligación se utilizó 1 µL de la enzima T4 DNA Ligasa (New England Biolabs), 2 µL del buffer para la enzima 10X y una relación de inserto:vector (3:1). Esta mezcla se llevó a un volumen final de 20 µL y se incubó durante toda la noche a 16°C.

### 6.35 Transformación de bacterias *E. coli* químicamente competentes.

El proceso de transformación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 100 µL de células HT115 DE3 (F<sup>-</sup>, *mcrA*, *mcrB*, IN(*rrnD-rrnE*)1, *rnc14::Tn10*) ó XL10 Gold (Tet<sup>r</sup>  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>], químicamente competentes se descongelaron en hielo y se transfirieron a un tubo de vidrio estéril al cual se le adicionó 5 µL de la mezcla de ligación pL4440 – EiSirDC o pGEX6P1 – EiSirDC y se incubaron por 30 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se dio un choque térmico incubando la mezcla durante 2 min a

42°C y posteriormente 1 min en hielo. Concluido este tiempo, a cada tubo se le adicionó 1 mL de medio Luria Bertoni (LB) y fue incubada durante 1 hora a 37°C en agitación. Posteriormente, las células se transfirieron a un tubo *Eppendorf* nuevo y estéril de 1.5 mL y se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 min. Se eliminaron 900 µL del medio y el botón de bacterias fue resuspendido en los 100 µL restantes y se espatularon, en el caso de pGEX6P1 EiSirDC en una caja de agar LB – ampicilina (100 mg/mL) para el caso de pL4440 EiSirDC en agar LB ampicilina – tetraciclina (100 mg/mL, 10 mg/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C hasta la aparición de colonias.

### **6.36 PCR de Colonia.**

Para identificar las colonias que contenían las construcciones de interés (pL4440 – EiSirDC y pGEX6P1 – EiSirDC), se realizaron ensayos de PCR de colonia a partir de 10 colonias elegidas al azar. Para cada construcción y para cada cepa, las colonias se tomaron con una micropunta, la cual se empleó para hacer una réplica de la colonia en una caja de medio LB-ampicilina o LB ampicilina – tetraciclina y el resto de la colonia se disolvió en la mezcla de reacción de PCR constituida por: 1.25 µL del buffer 10X, 2µL de la mezcla de los cuatro dNTPs (2.5 mM de cada uno), 0.75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.25 µL de los oligonucleótidos sentido EiSirDC-*HindIII* y EiSirDC-*BamHI* (10 pmol/µL), 1.25 µL del oligonucleótido antisentido EiSirDC-*KpnI* y EiSirDC-*EcoRI* (10 pmol), 0.25 µL de Taq Polimerasa (Invitrogene), DNA de la colonia y H<sub>2</sub>O a un volumen final de 12.5 µL. Las condiciones empleadas para la amplificación del inserto fueron: 1 ciclo de activación de la enzima y desnaturalización del DNA a 94°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de amplificación constituidos por 94°C durante 30 segundos, 65.5°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 min, y finalmente un ciclo de 5 min a 72°C.

Posteriormente, los productos amplificados fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.5% el cual fue teñido con bromuro de etidio. Por otro lado, las cajas de LB – ampicilina y LB – ampicilina y tetraciclina, que contenían a las réplicas de las colonias, fueron incubada a 37°C hasta observar claramente el crecimiento bacteriano.

### **6.37 Digestión de los plásmidos obtenidos mediante Miniprep de las colonias seleccionadas por PCR para los vectores pL4440 EiSirDC y pGEX6P1 EiSirDC**

En base a los resultados de la PCR de colonia, se seleccionó una colonia positiva de cada construcción y para verificar que efectivamente contuviera el plásmido con el inserto de interés se realizó la extracción del DNA plasmídico por miniprep de la manera indicada

anteriormente y una vez obtenido este DNA se realizó la digestión de cada plásmido utilizando las enzimas correspondientes, como se indica a continuación.

<b>pL4440 EiSirDC <i>HindIII/KpnI</i></b>		<b>pGEX6P1 EiSirDC <i>BamHI/EcoRI</i></b>	
Plásmido (5 µg)	X µL	Plásmido (5 µg)	X µL
Buffer NEB2 10X	5 µL	Buffer NEB2 10X	5 µL
<i>HindIII</i> (20U/µL)	1.5 µL	<i>BamHI</i> (20U/µL)	1.5 µL
<i>KpnI</i> (10 U/µL)	1.5 µL	<i>EcoRI</i> (20 U/µL)	1.5 µL
BSA 100X	0.5 µL	BSA 100X	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	X µL	H <sub>2</sub> O	X µL
<b>Volumen final</b>	<b>50 µL</b>	<b>Volumen final</b>	<b>50 µL</b>

Estas muestras se incubaron durante 2 h a 37°C y posteriormente los plásmidos digeridos fueron migrados en un gel al 1.5 % para observar la liberación del inserto de interés con un tamaño de 531 pb. Una vez que se identificaron las colonias que contenían las construcciones de interés, estas se enviaron a secuenciar para corroborar que el marco de lectura fuera correcto.

### **6.38 Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EiSirDC.**

La proteína recombinante GST-EiSirDC fue obtenida al inducir su expresión; para ello una colonia bacteriana que contenía el plásmido pGEX6P1 – EiSirDC previamente secuenciado se inoculó en 5 mL de medio LB, el cual, contenía ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. Este cultivo se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C con agitación constante a 250 rpm. Al día siguiente se tomó una alícuota de 2.5mL para inocularla en 250 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. El cultivo se creció a 37 °C con agitación constante hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 mn de 0.7-0.8 y se procedió a inducir la expresión de la proteína. Debido a que el vector *pGEX* está bajo el control del promotor *lac*, el cual es inducido con el análogo de lactosa isopropil-D-tiogalactosa (IPTG), al cultivo se le agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y el cultivo se incubó durante 4 h a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Concluido este tiempo, se procedió a la purificación de la proteína recombinante de acuerdo al protocolo de Frangioni J y Neel G., 1993. Para ello, las bacterias se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 min a 4°C y la pastilla que contiene nuestra proteína de interés sobreexpresada fue resuspendida por pipeteo en 15mL de STE frío suplementado con inhibidores de proteasas y 60 µL de Lisozima (25mg/mL) y se incubó durante 15 min en hielo. Posteriormente, se le adicionaron 750 µL de STE – DTT 100 mM y 2.25 mL de STE – Sarcosil al 10% y la muestra se vortexeo por 5 segundos. Posteriormente las bacterias se lisaron por sonicación



utilizando el equipo *Sonios Vibra-Cell 3* con las siguientes condiciones: 3 ciclos de 3 min cada uno a 50 de amplitud, con intervalos de 10 segundos ON y 10 segundos OFF. Entre cada ciclo se dejó 1 min de reposo para evitar que se calentara la muestra y desnaturalizaran las proteínas, por lo que la muestra se mantuvo todo el tiempo en hielo. Una vez concluida la sonicación, la muestra fue centrifugada a 14,800 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se colectó en un tubo cónico nuevo, obteniendo un volumen aproximado de 25 mL y a este sobrenadante se le adicionaron 7.5 mL de STE – Tritón X-100 10%, Con la finalidad de purificar a la proteína recombinante, el sobrenadante se puso a interactuar durante toda la noche a 4°C con 250 µL de perlas Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) en agitación constante y suave, las cuales habían sido previamente lavadas con PBS 1X. Al día siguiente las perlas se sedimentaron por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 min a 4°C. Las perlas se lavaron 5 veces durante 5 min con PBS 1X y La proteína fusionada a GST se liberó de las perlas al adicionar 250 µL de buffer Laemmli y se procedió a hervir la muestra a 100°C por 5 min. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 14,800 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó tanto la primera como la segunda elución. Las muestras fueron analizadas en geles SDS-PAGE para confirmar la expresión de la proteína de interés en el tamaño esperado y para corroborar que la proteína de interés se encontrara en marco con la bandera de GST, se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo  $\alpha$  GST 1:2,000.

### **6.39 Inducción y purificación del dsRNA para EiSirDC y GFP.**

La colonia de interés que contenía el plásmido pL4440 *EiSirDC* así como la del plásmido control pL4440 GFP se inoculó en 10 mL de medio 2xYT (suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL así como tetraciclina con una concentración final de 5µg/mL) y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación a 250 rpm cubierto de la luz. Al día siguiente, se tomaron 5 mL del pre-inóculo y se adicionaron a 500 mL de medio 2xYT con ampicilina (100 µg/mL) y tetraciclina (5µg/mL) y se incubaron a 37°C en agitación a 250 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.6. Una vez que se alcanzó esta densidad, se adicionó IPTG para tener una concentración final de 2 mM y se incubó a 37°C durante 4 h en agitación a 250 rpm cubierto de la luz. Transcurrido este tiempo, se colectaron las bacterias por centrifugación a 5,000 rpm durante 30 min a 4°C y la pastilla de bacterias se lavó una vez con PBS 1X (preparado en H<sub>2</sub>O DEPC) y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C.

Posteriormente la pastilla de bacterias fue resuspendida con la ayuda de una pipeta en 10 mL de TRIzol y se trabajó únicamente con la mitad del material y el resto se almacenó a -80°C. A los 5 mL de bacterias resuspendidas en TRIzol se les adicionó 1 mL de cloroformo y se vortexeo durante 30 segundos. La muestra se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 12,000 xg durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo se recuperó la fase acuosa en un tubo cónico de 15 mL y se le adicionaron 2.5 mL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y el RNA se dejó precipitando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 4,000 rpm durante 1 hora a 4°C y la pastilla obtenida se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y se lavó 2 veces con etanol al 70% (preparado con H<sub>2</sub>O DEPC) y se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min a 4°C. La pastilla obtenida se dejó secar al aire y finalmente fue resuspendida en 1 mL de H<sub>2</sub>O DEPC.

Para eliminar el DNA bacteriano contenido en la muestra de RNA, esta se trató con DNAasa I de la siguiente manera:

RNA (disuelto en H <sub>2</sub> O DEPC)	100 µL
DNAasa I (1U/µL)	25 µL
Buffer para DNAasa I 10X	140 µL
H <sub>2</sub> O DEPC	235 µL
<b>Volumen Final</b>	<b>1400 µL</b>

La muestra se incubó a 37°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo la muestra fue dividida en 2 tubos (900 µL de muestra en cada tubo) y se realizó el tratamiento con RNAasa A con la finalidad de eliminar el sRNA y quedarnos únicamente con el dsRNA. Para ello, la muestra se preparó como se indica a continuación:

Muestra tratada con DNAasa I	700 µL
NaCl 2.5 M (preparado en H <sub>2</sub> O DEPC)	144 µL
RNAasa A (20 mg/mL)	9 µL
H <sub>2</sub> O DEPC	47 µL
<b>Volumen final</b>	<b>900 µL</b>

Esta muestra se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, para purificar el dsRNA, se realizó una extracción con la mezcla Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico. Para ello, la muestra se dividió en alícuotas de 600 µL y a cada una de ellas se les adicionó un volumen igual de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico 25:24:1 (Sigma – Aldrich), se mezcló por inversión 15 veces y se vortexeo durante 10 segundos. La muestra fue centrifugada a 12,000 xg durante 30 min a 4°C y la fase acuosa fue recuperada. Se realizaron alícuotas de 400 µL de la fase acuosa en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se les adicionó 1000 µL de

etanol absoluto (equivalente a 2.5 volúmenes) y el dsRNA se dejó precipitando a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 14,800 rpm durante 30 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó 2 veces con etanol al 70% (preparado con H<sub>2</sub>O DEPC) y se centrifugó a 14,800 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla obtenida se dejó secar al aire y se resuspendió en aproximadamente 150 a 200 µL de H<sub>2</sub>O DEPC estéril, se incubó a 65°C durante 3 min, se realizaron alícuotas de 30 a 50 µL y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Al mismo tiempo, se tomó una alícuota para cuantificar la cantidad obtenida de dsRNA.

Para evaluar la calidad del dsRNA, el equivalente a 3 µg de dsRNA fue migrado en un gel de agarosa al 2%; para ello la muestra se mezcló con buffer de carga y se incubó a 65°C durante 3 min para posteriormente ser cargada en el gel. La migración se realizó a 100 V durante 30 min y transcurrido este tiempo se realizó la tinción con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL durante 15 min en agitación y finalmente el gel fue lavado con H<sub>2</sub>O DEPC durante 5 min en agitación para su visualización en un transiluminador.

#### **6.40 Modelado por homología**

Para realización del modelado molecular por homología molecular de las proteínas ortólogas de HDAC3 de humano en *E. invadens*, se utilizó el servicio web SWISS-MODEL (Guex N y Peitsch MC., 1997; Schwede T. *et al.*, 2003; Arnold K. *et al.*, 2006), para la superposición se empleó el paquete computacional de Molecular Operating Environment (MOE versión 2014.09.) Se construyó el modelo molecular por homología de los genes EIN\_486830 y EIN\_096050, basándose en una estructura cristalográfica previamente reportada de HDAC3 de humano, la cual se encuentra disponible en el Protein Data Bank o PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) con clave de acceso 4A69.

Las estructuras del modelado por homología de las proteínas EIN\_486830 y EIN\_096050 fueron preparadas por la aplicación LigX del MOE 2014.09, los pasos de preparación incluyen adición de átomos de hidrogeno, cálculos de protonación, tautómeros, asignación de cargas parciales y minimización de energía (relajación de los cristales), utilizando MMFF94 indicando una fuerza de rigidez media cuadrada (RMS) de 0.1kcal/mol/ Å<sup>2</sup>. Se utilizó la estructura en 2D de Tricostatina A utilizando la aplicación Dock MOE 2014.09 para realizar el docking sobre el complejo cristalizado de EiHDAC3- Tricostatina A, colocando

moléculas de agua definidas sobre la estructura, con el fin de darle el correcto funcionamiento a los átomos donadores y aceptores de puentes de hidrogeno. Se tomó la estructura de la Tricostatina A ([https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trichostatin\\_A](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trichostatin_A)) para obtener una conformación en 3D del ligando fueron preparados utilizando MOE 2014.09 mediante el cálculo de estado de protonación asignado de acuerdo con el campo de fuerza MMFF94 y realizando una minimización de energía a un gradiente de RMS de 0.1kcal/mol/ Å<sup>2</sup>.

#### **6.41 Docking molecular**

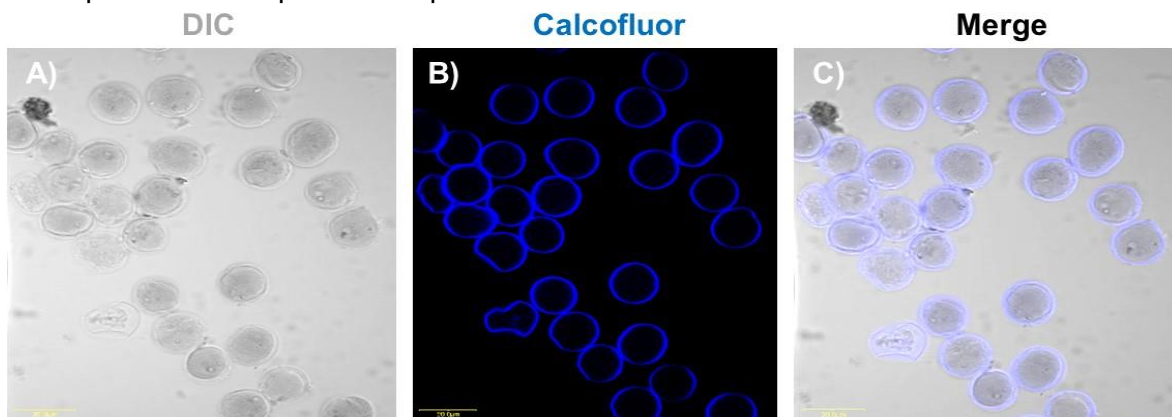
El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el software AutoDock 4.2.626 y el Dock de MOE 2014.09. Los cálculos de acoplamiento fueron llevados a cabo con los ajustes de parámetros estándar recomendados, se evaluaron 250000 energías máximas del ligando con el receptor, se evaluaron las energías máximas utilizando el algoritmo genérico, RMSD con una tolerancia de 2.0 Å, las cuadrículas se calcularon con Autogrid 4.2.626 con un espaciado de 0.375 Å centrándolos en los ligandos cristalizados.

El acoplamiento molecular con MOE 2014.09 se llevó a cabo utilizando las coordenadas de los ligandos reportados para la Tricostatina A en la proteína HDAC3. Se utilizó la función matcher como método de colocación para generar 1000 sitios de acoplamiento planteados para cada caso. Los 30 mejores resultados de acoplamiento se analizaron basándose en la puntuación Londres dG, los cuales fueron definidos utilizando cálculos de campos de fuerza y se sometieron a un nuevo cálculo usando la función de puntuación GBVI/WSA dG en todos los ensayos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Inducción del enquistamiento *in vitro* de trofozoítos de *E. invadens*.

Para determinar si existían diferencias en las marcas epigenéticas y en la arquitectura nuclear entre las fases de trofozoíto y quiste de *E. invadens*, un paso fundamental para poder abordar este objetivo fue contar con ambas fases de vida del parásito. En el caso de los trofozoítos, estos se mantuvieron en cultivo en medio LYI-S-2 a 26°C y a partir de ellos se realizó la inducción del enquistamiento al cultivar los trofozoítos en el medio LG diluido al 47%, con suero bovino adulto al 5% y vitaminas al 0.26%. Bajo estas condiciones de cultivo a 26°C y después de 72 h, se obtuvo una población heterogénea formada por trofozoítos, pre-quistes y quistes ya que no se logra un enquistamiento del 100%. Para purificar la fracción que correspondía a los quistes, se realizó la lisis con sarcosil y agua bidestilada seguida de su purificación mediante un gradiente de Percoll, en el cual los quistes se encontraron en la interfase del 30 y 40% del gradiente. Una vez purificados los quistes se confirmó su presencia y pureza mediante la tinción con calcofluor blanco, el cual es una molécula que se une a la pared de quitina y emite fluorescencia bajo luz ultravioleta (Arroyo-Begovich A. *et al.*, 1980). En la figura 8 se puede observar una imagen representativa de esta tinción en donde se aprecia que la fracción recuperada corresponde a una población enriquecida en quistes.



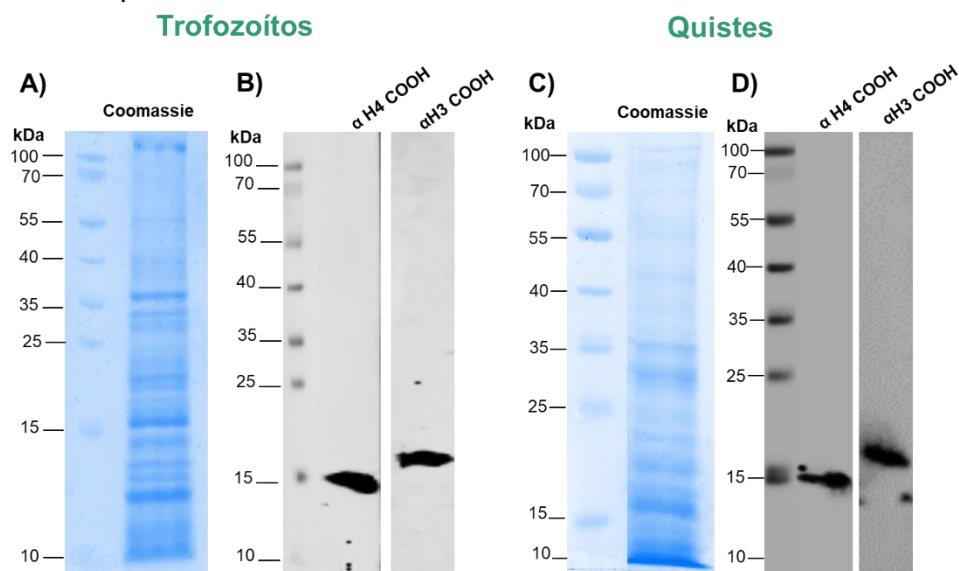
**Figura 8. Quistes de *E. invadens* teñidos con calcofluor blanco.** Los quistes presentan un tamaño de aproximadamente 10 – 20  $\mu\text{m}$  y morfología redonda, son refringentes y positivos a la tinción con calcofluor. A) Microscopía de contraste de fases, B) Microscopía de epifluorescencia en el canal de DAPI y C) empalme de las imágenes A) y B).

### 7.2 Obtención e identificación de las histonas en trofozoítos y quistes de *E. invadens*.

Una vez que se contó con las 2 fases del parásito (trofozoítos y quistes), y con el propósito de iniciar con la identificación de las modificaciones post-traduccionales de las histonas, se procedió a obtener las histonas tanto de trofozoítos como de quistes. En el caso de los

trofozoítos, se realizó una extracción ácida a partir de la obtención de núcleos, mientras que, en el caso de los quistes, no fue posible purificar exclusivamente núcleos por lo que se realizó un extracto total ácido. La integridad de las proteínas obtenidas en ambos casos se verificó en un gel SDS – PAGE al 18%. En la figura 9 A y C, se observa que hay una mayor cantidad de proteínas en la región del gel que comprende de los 10 a los 40 kDa, tanto en los extractos obtenidos de los trofozoítos y los quistes, respectivamente, lo que en base a su peso molecular nos sugería que probablemente en este rango de proteínas se encontraban las histonas.

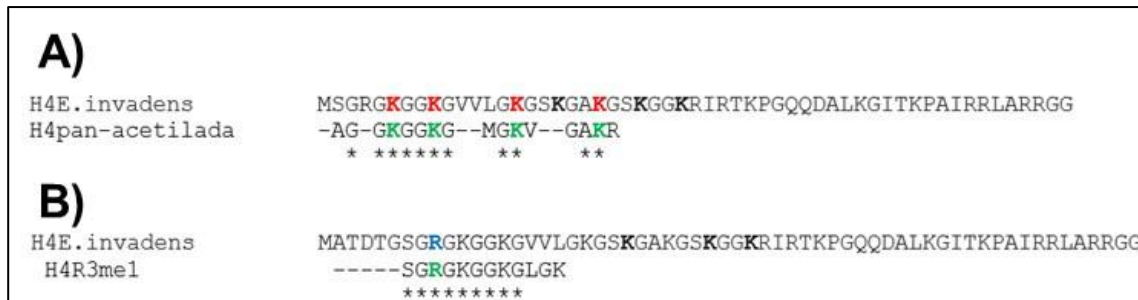
Para determinar si efectivamente en la preparación ácida tanto de los trofozoítos como la de los quistes se encontraban las histonas, se realizaron ensayos de WB utilizando anticuerpos dirigidos contra el extremo COOH terminal de las histonas H3 y H4 de humano, los cuales como se mencionó en la introducción son la región más conservada en las histonas de *Entamoeba*. Como se puede observar en las figuras 9 B y D, en la membrana que contiene las proteínas ácidas de trofozoítos y quistes que fueron incubadas con el anticuerpo anti H3COOH, se identificó una banda de aproximadamente 17 kDa. Mientras que para la histona H4 se incubó con el anticuerpo anti H4COOH el cual reconoció una proteína de aproximadamente 15 kDa. Por lo que estos resultados indicaban que los protocolos empleados tanto para trofozoítos como para quistes nos permitieron recuperar proteínas básicas entre las que se encontraban las histonas de *E. invadens*.



**Figura 9. Extracción ácida de proteínas totales básicas de trofozoítos y quistes de *E. invadens* e identificación de las histonas H3 y H4 mediante WB.** A) Patrón de proteínas nucleares básicas de trofozoítos y D) Patrón de proteínas totales básicas de quistes de *E. invadens*. En ambos casos las proteínas se obtuvieron mediante extracción con HCl y fueron resueltas en gels SDS-PAGE al 18% los cuales fueron teñidos con Azul de Coomassie. B) WB utilizando los anticuerpos dirigidos al extremo COOH tanto de la histona H3 como de la histona H4 en proteínas nucleares básicas de trofozoítos de *E. invadens* y D) en proteínas totales básicas de quistes de *E. invadens*. Estos anticuerpos identificaron 2 bandas, una de 17 kDa que corresponde a la histona H3 y otra de 15 kDa que corresponde a la histona H4 en ambas fases del parásito.

### 7.3 Identificación de modificaciones post – traduccionales de las histonas en trofozoítos y quistes de *E. invadens*.

Como se mencionó en la introducción, la histona H4 de *E. invadens* presenta inserciones en su secuencia en el extremo NH<sub>2</sub> terminal, sin embargo, a pesar de la presencia de estas inserciones, conserva residuos clásicos de modificaciones post – tradicionales como se muestra en la figura 10. Entre las PTMs que se han reportado que ocurren en el extremo NH<sub>2</sub> de la histona H4 se encuentran la acetilación de los residuos de lisina 5, 8, 12 y 16, así como la monometilación de la arginina 3 (H4R3me1). Todas esas PTMs asociadas a activación transcripcional; así como la trimetilación de la lisina 20 (H4K20me3) la cual es una PTM relacionada con represión transcripcional (Jorgensen S. *et al.*, 2013). Esto nos llevó pensar que probablemente podíamos identificar estas PTMs utilizando anticuerpos comerciales, debido a que al realizar el alineamiento entre el péptido reportado por el fabricante y la secuencia de la histona H4 de *E. invadens*, existía una alta probabilidad de que las PTMs fueran reconocidas, como se muestra en la figura 10. Es por ello que empleamos el anticuerpo anti-histona H4 pan – acetilada que reconoce las acetilaciones en los residuos de lisina (K) 5, 8, 12 y 16, así como el anticuerpo específico para identificar la monometilación de la R3 de la histona H4 mediante ensayos de WB a partir de las preparaciones obtenidas previamente para trofozoítos y quistes.



**Figura 10. La histona H4 de *E. invadens* conserva residuos clásicos de modificaciones post – traduccionales.** A) Alineamiento de la secuencia NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 de *E. invadens* con la secuencia del péptido del anticuerpo anti histona H4 pan–acetilada K5, K8, K12 y K16. En color rojo se indican los residuos conservados de K 5, 8, 12 y 16 mientras que en color verde se muestran los residuos de K acetilados en el péptido empleado para la obtención del anticuerpo. B) Alineamiento de la secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de la histona H4 de *E. invadens* con la secuencia del péptido del anticuerpo anti H4R3me1. En color azul se muestra el residuo de R presente en la histona H4 de *E. invadens* mientras que en verde se indica el residuo de R metilado en el péptido empleado para la obtención del anticuerpo. Todos los alineamientos se realizaron utilizando la herramienta Clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Como se aprecia en la figura 11, cuando la membrana que contenía a las proteínas básicas de trofozoítos y quistes de *E. invadens* se incubó con el anticuerpo dirigido al extremo COOH de la histona H4 se observó una banda de aproximadamente 15 kDa en trofozoítos y quistes; lo que nos confirmaba la presencia de esta histona en ambos extractos ácidos. Al incubarse la misma membrana con el anticuerpo anti histona H4 pan – acetilada, este reconoció una banda de aproximadamente 15 kDa tanto en trofozoítos como en quistes, lo que nos sugería que el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 de *E. invadens* se encuentra

acetilado en alguna o en varias de las K ubicadas en las posiciones 5, 8, 12 y 16 tanto en trofozoítos como en los quistes de *E. invadens*.

Debido a que el anticuerpo anti histona H4 pan – acetilada es capaz de dar una señal positiva al reconocer ya sea solamente una, dos, tres o las cuatro lisinas acetiladas y con el propósito de identificar de manera más precisa una de ellas, se realizó el ensayo de WB utilizando un anticuerpo comercial que reconoce únicamente la acetilación en la K12 (H4K12ac). Nuevamente el uso de este anticuerpo detectó una banda de 15 kDa tanto en extractos de trofozoítos como de quistes lo que nos indica que la K12 se encuentra acetilada en ambas fases del parásito (figura 11A y 11B).

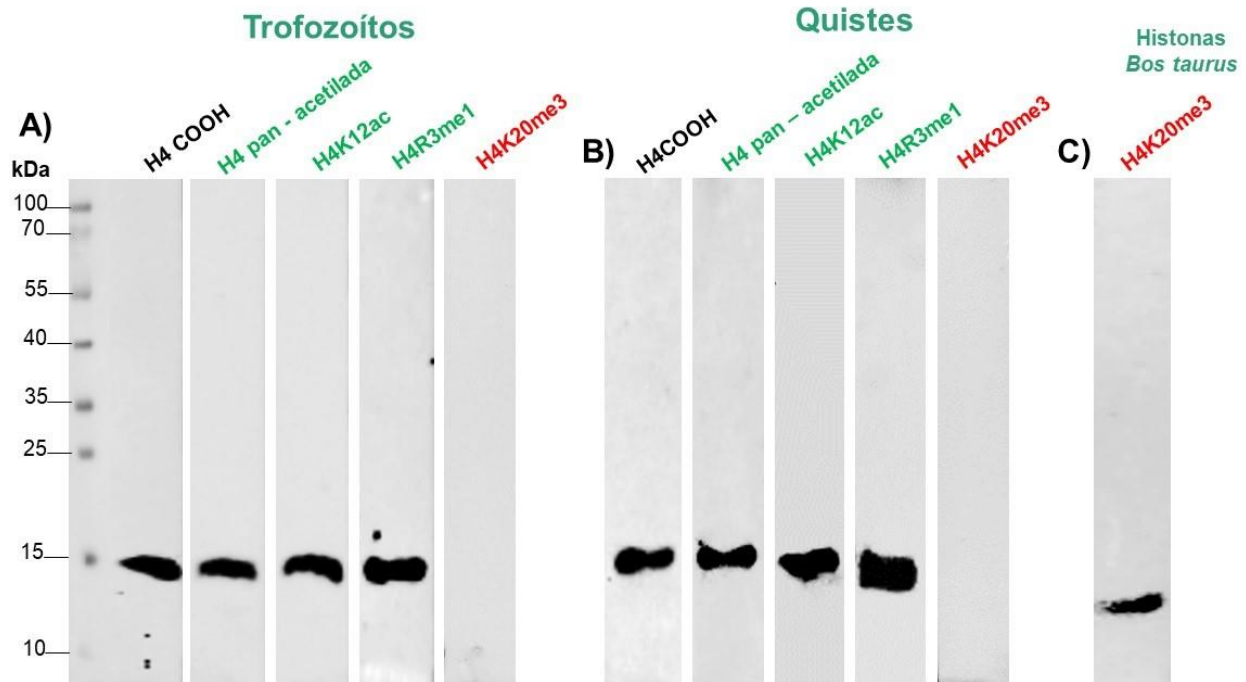
Como se comentó previamente, otra modificación asociada a estados de activación transcripcional que también ocurre en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 en eucariontes es la monometilación de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3me1) (Jahan S y Davie J, 2015) cuyo anticuerpo al realizar los ensayos de WB fue capaz de reconocer esta PTM tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens* (figura 11A y 11B).

Si bien se ha demostrado que existen PTMs asociadas a activación transcripcional en la histona H4, también se ha descrito en eucariontes la presencia de una PTM asociada a estados de represión transcripcional como es la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3) (Jorgensen S. *et al.*, 2013). Por esta razón se procedió a realizar un ensayo de WB utilizando un anticuerpo comercial dirigido contra esta marca epigenética. Como se observa en la figura 11 A y B, no se obtuvo una banda en trofozoítos ni en quistes. Descartamos que la ausencia de señal se debiera a un problema de los extractos ya que todos los ensayos de WB previamente hechos se habían realizaron con los mismos extractos. También se eliminó la posibilidad de que fuera un problema del anticuerpo ya que se realizó el WB utilizando histonas comerciales de timo de ternera en donde si se observa la banda del peso molecular esperado (Figura 11 C). Por lo que todos estos resultados nos sugieren que la H4K20me3 es una marca epigenética que no se encuentra presente en ninguna fase de *E. invadens*.

Hasta este punto y tomando en cuenta todos los resultados que habíamos obtenido en los ensayos de WB, éstos nos sugieren que en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 de *E. invadens* ocurren PTMs asociadas a activación transcripcional como es la acetilación en las posiciones de K5, 8, 12 y 16, así como la H4R3me1, tanto en trofozoítos como en quistes,



y que todas estas PTMs se encuentran presentes tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens*.



**Figura 11. Los trofozoítos y quistes de *E. invadens* presentan las mismas modificaciones post – traduccionales en el extremo NH<sub>2</sub> de la histona H4.** A) Ensayos de WB realizados en extractos nucleares de trofozoítos y B) quistes de *E. invadens*. En ambos casos se utilizó como control para detectar la presencia de la histona H4 el anticuerpo contra el extremo COOH de esta proteína. La identificación de las PTMs que ocurren en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 de *E. invadens* se determinaron mediante el uso de anticuerpos comerciales tales como: histona H4 pan – acetilada, la H4K12ac, H4R3me1. En todos los casos los anticuerpos identificaron una banda de aproximadamente 15 kDa tanto en extractos de trofozoítos como de quistes. Mientras que al utilizar el H4K20me3 no se observó ninguna banda. C) WB utilizando el anticuerpo dirigido contra H4K20me3 sobre histonas de timo de ternera el cual permitió validar el uso de este anticuerpo (control positivo).

#### 7.4 Arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de *E. invadens*.

Si bien, hasta este momento y de acuerdo a los anticuerpos empleados previamente no se encontraron marcas epigenéticas diferenciales entre trofozoítos y quistes, por lo que pensamos que probablemente las diferencias podrían estar a nivel de su localización dentro del núcleo. Es por esta razón que se utilizaron los mismos anticuerpos para determinar si todas las PTMs previamente identificadas se encontraban distribuidas de igual manera dentro del núcleo de trofozoítos y quistes, o bien si la localización de éstas se modificaba en la fase de trofozoíto en comparación con la fase de quiste en *E. invadens*.

Para lo cual, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (IFA) utilizando los anticuerpos previamente empleados en los ensayos de WB. Inicialmente empleamos el anticuerpo dirigido contra la histona H4 pan-acetilada tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens*. En la figura 12 se muestra el resultado obtenido en trofozoítos de *E. invadens* en donde la señal en rojo corresponde a la histona H4 pan-acetilada y en azul se muestran

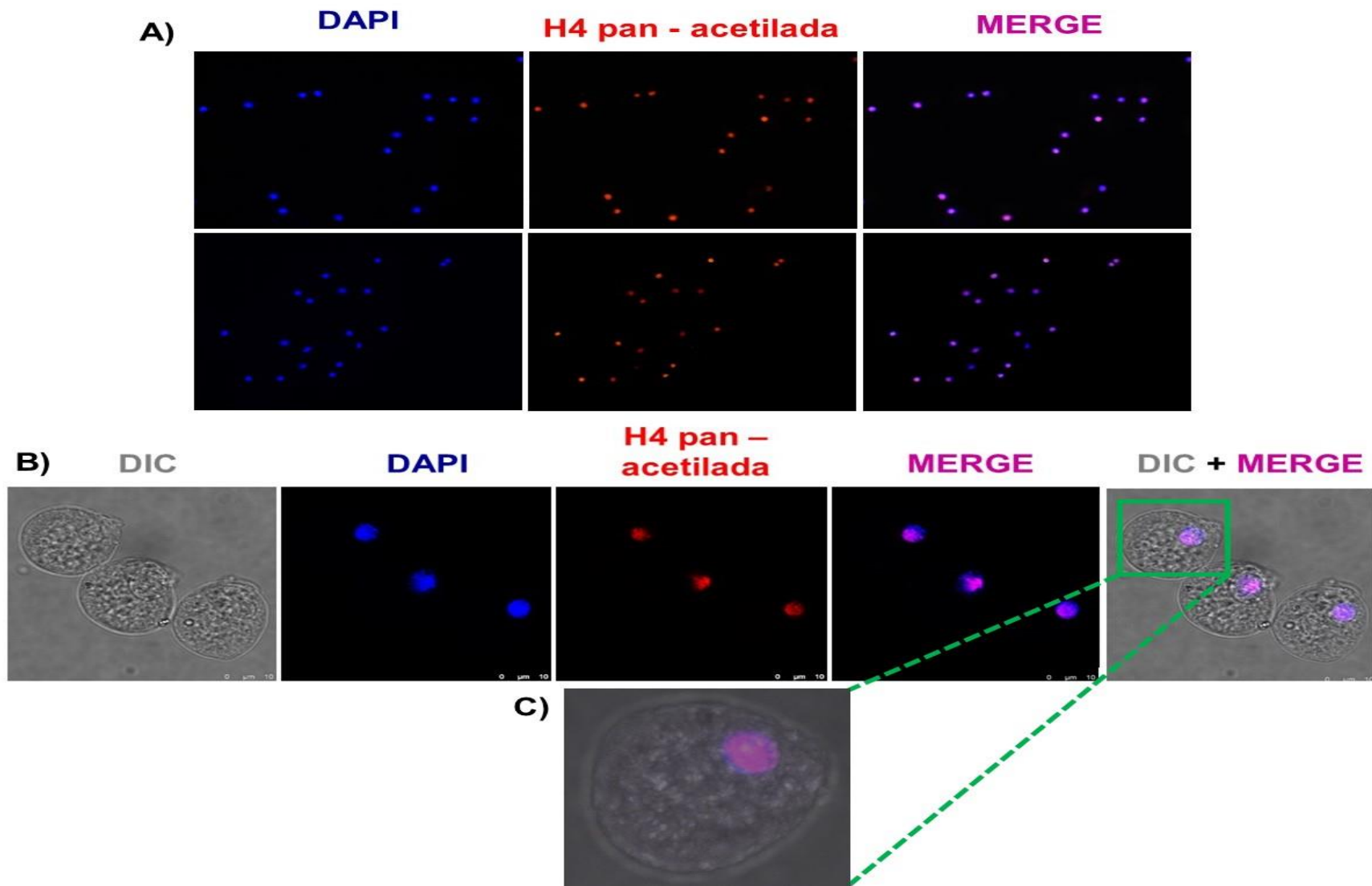
los núcleos teñidos con DAPI. Al hacer el empalme de ambas señales se observa una coloración rosa en la mayoría de los núcleos (Figura 12 A y B). Además, al hacer un acercamiento más detallado de una sola célula, se observó que la señal se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región de la periferia nuclear (Figura 12C).

El mismo ensayo de IF se realizó en quistes de *E. invadens* con diferente grado de madurez, lo cual está determinado por el número de núcleos que van desde 1 hasta 4 que es el grado máximo de madurez. En la figura 13 se muestra el resultado de este ensayo en donde la señal en rojo corresponde a la histona H4 pan – acetilada y en azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Al hacer el empalme de ambas señales se observa una coloración rosa localizada en la región de la periferia nuclear en los quistes menos maduros y esta señal se va intensificando hasta abarcar prácticamente todo el núcleo excepto en la región central, obteniéndose una estructura tipo “dona” en los quistes maduros.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con el anticuerpo anti histona H4 pan – acetilada tanto en trofozoítos como en quistes, estos nos sugieren que existe una localización diferencial de la histona H4 pan–acetilada dependiendo de la fase del parásito, es decir, la marca se distribuye en todo el núcleo en trofozoítos excepto en la región de la periferia nuclear y en el caso de los quistes en todo el núcleo excepto en la región central (Figura 14)

Con la finalidad de conocer si todas las marcas de activación transcripcional se localizaban en los mismos sitios dentro del núcleo independientemente de que fueran acetilación de K o metilación de R, se realizaron los ensayos de IF utilizando el anticuerpo H4R3me1 tanto en los trofozoítos como en los quistes de *E. invadens*.

En la figura 15 se muestra el resultado obtenido para los trofozoítos de *E. invadens* en donde la señal roja corresponde a la H4R3me1 y en azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Al hacer el empalme de ambas señales se observa una coloración rosa en la mayoría de los núcleos (Figura 15 A y B). Al hacer un acercamiento más detallado de una sola célula, se observó que la marca se encuentra distribuida en todo el núcleo incluyendo algunas regiones de la periferia nuclear (Figura 15 C).



**Figura 12. La histona H4 pan – acetilada se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región de la periferia nuclear en trofozoítos de *E. invadens*.** Ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti histona H4 pan – acetilada. A) En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI y en rojo la señal correspondiente al anticuerpo anti histona H4 pan–acetilada con un aumento de 40X y B) con un aumento de 60X. C) Aumento de 300X de una célula, Las señales positivas que se ubican dentro del núcleo y se observan en color rosa.

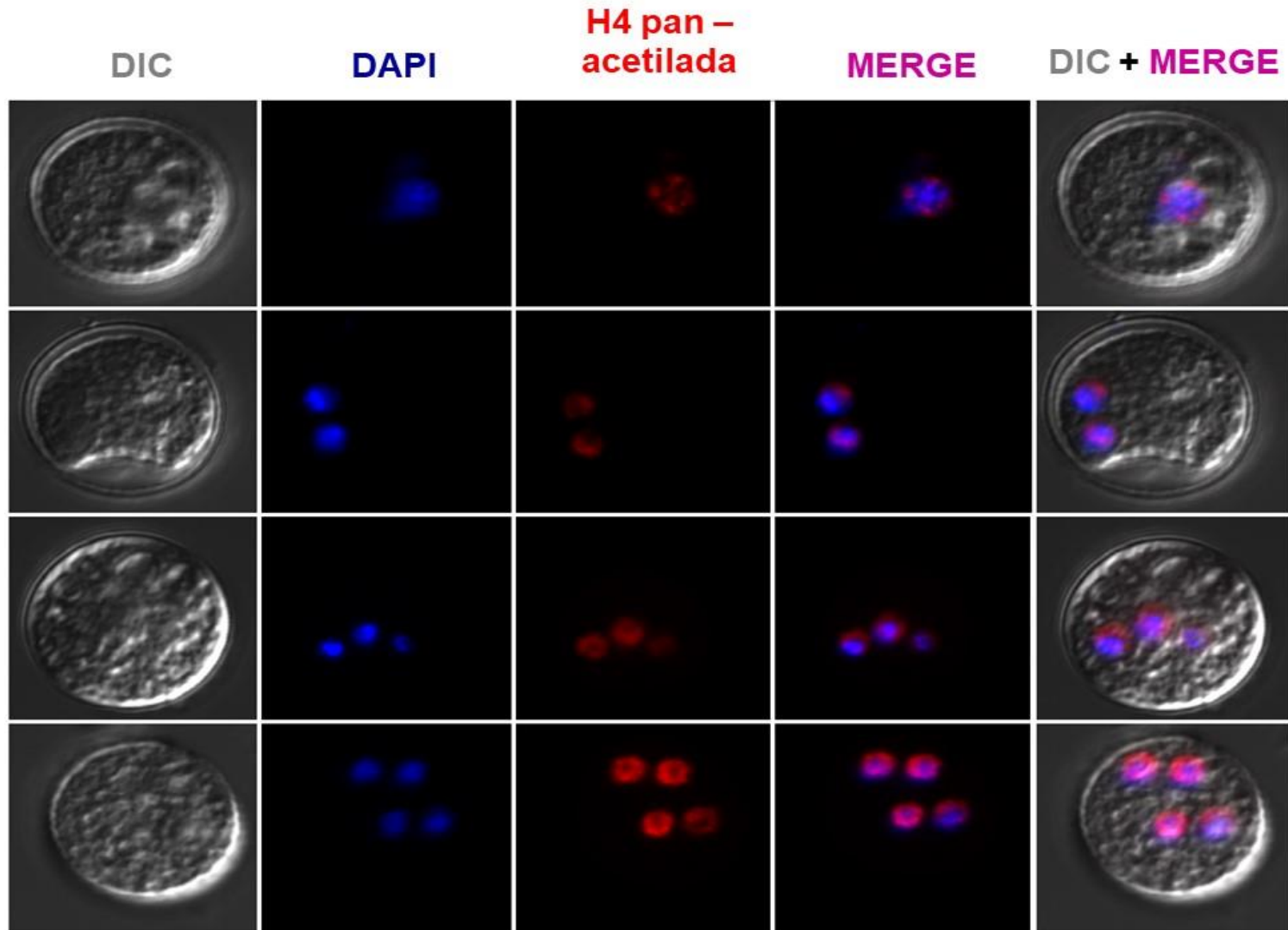
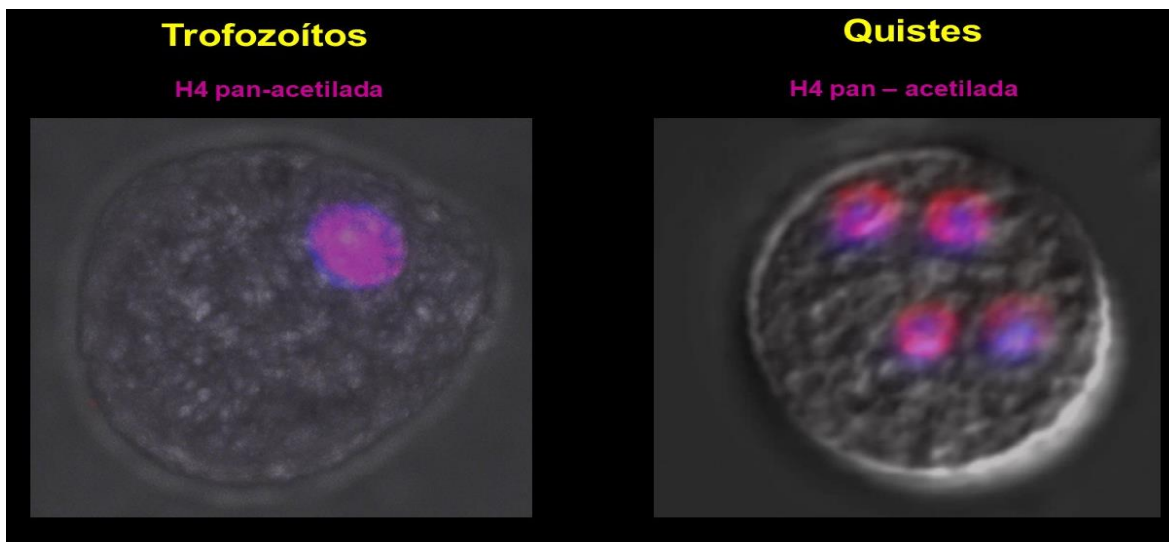


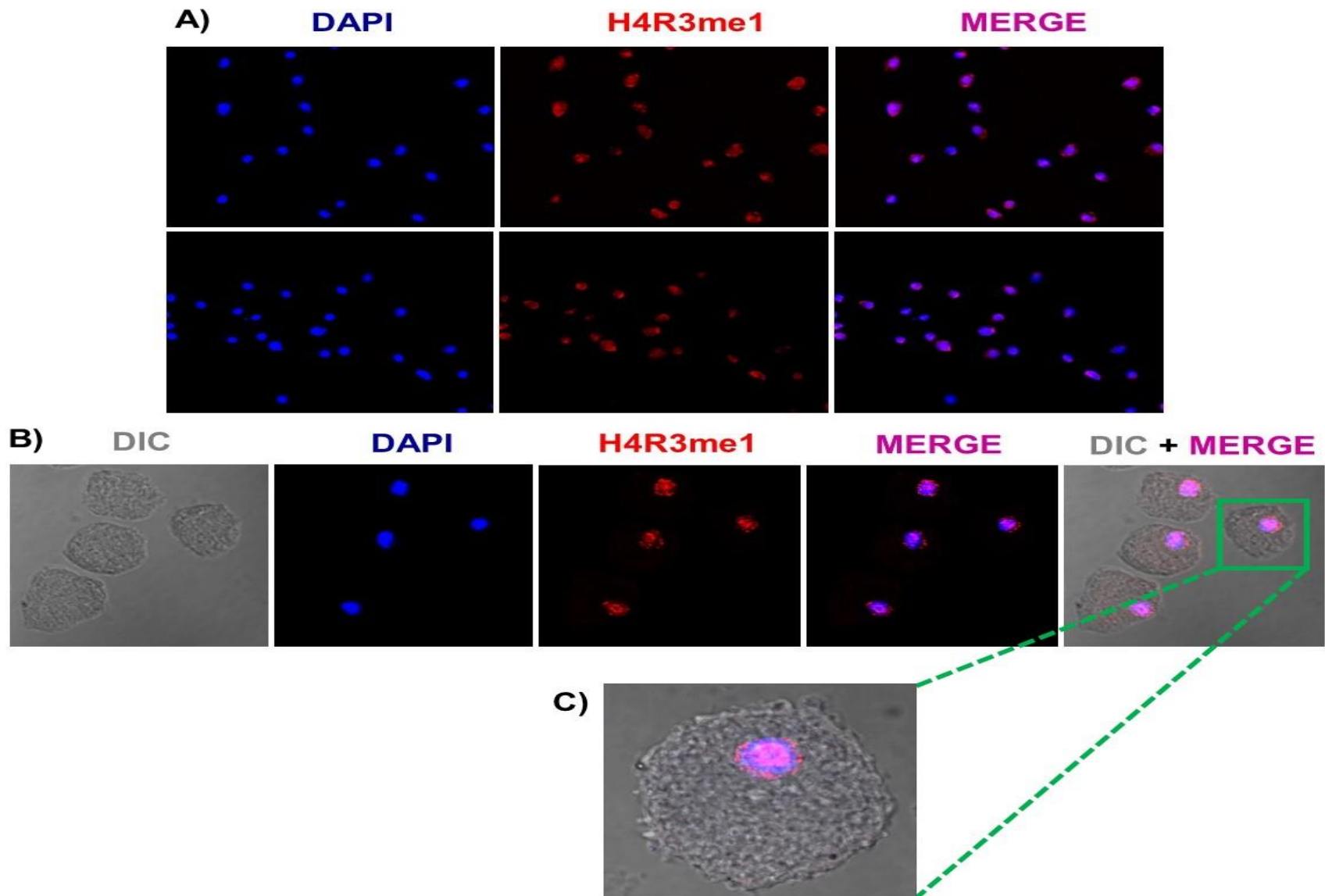
Figura 13. La histona H4 pan – acetilada se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región central del núcleo en quistes de *E. invadens*. Ensayo de inmunofluorescencia en quistes de *E. invadens*; en color azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI los cuales determinan el grado de madurez del quiste, y en color rojo la señal correspondiente al anticuerpo anti histona H4 pan - acetilada, todas con un aumento de 300X. Las señales positivas se ubican dentro del núcleo y se observan en color rosa.



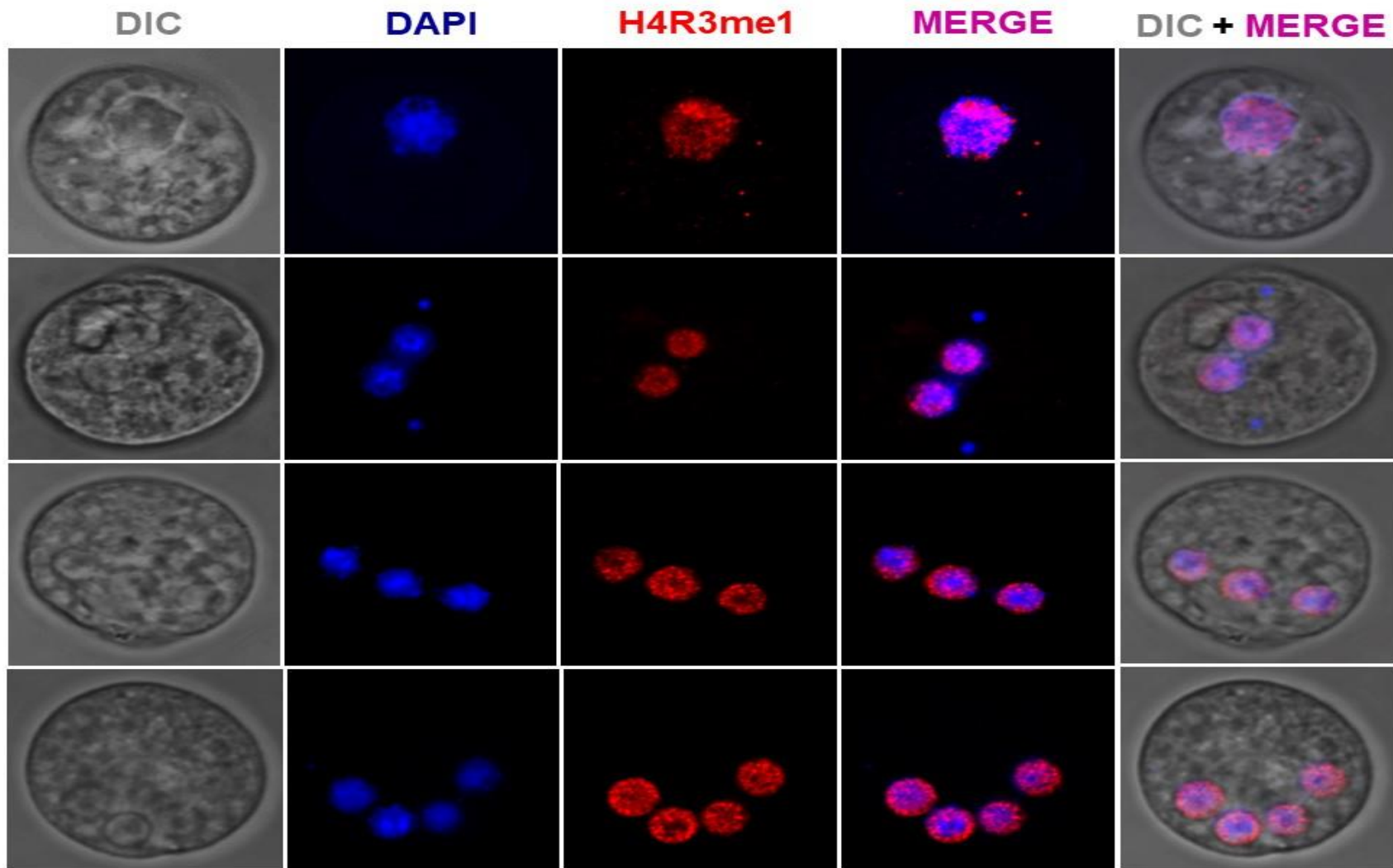
**Figura 14. Comparación de la localización de la histona H4 pan – acetilada dentro del núcleo de trofozoítos y quistes de *E. invadens*.** En el caso de los trofozoítos la marca se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región de la periferia nuclear, mientras que en los quistes la marca se localiza todo el núcleo excepto en la región central.

Al realizar este mismo ensayo de IF en quistes de *E. invadens* con diferente grado de madurez, encontramos que la señal roja correspondiente a la H4R3me1, al igual que la señal obtenida para la histona H4 pan – acetilada, se encuentra presente desde los quistes menos maduros que ésta se va enriqueciendo conforme el quiste va madurando hasta abarcar prácticamente todo el núcleo excepto la región central como se muestra en la figura 16.

Finalmente, al hacer un comparativo de la localización de las marcas de activación transcripcional identificadas en trofozoítos y quistes de *E. invadens*, los resultados nos sugieren que existe una localización diferencial de estas marcas epigenéticas entre ambas fases del parásito, encontrándose distribuidas en todo el núcleo en la fase de trofozoítos mientras que en la fase de quiste se ubican en todo el núcleo excepto en la región central del núcleo (Figura 17). Además, en el caso de los quistes, la localización de estas PTMs en el núcleo difiere de lo que ha sido reportado en eucariontes, en donde por ejemplo la histona H4 pan – acetilada en *Plasmodium falciparum* se localiza únicamente en regiones centrales del núcleo (Freitas-Junior LH. *et al.*, 2005), lo que nos estaría sugiriendo que en el caso de los quistes de *E. invadens* presentan una arquitectura nuclear inversa a lo ya reportado previamente en la literatura y que si bien todas las marcas de activación estudiadas en este trabajo están presentes en ambas fases del parásito su distribución en el trofozoítos y quistes son inversas.



**Figura 15. La H4R3me1 se encuentra distribuida en todo el núcleo y en la periferia nuclear en trofozoítos de *E. invadens*.** Ensayo de inmunofluorescencia en trofozoítos de *E. invadens* utilizando el anticuerpo anti H4R3me1. A) En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI y en rojo la señal correspondiente al anticuerpo anti H4R3me1 con un aumento de 40X y B) con un aumento de 100X. C) Aumento de 300X de una célula, Las señales positivas que se ubican dentro del núcleo y se observan en color rosa.



**Figura 16. La H4R3me1 se encuentra distribuida en todo el núcleo excepto en la región central del núcleo en quistes de *E. invadens*.** Ensayo de inmunofluorescencia en quistes de *E. invadens*; en color azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI los cuales determinan el grado de madurez del quiste, y en color rojo la señal correspondiente al anticuerpo anti H4R3me1, todas con un aumento de 400X. Las señales positivas se ubican dentro del núcleo y se observan en color rosa.

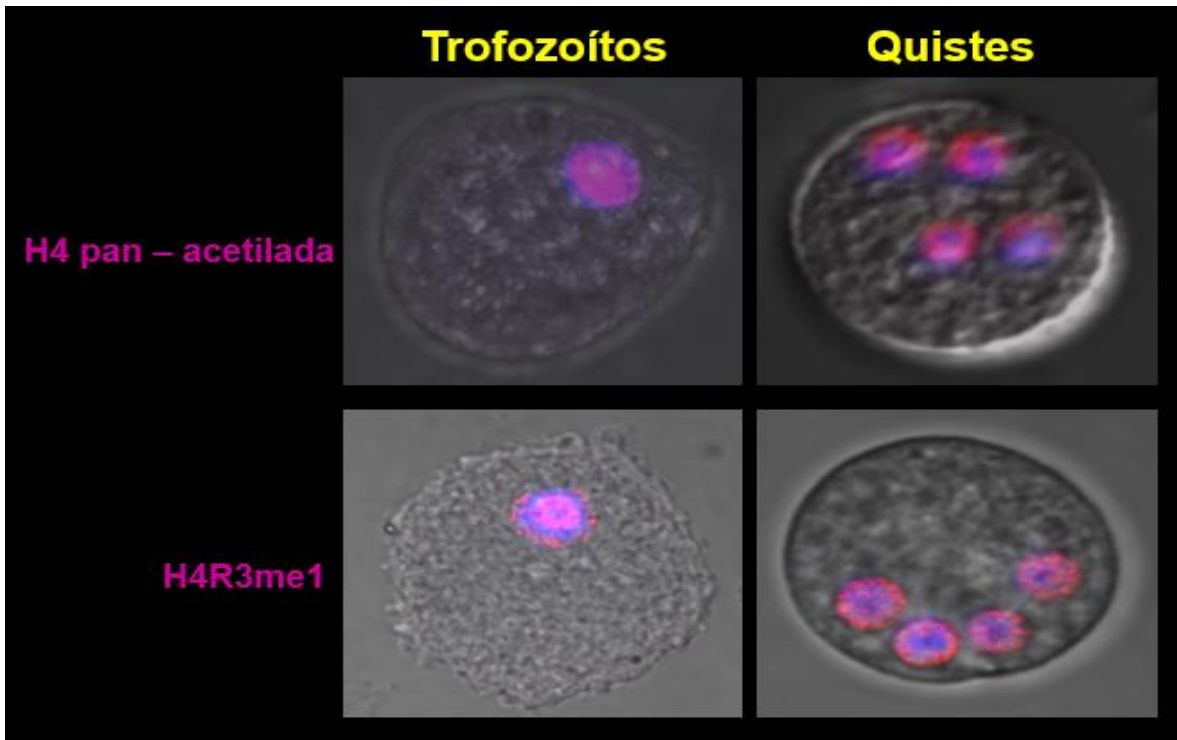


Figura 17. Comparación de la localización de las marcas de activación transcripcional como son la histona H4 pan – acetilada y H4R3me1 dentro del núcleo de trofozoítos y quistes de *E. invadens*. En el caso de los trofozoítos estas marcas de activación transcripcional se encuentran distribuidas en todo el núcleo, mientras que en el caso de los quistes estas marcas epigenéticas se localizan todo el núcleo excepto en la región central.

### 7.5 Identificación de modificaciones post – traduccionales de las histonas en trofozoítos de *E. histolytica*.

Los resultados mostrados anteriormente nos indicaban la presencia de modificaciones post–traduccionales de las histonas en ambas fases del parásito así como una localización diferencial de las mismas entre trofozoítos y quistes de *E. invadens*, por lo que entonces quisimos saber si los resultados obtenidos, al menos en trofozoítos de *E. invadens* podrían ser extrapolados a trofozoítos de *E. histolytica* el cual es el parásito de importancia clínica para el humano.

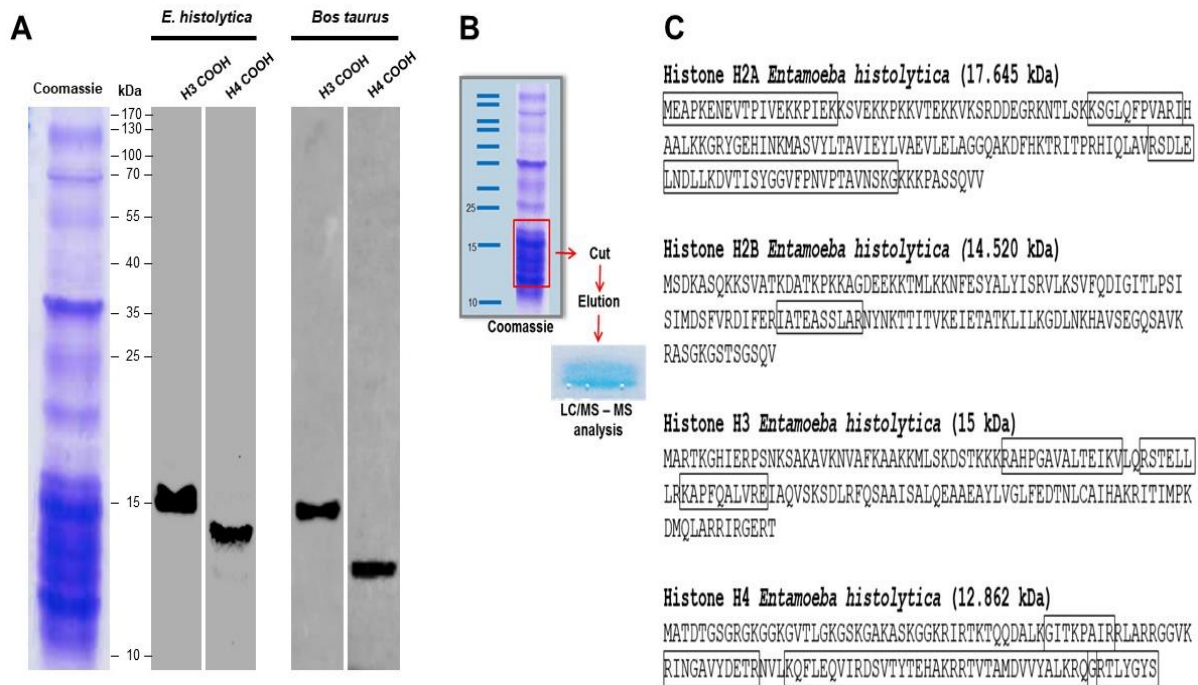
Como se puede observar en la figura 18 el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la histona H4 entre *E. invadens* y *E. histolytica* está altamente conservado entre ellas, por lo que esto sugiere que las modificaciones post – traduccionales de las histonas identificadas en las histonas de *E. invadens* deben existir en el extremo NH<sub>2</sub> de la histona H4 de *E. histolytica*.





**Figura 18. La histona H4 de *E. histolytica* conserva residuos clásicos de modificaciones post – traduccionales.** A) Alineamiento de la secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de la histona H4 de *E. invadens* y *E. histolytica* con la secuencia del péptido del anticuerpo anti histona H4 pan-acetilada K5, K8, K12 y K16. En color rojo se indican los residuos conservados de K 5, 8, 12 y 16 mientras que en color verde se indican los residuos de K acetilados en el péptido del anticuerpo. B) Alineamiento de la secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de la histona H4 de *E. invadens* con la secuencia del péptido del anticuerpo anti H4R3me1. En color azul se muestra el residuo de R presente en la histona H4 de *E. invadens* mientras que en verde se encuentra el residuo metilado de R. Todos los alineamientos se realizaron utilizando la herramienta Clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

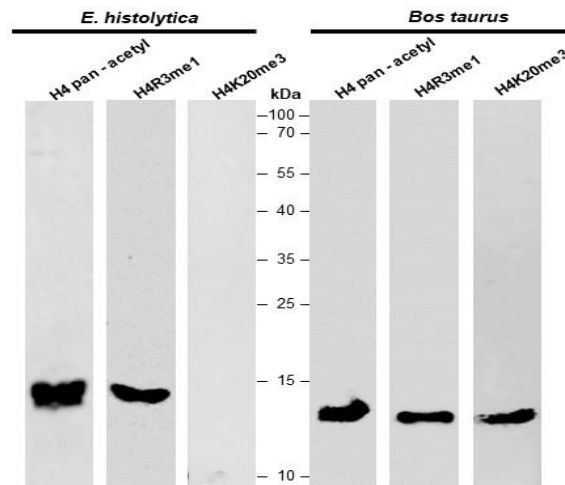
Para corroborar esto, se realizó la extracción ácida de proteínas nucleares de trofozoítos de *E. histolytica* entre las cuales se encuentran las histonas. Esta preparación se analizó en un gel SDS-PAGE al 18%. En la figura 19A se observa que hay un enriquecimiento en la fracción que comprende de los 10 a los 20 kDa, lo que nos sugería que probablemente en esta región se encontraban presentes las histonas de *E. histolytica*. Para demostrarlo, se realizaron ensayos de WB utilizando anticuerpos comerciales que reconocen al extremo COOH-terminal de la histona H3 y H4. Para el caso de la histona H3 se observó una señal de aproximadamente 17 kDa y para el caso de la histona H4 el anticuerpo identificó una proteína de aproximadamente 15 kDa. Como control positivo para ambos anticuerpos estos fueron incubados con histonas de timo de ternera, los cuales como se esperaba reconocieron una banda de 15 kDa para la histona H3 y otra de 11 kDa para la histona H4. Todos estos datos indican que efectivamente en esta preparación nuclear de proteínas básicas se encuentran las histonas de este parásito. Para corroborar que esta preparación contenía no solamente a la histona H3 y H4 de *E. histolytica* sino también a las histonas H2A y H2B, de las cuales no contábamos en el laboratorio con anticuerpos comerciales que permitieran su detección por WB, procedimos a recuperar a las proteínas que se encontraban entre el rango de 10 a 17 kDa a partir de un gel SDS – PAGE y estas se analizaron por espectrometría de masas. Los resultados obtenidos revelaron que efectivamente la muestra contiene a las histonas H2A, H2B H3 y H4 (Figura 19 B). Todos estos datos indican que esta preparación nuclear básica contiene a las cuatro histonas canónicas, aunque en este análisis no se identificó a ninguna de las variantes de histonas previamente identificadas en otros eucariontes y protozoarios.



**Figura 19. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 están presentes en proteínas nucleares básicas de trofozoítos de *E. histolytica*.** A) Extractos básicos nucleares de trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados con anticuerpos contra el extremo COOH de las histonas H3 y H4. Histonas de *Bos taurus* fueron utilizados como control positivo e incubados con los mismos anticuerpos. B) Esquema representativo de la obtención de la muestra de proteínas para su análisis por LC/MS-MS. El fragmento delimitado por el peso molecular de la histona H3 y H4 que abarca de los 15 a los 17 kDa, fue cortado de un gel SDS - PAGE al 18% teñido con azul de Coomassie. Las bandas contenidas en el fragmento fueron eluidas y concentradas en una sola banda, la cual fue enviada a su análisis por LC/MS-MS. C) Análisis de los péptidos identificados por LC/MS-MS. El análisis de espectrometría de masas identificó péptidos correspondientes a la histona H2A, H2B, H3 y H4, los cuales se encuentran marcados dentro de los rectángulos negros.

Para conocer si las PTMs previamente identificadas para la histona H4 en *E. invadens* también se encontraban en trofozoítos de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de WB utilizando extractos básicos nucleares de trofozoítos. Como se observa en la figura 20, al incubar estos extractos con el anticuerpo anti - histona H4 pan - acetilada se identificó una banda de 15 kDa, por lo que este resultado nos indica que la histona H4 de *E. histolytica* se encuentra acetilada en alguna o varias de las K ubicadas en las posiciones 5, 8, 12 y 16. Al realizar el ensayo de WB pero ahora utilizando el anticuerpo anti H4R3me1, también se observó una banda de aproximadamente 15 kDa, lo que nos está indicando que esta PTM también se encuentra presente en la histona H4 de *E. histolytica*. Estos resultados en conjunto nos indican que, al igual que ocurre en la histona H4 de *E. invadens*, en la histona H4 de *E. histolytica* también existen estas PTMs asociadas a activación transcripcional. Para saber si en *E. histolytica* se encontraba presente una PTM asociada a estados de represión transcripcional como es la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3), se realizó el ensayo de WB utilizando un anticuerpo comercial dirigido contra esta marca epigenética, en donde al igual que lo observado en *E. invadens*, esta marca no se identificó en *E. histolytica*. Como control positivo se utilizaron histonas comerciales de

timo de ternera en donde se observan las bandas de aproximadamente 11 kDa para todos los anticuerpos utilizados. En conclusión, estos resultados nos indican que el extremo amino de la histona H4 de *E. histolytica* presenta marcas epigenéticas asociadas con actividad transcripcional pero ninguna modificación postraducciona previamente relacionada con represión transcripcional, de la misma manera como lo habíamos encontrado en los trofozoítos de *E. invadens*.



**Figura 20. Identificación de modificaciones post – traduccionales de la histona H4 de trofozoítos de *E. histolytica*.** Ensayos de WB en extractos nucleares ácidos de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando anticuerpos comerciales dirigidos hacia la histona H4 pan – acetilada, la H4R3me1 y la H4K20me3, en donde los dos primeros anticuerpos mencionados identificaron una banda de aproximadamente 15 kDa, mientras que al utilizar el H4K20me3 no se observó ninguna banda. Como control positivo se utilizaron histonas de timo de ternera, las cuales permitieron validar la funcionalidad de los 3 anticuerpos empleados.

## 7.6 Localización de marcas epigenéticas de activación y represión transcripcional en trofozoítos de *E. histolytica*.

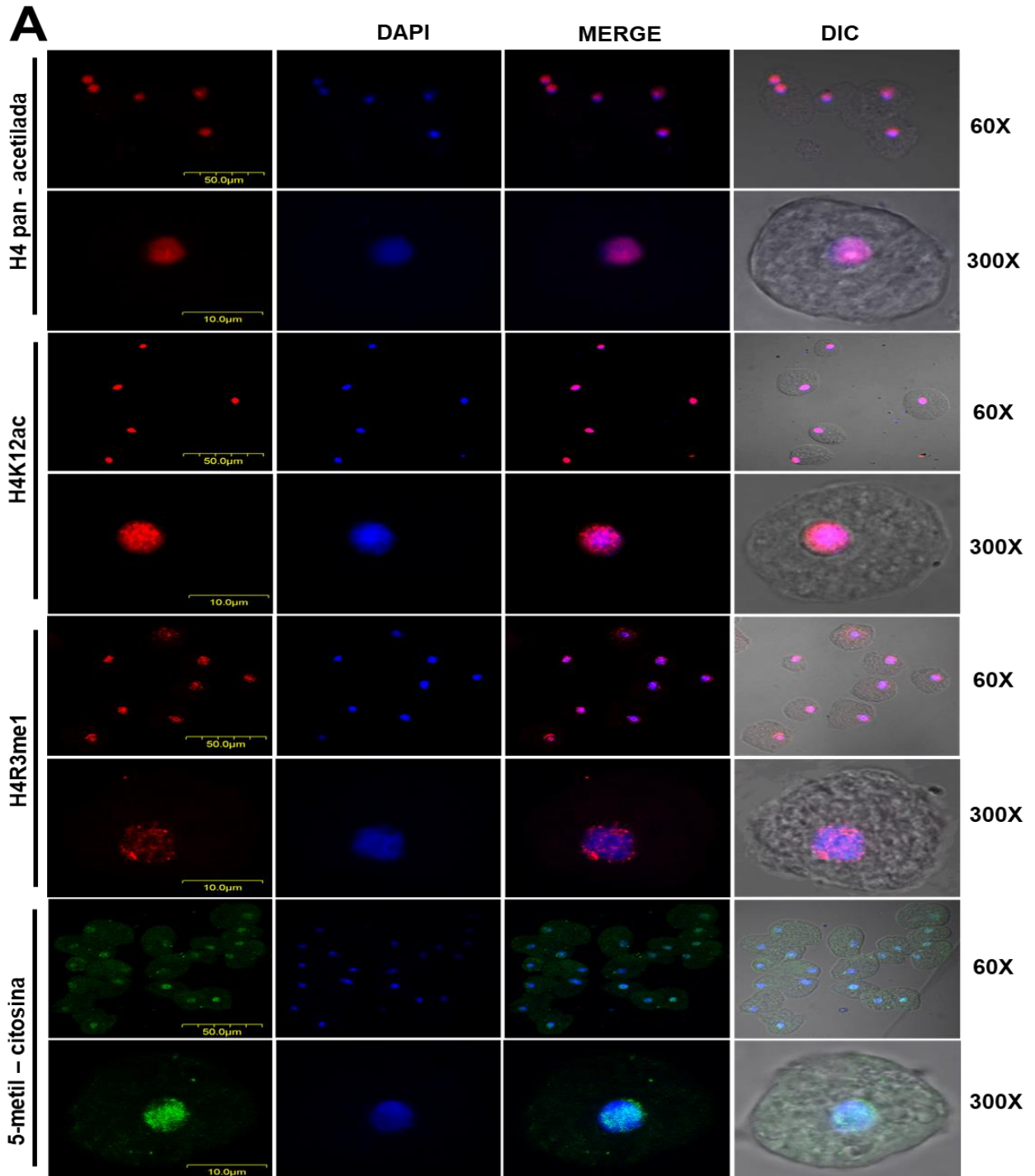
La acetilación de lisinas 5, 8, 12 y 16 así como la metilación de la arginina 3 en la histona H4 es una marca epigenética asociada a actividad transcripcional. Con la finalidad de conocer si las marcas epigenéticas previamente identificadas en *E. histolytica* ocupaban diferentes regiones dentro del núcleo se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia. Inicialmente las inmunofluorescencias fueron realizadas con el anticuerpo que reconoce a la histona H4 pan acetilada. En la figura 21 A se observa que prácticamente todos los trofozoítos presentan esta señal y al hacer el empalme con el DAPI encontramos que esta se ubica en el núcleo de todos los trofozoítos. Una amplificación de esta imagen (300X) indica que las lisinas acetiladas de la histona H4 se encuentra distribuidas en todo el núcleo. Posteriormente y para saber si cada una de las lisinas que identifica el anticuerpo pan-acetilado (K5, K8, K12, K16) ocupa un lugar específico en el núcleo de tal manera que la señal observada sea la suma de cada una de ellas, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia empleando al anticuerpo que reconoce de manera

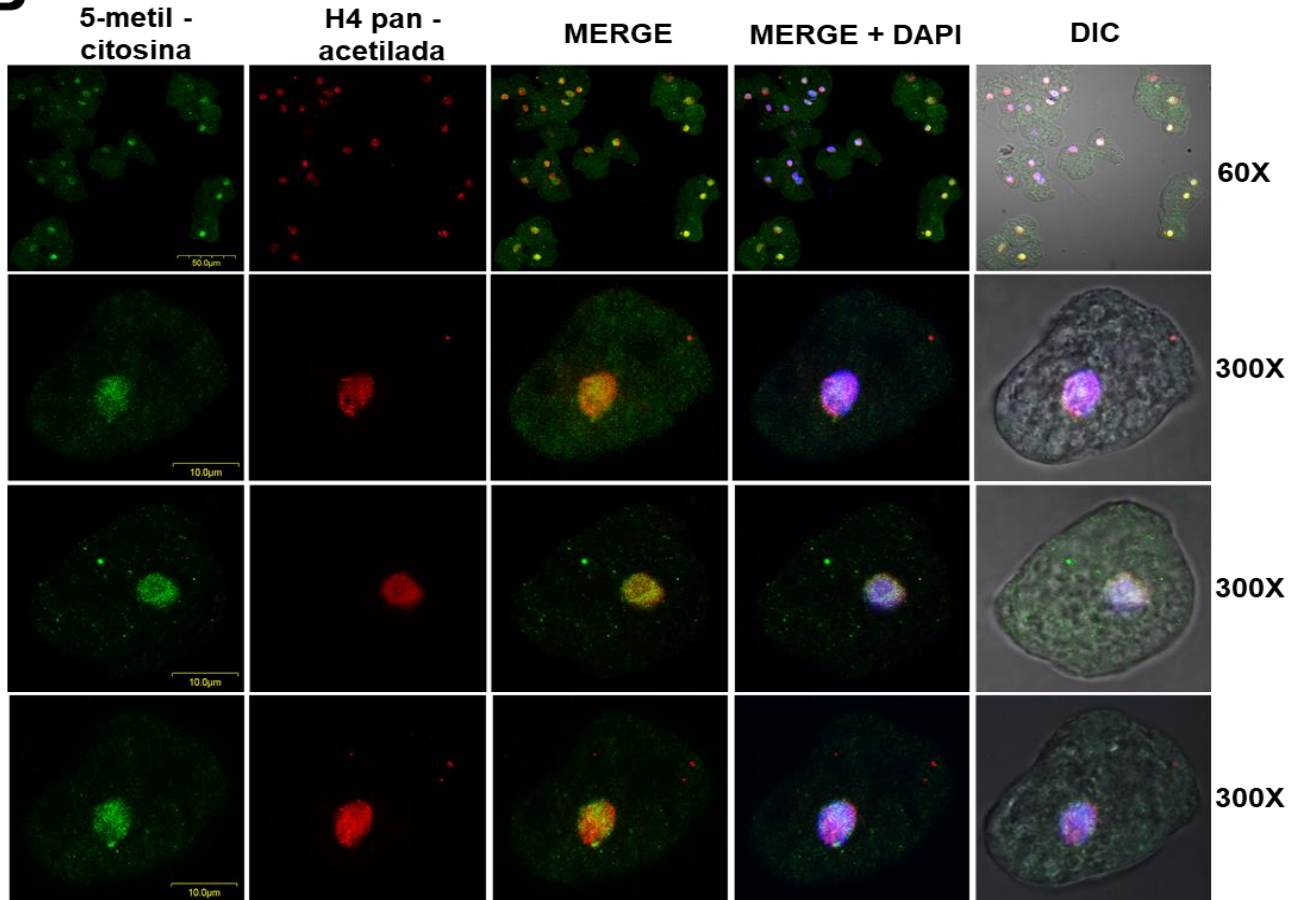
específica a la acetilación de la K12 de la histona H4. Nuevamente encontramos que la señal de la K12 de la histona H4 acetilada es más puntiforme pero que al igual que el anticuerpo H4 pan-acetilado se encuentra en todo el núcleo. Finalmente, quisimos averiguar si la otra marca epigenética identificada por WB como es la H4R3me1, la cual está asociada a activación transcripcional también se distribuía en todo el núcleo o se excluía de las lisinas acetiladas, se realizaron ensayos de IF. La señal que se obtuvo con este anticuerpo se encuentra en todos los núcleos y a una mayor resolución (300X) se aprecia su distribución en todo el núcleo. Todos estos datos sugieren que las marcas de activación identificadas en la histona H4 se encuentran distribuidas en todo el núcleo de *E. histolytica* independientemente de que sea acetilación de K o metilación de R.

Debido a que los ensayos de WB realizados con el anticuerpo H4K20me3 no dio ninguna señal y como la presencia de esta marca está asociada con formación de heterocromatina telomérica, no pudimos emplear este anticuerpo para identificar en que región del núcleo se encuentra ubicada la heterocromatina de *E. histolytica*. Por esta razón y tomando en cuenta que la metilación de las histonas y la metilación del DNA son mecanismos que actúan de manera concertada, y considerando que previamente se había demostrado la presencia de metilación del DNA de en este parásito (Fisher O. *et al.*, 2004) es que nosotros decidimos utilizar un anticuerpo que reconoce a la citosina metilada (anti-5 metil citosina) para que mediante ensayos de IF, de manera indirecta se pudieran localizar las regiones de heterocromatina. Como se muestra en la figura 21 A, nuestros datos indican que en la mayoría de los trofozoítos se encuentra esta marca y al realizar el empalme con el DAPI se observó que se encuentra presente en el núcleo. La amplificación de algunas de estas señales (300X) provenientes de tres experimentos independientes indican que el DNA metilado se encuentra distribuido en todo el núcleo. Con el propósito de establecer si las marcas de eucromatina (histona H4 pan-acetilada) y la metilación del DNA co-localizan, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- histona H4 pan-acetilada y la 5-metil-citosina (Figura 21 B). El resultado de la inmunofluorescencia nos indica que las marcas de activación y de represión transcripcional convergen por lo que todos estos datos indican que el núcleo de *E. histolytica* no está compartamentalizado.

Si comparamos los resultados de identificación y localización de marcas epigenéticas asociadas a activación transcripcional como son la histona H4 pan – acetilada así como la H4R3me1 tanto para trofozoítos de *E. invadens* como de *E. histolytica* podemos observar

que tanto la presencia de estas PTMs como la localización nuclear de las mismas se encuentran de manera similar en ambas especies, lo que nos estaría sugiriendo que los datos que se obtengan con el empleo de *E. invadens* como modelo de estudio, pueden ser extrapolados a *E. histolytica*, el cual es el parásito de importancia en salud pública.



**B**

**Figura 21. Localización nuclear de marcas epigenéticas de activación y represión transcripcional en trofozoítos de *E. histolytica*.** A) Ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra marcas epigenéticas asociadas a activación transcripcional (anti histona H4 pan – acetilada, anti- H4K12ac, anti H4R3me1) y de represión transcripcional (5 – metil – citosina). En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI y en rojo la señal correspondiente los anticuerpos anti histona H4 pan – acetilada, anti- H4K12ac, anti H4R3me1, mientras que en verde la señal para la 5 – metil – citosina. B) Ensayo de doble inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti histona H4 pan – acetilada (rojo) y 5 – metil – citosina (verde), mientras que los núcleos se muestra en azul. en todos los casos las células se observan en aumentos de 60X y 300X.

### 7.7 Identificación y localización de dos cuerpos nucleares: nucléolo y *speckles* en trofozoítos de *E. histolytica*.

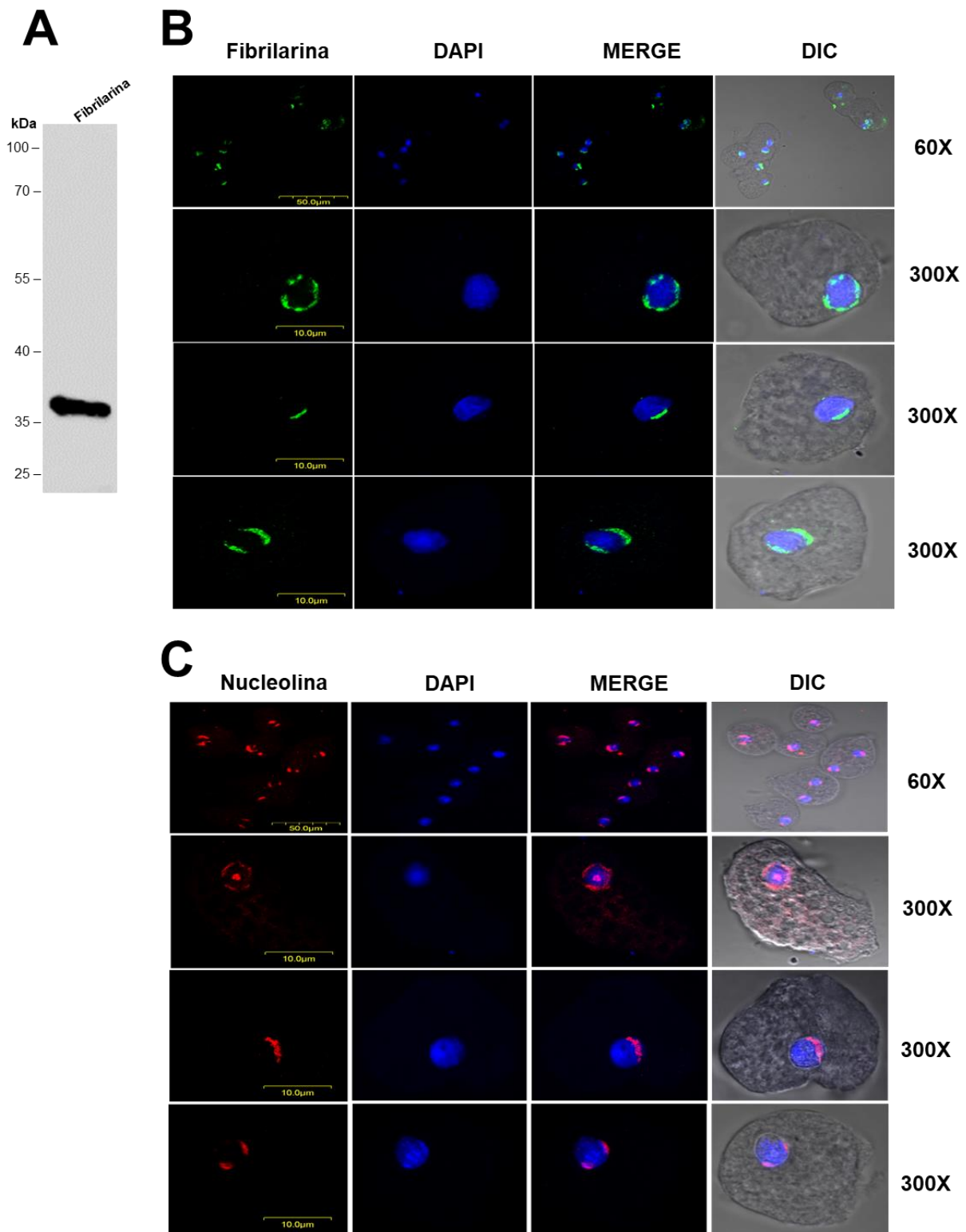
Estudios encaminados a averiguar como el núcleo se encuentra física y funcionalmente organizado ha revelado que se encuentra muy organizado y es altamente dinámico. Una característica prominente del paisaje nuclear es la habilidad para contener una variedad de organelos subnucleares discretos, colectivamente referidos como cuerpos nucleares. Los cuerpos nucleares espacialmente compartimentalizan el medio ambiente nuclear y crean distintos sitios en donde se concentran proteínas y RNAs que hacen más eficientes algunos procesos biológicos como la replicación, la reparación del DNA y la maduración de los mensajeros entre otros.

Con la finalidad de determinar si en el núcleo de *E. histolytica* también existen cuerpos nucleares nosotros empleamos dos anticuerpos: uno de ellos dirigido para la fibrilarina (el cual fue proporcionado por el Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía), y el otro contra la nucleolina, ambas proteínas específicas del nucléolo. Como primer paso, se realizó un ensayo de WB utilizando extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* con el anticuerpo anti-fibrilarina para validar este anticuerpo, el cual identificó una proteína de aproximadamente 37 kDa cuyo tamaño era el esperado (Figura 22 A).

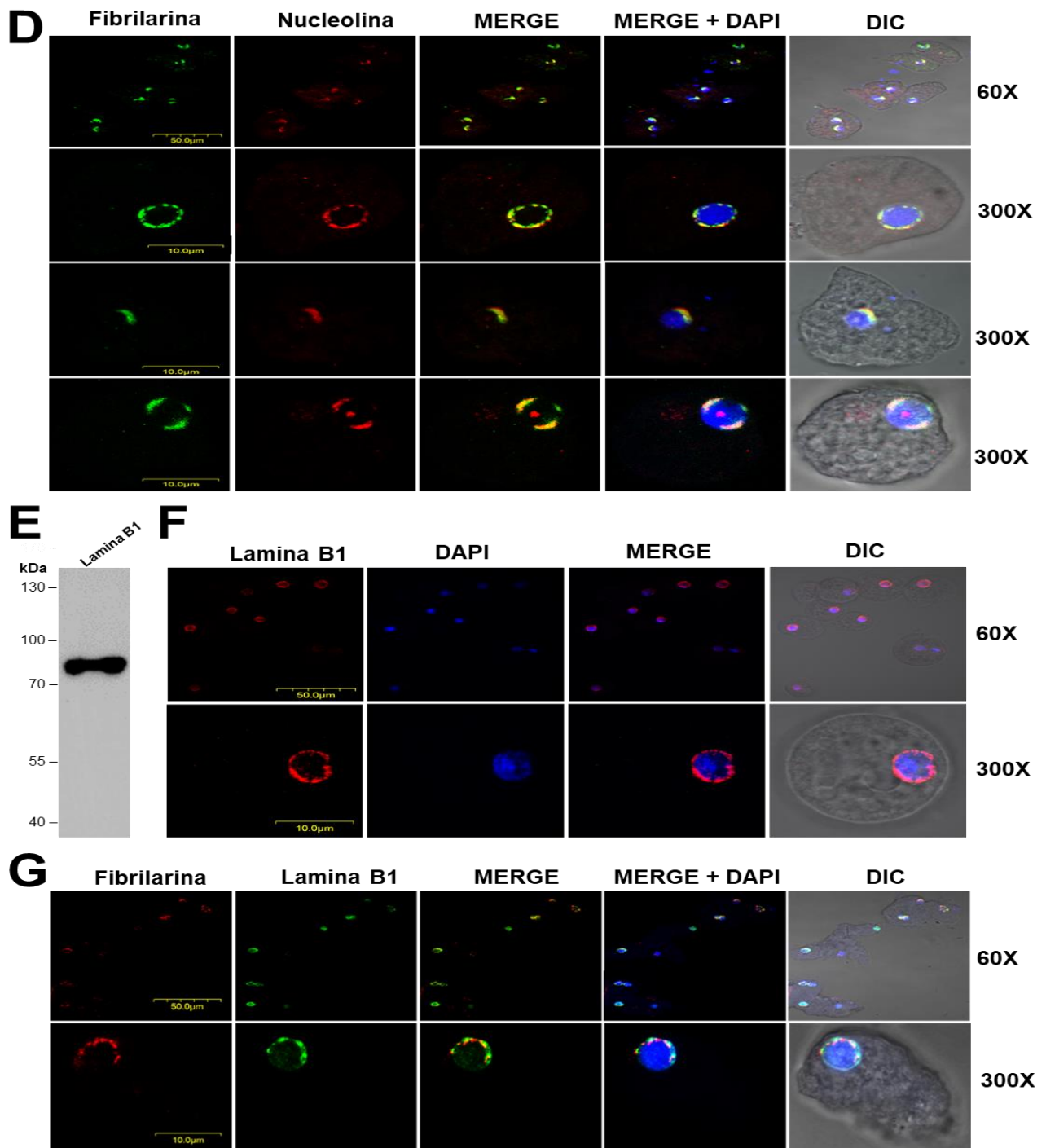
En base a este resultado ambos anticuerpos fueron empleado para hacer ensayos de IF. En la figura 22 B y 22 C se muestra que tanto el anticuerpo contra la nucleolina así como contra la fibrilarina dan tres tipos de señales. Una de ellas se identificó en el 50% de 100 células en el que se aprecia que la fibrilarina y la nucleolina prácticamente se encuentran en la periferia del núcleo. La segunda señal se localiza en ambos polos del núcleo en el 35% de los trofozoítos y en la tercera las proteínas se ubican en un solo lado del núcleo en el 15% de los parásitos. En el caso de la nucleolina además de que su señal siempre colocaliza con la fibrilarina, también se aprecian señales adicionales y esto se debe a que esta proteína en organismos eucariontes no solo es un constituyente del nucléolo sino que en el núcleo lleva a cabo otras funciones (Mongelard F y Bouvet P, 2007; Tajrishi MM. *et al.*, 2011). El solapamiento de la señal para ambas proteínas (nucleolina y fibrilarina) corroboran la existencia de un nucléolo presente en la periferia del núcleo de *E. histolytica* y además observamos dos tipos de señales no descritas previamente (Figura 22 C).

Para demostrar que el nucléolo se encuentra en la periferia nuclear se empleó el anticuerpo anti-lamina B1 de humano, el cual permite delimitar la membrana nuclear. Primeramente, decidimos averiguar si este anticuerpo reconocía a una proteína lamina-like en extractos nucleares de *E. histolytica* mediante ensayos de WB. El anticuerpo anti-lamina B1 de humano, reconoció una proteína de aproximadamente 80 kDa en extractos nucleares de *E. histolytica* (Figura 22 D), lo que de manera importante sugiere que existe una proteína lámina-B-like en amiba. Con este anticuerpo se realizaron ensayos de IF y como se aprecia en la figura 22 F, da una señal que se encuentra sobre toda la periferia del núcleo que al sobreponerla con la imagen de los núcleos teñidos con DAPI nos permite delimitar muy bien el núcleo del citoplasma. Por último, se realizaron ensayos de co-localización con el anticuerpo anti – lámina B1 y fibrilarina y encontramos que ambas señales colocalizan en

la periferia de los núcleos de los trofozoitos de *E. histolytica* corroborando que el nucléolo tiene una localización perinuclear en este parásito (Figura 22 G).





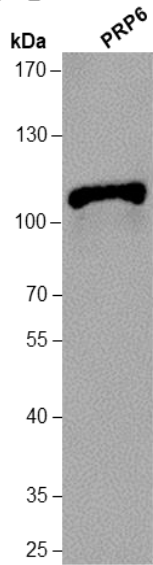
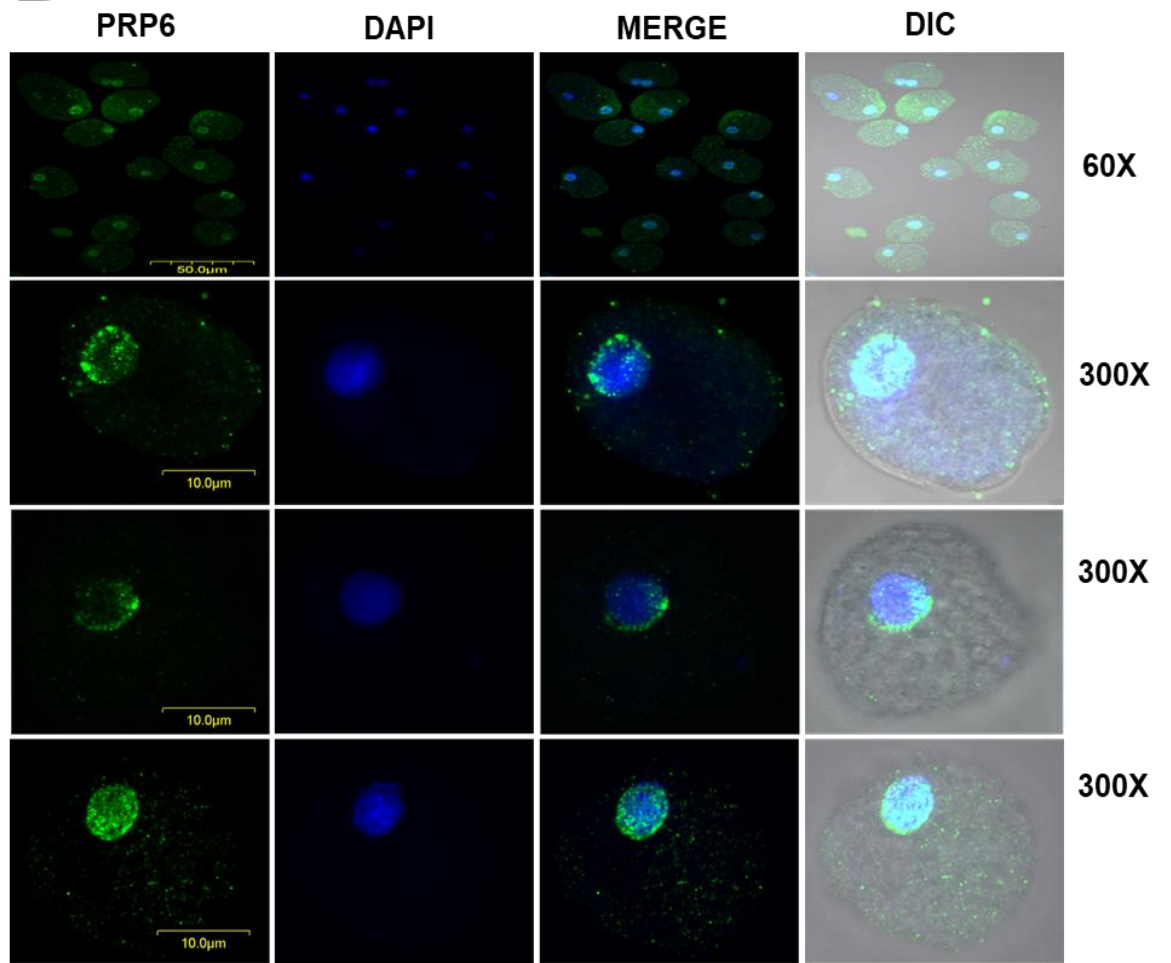
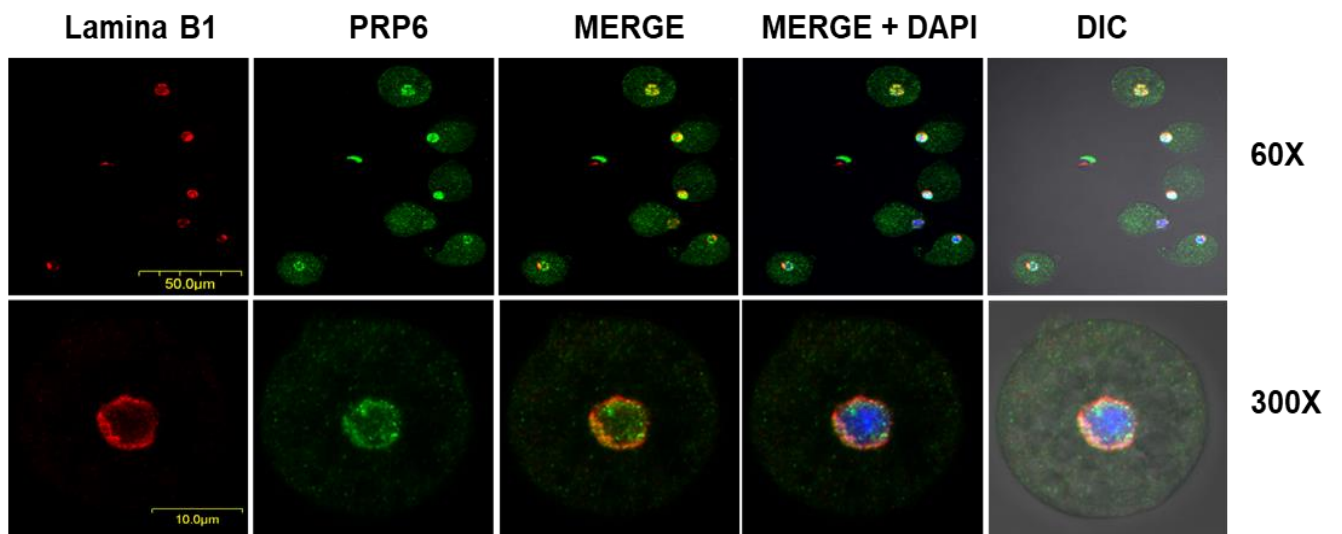


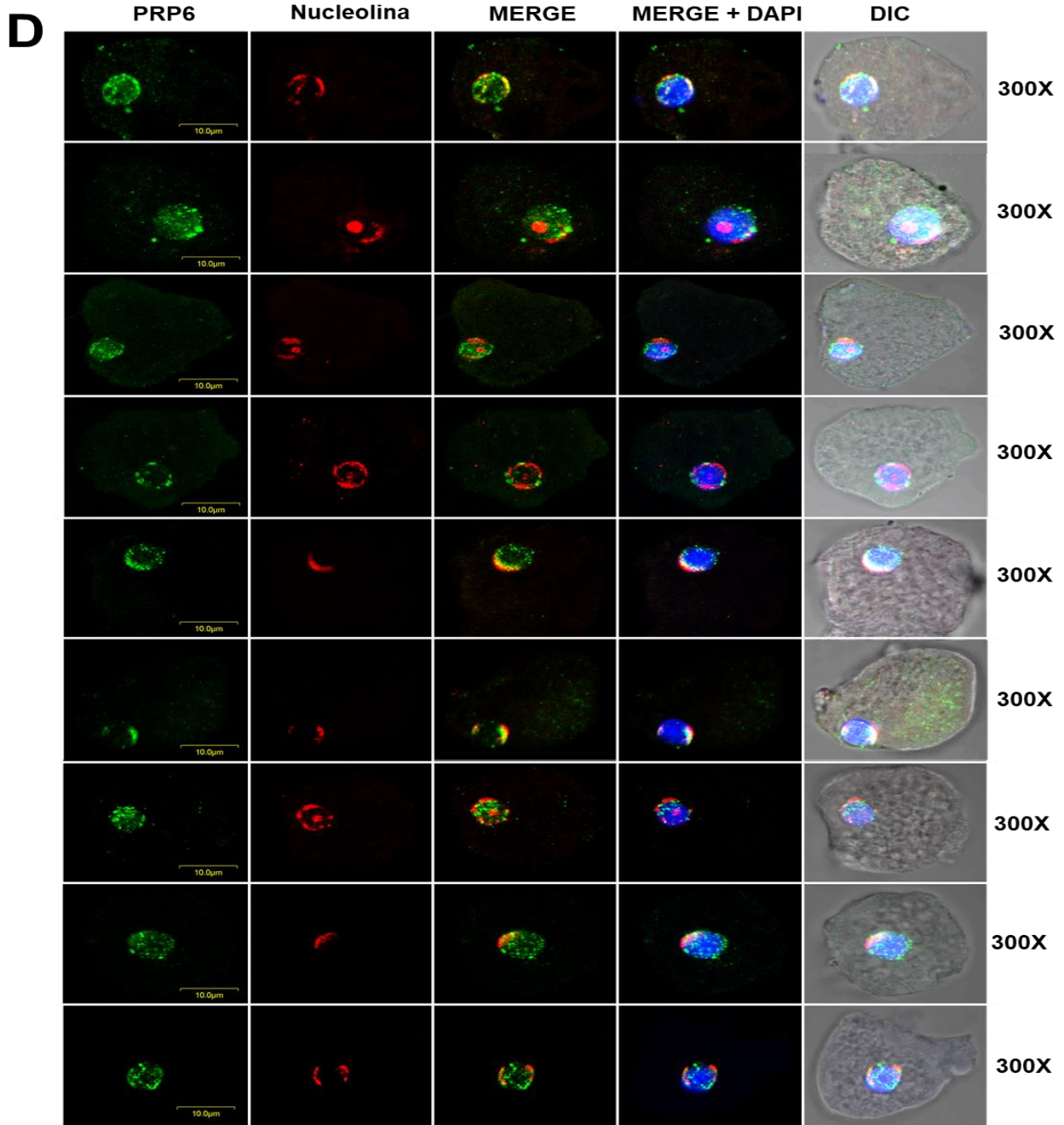
**Figura 22. El nucléolo en *E. histolytica* se encuentra localizado en la periferia nuclear.** A) Ensayo de WB en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando el anticuerpo anti – fibrilarina en donde se observa una banda de aproximadamente 35 kDa. B) Ensayo de IF utilizando el anticuerpo anti fibrilarina cuya señal se muestra en verde y los núcleos teñidos con DAPI. Se observaron 3 patrones de localización de esta proteína: uno de ellos en la región de la periferia nuclear, otro de ellos únicamente en un extremo del núcleo y el último en dos polos del núcleo. C) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti nucleolina (rojo) el cual también muestra los tres distintos patrones de distribución observados previamente al utilizar el anticuerpo anti fibrilarina. D) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti fibrilarina (verde) y anti nucleolina (rojo), el cual nos muestra que ambas proteínas co-localizan (amarillo). E) Ensayo de WB en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando el anticuerpo anti – lámina B1 en donde se observa una banda de aproximadamente 80 kDa. F) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti lamina B1 (rojo) el cual delimita la periferia nuclear. En todos los ensayos de IF los núcleos fueron teñidos con DAPI y se observan en color azul y las células se observan en aumentos de 60X y 300X.

Con el propósito de identificar otro cuerpo nuclear no membranoso común en muchos organismos eucariontes como son los *speckles*, los cuales participan en el *splicing* y procesamiento del RNA mensajero (RNAm), decidimos utilizar una de las proteínas específicas de este organelo como son las proteínas del procesamiento del RNA (PRP). La proteína PRP6 de *E. histolytica* fue descrita por el grupo del Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía (Hernández–Rivas R. *et al.*, 2000) por lo que se utilizó el anticuerpo contra esta proteína para llevar a cabo ensayos de WB en extractos totales de *E. histolytica*. El anticuerpo anti-PRP6 reconoció una proteína de aproximadamente 105 kDa como había sido descrito previamente (Figura 23 A) También se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con este anticuerpo en donde la señal en forma de estructuras puntiformes se encuentra en todos los núcleos de los trofozoítos. Sin embargo, la amplificación de algunas de estas imágenes mostro que esta proteína presenta tres tipos de señales. Una de ellas se observa en el interior del núcleo, así como en la periferia, otra se encuentra solo en el interior del núcleo y finalmente la tercera se aprecia solo en la periferia (Figura 23 B).

Con la finalidad de demostrar que efectivamente la señal se encontraba tanto en el interior, así como en la periferia del núcleo, pero no en el citoplasma se realizó otra inmunofluorescencia empleando los anticuerpos anti-PRP6 y lámina B1. El resultado indica que efectivamente la señal de PRP6 se encuentra tanto en el interior como en la periferia del núcleo (Figura 23 C).

Finalmente, con el objetivo de establecer si el nucléolo y los *speckles* ocupan diferentes sitios dentro del núcleo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia empleando al anticuerpo anti-PRP6 y anti – nucleolina. Como podemos apreciar en las figuras 23 D, 23 E y 23 F se muestra que cada señal ocupa un lugar distinto dentro del núcleo por lo que entonces hasta este punto y tomando en cuenta todos estos datos podemos decir que en el núcleo de los trofozoítos de *E. histolytica* existen al menos dos cuerpos nucleares: el nucléolo y los *speckles* y que además las PTMs identificadas en el núcleo de los trofozoítos de *E. invadens* presentan la misma localización en los núcleos de *E. histolytica*. Por lo que entonces creemos que los datos que obtengamos para los quistes de *E. invadens* podrían extrapolarse a los de quistes de *E. histolytica*. Todo esto refuerza el hecho de usar a *E. invadens* como modelo de estudio en procesos que ocurren en *E. histolytica* como es el enquistamiento.

**A****B****C**



**Figura 23. El nucléolo y los speckles están presentes en el núcleo de *E. histolytica*.** A) Ensayo de WB en extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* utilizando el anticuerpo anti – PRP6 en donde se observa una banda de aproximadamente 105 kDa. B) Ensayo de IF utilizando el anticuerpo anti PRP6 (verde), en donde se observa un patrón puntiforme distribuido de tres maneras distintas: en la periferia nuclear y en el interior del núcleo, exclusivamente en la periferia nuclear y únicamente dentro del núcleo. C) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti – lámina B1 (rojo) y anti – PRP6 (verde) en donde se muestra que PRP6 se localiza en la periferia nuclear (amarillo). D) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti – PRP6 (verde) y anti nucleolina (rojo). PRP6 se localiza alrededor y dentro del núcleo, mientras que la nucleolina esta en la periferia nuclear pero también en uno o dos polos del núcleo. Las señales de PRP6 y nucleolina se colocan solo cuando PRP6 se distribuye alrededor del núcleo (amarillo). E) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti – PRP6 (verde) y anti nucleolina (rojo). La señal PRP6 está ubicada principalmente en la periferia nuclear y co-localiza con la nucleolina cuando se distribuye alrededor del núcleo o en uno o ambos polos del núcleo (amarillo). F) Ensayo de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti – PRP6 (verde) y anti nucleolina (rojo). PRP6 se encuentra dentro del núcleo y no co-localiza con la nucleolina que se sitúa en la periferia nuclear o en uno o ambos polos del núcleo. En todos los ensayos de IF los núcleos fueron teñidos con DAPI y se observan en color azul y las células se observan en aumentos de 60X y 300X.

### **7.8 Identificación y localización de la proteína EiHDAC3 en trofozoítos y quistes de *E. invadens*.**

Si bien mediante los ensayos de IF se pudo determinar la localización diferencial de marcas epigenéticas asociadas a activación transcripcional como fue la histona H4 pan – acetilada y la H4R3me1 tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens*, hasta ese momento no se contaba con una marca epigenética asociada a represión transcripcional, ya que la única PTM en la histona H4 asociada a heterocromatina es la H4K20me3 la cual no se detectó en los ensayos de WB, por lo que era necesario contar con un marcador que nos permitiría inferir en qué regiones del núcleo se encontraba la heterocromatina.

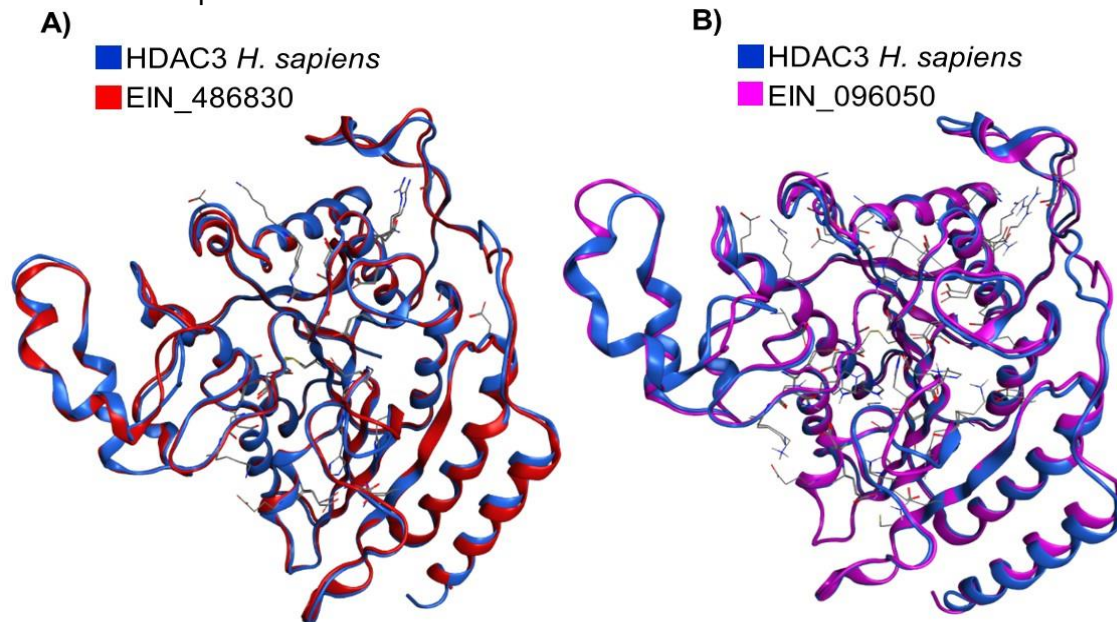
Entre las marcas epigenéticas asociadas a represión transcripcional, se sabe que la metilación del DNA está asociada a estados de represión transcripcional y previamente se había identificado mediante ensayos de inmunofluorescencia que existía la metilación del DNA en *E. invadens* (Harony H. *et al.*, 2006). Se realizaron los ensayos de IFA utilizando al menos dos anticuerpos distintos para la metilación del DNA; sin embargo, nunca se obtuvo una señal en trofozoítos y quistes de *E. invadens*, Por lo que entonces nos dimos a la tarea de identificar otra molécula que también estuviera asociada a la generación de estados de represión transcripcional como son las proteínas HDACs, las cuales son las encargadas de la remoción de los grupos acetilo de las histonas.

Con la finalidad de conocer si estas proteínas se encontraban en el genoma de *E. invadens*, se hizo una búsqueda *in silico* en la base de datos Amoeba DB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) en donde se identificaron 2 genes con los números de acceso (EIN\_486830 y EIN\_096050) que podrían codificar para una HDAC de la Clase I. Al realizar el alineamiento entre estas 2 proteínas se encontró que son prácticamente iguales ya que presentan una identidad del 87% a nivel de proteína (Figura 24).

En humano se ha establecido que el grupo de las HDACs de la clase I está conformado por las HDAC 1, 3, 5 y 8, por lo que para saber a cuál de ellas pertenecían las dos proteínas identificadas en *E. invadens* se realizó un análisis *in silico*. Para esto se compararon las secuencias reportadas para las HDACs de la clase I con las 2 secuencias identificadas en *E. invadens* y este análisis nos indicó que ambas proteínas son ortólogas de la proteína HDAC3 de *H. sapiens* y que presentaban una identidad a nivel de secuencia primaria entre un 50 y 52%. (Figura 25).



Con el objetivo de conocer si esta identidad del 50 al 52% a nivel de secuencia primaria de las HDACs de *E. invadens* respecto a la HDAC3 de *H. sapiens* era suficiente para adoptar una estructura terciaria similar a la reportada para la HDAC3, se realizó un modelado por homología utilizando como base el cristal reportado para HDAC3 de humano (Sonda S. *et al*; 2010) y la predicción de la estructura terciaria de las dos secuencias de *E. invadens*. Como se puede observar en la figura 26, ambas proteínas de *E. invadens* adoptan o presentan una estructura terciaria similar a la de HDAC3 de humano, lo que nos sugiere que ambas proteínas de *E. invadens* pueden realizar la actividad de desacetilasa de la misma manera que la HDAC3 de humano.

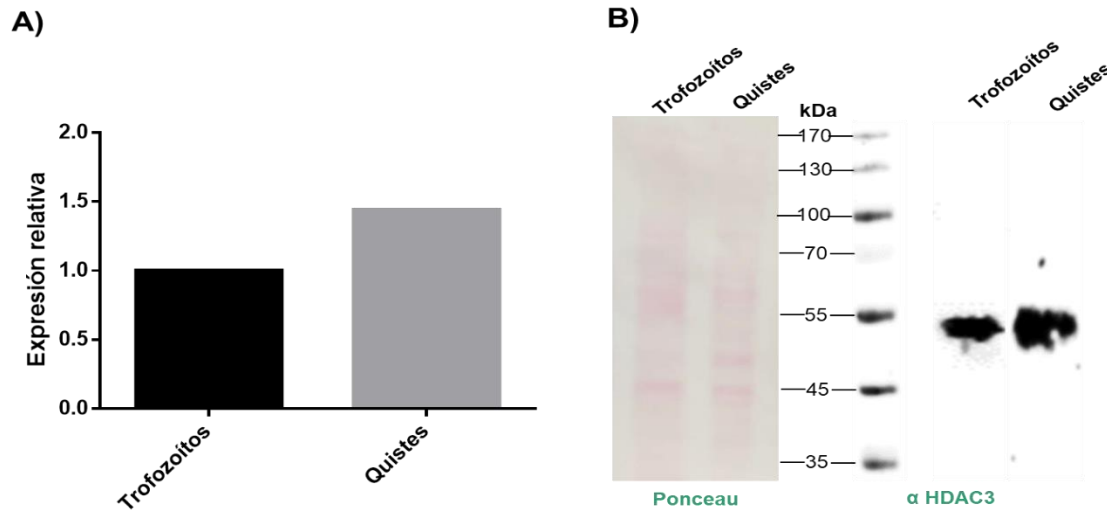


**Figura 26. Las HDACs de la clase I identificadas en *E. invadens* adquieren la estructura terciaria similar a la reportada para HDAC3 de humano.** A) Modelado por homología de las secuencias EIN\_486830 y B) EIN\_096050 y su comparación con la estructura terciaria reportada para la HDAC3 de *H. sapiens*. En ambos modelos se observa en azul la estructura del cristal para HDAC3 de humano, mientras que en rojo y rosa se muestra la predicción de la estructura terciaria para las dos proteínas HDACs de *E. invadens*.

Todos estos resultados nos sugerían la existencia de la HDAC3 en *E. invadens*. Por lo que entonces primeramente procedimos a demostrar que efectivamente se expresara a nivel de mRNA como a nivel de proteína. Para ello, se realizaron ensayos de qRT – PCR utilizando como templado RNA de trofozoítos y quistes de 24 h y ensayos de WB utilizando un anticuerpo comercial que nos permitiera identificar a la proteína HDAC3 en extractos totales de trofozoítos y quistes, así como averiguar si existía alguna diferencia en la expresión de esta proteína entre ambas fases del ciclo de vida del parásito.

Como se puede observar en la figura 27, al realizar el ensayo de qRT – PCR se observó que el gen para HDAC3 se expresa tanto en trofozoítos y aumenta sus niveles de expresión

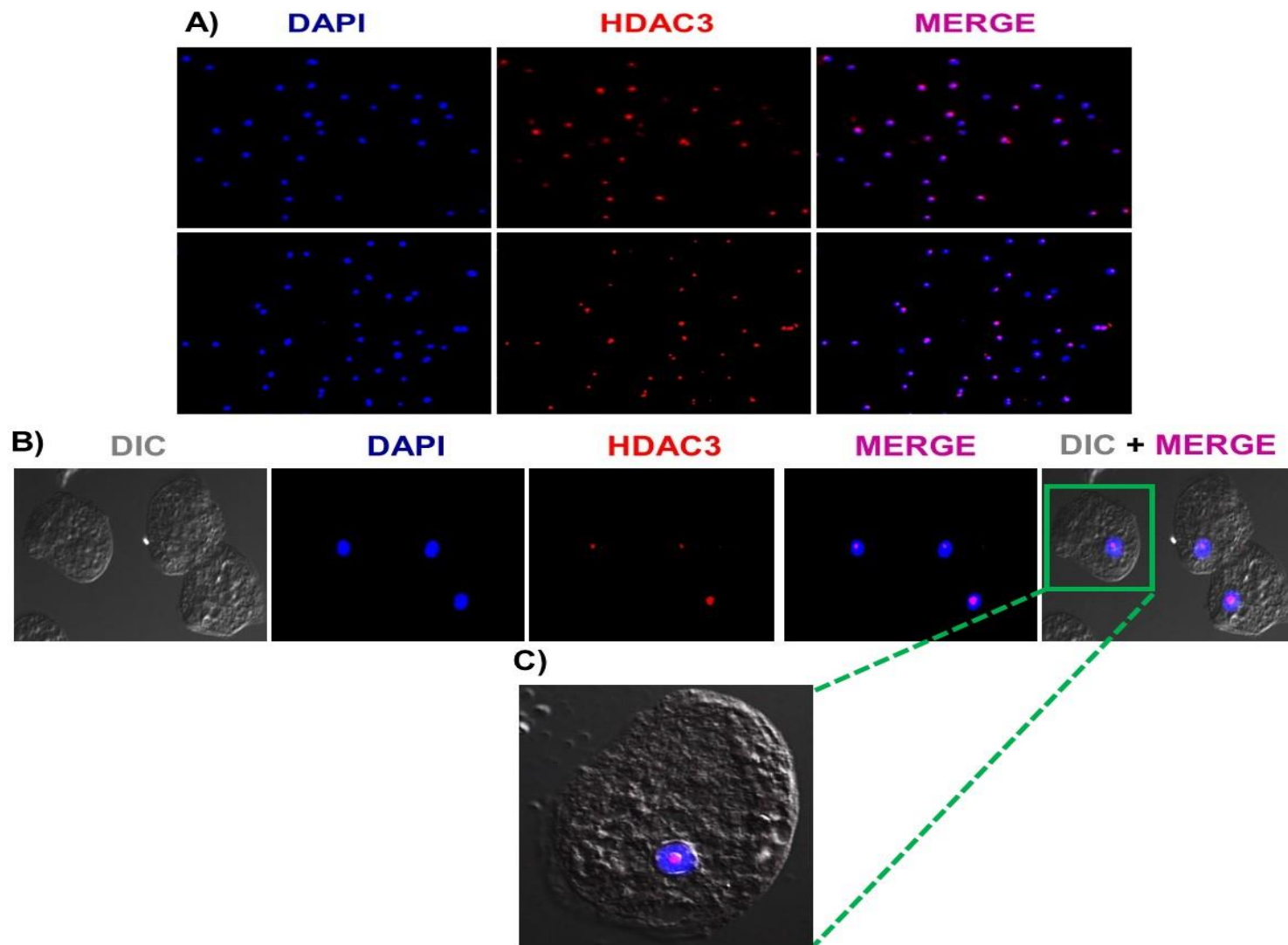
en quistes de 24 h. En el caso del ensayo de WB utilizando el anticuerpo para la HDAC3, se identificó una banda de aproximadamente 55 kDa tanto en trofozoítos como en quistes, lo que nos indicaba que esta proteína se expresa en ambas fases del parásito, y tomando en cuenta que como control de carga se muestra la membrana teñida con rojo de Ponceu, el resultado nos sugiere que existe una mayor expresión de esta proteína en la fase de quiste con respecto a la fase de trofozoíto en *E. invadens* a la cual de aquí en adelante denominaremos EiHDAC3 – like.



**Figura 27. HDAC3 se expresa más en la etapa de quiste respecto a la etapa de trofozoíto en *E. invadens*.** A) Ensayos de RT – qPCR para evaluar los niveles de expresión de EiHDAC3 en trofozoítos y quistes de 24 h de *E. invadens*. Los datos fueron normalizados utilizando como referencia al gen constitutivo EIN\_327460. B) WB utilizando el anticuerpo dirigido contra la proteína HDAC3, el cual identificó una banda de aproximadamente 55 kDa tanto en extractos totales de trofozoítos como de quistes. Como control de carga se muestra la membrana teñida con rojo de Ponceau.

Una vez que sabíamos que EiHDAC3 - like se expresaba en ambas fases de *E. invadens*, procedimos a tratar de conocer cuál es la localización celular de EiHDAC3 - like en trofozoítos de *E. invadens*. Para esto, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en trofozoítos de *E. invadens* utilizando el anticuerpo comercial previamente utilizado en los ensayos de WB. Como se aprecia en la figura 28 en azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI y la señal en rojo corresponde a la proteína EiHDAC3; al hacer el empalme de ambas señales se observa una coloración rosa en la mayoría de los núcleos, lo que nos indica que la marca se encuentra presente en el núcleo (Figura 28 A). Al hacer un acercamiento más detallado de una sola célula, se observó que la marca se encuentra específicamente en el centro del núcleo (Figura 28 B). Este resultado difiere de lo que ha sido encontrado en otros eucariontes en donde estas proteínas al generar estados de represión transcripcional se encuentran localizadas en la periferia nuclear, mientras que en el caso de los trofozoítos de *E. invadens* se localizan en la región central del núcleo.





**Figura 28. La proteína *EiHDAC3* se localiza en la región central del núcleo en trofozoítos de *E. invadens*.** Ensayo de inmunofluorescencia en trofozoítos de *E. invadens* utilizando el anticuerpo anti HDAC3 A) En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI y en rojo la señal correspondiente al anticuerpo anti HDAC3 con un aumento de 40X y B) con un aumento de 100 X. C) Aumento de 300X de una célula, Las señales positivas que se ubican dentro del núcleo se observan en color rosa.

### **7.9 Impacto de la acetilación de la histona H4 en el enquistamiento de *E. invadens*.**

Los resultados de WB realizados en extractos básicos obtenidos a partir de trofozoítos y quistes de *E. invadens* nos indicaron que los residuos de K5, 8, 12 y 16 de la histona H4 se encuentran acetilados en trofozoítos y quistes de *E. invadens* y que además el parásito expresa una HDAC de la clase I que es la ortóloga de HDAC3 de humano. Además, como se mencionó en la introducción Byers y colaboradores en el 2005, demostraron que la utilización de butirato de sodio, el cual es un inhibidor de las HDACs, tenía un efecto en el enquistamiento, esto nos estaría indicando la importancia que tiene la acetilación y desacetilación de histonas en el enquistamiento de *E. invadens*.

Por lo que una manera de estudiar el papel de la acetilación en diferentes procesos consiste en utilizar inhibidores de HDACs y uno de los más utilizados es la tricostatina A (TSA). TSA inhibe a las HDACs de la clase I y II a través de su interacción con el *pocket* catalítico de la proteína, así como su unión al Zinc, el cual es el cofactor que requieren las HDACs de la clase I y II para llevar a cabo la desacetilación del sustrato. Tomando en cuenta que el parásito posee dos proteínas ortólogas a HDAC3 de humano, la cual se encuentran clasificada dentro de la clase I de las HDACs y que se sabe que su actividad puede ser bloqueada con TSA, su uso nos permitiría conocer la función de EiHDAC3 – *like*.

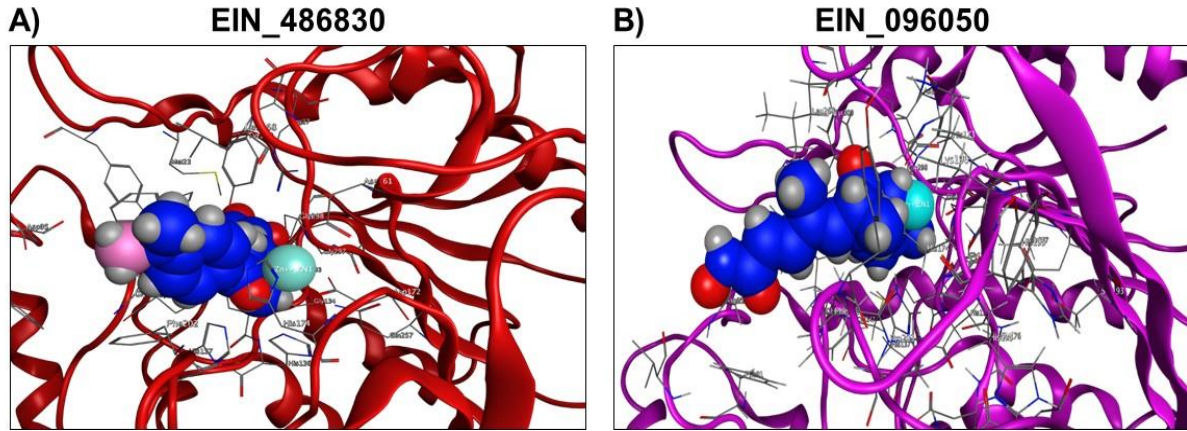
Con la finalidad de conocer si la TSA interactúa con las EiHDAC3 de la misma manera como lo hace con la HDAC3 de humano, se realizó un *docking* molecular de las estructuras predichas de EIN\_486830 y EIN\_096050 así como de la TSA. Como se observa en la figura 29, ambas EiHDAC3 de *E. invadens* poseen aminoácidos presentes en el *pocket* catalítico que pueden interaccionar con la TSA y con la molécula de Zinc, lo que conlleva al bloqueo de la actividad de desacetilasa (Finnin MS. *et al.*, 1999; Zhang L. *et al.*, 2018). Estos resultados nos indican que es posible utilizar a la Tricostatina A para bloquear la actividad de las EiHDAC3 en el parásito.

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió utilizar a la TSA para evaluar el efecto de la hiperacetilación en el enquistamiento de *E. invadens*. Sin embargo, primero era necesario conocer a qué concentración podríamos utilizar este reactivo que no fuera tóxico para los trofozoítos. Para ello, se tomaron como base las dosis previamente reportadas en *E.*

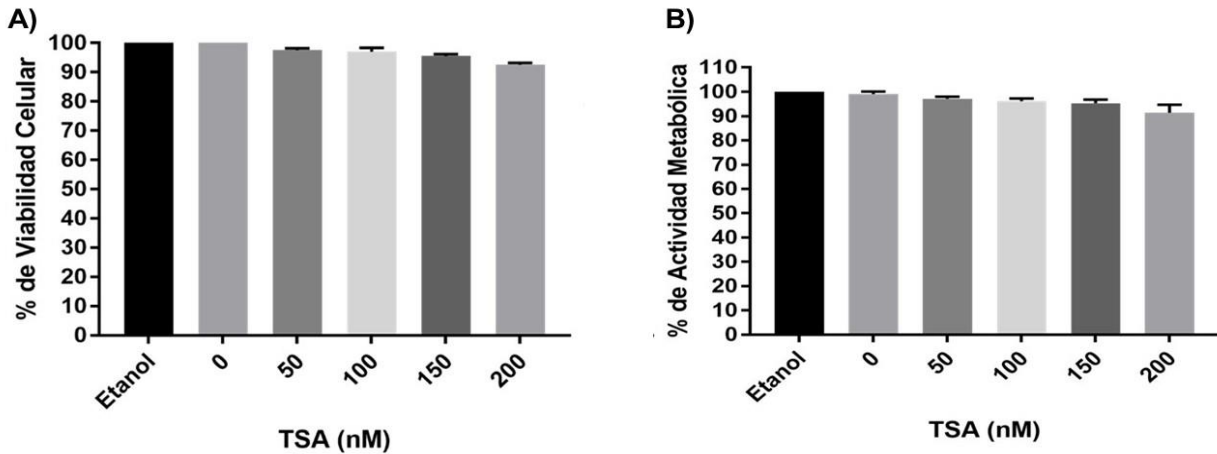
*histolytica* cuyos rangos de concentración van de 50 a 200 nM (Ehrenkaufner G. *et al.*, 2007; Isakov E., *et al.*, 2008).

Por esta razón, los trofozoítos de *E. invadens* fueron incubados con TSA en concentraciones de 50, 100, 150 y 200 nM así como 45  $\mu$ L de etanol absoluto, el cual fue el vehículo empleado para disolver el TSA. Los trofozoítos se incubaron durante 24 h con las diferentes concentraciones de TSA y como control se mantuvo un cultivo sin TSA. Una vez que concluyó el tiempo de incubación se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción con azul de tripano y su actividad metabólica mediante el ensayo de MTT. En ambos casos se tomó como el 100% de viabilidad celular y actividad metabólica los datos obtenidos en las células que no fueron tratadas con TSA ni con etanol absoluto. Como se muestra en la figura 30, la presencia del etanol no afecta la viabilidad ni la actividad metabólica y al utilizar la dosis de 200 nM se mantiene una viabilidad celular de aproximadamente 90% y además los trofozoítos con esa concentración de TSA son metabólicamente activos, por lo que con este resultado se decidió que para los experimentos posteriores se utilizaría la dosis de 200 nM de TSA.

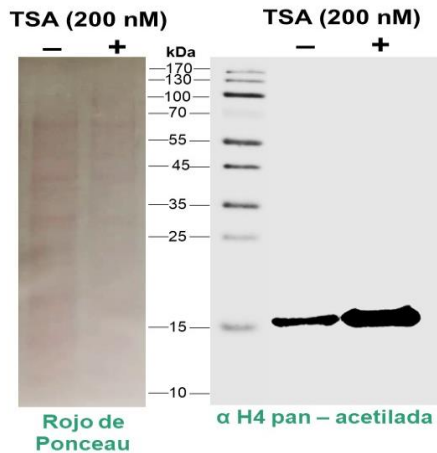
Una vez que se determinó cual era la dosis de TSA que se utilizaría en los experimentos y con el objetivo de confirmar lo que se ha reportado en la literatura respecto a que el uso de TSA induce una hiperacetilación de las histonas, nuevamente se incubaron trofozoítos de *E. invadens* con TSA a una concentración de 200 nM así como trofozoítos sin TSA durante 24 h. Después de este tiempo se realizó la extracción ácida de proteínas de las células tratadas y no tratadas con TSA. Los extractos se utilizaron para realizar ensayos de WB utilizando el anticuerpo anti histona H4 pan – acetilada, en donde como se muestra en la figura 31, en células no tratadas y tratadas con TSA se identificó la banda de aproximadamente 15 kDa correspondiente a la histona H4. Además se observó que el tratamiento con TSA induce una hiperacetilación de la histona H4 en los trofozoítos de *E. invadens* (tomando como control de carga a la membrana teñida con rojo de Ponceu). Todos estos resultados nos sugieren que al utilizar un inhibidor de las HDACs como es la TSA, se inhibe la actividad de EiHDAC3 lo que ocasiona una hiperacetilación de la histona H4.



**Figura 29. Docking molecular para identificar las interacciones de las dos EiHDAC3 con la TSA.** A) Estructura terciaria del pocket catalítico de EIN\_486830 (color rojo) y B) EIN\_096050 (color rosa) correspondientes a las dos HDACs de *E. invadens*. Se muestra que la TSA es capaz de interactuar con aminoácidos del *pocket* catalítico, así como con el Zinc, lo que conlleva a una inhibición de la actividad de desacetilasa.

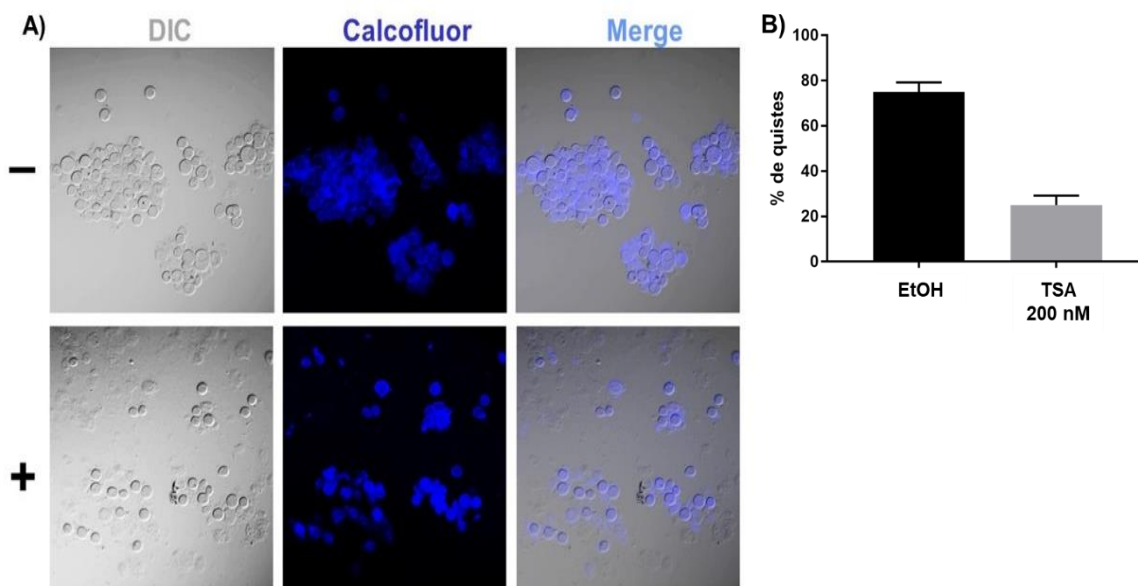


**Figura 30. La TSA no afecta la viabilidad celular ni la actividad metabólica de trofozoítos de *E. invadens*.** A) Ensayo de azul de tripano y B) ensayo de MTT en trofozoítos de *E. invadens* tratados con TSA a dosis de 50, 100, 150 y 200 nM durante 24 h. En ambos casos se observa que la dosis más alta (200 nM) permite mantener la viabilidad celular y la actividad metabólica en un 90% de los trofozoítos. Los datos corresponden a 2 experimentos independientes por duplicado.



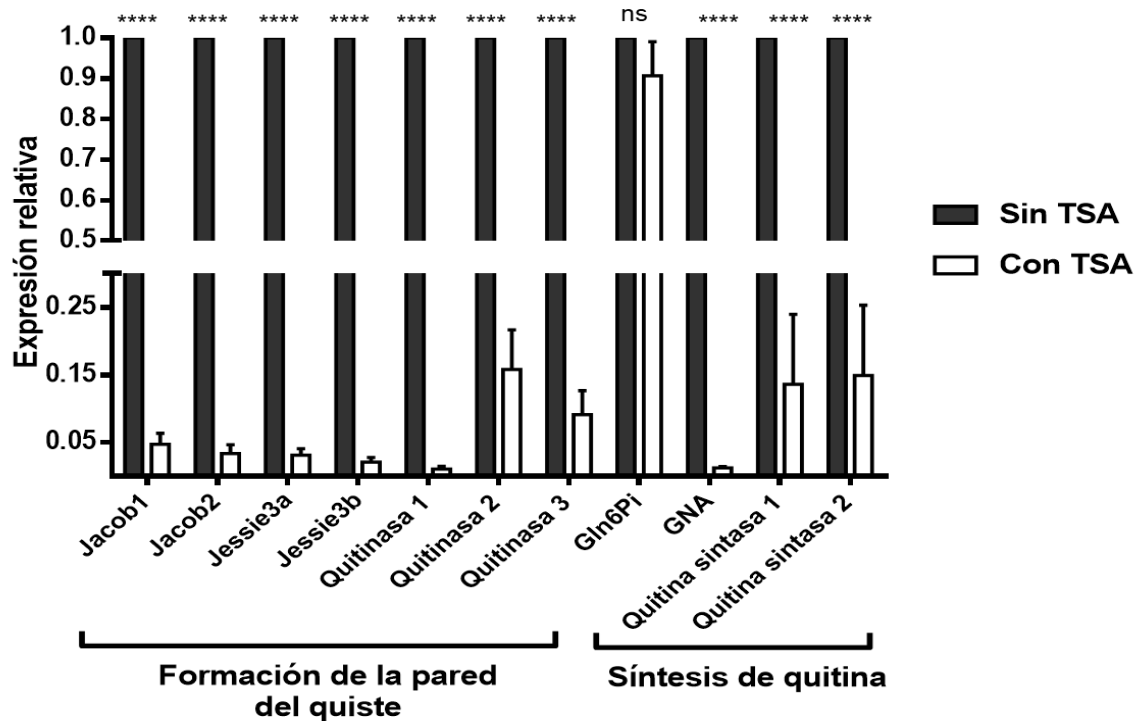
**Figura 31. TSA induce hiperacetilación de la histona H4 en trofozoítos de *E. invadens*.** WB utilizando el anticuerpo dirigido contra la histona H4 pan - acetilada, el cual identificó una banda de aproximadamente 15 kDa en extractos ácidos de trofozoítos no tratados y tratados con TSA a 200 nM durante 24 h. Como control de carga se muestra la membrana teñida con rojo de Ponceau.

Una vez que se determinó que la TSA inducía una hiperacetilación de la histona H4, surgió la pregunta de cuál es el impacto de esta hiperacetilación en el enquistamiento de *E. invadens*. Para ello, se realizó la inducción del enquistamiento de trofozoítos de *E. invadens* en ausencia y presencia de TSA a 200 nM durante 24 h. Posteriormente, la población total de células en ambas condiciones fue recuperada y se realizó una tinción con calcofluor blanco el cual nos permitió identificar a la población correspondiente a los quistes. Como se puede observar en la figura 32, en las células tratadas con TSA hubo una disminución en el número de células positivas a la tinción con calcofluor en comparación con las células no tratadas. Además, se observan células cuya morfología sugieren ser trofozoítos o pre – quistes, los cuales no son teñidos con el calcofluor (figura 32 A). Para tener datos cuantitativos del % de la reducción del enquistamiento en células tratadas con y sin TSA, se realizaron conteos de 5 campos en donde en cada campo se contaron 100 células en dos experimentos independientes. Nuestros resultados sugieren que aproximadamente el 70% de las células no tratadas con TSA fueron positivas a la tinción con calcofluor, mientras que en el caso de las células tratadas con TSA este % disminuye a un 30% de la población positiva a la tinción con calcofluor (Figura 32 B) Estos datos nos sugieren que el bloqueo de la actividad de EiHDAC3 ocasiona la hiperacetilación de la histona H4 impacta negativamente en el enquistamiento de *E. invadens*.



**Figura 32. La hiperacetilación de la histona H4 impacta en el enquistamiento de *E. invadens*.** A) Trofozoítos de *E. invadens* fueron inducidos al enquistamiento *in vitro* en ausencia (-) o presencia (+) de TSA a una concentración de 200 nM durante 24 h. Las células con ambos tratamientos fueron recuperadas y teñidas con calcofluor blanco y observadas bajo microscopia confocal. B) Conteo de células positivas a la tinción con calcofluor blanco en ausencia (EtOH) o presencia (+) de TSA a 200 nM. Los datos corresponden a 2 experimentos independientes por duplicado.

El impacto de la hiperacetilación de la histona H4 sobre el enquistamiento nos estaría sugiriendo que existe una desregulación de genes asociados a este proceso como son las moléculas que participan en la formación de la pared del quiste, así como de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de quitina. Para determinar si estos genes se desregulan como consecuencia de la inhibición de la actividad de EiHDAC3, se realizaron ensayos de RT – qPCR utilizando RNA proveniente de células inducidas al enquistamiento en ausencia (-) o presencia (+) de TSA a 200 nM. Como se observa en la figura 33, los mRNA de 5 genes involucrados en la vía de la formación de pared de quitina como son las lectinas Jacob 1 y 2, Jessie 3a y 3b y las quitinasas 1, 2 y 3, así como enzimas involucradas en la vía de la síntesis de la quitina como son la glucosamina 6 fosfato N – acetiltransferasa (GNA) así como las quitina sintasa 1, 2 y 3 se encontraron disminuidos en las células inducidas al enquistamiento en presencia de TSA en comparación con las que no se les adicionó TSA, lo cual nos está sugiriendo que la acetilación de histonas participa en la regulación de la expresión de genes involucrados en el enquistamiento de *E. invadens*.



**Figura 33. El bloqueo de la actividad de EiHDAC3 disminuye la expresión de genes involucrados en la vía de formación de la pared del quiste y la síntesis de quitina.** Ensayos de RT – qPCR para evaluar los niveles de expresión de genes involucrados en la vía de formación de la pared del quiste como son Jacob 1 y 2, Jessie 3a y 3b, quitinasa 1, 2 y 3 así como genes que participan en la vía de síntesis de quitina como son la glucosamina 6 fosfato isomerasa (Gln6Pi), la glucosamina 6 fosfato N – acetiltransferasa (GNA) y las quitina sintasa 1 y 2. Trofozoitos de *E. invadens* fueron inducidos al enquistamiento *in vitro* en ausencia o en presencia de TSA a una concentración de 200 nM durante 24 h y posteriormente se obtuvo el RNA de ambos tratamientos. Los niveles de expresión relativa fueron determinados respecto a la expresión del mRNA en las células sin TSA. Los datos fueron normalizados utilizando como referencia al gen constitutivo EIN\_327460. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes por duplicado.

### 7.10 Identificación y expresión de genes que codifican para HDACs de la clase III o sirtuinas.

Los resultados obtenidos nos sugieren que las HDACs de la clase I específicamente EiHDAC3 mediante el control de los estados de acetilación y desacetilación de las histonas estarían participando en la regulación de la expresión de genes implicados en el enquistamiento de *E. invadens*. Sin embargo, no son las únicas proteínas encargadas de modular los estados de acetilación y desacetilación tanto de sustratos histónicos como no histónicos. Otro grupo de HDACs son las HDAC de la clase III mejor conocidas como sirtuinas, las cuales a diferencia de las HDACs de la clase I y II, utilizan como factor al NAD<sup>+</sup>, además se sabe que son proteínas activadas bajo condiciones de estrés y han sido consideradas sensores del metabolismo. Previamente ya fue reportado por el grupo del Dr. Tomoyoshi Nozaki que existe una sirtuina que aumenta sus niveles de expresión a nivel de mRNA a lo largo del enquistamiento de *E. invadens* (De Cádiz AE. *et al.*, 2013) por lo que se propone que las sirtuinas pudieran jugar un papel importante en el enquistamiento de este parásito.

Con la finalidad de conocer si la sirtuina previamente reportada era la única que se encontraba en el genoma de *E. invadens* o existían más genes que pudieran codificar para estas proteínas, se realizó una búsqueda *in silico* en la base de datos Amoeba (<http://amoebadb.org/amoeba/>) tomando como criterio la presencia del dominio catalítico SIR2 que es característico de estas proteínas. Este análisis nos permitió identificar 5 genes adicionales al previamente reportado, los cuales se muestra en la tabla III.

**Tabla III.** Genes identificados *in silico* en la base de datos Amoeba DB que codifican para HDACs de la clase III o sirtuinas.

ID de acceso (Amoeba DB)	Nombre asignado	Número de aminoácidos	Aminoácidos que abarca el dominio SIR2
EIN_218620	<i>EiSir2</i>	283	41 – 217
EIN_181960	<i>EiSir3</i>	372	35 – 212
EIN_110100	<i>EiSir4</i>	332	46 – 228
EIN_219010	<i>EiSir5</i>	355	108 – 290
EIN_229510	<i>EiSir6</i>	360	60 – 235
EIN_060040	<i>EiSir7</i>	383	142 – 326

Con el objetivo de conocer si estos genes se expresaban a nivel de mRNA tanto en trofozoítos como en quistes, se realizaron ensayos de RT – PCR semicuantitativa de punto

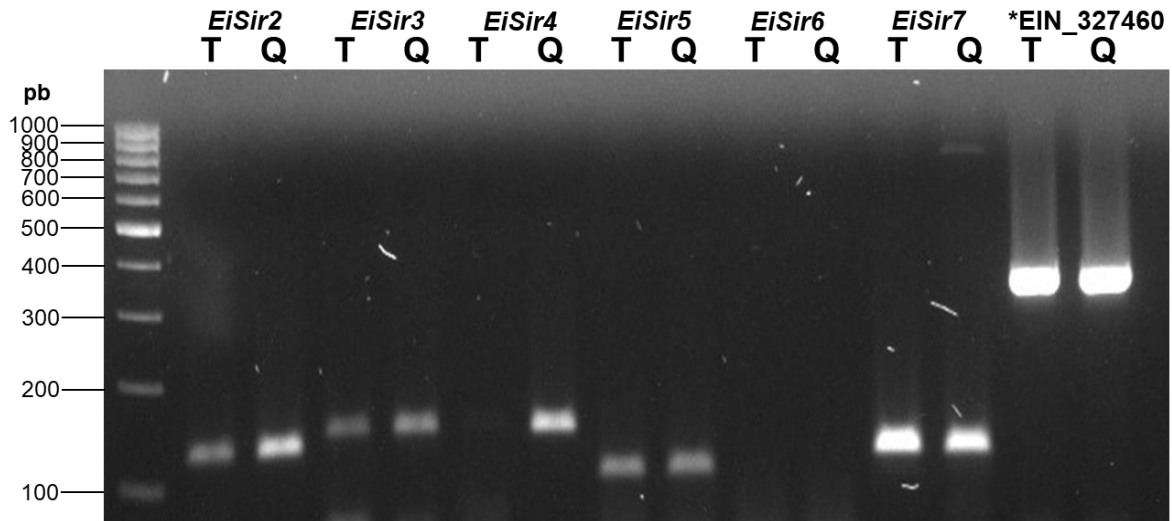
final a 25 ciclos empleando como templado el cDNA obtenido de trofozoítos y de quistes de 24 h post – enquistamiento. Como se muestra en la figura 34, los resultados de este ensayo mostraron que existen genes que no se expresan ni en trofozoítos ni en quistes como es el caso de *EiSir6*. Mientras que para el transcrito de *EiSir3*, *EiSir5* y *EiSir7*, estos se expresan de manera similar en ambas fases del parásito. En el caso de *EiSir2* se encontró que el transcrito de este gen se expresa más en la fase de quiste que en la etapa de trofozoíto, mientras que para el gen *EiSir4*, este se expresa únicamente en la fase de quiste. Como control de carga se utilizó el gen EIN\_327460 el cual ya había sido reportado que mantiene sus niveles de expresión entre trofozoítos y quistes de *E. invadens* (Suresh S. *et al.*, 2016). Por lo que todos estos resultados nos sugieren que existe una expresión diferencial de 2 genes (*EiSir2* y *EiSir4*) en las etapas de trofozoítos y quistes a 24 h post – enquistamiento.

Para saber si los niveles de expresión de *EiSir2* y *EiSir4* aumentaban o disminuían a lo largo del enquistamiento, se realizaron ensayos de RT – PCR en tiempo real utilizando cDNA de trofozoítos y quistes de 24, 48 y 72 h post – enquistamiento de *E. invadens*. Como se puede observar en la figura 35, se confirmó que *EiSir2* y *EiSir4* aumentan sus niveles de expresión en quistes de 24 h como se había visto en el ensayo de RT – PCR de punto final a 25 ciclos. Este aumento en la expresión se mantiene a las 48 h para ambos genes, pero a las 72 h únicamente aumenta la expresión de *EiSir2*, lo cual correlaciona con lo previamente reportado por De Cádiz AE. *et al.*, 2013. Mientras que *EiSir4* disminuye su expresión a niveles menores que el observado a 48 h. En conjunto estos resultados nos indica que ambos genes aumentan su expresión a las 24 y 48 h de enquistamiento, lo cual los vuelve blancos para el estudio de su función en el enquistamiento de *E. invadens*.

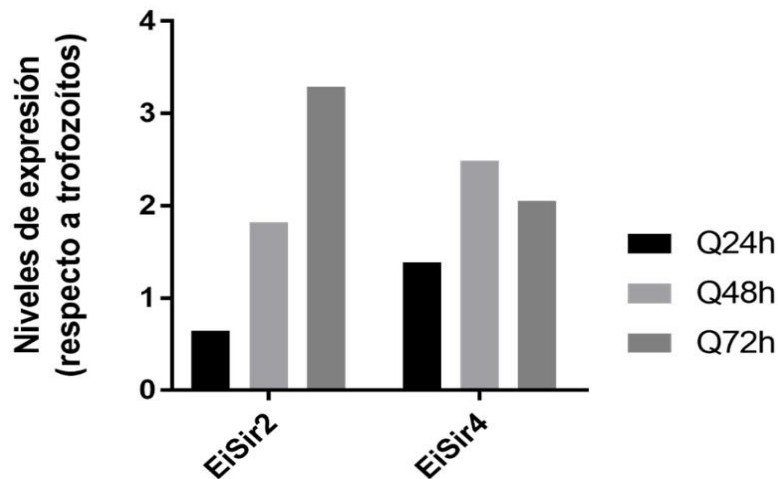
Debido a que la región común entre los genes *EiSir2* y *EiSir4* es la región del dominio catalítico, nosotros consideramos que esta región sería ideal para ser empleada como blanco en la generación de un *knock down* que nos permita conocer la participación de estas sirtuinas en el enquistamiento de *E. invadens*. Para generar los parásitos *knock down EiSirDC* se utilizó la estrategia de RNA de doble cadena y “*soaking*” descrita por Solis, C. *et al.*, 2009. El método consistió en amplificar el gen de interés y clonarlo en el vector pL4440 en donde se encuentra flanqueado bidireccionalmente por la secuencia promotora para la RNA polimerasa T7 y este plásmido se transformó en bacterias *E. coli* HT115 las cuales carecen de la *endonucleasa* RNasa III, por lo que son incapaces de degradar el dsRNA que se generará mediante la inducción con IPTG. De esta manera se obtienen



grandes cantidades de dsRNA que después de ser purificado, se añade al medio de cultivo y es ingerido por los trofozoítos y en el interior de los cuales se llevará a cabo el procesamiento por la maquinaria del RNA de interferencia (con la que cuenta el parásito) y de esta manera se ocasione la desregulación de la expresión del gen de interés a nivel del mRNA.

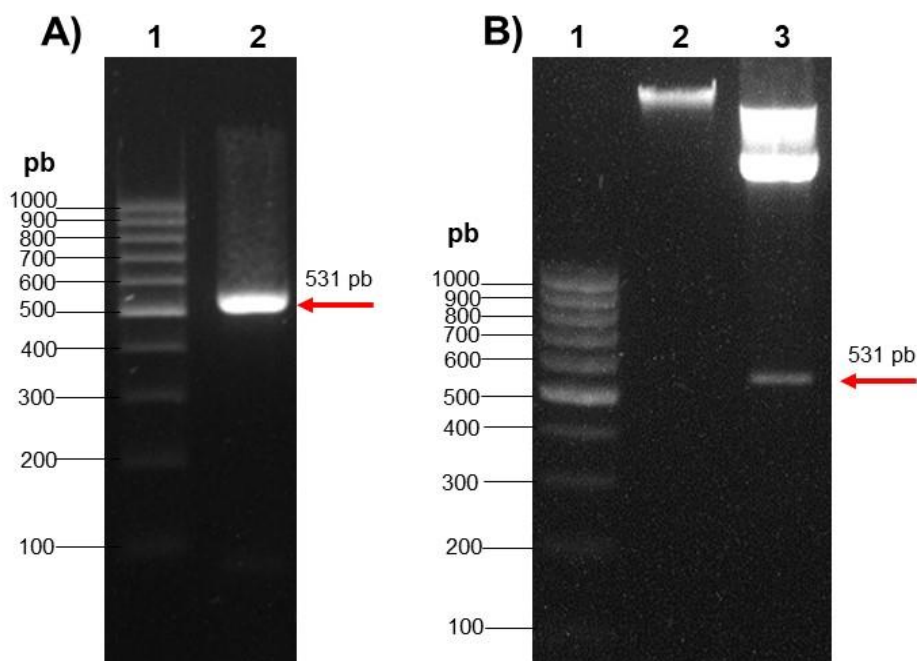


**Figura 34.** Expresión a nivel de mRNA de los genes identificados *in silico* que codifican para sirtuinas en trofozoítos y quistes de 24 h en *E. invadens*. Gel de agarosa al 2% en donde se migraron los productos de PCR obtenidos del ensayo de RT – PCR de punto final semicuantitativa a 25 ciclos para los genes *EiSir2* reportado previamente y 5 genes *EiSir3*, *EiSir4*, *EiSir5*, *EiSir6*, *EiSir7* identificados *in silico* que codifican para las sirtuinas. Como control de carga se amplificó el gen constitutivo EIN\_327460.



**Figura 35.** *EiSir2* y *EiSir4* aumentan sus niveles de expresión a nivel de mRNA a lo largo del enquistamiento de *E. invadens*. Ensayo de RT – PCR en tiempo real para los genes *EiSir2* y *EiSir4* empleando RNA obtenido de trofozoítos y quistes a partir de las 24, 48 y 72 h post – enquistamiento. Los niveles de expresión de ambos genes en los diferentes tiempos fueron determinados respecto a la expresión en trofozoítos y los datos fueron normalizados utilizando como control el gen constitutivo EIN\_327460.

Para la obtención del vector pL4440 – *EiSirDC* se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar un fragmento de 531 pb que corresponden al dominio catalítico de *EiSir2* con los sitios de restricción *HindIII* y *KpnI*. (Figura 36 A). Este amplificado fue migrado en un gel de agarosa, se recuperó y se digirió con las enzimas *HindIII* y *KpnI* para posteriormente ser ligado con el vector pL4440 linearizado con las mismas enzimas. Esta ligación se transformó en bacterias *E. coli* HT 115 y se realizó la selección de las colonias mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para el inserto de interés. Una colonia positiva que contenía el plásmido con el inserto de interés fue seleccionada para obtener el DNA plasmídico. Este fue digerido con las enzimas *Hind III* y *KpnI* lo que nos permitió confirmar que el plásmido contenía el inserto del tamaño esperado de 531 pb el cual fue liberado en la reacción de digestión (Figura 36 B). Una vez confirmada la presencia del inserto en el plásmido, este se envió a secuenciar para asegurarnos que durante el proceso de amplificación no se hubiera generado algún cambio de base. En la figura 37 se muestra la secuencia nucleotídica del plásmido, lo cual confirmó que la construcción estaba correcta y que no presentaba ningún cambio, por lo que a partir de este momento el plásmido pL4440 fue empleado para realizar los ensayos de inducción del dsRNA *EiSirDC*.

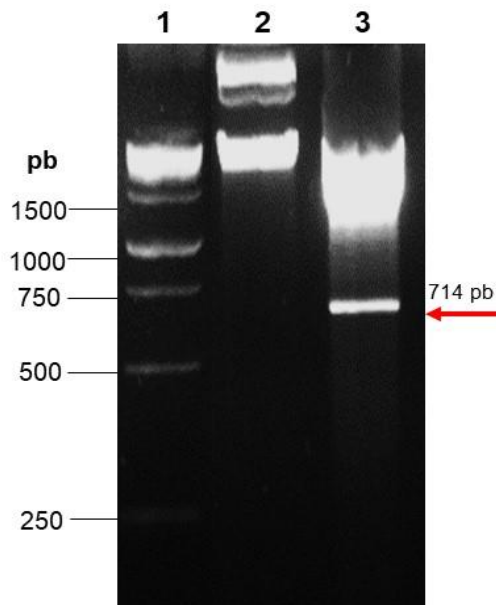


**Figura 36. Obtención del vector pL4440 *EiSirDC*.** A) Gel de agarosa al 1.5% en donde se muestra el fragmento de PCR correspondiente a *EiSirDC* *HindIII* / *KpnI* cuyo tamaño esperado fue de 531 pb. Carril 1 Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 Producto de PCR *EiSirDC* *HindIII* / *KpnI*. B) Reacción de restricción del vector pL4440 *EiSirDC* donde se observa la liberación del inserto *EiSirDC* de 531 pb. Carril 1 Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 pL4440 *EiSirDC* sin digerir. Carril 3 pL4440 *EiSirDC* digerido con *HindIII* y *KpnI*.

**aatacgaactcactataggg**gagacogggcagatctgatatcatogatgaattcgagctccac  
**N T T H Y R E T G R S D I I D E F E L H**  
 cgcggtggcggcogctctagaactagtggatccacoggttccatggctagccacgtgacg  
**R G G G R S R T S G S T G S M A S H V T**  
 cgtggatcccccgggctgcaggaattcgatata**aagcttggcgcgggaatctccggtgag**  
**R G S P G L Q E F D I K L G A G I S V E**  
 tcgggtatccccgaacttcaggtcgtcgaatgggctttggaagaaatatgaccccgcaaca  
**S G I P D F R S S N G L W K K Y D P A T**  
 tacgggtcttacgagaacttcaaaaccgacccgaagccattttggaaaatggctgaggaa  
**Y G S Y E N F K T D P K P F W K M A E E**  
 ctgcacaagatcaaggcatacccaaatgtgttcaccaatgccttgccggagttacagaaa  
**L H K I K A Y P N C V H Q C L A E L Q K**  
 ctcaacgctcgtgaagacaatcgtcacacagaatgtcogatgggttacatcaacaggccggg  
**L N V V K T I V T Q N V D G L H Q Q A G**  
 tcaaaacatgtgttagaaattcatggaaatggcgatttgtgtcactgcgtgaactgcgat  
**S K H V L E I H G N G D L C H C V N C D**  
 ttcatcgaaaaatccgaaaaacaaatttggaaataaaaaaacttcaccacaaaaacgaccct  
**F I E K S E K Q I W N K K T S P Q N D P**  
 ccaaaatgcccgaggtgtggagcattaatgaaactcogatgtagtgctttttggagaaaag  
**P K C P K C G A L M K L D V V L F G E K**  
 ttggacagaaagatttatgacgaagtcgtggcatcaacaactaaaacagactttttgctt  
**L D R K I Y D E V V A S T T K T D F L L**  
 gtccttggcacttcaactacaagtcgcgcgta**aggtacc**ccgcgcgtaaggtacc**ccgc**  
**V L G T S L Q V A P - G T P R R K V P R**  
**gccgtaaggtacc**caat**cgcccta**  
**A V R Y P I A L**

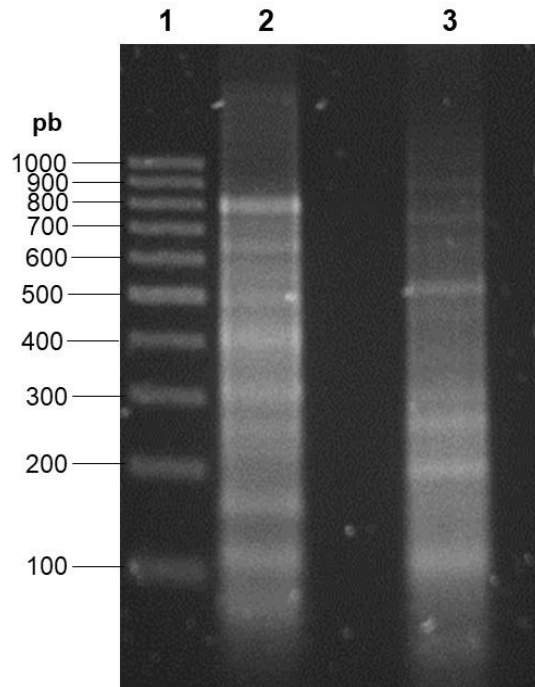
**Figura 37. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del plásmido pL4440 *EiSirDC*.** En color verde se muestra la secuencia correspondiente a *EiSirDC*, en color rojo la secuencia para el promotor de T7 el cual flanquea al inserto *EiSirDC*, en rosa se muestra el sitio de restricción para *HindIII* y en azul el sitio de restricción para *KpnI*.

Como plásmido control para la inducción del dsRNA se utilizó el plásmido pL4440 GFP, que contiene una secuencia de 714 pb correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP), cuyo uso ya fue previamente reportado por el grupo de la Dra. Nancy Guillén (Solis CF. *et al.*, 2009) y el cual fue proporcionado por el Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía. Para confirmar la presencia del inserto de GFP en el plásmido proporcionado, se realizó una digestión utilizando las enzimas *BamHI* y *KpnI* que son los sitios que flanquean la secuencia de GFP y como se puede observar en la figura 38, la digestión nos muestra la liberación del inserto de GFP de 714 pb, lo que nos confirmaba la identidad de este plásmido, el cual a partir de este momento fue empleado para realizar los ensayos de inducción del dsRNA *GFP*.



**Figura 38. Digestión del vector pL4440 GFP.** Reacción de restricción del vector pL4440 *GFP* con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I donde se observa la liberación del inserto *GFP* de 714 pb. Carril 1 Marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 pL4440 *GFP* sin digerir. Carril 3 pL4440 *GFP* digerido con *Bam*HI y *Kpn*I.

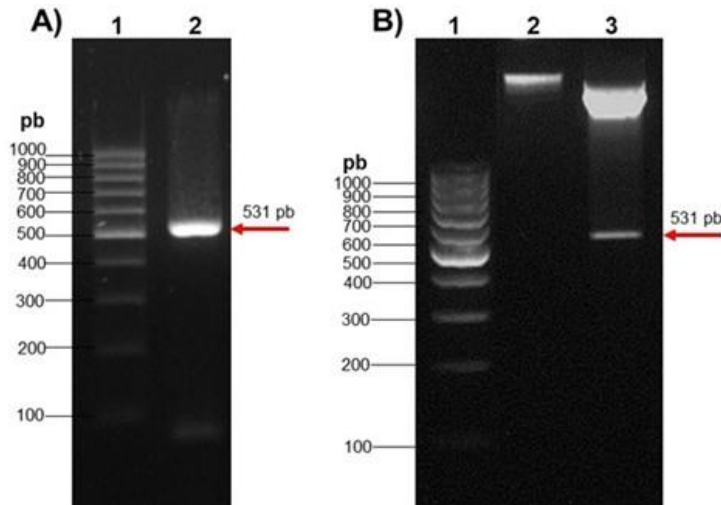
Una vez que se contaban con las construcciones pL4440 *EiSirDC* y pL4440 *GFP*, se realizó la inducción a gran escala con IPTG para la obtención del dsRNA para ambas construcciones. Este dsRNA fue purificado a partir de las bacterias *E. coli* HT 115, tratado con DNAasa I para eliminar el DNA proveniente de las bacterias. También esta preparación se trató con RNAasa A con la finalidad de eliminar el RNA de cadena sencilla y quedarnos exclusivamente con el dsRNA. Una vez que se obtuvieron ambos dsRNAs, el equivalente a 3 µg de cada muestra fueron migrados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. En la figura 39, podemos observar que en ambos casos se obtuvo un barrido. En el caso de *GFP* este barrido se observa a partir de los 800 pb, mientras que para *EiSirDC* el barrido se observa a partir de los 600 pb, lo que nos indicó que el dsRNA se indujo en ambos casos y que por lo tanto estos dsRNAs podrían ser utilizados para los experimentos de silenciamiento mediante la técnica de *soaking* para evaluar el papel de *EiSir2* y *EiSir4*.



**Figura 39. Purificación del dsRNA para GFP y *EiSirDC*.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se migró el equivalente a 3 µg de dsRNA GFP (carril 2) y dsRNA *EiSirDC* (carril 3) en donde se confirma la obtención de ambos dsRNAs.

Una vez que se obtuvo el dsRNA para GFP y para *EiSirDC*, el siguiente paso era generar los parásitos *knock down*. El silenciamiento se evaluaría tanto a nivel de mRNA mediante ensayos de RT – PCR y a nivel de proteína mediante ensayos de WB. Sin embargo, debido a que no existe un anticuerpo comercial que pueda reconocer el dominio catalítico de estas proteínas en *E. invadens*, se generó una proteína recombinante en el vector pGEX6P1, en donde nuestro inserto se encontraría fusionado y en marco de lectura con respecto a la bandera de GST. Esta proteína recombinante se empleará como antígeno para inocular en ratones y obtener un anticuerpo policlonal contra *EiSirDC*. Por lo que para obtener la construcción pGEX6P1, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar un fragmento de 531 pb que corresponden al dominio catalítico de *EiSir2* con los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* (Figura 40 A). Este amplificado fue migrado en un gel de agarosa, se recuperó y se digirió con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* para posteriormente ser ligado con el vector pGEX6P1 linearizado con las mismas enzimas. Esta ligación se transformó en bacterias *E. coli* XL10 Gold y se realizó la selección de las colonias positivas por realizar una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos específicos para el inserto de interés. De varias colonias positivas, una de ellas fue seleccionada y se obtuvo el DNA plasmídico el cual fue digerido con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* lo cual nos permitió confirmar que el plásmido contenía el inserto de interés de 531 pb el cual fue liberado en la reacción de

digestión (Figura 40 B). Una vez confirmada la presencia del inserto en el plásmido, este se envió a secuenciar para asegurarnos que durante el proceso de amplificación no se haya generado algún cambio de base que pudiera modificar nuestro marco de lectura. En la figura 41 se muestra la secuencia nucleotídica así como la secuencia de aminoácidos obtenida del plásmido secuenciado, confirmando que la construcción se encontraba en marco de lectura con la bandera de GST y que no se había generado ningún cambio de base.



**Figura 40. Obtención del vector pGEX6P1-*EiSirDC*.** A) Gel de agarosa al 1.5% en donde se muestra el fragmento de PCR correspondiente a *EiSirDC* *Bam*HI / *Eco*RI cuyo tamaño esperado fue de 531 pb. Carril 1 Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 Producto de PCR *EiSirDC* *Bam*HI / *Eco*RI. B) Reacción de restricción del vector pGEX6P1 *EiSirDC* donde se observa la liberación del inserto *EiSirDC* de 531 pb. Carril 1 Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2 pGEX6P1 *EiSirDC* sin digerir. Carril 3 pGEX6P1 *EiSirDC* digerido con *Bam*HI y *Eco*RI.

Posteriormente se procedió a inducir la expresión de la proteína recombinante GST – *EiSirDC* con IPTG ya que la expresión de la secuencia clonada está bajo el control del operón *lac*. La inducción se llevó a cabo por 4 h a 37°C. Una vez inducidas las proteínas, las bacterias fueron sonicadas y se determinó si la proteína inducida se encontraba en la fracción soluble o insoluble, encontrándose en la fracción insoluble y a partir de la cual se procedió a purificar a la proteína recombinante utilizando perlas de glutatión. Las proteínas totales obtenidas de las bacterias no inducidas (NI), inducidas (I), fracción soluble (S), fracción insoluble (IS) y la proteína recuperada con las perlas de glutatión (P), fueron migradas en geles SDS – PAGE al 12% y como se puede observar en la figura 42 A, se recuperó la proteína recombinante GST – *EiSirDC* cuyo peso molecular es de 46 kDa. Estas mismas fracciones fueron migradas nuevamente en otro gel SDS – PAGE con la finalidad de realizar un ensayo de WB utilizando el anticuerpo anti GST y como se observa en la

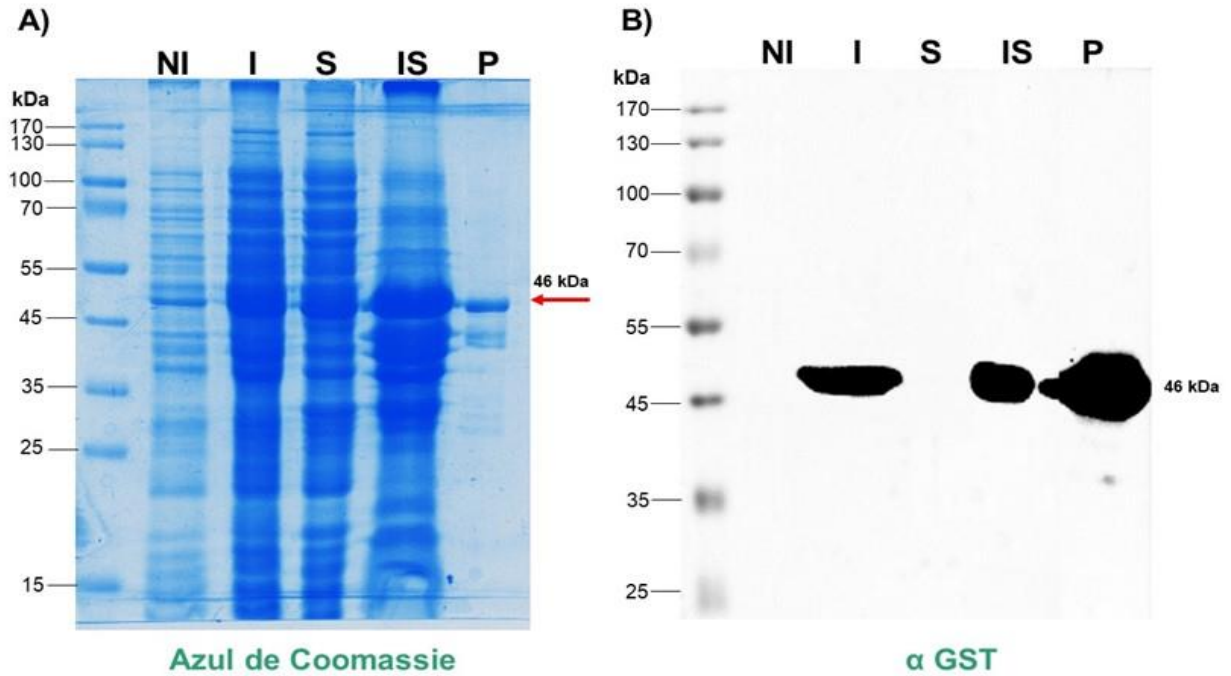
figura 42 B la proteína recombinante solo se expresa en presencia de IPTG y está presente en la fracción insoluble. Posteriormente la proteína se recuperó del resto de las proteínas bacterianas con la utilización de perlas de glutatión. Posteriormente, la proteína recombinante purificada (de aproximadamente 46 kDa) se migró en un gel SDS – PAGE el cual se tiñó con Azul de Coomassie. Después sobre el gel se cortó la banda correspondiente a la proteína recombinante y será utilizada como antígeno para obtener anticuerpos policlonales en ratones BALB/c.

```

atgtcccctatactaggttatttgaaaattaagggccttgtgcaaccactcgacttctt
M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L
ttggaatatcttgaagaaaaatatgaagagcatttgtatgagcgcgatgaagggtgataaa
L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K
tggcgaacaaaaagtttgaattgggtttggagtttcccattcttcttattattattgt
W R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D
ggtgatgttaaattaacacagtcctatggccatcatacgttatatagctgacaagcacaac
G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N
atgtgggtgggttgtccaaaagagcgtgcagagatttcaatgcttgaaggagcgggtttg
M L G G C P K E R A E I S M L E G A V L
gatattagatacgggtgtttcgagaattgcataatagtaaaagactttgaaactctcaagtt
D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V
gattttcttagcaagctacctgaaatgetgaaaatgttcgaagatcgtttatgtcataaa
D F L S K L P E M L K M F E D R L C H K
acatatttaaatggtgatcatgtaacccatctgacttcatgttgtatgacgctcttgat
T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D
gttgttttatacatggacccaatgtgectggatgecttcccaaaattagtttgttttaa
V V L Y M D P M C L D A F P K L V C F K
aaacgtattgaagctatcccacaaattgataagtacttgaaatccagcaagtatatatgca
K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A
tggcctttgcaggctgccaagccaagtttgggtggcgaccatcctccaaaatcggt
W P L Q G W Q A T F G G G D H P P K S D
ctggaagtctgttccaggggcccctgggatccggcggggaattctccgttgagtcgggt
L E V L F Q G P L G S G A G I S V E S G
atcccgaacttcaggctcgtcgaatgggtttggaagaaatagaccocgcaacatacggg
I P D F R S S N G L W K K Y D P A T Y G
tcttacgagaacttcaaaaaccgaccocgaagccattttggaanaatggctgaggaactgcac
S Y E N F K T D P K P F W K M A E E L H
aagatcaaggcatacccacaaattgtgttcccaatgecttgcggagttacagaaactcaac
K I K A Y P N C V H Q C L A E L Q K L N
gtcgtgaagacaatcgtcacacagaatgtcgatgggttacatcaacaggecgggtcaaaa
V V K T I V T Q N V D G L H Q Q A G S K
catgtgttagaaattcatggaaatggcgatttgtgtcactgectgaaactgcgatttcatc
H V L E I H G N G D L C H C V N C D F I
gaaaaatccgaaaaacaaatttggataaaaaaacttaccacaaaacgacctccaaa
E K S E K Q I W N K K T S P Q N D P P K
tgcccgaagtgtggagcattaatgaaactcgatgtagtgetttttggagaaaagtggac
C P K C G A L M K L D V V L F G E K L D
agaaagatttatgacgaagtcgtggcatcaacaactaaaacagactttttgcttgcctt
R K I Y D E V V A S T T K T D F L L V L
ggcaacttcactacaagtcgcgcgtaagaattc
G T S L Q V A P - E F

```

Figura 41. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del plásmido pGEX6P1 *EiSirDC*. En color azul se muestra la secuencia correspondiente a la bandera de GST, en rojo el sitio de restricción para *Bam*HI, en verde la secuencia correspondiente a *EiSirDC*, en negro el codón de paro y en naranja el sitio de restricción para *Eco*RI.



**Figura 42. Inducción y purificación de la proteína recombinante GST-EiSirDC.** A) Gel SDS – PAGE al 12% en donde se migraron las proteínas extraídas de las bacterias no inducidas (NI), inducidas (I), fracción soluble (S), fracción insoluble (IS) y la proteína recuperada con las perlas de glutatión (P). Se observa la recuperación de una banda de aproximadamente 46 kDa que corresponde a la proteína recombinante GST – EiSirDC. B) WB utilizando el anticuerpo anti GST en las mismas fracciones migradas en la figura A. Este anticuerpo identificó una banda de aproximadamente 46 kDa en las fracciones I, IS y P, lo cual nos indica la presencia de la proteína recombinante GST – EiSirDC.



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Identificación de PTMs en trofozoítos y quistes de *E. invadens* y *E. histolytica*.

Para completar su ciclo de vida, tanto *E. histolytica* como *E. invadens* alternan entre dos fases, el trofozoíto y el quiste. La infección se adquiere tras el consumo de alimentos o agua contaminando con quistes que es la fase infectiva del parásito. Una vez en el hospedero humano estos quistes se convierten en trofozoítos que es la forma invasiva del parásito. Es por esta razón que es importante dilucidar los mecanismos moleculares que participan en el proceso de enquistamiento. Recientes estudios han sugerido que mecanismos epigenéticos como las PTMs de las histonas en particular la acetilación, podría ser uno de los mecanismos epigenéticos involucrados en regular el proceso de enquistamiento en *E. invadens* (Byers J. *et al.*, 2005). Por lo que en este trabajo uno de nuestros objetivos fue conocer si existían PTMs diferenciales en las histonas de trofozoítos y quistes que participaran en regular el enquistamiento de *Entamoeba* utilizando como modelo de estudio a *E. invadens*.

Como ya se mencionó en la introducción, el genoma de *E. histolytica* está organizado en cromatina cuya unidad básica es el nucleosoma, como fue demostrado por Torres – Guerrero y cols., quienes por microscopía electrónica observaron una estructura de “collar de perlas” conocida como fibra de 10nm (Torres – Guerrero. *et al.*, 1991). Además de que *E. histolytica* y *E. invadens* contienen los genes que codifican para las cuatro histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4), lo que sugiere que en ambos parásitos la cromatina presenta una organización similar a la descrita en organismos eucariontes.

En el caso de *E. histolytica* y *E. invadens* si bien se han identificado los genes que codifican para las histonas canónicas, un análisis más detallado mostró que las histonas H3 y H4 de ambos parásitos presentan una alta divergencia en su extremo NH<sub>2</sub> terminal en comparación con la reportada en eucariontes (Födinger M. *et al.*, 1992; Binder M. *et al.*, 1995; Byers J. *et al.*, 2005; Hughenin M. *et al.*, 2010). Sin embargo, y a pesar de esto, ambas histonas conservan la característica de contener en su secuencia varios residuos de K y R, que son susceptibles a sufrir diferentes PTMs como la metilación y la acetilación.

Hasta la fecha se ha demostrado experimentalmente que en *E. histolytica* ocurren algunas PTMs en los residuos de K en la histona H3 como es la di – o – trimetilación de la lisina 4 (H3K4me2/3), la cual mediante ensayos tipo CHIP se demostró que se encuentra enriquecida en genes que codifican para factores de virulencia del parásito (Huguenin M. *et al.*, 2010). Otra PTM identificada recientemente en *E. histolytica* es la H3K27me2, la cual se ha encontrado que favorece la deposición de proteínas de la maquinaria del RNA de interferencia como Argonauta, lo que conlleva al silenciamiento de genes (Foda B. y Singh U., 2015). Respecto a la histona H4, únicamente se ha demostrado la existencia de la dimetilación de la arginina 3 (H4R3me2), la cual se sugiere es llevada a cabo por la enzima PRMT1 (Borbolla – Vazquez J. *et al.*, 2015).

Sin embargo, se desconoce si existen otras PTMs en el extremo NH<sub>2</sub> de la histona H4 en trofozoítos y mucho menos en quistes de *E. invadens*, por lo tanto, no se conocen (en caso de que existieran) otras marcas epigenéticas y si éstas pudieran participar en regular la expresión de genes durante el enquistamiento, por lo que esto fue el objetivo principal de este trabajo.

El análisis por MS de las proteínas básicas obtenidas en el presente trabajo permitió identificar a las histonas canónicas de *E. histolytica*, sin embargo, no se identificó alguna variante de histonas. De manera particular, en la base de datos *Amoeba* DB y para el caso de la histona H3 se han descrito 5 genes que codifican para la histona H3 por lo que se realizó un análisis *in silico* para determinar si alguna de estas podrían corresponder a las variantes de la histona H3 como son: la histona H3.1, H3.2, H3.1t y CENP-A, las cuales ya han sido reportadas desde protozoarios hasta eucariontes superiores (Dalmasso MC. *et al.*, 2011; Henikoff S y Smith MM, 2015). Cada una de estas variantes se caracteriza por contener *motifs* y residuos específicos en su secuencia (Bernstein E y Hake S., 2006). Sin embargo, el análisis *in silico* nos indicó que ninguna de estas secuencias corresponde a alguna variante de histonas reportadas para la histona H3, por lo que esto nos hace pensar que probablemente correspondan a algunas variantes específicas de este parásito. Esto no sería inusual ya que han sido reportadas variantes específicas como son la variante de la histona H4v de *T. brucei* o H2B.Z de *P. falciparum* (Trelle M *et al.*, 2009; Siegel TN. *et al.*, 2009; Talbert PB *et al.*, 2012). Además el hecho de no identificar ninguna variante de histonas en *Entamoeba* contrasta con lo que ha sido reportado para otros parásitos como *P. falciparum*, *T. brucei* y *T. gondii* en donde algunas variantes de histonas tales como H.3.3,

CenH3, H2AZ y H2AX han sido identificadas y su participación en la regulación de genes ha sido demostrada (Lowell JE. *et al.*, 2005; Sullivan WJ Jr. *et al.*, 2006; Dalmaso MC. *et al.*, 2009; Siegel TN. *et al.*, 2009; Petter M. *et al.*, 2011; Petter M. *et al.*, 2013). Otra posibilidad podría ser que, de los 5 genes que codifican para la histona H3, estos se expresaran diferencialmente y entonces cada uno de ellos podría a su vez regular genes específicos.

También en este trabajo quisimos identificar las PTMs presentes en las histonas de *E. invadens*. Sin embargo, debido a que no se obtuvo una preparación pura de histonas, no se pudo identificar las PTMs que contenían las histonas de este parásito. Por esta razón, se emplearon anticuerpos comerciales que, de acuerdo con el alineamiento entre el péptido reportado por el fabricante y la secuencia de las histonas, éstos podrían tener un mejor reconocimiento para la histona H4 que para la histona H3 (Figura 10). Estos anticuerpos nos permitieron demostrar que la histona H4 de *E. invadens* está acetilada tanto en la fase de trofozoíto como de quiste en las posiciones de K5, K8, K12 y K16, aunque aún queda pendiente conocer si los residuos de K extras que se encuentran en el extremo NH<sub>2</sub> de la histona H4 también son susceptibles de ser modificados, lo cual podría realizarse mediante la generación de anticuerpos específicos para la acetilación y/o metilación por la síntesis de péptidos que contuvieran a estos residuos modificados.

Un aspecto muy interesante que queda pendiente por responder es conocer a la HAT responsable de la adición de los grupos acetilo a los residuos de K en la histona H4. Se ha descrito que las principales proteínas responsables de la acetilación de las histonas son las proteínas de la familia MYST y GCN5, las cuales modifican diferentes residuos de K. Se sabe que en el caso de GCN5, esta HAT tiene una mayor afinidad por la histona H3, en particular por los residuos H3K14, así como los residuos H3K9, H3K18, H3K23, H3K27, H3K36 y baja afinidad por los residuos de K8 y K16 de la histona H4 (Kuo MH *et al.*, 1996; Kuo YM, Andrews AJ, 2013). En el caso de las proteínas de la familia MYST, se ha demostrado que acetila a la histona H3 en los residuos K14 y K23, y respecto a la histona H4, se sabe que en levadura Esa1 es la HAT responsable de la acetilación global de la histona H4 y en otros organismos como *H. sapiens* y *Drosophila* se ha identificado como su principal blanco el residuo de K16 (Vasileia Sapountzi V y Côté J., 2011; Chen QY *et al.*, 2015).

En otros parásitos como en *P. falciparum*, *T. brucei*, *T. gondii* y *Leishmania donovani*, se ha establecido que la enzima encargada de acetilar los residuos de K en la histona H4 es la HAT de la familia MYST (Smith AT. *et al.*; 2005; Kawahara T, *et al.*, 2008; Siegel TN. *et al.*, 2008; Miao J. *et al.*, 2010; Kumar D, *et al.*, 2012). Por lo que entonces, al buscar a la proteína MYST en la base de datos de *Entamoeba*, se encontró que *E. invadens* y *E. histolytica* contienen el gen que codifica para esta HAT, por lo que su estudio mediante la generación de parásitos *knock – down* nos permitirá establecer si esta es la enzima responsable de la acetilación de la histona H4 en ambos parásitos.

Por otra parte, y de manera interesante, además de identificar la acetilación en los residuos de K5, K8, K12 y K16, también se identificó una PTM asociada a activación transcripcional la cual ocurre sobre un residuo de arginina y que ha sido poco estudiada como es la H4R3me1. Si bien previamente se había descrito que en *E. histolytica* este residuo de arginina puede sufrir una dimetilación asimétrica catalizada por la enzima PRMT1 (Borbolla – Vazquez. *et al.*, 2015), hasta la fecha no se había descrito la monometilación de este mismo residuo, por lo que este estudio permite decir que la R3 no es únicamente dimetilada, sino también puede ser monometilada. En eucariontes se ha descrito que la enzima PRMT1 es capaz de llevar a cabo tanto la monometilación como la dimetilación asimétrica de este mismo residuo, ambas PTMs asociadas a activación transcripcional (Di Lorenzo A y Bedford M, *et al.*, 2011; Jahan S y Davie J, 2015; Blanc RS y Richard S, 2017), pero aún queda pendiente conocer cuál es el impacto que tiene esta PTM en la regulación de la expresión de genes, lo cual hasta la fecha no ha sido estudiada.

En contraste con los resultados que obtuvimos para las marcas de activación transcripcional que ocurren en la histona H4, los resultados obtenidos por WB utilizando el anticuerpo contra la H4K20me3 (marca de represión transcripcional), nos sugieren que esta marca no se encuentra presente en ninguna fase del parásito. Esto podría deberse a que la H4K20me3 es una marca epigenética que se ha asociado a la formación de heterocromatina, por lo que se encuentra altamente enriquecida en las regiones teloméricas (Schotta G. *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta la fecha tanto para *E. histolytica* como para *E. invadens* las evidencias experimentales sugieren que sus cromosomas son circulares (Willhoeft U. y Tannich E., 1999; Loftus B., *et al.*, 2005) por lo que, al carecer de telómeros, también estaría ausente la marca epigenética H4K20me3 en el parásito. Sin embargo, recientemente se describió la presencia de esta marca epigenética en *E. histolytica*. Estos

autores mediante ensayos de inmunofluorescencia encontraron que la H4K20me3 se localiza en la periferia nuclear junto con la proteína asociada a telómeros EhTRF-like I (Rendón-Gandarilla FJ, *et al.*, 2018), lo que sugiere que existe una región represiva en la periferia nuclear. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de DNA – FISH acoplado a inmunofluorescencia (IFA – DNA FISH) para confirmar que la H4K20me3 colocaliza con los telómeros, así como ensayos de RNA – FISH acoplados a inmunofluorescencia (IFA – RNA – FISH) para confirmar que en esta región se encuentran genes transcripcionalmente silentes.

Por lo que entonces, tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, demostramos por primera vez que tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens* existen PTMs asociadas a activación transcripcional (H4 pan – acetilada y H4R3me1), las cuales no había sido descritas anteriormente en este parásito, aunque estas PTMs no fueron diferenciales para cada fase del parásito. El hecho de no encontrar diferencias en la presencia de las PTMs entre trofozoítos y quistes no resulta extraño ya que el papel funcional de las PTMs está dado cuando estas se encuentran en contexto de cromatina, es decir, cuando ocurren directamente sobre los nucleosomas. Además, existe un *cross talk* entre las diferentes PTMs que ocurren en el extremo NH<sub>2</sub> terminal de las histonas lo que puede generar interacciones sinérgicas o antagónicas, por lo que esto nos indica que existe una comunicación entre ellas (Bannister A. y Kouzarides T., 2011). Esta comunicación se da tanto entre modificaciones que se encuentran adyacentes en la misma histona por lo que se denominan comunicación en *cis*. Sin embargo, también se ha descubierto que las interacciones pueden darse entre modificaciones localizadas en diferentes extremos NH<sub>2</sub> de diferentes histonas y se conoce como comunicación en *trans*. Es decir, el efecto en la regulación de la expresión de genes no depende de una sola PTM, sino del conjunto y diversidad de las PTMs que se encuentren presentes en diferentes nucleosomas. De esta manera, la adición de grupos químicos a los extremos NH<sub>2</sub> terminal de las histonas, la lectura de estas modificaciones y la eliminación de estas marcas es lo que le confiere esta naturaleza dinámica a la cromatina que conlleva a la expresión de genes o bien a la compactación de la cromatina y a la generación de dominios de DNA transcripcionalmente inactivos.

Una de las preguntas que quedaron abiertas en este trabajo consiste en determinar el papel funcional de cada una de las PTMs identificadas, para lo cual es necesario realizar ensayos

de ChIP. Esto nos permitiría determinar si estas PTMs identificadas se encuentran presentes en las regiones promotoras de genes activos en trofozoítos y/o quistes, lo cual nos estaría indicado que efectivamente, la presencia de esas PTMs tiene un impacto en la regulación de la expresión de genes. En el presente trabajo intentamos realizar los ensayos de ChIP utilizando el anticuerpo anti histona H4 pan – acetilada tanto en la cromatina obtenida de trofozoítos y de quistes de *E. invadens*. Tomando en cuenta que estas PTMs asociadas a activación transcripcional tanto en eucariontes superiores y en parásitos se localizan en las regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos (Deckert J y Struhl K, 2001; Saksouk N. *et al.*, 2005; Lopez-Rubio JJ. *et al.*, 2007; Zhang T. *et al.*, 2015), se realizaron ensayos de PCR en tiempo real con el material inmunoprecipitado para las regiones promotoras de genes, que de acuerdo a la base de datos de *Amoeba* DB se encontraran transcripcionalmente activos en trofozoítos y quistes, así como en regiones promotoras de genes transcripcionalmente inactivos. Sin embargo, no observamos enriquecimiento de esta marca epigenética en las regiones promotoras de genes activos respecto a los genes inactivos, por lo que no sabemos si, este resultado negativo se debe a que no se hayan elegido los genes más adecuados para validar este ensayo o si en realidad, esta marca se encuentra distribuida de manera indistinta en regiones promotoras de genes activos e inactivos a lo largo del genoma del parásito.

## **8.2 Arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de *E. invadens* y *E. histolytica*.**

El hecho de no encontrar diferencias en la presencia o ausencia de las PTMs nos llevó a averiguar cuál era la localización nuclear de las marcas epigenéticas previamente identificadas tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens*. En caso de que estas marcas epigenéticas mostrarán una localización diferente dependiendo de su estadio, nos sugeriría que la arquitectura nuclear podría jugar un papel en regular la expresión de genes durante el enquistamiento de *E. invadens*. Esto ocurre porque numerosos estudios han llevado a proponer que la cromatina en eucariontes se encuentra subdivida en regiones enriquecidas en genes transcripcionalmente activas localizadas en la región central del núcleo, conocida como eucromatina, y regiones transcripcionalmente silenciadas ubicadas en la periferia nuclear conocida como heterocromatina (Heitz E, 1928), sugiriendo que el núcleo de los organismos eucariontes esta compartamentalizado. Esta compartamentalización del núcleo, es altamente conservada en la evolución y ha sido demostrado que juega un papel fundamental en la regulación de las diferentes funciones nucleares como el *splicing*, biogénesis del rDNA, almacenamiento de mRNAs, entre otros

(Solovei I. y Joffe B., 2010). Gracias al desarrollo de múltiples métodos de fluorescencia que han permitido la tinción individual de cromosomas, se ha establecido con claridad que los cromosomas ocupan un espacio bien definido dentro del núcleo conocido como territorio cromosomal (Cremer T y Cremer C., 2001). El arreglo espacial de estos territorios cromosomales juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes ya que su reposicionamiento es un proceso dinámico que les permite a los dominios de los territorios cromosomales tener interacciones intra e intercromosomales lo cual puede ocasionar que tengan contactos hacia subcompartimentos localizados en la periferia nuclear en donde existe una acumulación de proteínas represoras que condicionan la generación de un ambiente transcripcionalmente represivo; o bien relocalizar dominios de cromosomas a la región central, enriquecida en proteínas que activan la transcripción (Zimmer C. y Fabre E., 2011), Por lo que se ha propuesto que la relocalización de cromosomas de una región de eucromatina a heterocromatina o viceversa es otro mecanismo que puede regular la expresión de genes a través de su reposicionamiento.

Respecto a la arquitectura nuclear en *E. histolytica* y *E. invadens*, ha sido un tema poco estudiado y solo existe un trabajo del 2009 de Jhingan y cols., quienes a través de ensayos de inmunofluorescencia y utilizando un anticuerpo dirigido contra la fibrilarina, la cual es una proteína específica del nucléolo, reportaron que se localiza en la periferia nuclear de *E. invadens* y *E. histolytica*. Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado otros estudios enfocados en dilucidar si el patrón convencional de la cromatina se conserva en *E. invadens* y si éste se modifica dependiendo de la fase del parásito.

En el presente trabajo se demostró mediante los ensayos de inmunofluorescencia que en la fase de trofozoíto de *E. invadens*, la histona H4 acetilada (la cual es una marca de activación transcripcional), se encuentra distribuida en todo el núcleo, mientras que en los quistes la histona H4 acetilada se localiza en todo el núcleo excepto en la región central. Por lo que estos resultados nos sugieren que la localización de las regiones transcripcionalmente activas se modifica dependiendo de la fase del ciclo de esta parásito.

Además, al tratar de identificar la localización de otras PTMs asociadas a activación transcripcional como la H4R3me1, nuevamente esta PTM también se encontró distribuida en todo el núcleo y en la periferia nuclear en la fase de trofozoítos de *E. invadens* y en todo el núcleo excepto en la región central en el caso de los quistes. Por lo que tomando en

cuenta todos estos resultados, nos están sugiriendo que las marcas de activación transcripcional independiente de que sean acetilación de K o monometilación de R, se localizan en los mismos sitios en cada fase de este parásito.

Respecto a la búsqueda de marcas epigenéticas asociadas a represión transcripcional, se sabe que la metilación del DNA está asociada a estados de represión transcripcional y previamente se había identificado mediante ensayos de inmunofluorescencia que existía la metilación del DNA en *E. invadens* (Harony H. *et al.*, 2006); sin embargo, en varias ocasiones se intentaron realizar nuevamente estos ensayos tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens* con el empleo de al menos dos diferentes anticuerpos sin tener éxito. Por lo que entonces nos dimos a la tarea de identificar otra molécula que también estuviera asociada a la generación de estados de represión transcripcional como son las proteínas HDACs, encargadas de la remoción de los grupos acetilo de las histonas. En el caso de *E. histolytica*, existe un gen putativo para la HDAC, el cual se ha clasificado como un miembro de la clase I y ha sido denominado EhHDAC (Ramakrishnan G. *et al.*, 2004), sin embargo, su caracterización molecular y funcional no ha sido determinada aún.

En el presente trabajo al realizar el análisis *in silico* para identificar a la o las HDACs presentes en el genoma de *E. invadens*, también se encontraron dos genes que codifican para dos HDACs correspondiente a la clase I, ambas ortólogas de la HDAC3 de *H. sapiens*. Mediante ensayos de WB y utilizando un anticuerpo comercial contra la HDAC3 de humano, encontramos que esta proteína se expresa tanto en trofozoítos como en quistes de *E. invadens*. También por ensayos de IF se encontró que esta proteína se localiza únicamente en la parte central del núcleo de trofozoítos de *E. invadens*, en contraste esta marca en otros eucariontes se encuentra ubicada en todo el núcleo.

Los datos obtenidos de la localización de las marcas de activación versus la de HDAC3 en ensayos de inmunofluorescencia, nos sugieren que las marcas de activación y de represión transcripcional convergen dentro del núcleo. Este hallazgo contrasta con lo previamente reportado para otros organismos desde levadura hasta humano, así como en dos parásitos ampliamente estudiados como son *P. falciparum* y *T. brucei*, sugiriendo que el núcleo de *E. histolytica* no se encuentra compartimentalizado. Este hallazgo es interesante, ya que en el caso de *P. falciparum* ha sido reportado que el núcleo se encuentra compartimentalizado en una región central enriquecida en marcas de activación transcripcional (H3K4me3 y H4



pan -acetilada) y en una región periférica en donde se localizan los denominados centros de represión perinuclear en donde se incluyen los sitios activos de los genes *var* y clusters teloméricos así como factores que promueven la formación de heterocromatina tales como la histona desacetilasa PfSir2, la proteína PfOrc1, la histona metiltransferasa PfSET3/PfHKMT1 así como proteínas no histónicas como PfHP1 (Hernández–Rivas *et al.*, 2010). Por lo que el reposicionamiento de un cromosoma de la parte central del núcleo hacia la periferia nuclear o viceversa, puede regular la expresión de genes. Esto ha sido demostrado exclusivamente para los genes *var*, que codifican para la proteína PfEMP1 que participa en la variación antigénica de *P. falciparum* (Issar N. *et al.*, 2009; Lopez-Rubio JJ. *et al.*, 2009). Un panorama similar se ha establecido en *T. brucei* que también muestra un núcleo compartimentalizado. Esta compartimentalización está involucrada en la regulación de la expresión de genes que participan en la variación antigénica (Navarro M. *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta los resultados de inmunofluorescencia obtenidos tanto en la fase de trofozoítos como de quistes, nos estarían sugiriendo que en *E. invadens* la arquitectura nuclear podría ser inversa a lo reportado para otros eucariontes, sin embargo, no sería el único modelo en donde se reporte este tipo de arquitectura nuclear inversa ya que previamente se ha reportado que este patrón presente en las células fotorreceptoras presentes en la retina conocidas como bastoncillos en animales de vida nocturna, en donde se determinó la localización de diferentes PTMs asociadas a activación transcripcional como son la H3K4me3 en la región de la periferia nuclear, así como diferentes PTMs asociadas a represión transcripcional como son la H3K9me3 y H4K20me3 en la región central (Solovei I. *et al.*; 2009). Sin embargo, debido a que en nuestro caso únicamente identificamos una proteína asociada a represión transcripcional, para respaldar nuestra propuesta de la arquitectura nuclear inversa en *Entamoeba*, se requiere la evaluación de una mayor cantidad de marcas epigenéticas asociadas a represión transcripcional. También para relacionar la presencia de marcas epigenéticas con la regulación de la expresión de genes, sería necesario realizar ensayos de RNA – FISH acoplados a inmunofluorescencia tanto en trofozoítos como en quistes. Para lo cual se realizaría el marcaje de un gen que se sepa es transcripcionalmente activo en cada fase del parásito y si existe una co-localización del gen activo con las marcas epigenéticas de activación transcripcional nos estaría sugiriendo que las PTMs están relacionadas con la actividad transcripcional.

Otro interesante hallazgo del presente trabajo fue la identificación de una posible lámina B1 en *E. histolytica*. Las láminas nucleares juegan un papel importante en diferentes procesos nucleares como son la transcripción, la replicación del DNA, control del ciclo celular y reparación del DNA, así como en organizar dominios de eucromatina y heterocromatina (Dittmer TA y Misteli T., 2011). Durante mucho tiempo, se consideró que la lámina era una proteína exclusiva de metazoarios. Sin embargo, recientemente de manera experimental se identificó una proteína similar a lámina, designada NUP-1, en *T. brucei*. Esta proteína, con un peso molecular mayor a 400 kDa inicialmente fue identificada mediante ensayos proteómicos como uno de los principales componentes de fracción fibrilar de la membrana nuclear interna de este parásito (Rout MP y Field MC., 2001). Estructuralmente, la lámina B1 es una proteína *coiled-coil* con una región central de 17 repetidos formados por 144 aminoácidos cada uno, a diferencia de las láminas identificados en metazoarios cuyo tamaño oscila entre los 40 a 80 kDa y que poseen una estructura tripartita conformada por un dominio largo  $\alpha$  hélice con una estructura *coiled – coil* característico de estas proteínas, flanqueado por una secuencia amino globular y un dominio carboxilo terminal donde se encuentra una secuencia de localización nuclear (Dittmer TA y Misteli T., 2011). Sin embargo, a pesar de estas diferencias tanto en peso molecular como en estructura, mediante ensayos de inmunofluorescencia se determinó que se localizaba en la periferia nuclear y que co-localizaba parcialmente con los telómeros. Finalmente, mediante la generación de parásitos *knock – down* se observaron anomalías en la estructura y número de núcleos y cinetoplastos así como una desorganización de los telómeros y la desregulación de los genes VSG implicados en los mecanismos de variación antigénica que permiten al parásito escapar de la respuesta inmune del hospedero (DuBois KN. *et al.*, 2012). Posteriormente, mediante análisis *in silico* se han identificado posibles ortólogos de láminas en *E. invadens*, *Gregarina melanopli*, *Euglena gracilis*, *Giardia* y *Trichomonas*, lo que indica que la lámina no es exclusiva de los metazoarios (Kollmar M, 2015). Por lo tanto, la proteína de 78 kDa identificada en *E. histolytica* en este estudio podría ser una lámina–*like* que también podría estar implicada en regular la expresión génica, como ha sido reportado en eucariontes y en *T. brucei*. Por lo tanto, el desarrollo de parásitos *knock – out* o *knock – down* para el gen que codifica para esta proteína nos permitirían dilucidar su participación en la organización del genoma y, por lo tanto, en la regulación de la expresión génica en *E. histolytica*. Además, la implementación de otras técnicas como la Captura de Conformación Cromosómica (3C) o HiC, nos permitirían mapear las regiones de contacto entre la cromatina y esta proteína lamina – *like*.

En el caso de *E. invadens* no se identificó experimentalmente la presencia de la lámina por lo que no sabemos si esta podría estar participando en el anclaje de cromosomas circulares en este parásito. Si bien en eucariontes no se ha descrito la presencia de cromosomas circulares y su anclaje a la membrana nuclear, en el caso de bacterias que cuentan con cromosomas circulares como es el caso de *Bacillus subtilis*, se sabe que una proteína llamada RacA se acumula y se concentra cerca de un polo de la célula antes del proceso de esporulación y esto permite que haya un reposicionamiento y anclaje del origen de replicación hacia este polo de la membrana plasmática a través de la proteína DivIVA (Badrinarayanan A. *et al*; 2015). En nuestro caso, desconocemos si en *E. histolytica* o *E. invadens* exista alguna proteína similar a las identificadas en bacterias que permita el anclaje de los cromosomas circulares del parásito a la región de la periferia nuclear de manera independiente a la presencia de la lámina.

Por otra parte, en *E. histolytica* se identificaron dos distintos cuerpos nucleares como lo son el nucléolo y los *speckles*. La presencia del nucléolo en la región de la periferia nuclear en *E. histolytica* había sido previamente demostrada (Jhingan GD. *et al.*, 2009). Comparando con lo previamente reportado, en nuestro trabajo se identificaron dos patrones de localización adicionales, uno de ellos en solo un polo del núcleo y otro localizado en dos polos del núcleo. Esta dinámica de localización del nucléolo se ha demostrado que puede ser dependiente de ciclo celular. Por ejemplo, en *P. falciparum* el rDNA se localiza en un polo del núcleo durante el estadio de anillo. Sin embargo, durante la replicación el rDNA se separa en unidades individuales observándose como múltiples “focis”, demostrando que la organización del nucléolo es dependiente del ciclo celular (Mancio-Silva L. *et al.*, 2010). En el caso de *E. histolytica*, y de acuerdo con los patrones de localización observados en nuestro trabajo (figura 22 D), proponemos que el nucléolo también podría ser un compartimento altamente dinámico dependiente de ciclo celular.

En el caso de los *speckles*, son cuerpos nucleares altamente conservados, los cuales se especializan en el almacenaje de factores involucrados en el *splicing* en los sitios activos de transcripción, por lo que son observados dentro del núcleo con un patrón irregular puntiforme que varían en tamaño y forma (Spector DL y Lamond AI., 2011). Considerando que los *speckles* son estructuras altamente conservadas, es que decidimos determinar si estas estructuras se encuentran presentes en el núcleo de *E. histolytica*, ya que se sabe que en este parásito el 30% de los genes anotados en el genoma se predice que contienen

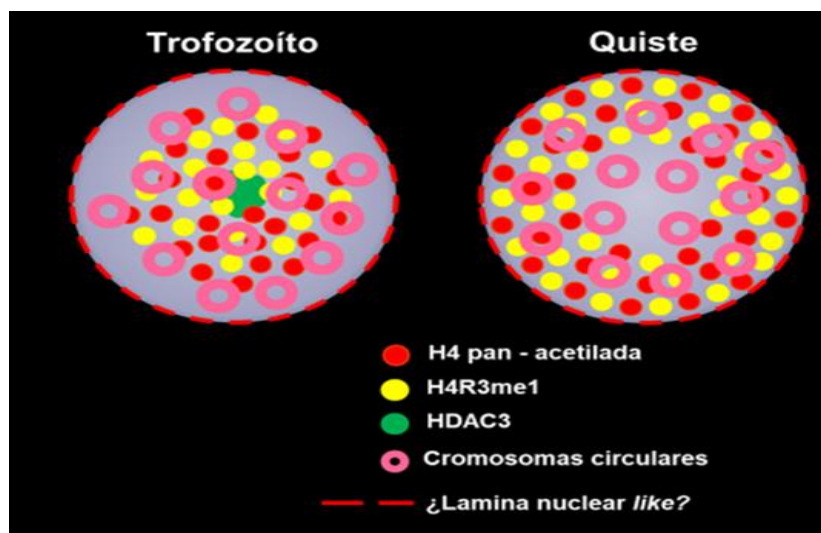
intrones (Loftus B *et al.*, 2005; Weedall GD y Hall N., 2011), muchos de ellos están flanqueados en las regiones 5' y 3' por los sitios donadores y aceptores del *splicing* (GUUUGU y UAG, respectivamente) pero las secuencias *branch point* pierden cierto grado de conservación (Wilihoeft U. *et al.*, 2001; Hon CC. *et al.*, 2013) y además recientemente se describió la existencia de algunos factores que constituyen el spliceosoma en este parásito (Valdés J. *et al.*, 2014; 2018). Por lo que en este proyecto los resultados obtenidos sugieren la existencia de este cuerpo nuclear en donde, de acuerdo con la literatura, se encontrarían los factores del *splicing* necesarios para la eliminación de los intrones en los mRNA de *E. histolytica*. Finalmente, los ensayos de co-localización entre la nucleolina y PRP6, siendo esta última una proteína precursora del procesamiento del RNA (PRP), la cual se asocia a las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) U4/U6, que conforman la subunidad grande del complejo de pre-ensamblaje del spliceosoma (DE Agafonov, *et al.*, 2016), indican que cuando PRP6 está en el interior del núcleo, no co-localiza con la nucleolina, sin embargo, cuando ambas proteínas se encuentran en la periferia o en un polo del núcleo si existe la co-localización, lo que nos está sugiriendo que las proteínas que constituyen ambos cuerpos nucleares son altamente dinámicas. Además, existen evidencias que sugieren que proteínas específicas de un organelo no membranoso pueden no solo residir en el cuerpo nuclear en donde ejercen su función, sino que también pueden viajar en el interior del núcleo y estar en otros cuerpos nucleares (Pederson T, 2000; Carmo-Fonseca M, 2002).

Con la idea en mente de que la fibrilarina así como PRP6 son proteínas que también se encuentran en *E. invadens*, pensamos que al emplear estos anticuerpos que fueron generados para estas proteínas en *E. histolytica* iba a existir una reactividad en los ensayos en *E. invadens*, sin embargo, no se pudo obtener una señal para ambas proteínas, razón por la cual no fue posible determinar la localización de estos cuerpos nucleares en trofozoítos y quistes, por lo que aún queda abierta esa pregunta respecto a la dinámica de la localización de ambos cuerpos nucleares en ambas fases de *E. invadens*.

Sabemos que el agente de importancia clínica es *E. histolytica*, sin embargo, hasta el momento el proceso de enquistamiento *in vitro* en este parásito no ha sido logrado con una alta eficiencia y esa es la razón por la cual se ha empleado a *E. invadens* para estudiar los mecanismos involucrados en este proceso. Para validar que *E. invadens* es un buen modelo de estudio y que los resultados obtenidos en este parásito (al menos en trofozoítos) pueden

ser extrapolados a *E. histolytica*, se realizaron los experimentos de WB para la identificación de PTMs así como las inmunofluorescencias en trofozoítos de *E. histolytica*, en donde se encontraron presentes las PTMs identificadas en *E. invadens*. Nuestros resultados indican que las PTMs estudiadas en *E. histolytica* tienen una localización similar en *E. invadens*. Estos resultados sugieren, por una parte, que las marcas epigenéticas y probablemente los mecanismos epigenéticos se conservan en estas dos especies de *Entamoeba* y además, que *E. invadens* es un buen modelo de estudio para los procesos que ocurran en *E. histolytica*, por lo que probablemente, esto también ocurra en la fase de quiste.

Considerando los resultados obtenidos con la arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de *E. invadens*, proponemos el siguiente modelo en donde existe una localización diferencial en las marcas de activación transcripcional entre trofozoítos y quistes, localizándose en todo el núcleo excepto en la región de la periferia en trofozoítos, mientras que en el caso de los quistes estas marcas se localizan en todo el núcleo excepto en la región central. La localización de estas marcas en los quistes de *E. invadens* presenta una arquitectura nuclear inversa que difiere de lo reportado en eucariontes, Además, en el caso de los trofozoítos, una proteína asociada a represión transcripcional como es HDAC3 se localiza en el centro del núcleo, lo que nos sugiere que no existe una compartimentalización de regiones de eucromatina y heterocromatina al menos en esta fase del parásito. Además, se sugiere la presencia de una lámina B1 – *like* cuyas funciones aún no han sido descritas en este parásito y debido a la presencia de cromosomas circulares, cabe la posibilidad de podrían existir proteínas que permitan el anclaje de este tipo de cromosomas a la periferia nuclear (Figura 43). Es decir, hasta este momento no sabemos si existen territorios cromosomales en este parásito y como estos pudieran participar en regular la expresión de genes en *E. invadens*.



**Figura 43. Modelo propuesto para la arquitectura nuclear en trofozoítos y quistes de *E. invadens*.** Existe una localización diferencial de marcas epigenéticas asociadas a actividad transcripcional, entre trofozoítos y quistes de *E. invadens*. En el caso de los trofozoítos estas marcas de activación transcripcional se encuentran distribuidas en todo el núcleo, mientras que en el caso de los quistes estas marcas epigenéticas se localizan todo el núcleo excepto en la región central. Además, en el caso de los trofozoítos, una proteína asociada a generar estados de represión transcripcional como es la HDAC3, se localizó en la región central del núcleo. Esto sugiere que la arquitectura nuclear de este parásito se encuentra invertida en comparación con lo observado en otros eucariontes en donde las regiones de eucromatina se localizan en la región central, mientras que las regiones de heterocromatina se localizan en la periferia nuclear. Por otro lado, se identificó la presencia de una proteína lámina B1 *like*, la cual pudiera jugar un papel en la organización de los cromosomas de *Entamoeba*, sin embargo, hasta la fecha se desconocen sus funciones y si esta es capaz de interactuar con cromosomas circulares, permitiendo la formación de territorios cromosomales en el núcleo de este parásito.

### 8.3 Participación de la acetilación de histonas en el enquistamiento de *E. invadens*.

Los parásitos protozoarios tienen ciclos de vida complejos que involucran diferentes fases de desarrollo en donde ocurren diversos eventos como son: modificaciones morfológicas, así como cambio en la expresión de genes con la finalidad de sobrevivir a los ambientes poco favorables. Se ha establecido que la acetilación y la desacetilación, de las histonas realizadas por las HATs y HDACs respectivamente, juegan un papel crítico en el ciclo de vida de parásitos protozoarios del género Apicomplexa como son *P. falciparum* y *T. gondii*, y en los tripanosomátidos como *T. brucei* y *Leishmania spp.* Además en todos estos parásitos, se han identificado genes que codifican para ortólogos de las HATs y HDACs, y se ha demostrado que el bloqueo de su función a través de la utilización de diferentes inhibidores farmacológicos de las HDACs como la apicidina, el TSA, y los derivados de ácidos grasos de cadena corta como butirato de sodio o ácido valpróico, conducen a una menor tasa de multiplicación *in vitro*, así como a una reducción de la expresión de genes implicados en las transiciones de estadio en *T. gondii*, *P. falciparum*, *T. brucei* y *Schistosoma mansoni* (Ouaisi M y Ouaisi A., 2006; Andrews KT *et al.*, 2012; Hansen FK *et al.*, 2014).

Como se mencionó, en el caso de *E. invadens* mediante análisis *in silico* identificamos dos genes que codifican para una HDAC de la clase I con un 87% de homología entre sí a nivel de proteína y que ambas proteínas son ortólogas de la HDAC3 de *H. sapiens*. Este resultado es interesante ya que se ha demostrado que en otro parásito protozoario como es *G. lamblia*, también cuenta con una sola HDAC de la clase I, la cual también es ortóloga a la HDAC3 de *H. sapiens* (Sonda S. et al., 2010). Esto nos indica la alta conservación de esta proteína en parásitos protozoarios y sugiere que probablemente en los parásitos que divergieron más tempranamente, la existencia de una HDAC de la clase I sería suficiente para desacetilar las histonas en ambos parásitos, lo cual de comprobarse contrastaría con lo que ha sido reportado para otros eucariontes donde existe más de una HDAC de la clase I.

En el caso de *E. invadens*, existen evidencias experimentales que demuestran que al inducir el enquistamiento en presencia de ácidos grasos de cadena corta como son: acetato, propionato y butirato (inhibidores de HDACs), este proceso no se lleva a cabo, lo que sugiere que la desacetilación es un mecanismo que participa en regular el enquistamiento (Byers J. et al., 2005).

Una vez que habíamos determinado que la histona H4 de *E. invadens* era acetilada en varios residuos y para averiguar si de manera similar a lo encontrado en *G. lamblia* en donde la desacetilación de histonas participaba en el enquistamiento, se utilizó un inhibidor de las HDACs que ha sido ampliamente empleado como es la TSA, el cual se sabe inhibe la actividad de las HDACs de la clase I y II al unirse irreversiblemente con algunos aminoácidos del sitio catalítico (ácido aspártico/histidina), así como con el Zinc, que es el cofactor requerido para realizar la desacetilación de su sustrato, bloqueando de esta manera la actividad catalítica de las HDACs del tipo I y II (Finnin MS. et al., 1999; Zhang L. et al., 2018).

En este trabajo mediante *docking* molecular se observó que la TSA interactúa con ambas EihDAC3 de manera similar a lo que ha sido observado para otras HDACs, lo que nos estaría sugiriendo que el empleo de TSA permitiría bloquear la actividad de EihDAC3 y de esta manera conocer el papel de la acetilación en el enquistamiento de *E. invadens*. Al realizar los ensayos de enquistamiento durante 24 h en presencia o ausencia de TSA el resultado nos indicó que existía una drástica disminución en el porcentaje de

enquistamiento en las células tratadas con TSA en comparación con las que no contenían TSA. Además, se verificó mediante ensayos de qRT – PCR que algunos genes involucrados en la vía de la síntesis de quitina, así como en la formación de la pared del quiste se encuentran disminuidos en las células enquistadas en presencia de TSA, lo que nos confirma el hecho de que existe una desregulación de genes que a su vez estarían probablemente regulados por los estados de acetilación y desacetilación de las histonas.

Si bien, el hecho de que EiHDAC3 es la única HDAC de la clase I identificada en este parásito, el empleo de un inhibidor para esta clase de proteína como es la TSA nos estaría sugiriendo que hay un bloqueo en la actividad de EiHDAC3 y que esto impacta en el enquistamiento. Sin embargo, es de suma importancia corroborar que el efecto esté dado por la inhibición específica de esta proteína, por lo que para complementar y reforzar nuestros hallazgos es necesario realizar ensayos de actividad específicos para EiHDAC3 en presencia de TSA en donde se esperaría encontrar disminuida su actividad o bien, realizar el silenciamiento de EiHDAC3 en trofozoítos de *E. invadens* mediante el uso de siRNAs, la posterior inducción del enquistamiento y demostrar que ocurre el mismo fenómeno que cuando se emplea la TSA, lo cual nos diría con toda certeza que se debe a la acción de la EiHDAC3.

Otra manera en la que se podría confirmar que la disminución en el enquistamiento se debe a la inhibición de la actividad de EiHDAC3 es el empleo de la droga FR235222, la cual se demostró que en *T. gondii* que bloquea a HDAC3 y esto impacta en la diferenciación de taquizoito (fase replicativa) a bradizoito (fase no replicativa) (Bougdour A. *et al.*, 2009) mientras que esta misma droga en *G. lamblia* también bloquea específicamente la actividad de HDAC3 y esto ocasiona un menor porcentaje de enquistamiento de este parásito lo cual sugiere que HDAC3 es un regulador central en el control de la expresión de genes y la conversión de estadio (Sonda S. *et al.*, 2010), Además, en este parásito, al ser la HDAC3 la única HDAC de la clase I identificada, estos hallazgos refuerzan la importancia de esta desacetilasa en un proceso tan importante para *G. lamblia* como lo es el enquistamiento y ahora, de acuerdo a nuestros hallazgos, también en el enquistamiento de *E. invadens*.

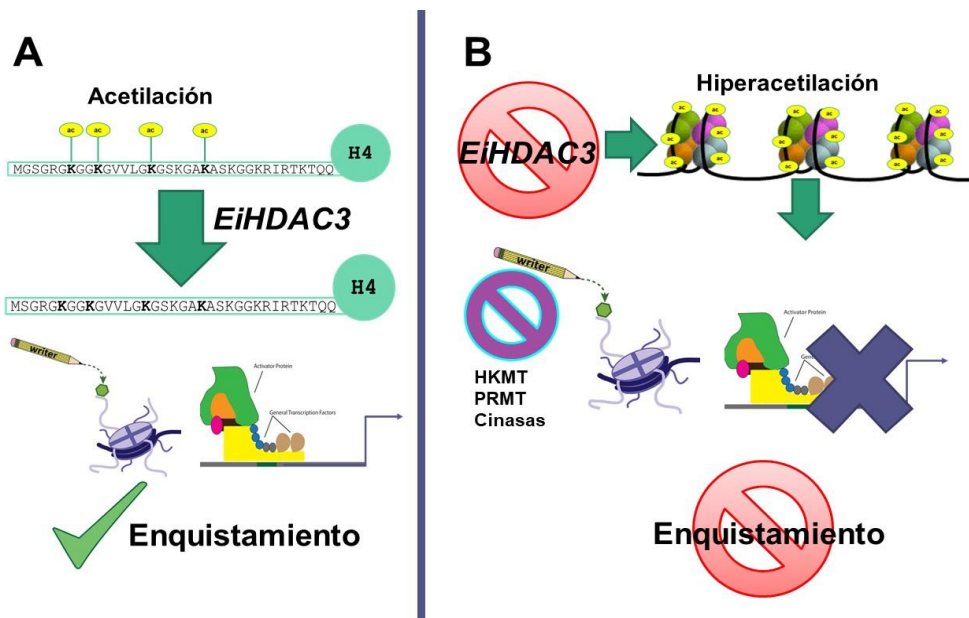
Considerando los hallazgos respecto al posible papel de EiHDAC3 en la regulación del enquistamiento, esta proteína se vuelve una molécula blanco para el bloqueo de la transmisión de la enfermedad, ya que si se identifica o se diseña *in silico* alguna molécula



que sea capaz de unirse a una región exclusiva de EiHDAC3 como podría ser el extremo COOH que de acuerdo al alineamiento a nivel de proteína es la región en la que difiere más de la HDAC3 de humano, presentando una identidad de 30%. Esto podría bloquear en el enquistamiento y como consecuencia, esto impactaría en la transmisión de la enfermedad, lo que permitirá el desarrollo de una epidroga específica para este parásito.

Tomando en cuenta los resultados respecto al papel de la acetilación en el enquistamiento de *E. invadens*, proponemos el siguiente modelo en donde la histona H4 de este parásito se encuentra acetilada en los residuos de K5, K8, K12 y K16. Estas PTMs pudieran ser eliminadas, probablemente por EiHDAC3

, lo que ocasiona que estos residuos se encuentren disponibles para la adición de otras PTMs o el acceso de factores de transcripción que permiten el encendido de genes implicados en el enquistamiento. Sin embargo, cuando existe un bloqueo de la actividad de las HDACs de la clase I (probablemente EiHDAC3) mediante el uso de la TSA, se generan estados de hiperacetilación que conllevan a que estos residuos no estén accesibles para ser modificados por proteínas escritoras y a su vez se bloquee el acceso de factores de transcripción que sean necesarios para el encendido de genes implicados en el proceso de enquistamiento de *E. invadens* (Figura 44).



**Figura 44. Modelo propuesto para el papel de la acetilación en el enquistamiento de *E. invadens*.** A) La histona H4 en *E. invadens* se encuentra acetilada en las K5, K8, K12 y K16. Estas PTMs son eliminadas por la EiHDAC3 dejando estos residuos accesibles a otras PTMs así como a factores de transcripción que permiten el encendido de genes implicados en el enquistamiento. B) El bloqueo de la actividad de EiHDAC3 mediante el uso de la TSA genera estados de hiperacetilación, lo cual conlleva a que estos residuos no estén accesibles para ser modificados por proteínas escritoras y a su vez se bloquee el acceso de factores de transcripción que sean necesarios para el encendido de genes implicados en el proceso de enquistamiento de *E. invadens*.

#### **8.4 Papel de las sirtuinas en el enquistamiento de *E. invadens*.**

Las HDACs de la clase III o sirtuinas, son proteínas que regulan los estados de acetilación tanto de histonas como de sustratos no histónicos, además que se caracterizan por ser sensores del metabolismo ya que esta condición favorece su actividad catalítica.

Respecto al papel de estas proteínas en *Entamoeba* se sabe muy poco; únicamente ha sido caracterizada una sirtuina en *E. histolytica* denominada *EhSir2a*, la cual se demostró que es la responsable de la acetilación de tubulina, sin embargo, sus posibles funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo no han sido aún caracterizadas (Dam S. y Lohia A., 2010).

En el caso de *E. invadens*, en el presente trabajo identificamos y confirmamos la expresión de 5 genes que podrían codificar para estas proteínas y además demostramos que estos genes tienen diferentes niveles de expresión a lo largo del enquistamiento. De manera particular, se confirmó el aumento de la expresión del gen que denominamos *EiSir2* durante el enquistamiento, lo cual previamente había sido reportado por el grupo del Dr. Tomoyoshi Nozaki y de manera adicional, el gen denominado *EiSir4* también presenta un aumento en sus niveles de expresión del mRNA a las 24 y 48 h post – enquistamiento. Hasta este momento, únicamente describimos estos diferentes perfiles de expresión, pero queda pendiente estudiar cuál es el papel de las sirtuinas en el enquistamiento, lo cual podría responderse mediante la generación de parásitos *knock – down* y evaluar su impacto en el enquistamiento, lo cual nos estaría demostrando que las sirtuinas regulan genes que participan en el enquistamiento.

## 9. CONCLUSIONES

- ✓ Se identificaron por primera vez PTMs presentes en la histona H4 de trofozoítos de *E. histolytica* así como en trofozoítos y quistes de *E. invadens* como son la acetilación de los residuos de K5, K8, K12 y K16 y la monometilación de la R3, todas estas asociadas a activación transcripcional.
- ✓ Por primera ocasión se determinó que la localización de estas PTMs asociadas a activación transcripcional en el núcleo de trofozoitos y quistes de *E. invadens* es diferente entre ambas fases.
- ✓ En el caso de los quistes de *E. invadens*, su localización difiere de lo reportado en eucariontes, ya que se ubican en la periferia y no en la parte central del núcleo, lo que sugiere la presencia de una arquitectura nuclear inversa.
- ✓ En trofozoítos de *E. histolytica* se identificó la presencia y localización de una lámina B1 – *like* así como dos cuerpos nucleares: los *speckles* y el nucléolo, implicados en los procesos de *splicing* y síntesis del rRNA, respectivamente, lo que probablemente sugiere que la lámina B1 participe en la regulación de la expresión de genes.
- ✓ *E. invadens* cuenta con una sola HDAC de la clase I, ortóloga de la HDAC3 de *H. sapiens*.
- ✓ La hiperacetilación de la histona H4 ocasionada por el uso de la TSA, impacta negativamente en el enquistamiento de *E. invadens* al desregular de manera directa o indirecta a genes implicados en la formación de la pared del quiste y en la vía de la síntesis de la quitina, probablemente a través de EiHDAC3.
- ✓ Existen dos sirtuinas (*EiSir2* y *EiSir4*) que aumentan sus niveles de expresión durante el enquistamiento.

## 10. PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar el papel funcional de cada una de las PTMs identificadas en la histona H4 mediante ensayos de ChIP, lo que nos permitiría determinar si estas PTMs se encuentran presentes en las regiones promotoras de genes activos en trofozoítos y/o quistes, y de esta forma averiguar si estas PTMs tienen un impacto en regular la expresión de genes.
- ✓ Realizar ensayos de RNA-FISH acoplados a inmunofluorescencia tanto en trofozoítos como en quistes marcando genes activos en cada fase del parásito, lo que permitirá relacionar la presencia de marcas epigenéticas con la regulación de la expresión de genes.
- ✓ Implementar tanto en *E. histolytica* como en *E. invadens* algunas técnicas como la Captura de Conformación Cromosómica (3C) o HiC, nos permitirían mapear las regiones de contacto entre la cromatina y la lámina – *like*, para dilucidar su participación en la organización del genoma y, por lo tanto, en la regulación de la expresión génica
- ✓ Estudiar el papel de la proteína MYST mediante la generación de parásitos *knock-down* para establecer si esta es la enzima responsable de la acetilación de la histona H4 tanto en *E. histolytica* como en *E. invadens* y si esto impacta en el enquistamiento.
- ✓ Confirmar que el bloqueo de EihDAC3 impacta en el enquistamiento mediante dos estrategias: 1. a través del silenciamiento de este gen en *E. invadens* mediante el uso de siRNA, o 2. mediante el empleo de la droga FR235222, la cual inhibe específicamente la actividad de HDAC3.
- ✓ Estudiar el papel de las sirtuinas en el enquistamiento mediante la generación de parásitos *knock-down*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Agafonov DE, Kastner B, Dybkov O, Hofele RV, Liu WT, Urlaub H, Lührmann R, Stark H. (2016). Molecular architecture of the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *Science*. 351(6280):1416-20.

Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García R, Lacleste JP, Morales-Montor J. (2011). Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends Parasitol*. 27(10):450-8.

Aguilar-Díaz H, Díaz-Gallardo M, Lacleste JP, Carrero JC. (2010). *In vitro* induction of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures from trophozoites. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(2):e607.

Ali IK, Haque R, Siddique A, Kabir M, Sherman NE, Gray SA, Cangelosi GA, Petri WA Jr. (2012). Proteomic analysis of the cyst stage of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(5):1643.

Andrews KT, Haque A, Jones MK. (2012). HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunology and Cell Biology*. 90(1):66-77.

Annunziato T. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education*. 1(1):26

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22(2):195-201.

Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruíz-Herrera J. (1980). Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol*. 66(5):735-41.

Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A. (1982). Location on chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J Parasitol*. 68(2):253-8.

Avron B, Stolarsky T, Chayen A, Mirelman D. (1986). Encystation of *Entamoeba invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *J Protozool*. 33(4):522-5.

Badrinarayanan A, Le TB, Laub MT. (2015). Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 31:171-99.

Bailey GB, Rengypian S. (1980). Osmotic stress as a factor controlling encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch Invest Med (Mex)*. 11(1 Suppl):11-6.

Banerjee S, Fisher O, Lohia A, Ankri S. (2005). *Entamoeba histolytica* DNA methyltransferase (EhMeth) is a nuclear matrix protein that binds EhMRS2, a DNA that includes a scaffold/matrix attachment region (S/MAR). *Mol Biochem Parasitol*. 139(1):91-7.

Bannister AJ, Kouzarides T. (2004). Histone methylation: recognizing the methyl mark. *Methods Enzymol*. 376:269-288.

Bannister AJ, Kouzarides T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature*. 436:1103-1106.

- Bannister AJ, Kouzarides T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21:381-395.
- Baptista T, Graça I, Sousa EJ, Oliveira AI, Costa NR, Costa-Pinheiro P, Amado F, Henrique R, Jerónimo C. (2013). Regulation of histone H2A.Z expression is mediated by sirtuin 1 in prostate cancer. *Oncotarget.* 4(10):1673-85.
- Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, Li W, Chua KF. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature.* 487(7405):114-8.
- Barrón-González MP, Villarreal-Treviño L, Reséndez-Pérez D, Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. (2008). *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures *in vitro* induction. *Exp Parasitol.* 118(4):600-3.
- Bernes S, Siman-Tov R, Ankri S. (2005). Epigenetic and classical activation of *Entamoeba histolytica* heat shock protein 100 (EHsp100) expression. *FEBS Lett.* 579(28):6395-402.
- Bernstein E, Hake SB. (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol.* 84(4):505-17.
- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol.* 30(4):401-10.
- Biel M, Wascholowski V, Giannis A. (2005). Epigenetics an epicenter of gene regulation: histones and histone modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44:3186-3216.
- Binder M, Ortner S, Plaimauer B, Födinger M, Wiedermann G, Scheiner O, Duchêne M. (1995). Sequence and organization of an unusual histone H4 gene in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 71(2):243-7.
- Blanc RS, Richard S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell.* 65(1):8-24.
- Bock CT., Franz S., Zentgraf H., Sommerville J. (2007). Electron Microscopy of Biomolecules. Proteins. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.* Chapter 3. 104–128.
- Borbolla-Vázquez J, Orozco E, Betanzos A, Rodríguez MA. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasit Vectors.* 8:219.
- Borbolla-Vázquez J, Orozco E, Medina-Gómez C, Martínez-Higuera A, Javier-Reyna R, Chávez B, Betanzos A, Rodríguez MA. (2016). Identification and functional characterization of lysine methyltransferases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* 101(2):351-65.
- Bosch-Presegué L, Vaquero A. (2014). Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene.* 33(29):3764-75.

Bosch-Presegué L, Vaquero A. (2015). Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J.* 282(9):1745-67.

Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, Ortet P, Bastien O, Bouillon A, Barale JC, Pelloux H, Ménard R, Hakimi MA. (2009). Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med.* 206(4):953-66.

Buckstein MH, He J, Rubin H. (2008). Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 190(2):718-26.

Byers J, Eichinger D. (2008). Acetylation of the *Entamoeba* histone H4 N-terminal domain is influenced by short-chain fatty acids that enter trophozoites in a pH-dependent manner. *Int J Parasitol.* 38(1):57-64.

Byers J, Faigle W, Eichinger D. (2005). Colonic short-chain fatty acids inhibit encystation of *Entamoeba invadens*. *Cell Microbiol.* 7(2):269-79.

Campos JM, Monroy V, Villalba J. (2011). *Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito. *Enf Inf Microbiol.* 31(2): 63-70.

Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Galindo JM, Said-Fernández S. (2000). Mg, Mn, and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cyst-like structures resistant to sodium dodecyl sulfate. *Arch Med Res.* 31(2):162-8.

Carmo-Fonseca M, Platani M, Swedlow JR. (2002). Macromolecular mobility inside the cell nucleus. *Trends Cell Biol.* 12(11):491-5.

Chatterjee A, Ghosh SK, Jang K, Bullitt E, Moore L, Robbins PW, Samuelson J. (2009). Evidence for a "wattle and daub" model of the cyst wall of *Entamoeba*. *PLoS Pathog.* 5(7):e1000498.

Chávez-Munguía B, Castañón G, Hernández-Ramírez V, González-Lázaro M, Talamás-Rohana P, Martínez-Palomo A. (2012b). *Entamoeba histolytica* electrondense granules secretion in vitro and in vivo: ultrastructural study. *Microsc Res Tech.* 75(2):189-96.

Chávez-Munguía B, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A. (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res.* 31(4 Suppl):S165-7.

Chávez-Munguía B, González-Robles A. (2013). *Entamoeba histolytica*: la estructura interna de un destructor por naturaleza. *Ciencia: Revista de la Academia Mexicana de Ciencias.* 64(2): 42 – 49.

Chávez-Munguía B, Martínez-Palomo A. (2011). High-resolution electron microscopical study of cyst walls of *Entamoeba* spp. *J Eukaryot Microbiol.* 58(6):480-6.

Chávez-Munguía B, Salazar-Villatoro L, Lagunes-Guillén A, Omaña-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. (2013). *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol Res.* 112(3):1125-30.

Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P, Castañón G, Salazar-Villatoro L, Hernández-Ramírez V, Martínez-Palomo A. (2012a). Differences in cap formation between invasive *Entamoeba histolytica* and non-invasive *Entamoeba dispar*. *Parasitol Res.* 111(1):215-21.

Chávez-Munguía B, Talamás-Rohana P, Ríos A, González-Lázaro M, Martínez-Palomo A. (2008). *Entamoeba histolytica*: fibrillar aggregates in dividing trophozoites. *Exp Parasitol.* 118(2):280-4.

Chen QY, Costa M, Sun H. (2015). Structure and function of histone acetyltransferase MOF. *AIMS Biophys.* 2(4):555-569.

Coppi A, Merali S, Eichinger D. (2002). The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *J Biol Chem.* 277(10):8083-90.

Cremer T, Cremer C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2(4):292-301.

Dalmasso MC, Sullivan WJ Jr, Angel SO. (2011). Canonical and variant histones of protozoan parasites. *Front Biosci.* 16:2086-105.

Dam S, Lohia A. (2010). *Entamoeba histolytica* sirtuin EhSir2a deacetylates tubulin and regulates the number of microtubular assemblies during the cell cycle. *Cell Microbiol.* 12(7):1002-14.

Das S, Van Dellen KL, Bulik D, Magnelli P, Cui J, Head J, Robbins PW, Samuelson J. (2006). The cyst wall of *Entamoeba invadens* contains chitosan (deacetylated chitin). *Mol Biochem Parasitol.* 148(1):86-92.

De Cádiz AE, Jeelani G, Nakada-Tsukui K, Caler E, Nozaki T. (2013). Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. *PLoS One.* 8(9):e74840.

de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA. (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays.* 27:164-175.

de la Vega H, Specht CA, Semino CE, Robbins PW, Eichinger D, Caplivski D, Ghosh S, Samuelson J. (1997) Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol Biochem Parasitol.* 85(2):139-47.

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 370(Pt 3):737-49.

Deckert J, Struhl K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol.* 21(8):2726-35.

Dey T, Basu R, Ghosh SK. (2009). *Entamoeba invadens*: cloning and molecular characterization of chitinases. *Exp Parasitol.* 123(3):244-9.

Di Lorenzo A, Bedford MT. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett.* 585(13):2024-31.



- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 72(4):431-2.
- Dittmer TA, Misteli T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biol.* 12(5):222.
- DuBois KN, Alsford S, Holden JM, Buisson J, Swiderski M, Bart JM, Ratushny AV, Wan Y, Bastin P, Barry JD, Navarro M, Horn D, Aitchison JD, Rout MP, Field MC. (2012). NUP-1 Is a large coiled-coil nucleoskeletal protein in trypanosomes with lamin-like functions. *PLoS Biol.* 10(3):e1001287.
- Ehrenkaufer GM, Eichinger DJ, Singh U. (2007). Trichostatin A effects on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics.* 8:216.
- Eichinger D. (1997) Encystation of *Entamoeba* parasites. *Bioessays.* 19(7):633-9.
- Eichinger D. (2001a). Encystation in parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 4(4):421-6.
- Eichinger D. (2001b) A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 48(1):17-21.
- Falkenberg KJ, Johnstone RW. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 13(9):673-91.
- Fedorova E, Zink D. (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1783(11):2174-84.
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature.* 401(6749):188-93.
- Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S. (2004). Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res.* 32(1):287-97.
- Fisk JC, Read LK. (2011). Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell.* 10(8):1013-22.
- Foda BM, Singh U. (2015). Dimethylated H3K27 Is a Repressive Epigenetic Histone Mark in the Protist *Entamoeba histolytica* and Is Significantly Enriched in Genes Silenced via the RNAi Pathway. *J Biol Chem.* 290(34):21114-30.
- Födinger M, Ortner S, Plaimauer B, Wiedermann G, Scheiner O, Duchêne M. (1992). cDNA cloning of *Entamoeba histolytica* histone H3. *Arch Med Res.* 23(2):19-21.
- Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 20(9):1075-80.
- Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, Nehrbass U, Wellems TE, Scherf A. (2000). Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature.* 407(6807):1018-22.

Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, Rojas-Meza AP, Mâncio-Silva L, Leal-Silvestre RJ, Gontijo AM, Shorte S, Scherf A. (2005). Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell*. 121(1):25-36.

Frisardi M, Ghosh SK, Field J, Van Dellen K, Rogers R, Robbins P, Samuelson J. (2000). The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect Immun*. 68(7):4217-24.

Frye RA. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 273(2):793-8.

García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocádiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, González-Robles A, Orozco E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol*. 33(3):556-68.

Gardner KE, Allis CD, Strahl BD. (2011). Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol*. 409:36-46.

Ghosh SK, Van Dellen KL, Chatterjee A, Dey T, Haque R, Robbins PW, Samuelson J. (2010). The Jacob2 lectin of the *Entamoeba histolytica* cyst wall binds chitin and is polymorphic. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(7):e750.

Glatt S, Alfieri C, Muller CW. (2011). Recognizing and remodeling the nucleosome. *Curr Opin Struct Biol*. 21:335-341.

Gómez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA. (2010). Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010:726045

Grant PA. A tale of histone modifications. (2001). *Genome Biol*. 2(4).

Guex N, Peitsch MC. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18(15):2714-23.

Hansen FK, Sumanadasa SD, Stenzel K, Duffy S, Meister S, Marek L, Schmetter R, Kuna K, Hamacher A, Mordmüller B, Kassack MU, Winzeler EA, Avery VM, Andrews KT, Kurz T. (2014). Discovery of HDAC inhibitors with potent activity against multiple malaria parasite life cycle stages. *Eur J Med Chem*. 82:204-13.

Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. (2003). Amebiasis. *N Engl J Med*. 348(16):1565-73.

Harony H, Bernes S, Siman-Tov R, Ankri S. (2006). DNA methylation and targeting of LINE retrotransposons in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol*. 147(1):55-63.

Hassig CA, Schreiber SL. (1997). Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol*. 1:300-308.

Heitz E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik*. 69:762–818.

Henikoff S, Smith MM. (2015). Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(1):a019364.

Hernández-Rivas R, Herrera-Solorio AM, Sierra-Miranda M, Delgadillo DM, Vargas M. (2013). Impact of chromosome ends on the biology and virulence of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 187(2):121-8.

Hernández-Rivas R, Ramírez C, Guillén N, Vargas M. (2000). DNA cloning of the *Entamoeba histolytica* PRP6 gene: a putative U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP). *Arch Med Res.* 31(4 Suppl):S294-5.

Hon CC, Weber C, Sismeiro O, Proux C, Koutero M, Deloger M, Das S, Agrahari M, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, Bhattacharya A, Guillen N. (2013). Quantification of stochastic noise of splicing and polyadenylation in *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res.* 41(3):1936-52.

Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(4):225-238.

Huang H, Sabari BR, Garcia BA, Allis CD, Zhao Y. (2014). SnapShot: histone modifications. *Cell.* 159(2):458-458.e1.

Huguenin M, Bracha R, Chookajorn T, Mirelman D. (2010). Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*: insight into histone and chromatin modifications. *Parasitology.* 137(4):619-27.

Huston CD, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA. (2000). Role of host caspases in cell killing by *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 31(4 Suppl):S216-7.

Isakov E, Siman-Tov R, Weber C, Guillen N, Ankri S. (2008). Trichostatin A regulates peroxiredoxin expression and virulence of the parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 158(1):82-94.

Issar N, Ralph SA, Mancio-Silva L, Keeling C, Scherf A. (2009). Differential sub-nuclear localisation of repressive and activating histone methyl modifications in *P. falciparum*. *Microbes Infect.* 11(3):403-7.

Jahan S, Davie JR. (2015). Protein arginine methyltransferases (PRMTs): role in chromatin organization. *Adv Biol Regul.* 57:173-84.

Jeelani G, Sato D, Husain A, Escueta-de Cadiz A, Sugimoto M, Soga T, Suematsu M, Nozaki T. (2012). Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba invadens* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS One.* 7(5):e37740.

Jhingan GD, Panigrahi SK, Bhattacharya A, Bhattacharya S. (2009). The nucleolus in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* is located at the nuclear periphery. *Mol Biochem Parasitol.* 167(1):72-80.

Jorgensen S, Schotta G, Sorensen CS. (2013). Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 41(5):2797-806.

- Kalverda B, Roling MD, Fornerod M. (2008). Chromatin organization in relation to the nuclear periphery. *FEBS Lett.* 582:2017-2022.
- Kawahara T, Siegel TN, Ingram AK, Alsford S, Cross GA, Horn D. (2008). Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol Microbiol.* 69(4):1054-68.
- Kollmar M. (2015). Polyphyly of nuclear lamin genes indicates an early eukaryotic origin of the metazoan-type intermediate filament proteins. *Sci Rep.* 5:10652.
- Kouzarides T. (2007). Histone-modifying enzymes. *Cell.* 131:822
- Kumar D, Rajanala K, Minocha N, Saha S. (2012). Histone H4 lysine 14 acetylation in *Leishmania donovani* is mediated by the MYST-family protein HAT4. *Microbiology.* 158(Pt 2):328-37.
- Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature.* 383(6597):269-72.
- Kuo YM, Andrews AJ. (2013). Quantitating the specificity and selectivity of Gcn5-mediated acetylation of histone H3. *PLoS One.* 8(2):e54896.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 8(2):104-15.
- Lavi T, Isakov E, Harony H, Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S. (2006). Sensing DNA methylation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* 62(5):1373-86.
- Lavi T, Siman-Tov R, Ankri S. (2008). EhMLBP is an essential constituent of the *Entamoeba histolytica* epigenetic machinery and a potential drug target. *Mol Microbiol.* 69(1):55-66.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods.* 25(4):402-8.
- Loftus B., Anderson I., Davies R., Alsmark C., Samuelson J., *et al.* (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* 433(7028):865-8.
- Lopez-Rubio JJ, Gontijo AM, Nunes MC, Issar N, Hernandez Rivas R, Scherf A. (2007). 5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Mol Microbiol.* 66(6):1296-305.
- Lopez-Rubio JJ, Mancio-Silva L, Scherf A. (2009). Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe.* 5(2):179-90.

- Lowell JE, Kaiser F, Janzen CJ, Cross GA. (2005). Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*. 118(Pt 24):5721-30.
- Lu L, Li L, Lv X, Wu XS, Liu DP, Liang CC. (2011). Modulations of hMOF autoacetylation by SIRT1 regulate hMOF recruitment and activities on the chromatin. *Cell Res*. 21(8):1182-95.
- Luger K. (2001). Nucleosomes: Structure and function. *Encyclopedia of Life Sciences Nature*.
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. (2006). Effect of artificial gastrointestinal fluids on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*. 98(5):443-6.
- Mancio-Silva L, Zhang Q, Scheidig-Benatar C, Scherf A. (2010). Clustering of dispersed ribosomal DNA and its role in gene regulation and chromosome-end associations in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(34):15117-22.
- Mann BJ. (2002). Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Int Rev Cytol*. 216:59-80.
- Mao YS, Zhang B, Spector DL. (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet*. 27(8):295-306.
- Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A, Gorbunova V. (2011). SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*. 332(6036):1443-6.
- Marmorstein R, Zhou MM. (2014). Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6(7):a018762.
- Mazzuco A, Benchimol M, De Souza W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron*. 28(3):241-7.
- McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, Guan S, Shi X, Gozani O, Burlingame AL, Bohr VA, Chua KF. (2009). SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging*. 1(1):109-21.
- Meza I, Talamás-Rohana P, Vargas MA. (2006). The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res*. 37(2):234-43.
- Miao J, Fan Q, Cui L, Li X, Wang H, Ning G, Reese JC, Cui L. (2010). The MYST family histone acetyltransferase regulates gene expression and cell cycle in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 78(4):883-902.
- Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. 452(7186):492-6.

- Mitra BN, Pradel G, Frevert U, Eichinger D. (2010). Compounds of the upper gastrointestinal tract induce rapid and efficient excystation of *Entamoeba invadens*. *Int J Parasitol.* 40(6):751-60.
- Mongelard F, Bouvet P. (2007). Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* 17(2):80-6.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell.* 116(4):551-63.
- Navarro M, Peñate X, Landeira D. (2007). Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* 15(6):263-70.
- New M, Olzscha H, La Thangue NB. (2012). HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol.* 6(6):637-56.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell.* 11(2):437-44.
- Olivos-García A, Saavedra E, Nequiz-Avedaño M, Pérez-Tamayo R. (2011). Amibiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM.* 54(2):10–20.
- Ouaissi M, Ouaissi A. (2006). Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *J Biomed Biotechnol.* (2):13474.
- Pederson T. (2000). Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nat Cell Biol.* 2(5):E73-4.
- Petri WA Jr, Mann BJ. (1993). Molecular mechanisms of invasion by *Entamoeba histolytica*. *Semin Cell Biol.* 4(5):305-13.
- Petter M, Lee CC, Byrne TJ, Boysen KE, Volz J, Ralph SA, Cowman AF, Brown GV, Duffy MF. (2011). Expression of *P. falciparum* var genes involves exchange of the histone variant H2A.Z at the promoter. *PLoS Pathog.* 7(2):e1001292.
- Petter M, Selvarajah SA, Lee CC, Chin WH, Gupta AP, Bozdech Z, Brown GV, Duffy MF. (2013). H2A.Z and H2B.Z double-variant nucleosomes define intergenic regions and dynamically occupy var gene promoters in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 87(6):1167-82.
- Ralston KS, Petri WA Jr. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 27(6):254-63.
- Ramakrishnan G, Gilchrist CA, Musa H, Torok MS, Grant PA, Mann BJ, Petri WA Jr. (2004). Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 138(2):205-16.
- Rendón-Gandarilla FJ, Álvarez-Hernández V, Castañeda-Ortiz EJ, Cárdenas-Hernández H, Cárdenas-Guerra RE, Valdés J, Betanzos A, Chávez-Munguía B, Lagunes-Guillen A,

- Orozco E, López-Canovas L, Azuara-Liceaga E. (2018). Telomeric Repeat-Binding Factor Homologs in *Entamoeba histolytica*: New Clues for Telomeric Research. *Front Cell Infect Microbiol.* 8:341.
- Romero-Cabello R., Becerril-Flores MA. (2004). Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad. Capítulo 4 Amibiasis. México, D.F. 19 – 26.
- Rosales-Encina JL, Meza I, López-De-León A, Talamás-Rohana P, Rojkind M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* 156(5):790-7.
- Rothbart SB, Strahl BD. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta.* S1874-9399(14)00052-2.
- Rout MP, Field MC. (2001). Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. *J Biol Chem.* 276(41):38261-71.
- Said-Fernández S, Campos-Góngora E, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez HG, Vargas-Villarreal J, Viader-Salvadó JM. (2001). Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup> stimulate *Entamoeba histolytica* to produce chitin-like material. *J Parasitol.* 87(4):919-23.
- Saksouk N, Bhatti MM, Kieffer S, Smith AT, Musset K, Garin J, Sullivan WJ Jr, Cesbron-Delauw MF, Hakimi MA. (2005). Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol.* 25(23):10301-14.
- Salah Ud-Din AI, Tikhomirova A, Roujeinikova A. (2016). Structure and Functional Diversity of GCN5-Related N-Acetyltransferases (GNAT). *Int J Mol Sci.* 17(7).
- Samanta SK, Ghosh SK. (2012). The chitin biosynthesis pathway in *Entamoeba* and the role of glucosamine-6-P isomerase by RNA interference. *Mol Biochem Parasitol.* 186(1):60-8.
- Samuelson J., Robbins P. (2011). A simple fibril and lectin model for cyst walls of *Entamoeba* and perhaps *Giardia*. *Trends Parasitol.* 27(1):17-22.
- Sánchez L, Enea V, Eichinger D. (1994). Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol.* 67(1):125-35.
- Sapountzi V, Côté J. (2011). MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci.* 68(7):1147-56.
- Schneider R, Grosschedl R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21(23):3027-43.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18(11):1251-62.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3381-5.

Segovia-Gamboa NC, Chávez-Munguía B, Medina-Flores Y, Cázares-Raga FE, Hernández-Ramírez VI, Martínez-Palomo A, Talamás-Rohana P. (2010). *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. *Exp Parasitol.* 125(2):63-9.

Seto E, Yoshida M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(4):a018713.

Shore D. (2000). The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14030-14032.

Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, Wang X, Dewell S, Cross GA. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* 23(9):1063-76.

Siegel TN, Kawahara T, Degrasse JA, Janzen CJ, Horn D, Cross GA. (2008). Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* 67(4):762-71.

SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales Julio, 2012.

[https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/infecciosas-intestinales\\_-junio12.pdf](https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/infecciosas-intestinales_-junio12.pdf)

Singh U, Ehrenkaufer GM. (2009). Recent insights into *Entamoeba* development: identification of transcriptional networks associated with stage conversion. *Int J Parasitol.* 39(1):41-7.

Smith AT, Tucker-Samaras SD, Fairlamb AH, Sullivan WJ Jr. (2005). MYST family histone acetyltransferases in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* 4(12):2057-65.

Solis CF, Santi-Rocca J, Perdomo D, Weber C, Guillén N. (2009). Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate *Entamoeba histolytica* gene expression. *PLoS One.* 4(12):e8424.

Solovei I, Joffe B. (2010). Inverted nuclear architecture and its development during differentiation of mouse rod photoreceptor cells: a new model to study nuclear architecture. *Genetika.* 46(9):1159-63.

Solovei I, Kreysing M, Lanctôt C, Kösem S, Peichl L, Cremer T, Guck J, Joffe B. (2009). Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. *Cell.* 137(2):356-68.

Sonda S, Morf L, Bottova I, Baetschmann H, Rehrauer H, Caflisch A, Hakimi MA, Hehl AB. (2010). Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol.* 76(1):48-67.

Spector DL, Lamond AI. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(2). pii: a000646.



- Spector DL. (2006). SnapShot: Cellular bodies. *Cell*. 127(5):1071.
- Stanley SL Jr. (2003). Amoebiasis. *Lancet*. 361(9362):1025-34.
- Strahl BD, Allis CD. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-45.
- Sullivan WJ Jr, Naguleswaran A, Angel SO. (2006). Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 8(12):1850-61.
- Suresh S, Ehrenkauf G, Zhang H, Singh U. (2016). Development of RNA Interference Trigger-Mediated Gene Silencing in *Entamoeba invadens*. *Infect Immun*. 84(4):964-975.
- Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol*. 4(3):267-75.
- Talbert PB, Ahmad K, Almouzni G, Ausió J et al. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin*. 5:7.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ et al. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*. 14:1025-1040.
- Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 45(1):121-30.
- Tovy A, Ankri S. (2010). Epigenetics in the unicellular parasite *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol*. 5(12):1875-84.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 24:145-9.
- Trelle MB, Salcedo-Amaya AM, Cohen AM, Stunnenberg HG, Jensen ON (2009). Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Proteome Res*. 8(7):3439-50.
- Valdés J, Nozaki T, Sato E, Chiba Y, Nakada-Tsukui K, Villegas-Sepúlveda N, Winkler R, Azuara-Liceaga E, Mendoza-Figueroa MS, Watanabe N, Santos HJ, Saito-Nakano Y, Galindo-Rosales JM. (2014). Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* *in vivo* assembled pre-mRNA splicing complexes. *J Proteomics*. 111:30-45.
- Valdés-Flores J, López-Rosas I, López-Camarillo C, Ramírez-Moreno E, Ospina-Villa JD, Marchat LA. (2018). Life and Death of mRNA Molecules in *Entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Microbiol*. 8:199.
- Van Dellen KL, Chatterjee A, Ratner DM, Magnelli PE, Cipollo JF, Steffen M, Robbins PW, Samuelson J. (2006). Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryot Cell*. 5(5):836-48.

- Van Dellen KL, Ghosh SK, Robbins PW, Loftus B, Samuelson J. (2002). *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains. *Infect Immun.* 70(6):3259-63.
- Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell.* 16(1):93-105.
- Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* 20(10):1256-61.
- Vázquezdelara-Cisneros LG, Arroyo-Begovich A. (1984). Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol.* 70(5):629-33.
- Wang J, Chen J. (2010). SIRT1 regulates autoacetylation and histone acetyltransferase activity of TIP60. *J Biol Chem.* 285(15):11458-64.
- Weedall GD, Hall N. (2011). Evolutionary genomics of *Entamoeba*. *Res Microbiol.* 162(6):637-45.
- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull.* 1997 Mar;18(1):13-4.
- Willhoeft U, Tannich E. (1999). The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 99(1):41-53.
- Wu C, Bassett A, Travers A. (2007). A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep.* 8(12):1129-34.
- Ximénez C. (2006). Epidemiology of amebiasis in Mexico: a molecular approach. *Arch Med Res.* 37(2):263-5.
- Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. (2015). The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* 16(11):1467-81.
- Zimmer C, Fabre E. (2011). Principles of chromosomal organization: lessons from yeast. *J Cell Biol.* 192(5):723-33
- Zuo X, Coombs GH. (1995). Amino acid consumption by the parasitic, amoeboid protists *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *FEMS Microbiol Lett.* 130(2-3):253-8.

## 12. ANEXOS

**Tabla IV:** Lista de oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR.

Nombre	Secuencia (5' – 3')
EIN327460 FWD	AACAAGTCGGGTTGGTCTTG
EIN327460 RVS	CTCGAATGTTCCAGCAGTCA
EiHDAC3 FWD	CGTTTGTCCAAACKGTAGTTG
EiHDAC3 RVS	GTCGCTTTGAACGCYTCTTC
EiJacob1 FWD	CTGGCGCATCAACAAAACCA
EiJacob1 RVS	ACTCGTTGTCGTGCTTCCC
EiJacob2 FWD	TCCGTGCATTCTTGATGGGT
EiJacob2 RVS	GGGGCACTTCATGAAACCC
EiJessie3a FWD	ATGAATGCTCGCTTCACCCA
EiJessie3a RVS	AACATTCCAGGGTTGAGTCC
EiJessie3b FWD	CGGCTCACTTACCACTCGT
EiJessie3b RVS	TCCGAGGGTCTTCCAATCC
EiChitinase1 FWD	TGCATGGTTCCTTGGGACGAT
EiChitinase1 RVS	GTTGGCTGATTTCAAAGTCCA
EiChitinase2 FWD	AGCGCAATCCAATTTGCGAG
EiChitinase 2 RVS	TCTTCTTATTACAGTAGCCGC
EiChitinase3 FWD	GAGCGGCATTTATCAGGAAC
EiChitinase3 RVS	CGCTGCTTTGGGCTTCACT
EiGln6Pi FWD	TCAACTGAACTTTGCGCAGC
EiGln6Pi RVS	CCAACCATAACAACAGCTTGTT
EiGNA FWD	GAATTTGACCGCTAAGTCG
EiGNA RVS	TGTGTCTCGATGTCTTCTGC
EiChitin Synthase1 FWD	ATGCAAACCACATGTCCGAG
EiChitin Synthase1 RVS	GGTCAAACACACGGACAACA
EiChitin Synthase2 FWD	TGTGTGTATCGCACCGTTCA
EiChitin Synthase2 RVS	GGCATAGAACGTACACATCC
EiSir2 FWD	TATGACCCCGCAACATACGG
EiSir2 RVS	TAACTCCGCAAGGCATTGGT
EiSir3 FWD	TCGTTCGAAGGGTGGGATG
EiSir3 RVS	CGCTTTCGTGCGTTGTTTGT
EiSir4 FWD	GAGTGCACAACCCAATGCAG
EiSir4 RVS	ATGAAGTTCGGCGCAGTCTT
EiSir5 FWD	CAACACCAACGCACCACTTT
EiSir5 RVS	GGATATTCGCGACGGTCTCC
EiSir6 FWD	CGAACGTGTTACTGCGTGTG
EiSir6 RVS	GTTTCATCAACCCGCCACAC
EiSir7 FWD	TGACTGTGGTGGTCGTGATG
EiSir7 RVS	AGCAAACCTGGATGGTCGTGT
EiSirDC BamHI FWD	cgGGATCCGGCGCGGGAATCTCCGTTGAGTCG
EiSirDC EcoRI RVS	gGAATTCTTACGGCGCGACTTGTAGTGAAGT
EiSirDC HindIII FWD	cccAAGCTTGGCGCGGGAATCTCCGTTGAGTCG
EiSirDC KpnI RVS	ggGGTACCTTACGGCGCGACTTGTAGTGAAGT

RESEARCH

Open Access



# Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*

Daniela Lozano-Amado<sup>1</sup>, Abril Marcela Herrera-Solorio<sup>1</sup>, Jesús Valdés<sup>2</sup>, Leticia Alemán-Lazarini<sup>1</sup>, Ma. de Jesús Almaraz-Barrera<sup>1</sup>, Eva Luna-Rivera<sup>1</sup>, Miguel Vargas<sup>1</sup> and Rosaura Hernández-Rivas<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** In human hosts, *Entamoeba histolytica* cysts can develop into trophozoites, suggesting that the life cycle of this parasite are regulated by changes in gene expression. To date, some evidence has suggested that epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone modification are involved in the regulation of gene expression in *Entamoeba*. Some post-translational modifications (PTMs) at the N-terminus of *E. histolytica*'s histones have been reported experimentally, including tri-methylation in the lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) and dimethylation in the lysine 27 of histone H3 (H3K27me2), dimethylation of arginine 3 (H4R3me2) and the indirect acetylation of histone H4 in the N-terminal region. However, it is not known which residues of histone H4 are subject to acetylation and/or methylation or where in the nucleus these epigenetic marks are located.

**Methods:** Histones from trophozoites of *E. histolytica* were obtained and analyzed by LC-MS/MS. WB assays were performed using antibodies against epigenetic marks (acetylated lysines and methylated arginines). Immunofluorescence assays (IFA) were carried out to determine the distribution of PTMs and the localization of DNA methylation as a heterochromatin marker. Nuclear bodies such as the nucleolus were identified by using antibodies against fibrillarin and nucleolin and speckles by using anti-PRP6 antibody.

**Results:** Some new PTMs in histone H4 of *E. histolytica*, such as the acetylation of lysines 5, 8, 12 and 16 and the monomethylation of arginine 3, were identified by WB. IFA demonstrated that some marks are associated with transcriptional activity (such as acetylation and/or methylation) and that these marks are distributed throughout the *E. histolytica* nucleus. Staining with antibodies against anti-pan-acetylated lysine H4 histone and 5-methyl cytosine showed that the activation and transcriptional repression marks converge. Additionally, two nuclear bodies, the nucleolus and speckles, were identified in this parasite.

**Conclusions:** This study provides the first evidence that the nucleus of *E. histolytica* is not compartmentalized and contains two nuclear bodies, the nucleolus and speckles, the latter of which was not identified previously. The challenge is now to understand how these epigenetic marks and nuclear bodies work together to regulate gene expression in *E. histolytica*.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, Transcriptional regulation, Histone post-translational modifications, Epigenetics, Nuclear architecture

\* Correspondence: rohernan@cinvestav.mx

<sup>1</sup>Molecular Biomedicine Department, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508, Apartado postal 14-740, 07360 D. F. Mexico, México  
Full list of author information is available at the end of the article

## Background

The parasite *Entamoeba histolytica* has two morphologically distinct life stages: the cyst, which is the infectious form that transmits disease from person to person, and the trophozoite, which is the invasive form that multiplies in the colon and can eventually invade the liver, brain and lungs. A total of 500 million people worldwide are affected by this parasite; resulting in 50 million cases of invasive disease and approx. 70,000 deaths annually [1].

Despite the medical relevance of *E. histolytica*, very little is known about how gene expression is modulated in this parasite during the invasion of its human host or the encystation process. Changes in the abundance of transcripts in *E. histolytica* are associated with human host invasion [2] and with conversion between the cyst and the trophozoite form. However, the molecular mechanisms that regulate gene expression in this parasite are poorly understood. A number of *cis* elements that function as gene promoters in this parasite and transcription factors that recognize these elements have been described [3]. Additionally, it has been shown that the *E. histolytica* genome is organized into chromatin, whose fundamental unit is the nucleosome [4], and contains genes encoding histones H2A, H2B, H3 and H4. Thus, it is very likely that these histones form the nucleosomes of this parasite. However, the DNA that separates each nucleosome (the DNA linker) exhibits an irregular length compared with the 40 bp DNA linker found in metazoans [4]. Furthermore, it has been found that although the amino - terminus of the *E. histolytica* histones diverge from the primary sequence present in the metazoan histones, they are highly basic and contain several lysine and arginine residues that may be potential targets for post-translational modifications such as acetylation and methylation, through the action of histone acetyltransferases (HATs) or lysine or arginine methyl transferases (HKMTs or PRMTs), respectively [5]. *In silico* analysis of the *E. histolytica* genome has revealed the presence of HAT enzymes belonging to the GNAT and MYST families as well as the presence of a protein capable of removing acetyl groups present at the amino-terminus of histones, a class I histone deacetylase (HDAC) [6]. To date, the only post-translational modifications that have experimentally been shown to occur at the amino-terminus of histone H3 are the di- and tri-methylation of lysine 4 (H3K4me<sub>2/3</sub>) in *Entamoeba* [7], which are associated with changes in transcriptional activity, as well as the di-methylation of lysine 27, which is highly enriched in genes silenced through RNA interference (RNAi) [8]. In the case of *E. histolytica*, histone H4 shares 71 % identity with the mammalian histone H4 [5]. The differences primarily occur in the amino-terminus of histone H4, where three insertions that do not exist in other eukaryotic histone H4 genes are found. One of these insertions is located at the beginning of the NH<sub>2</sub>-terminus,

while the second is located between amino acids 10 and 11, and the third is located after amino acid 14 [5]. This last insertion site merits particular attention due to the presence of three extra lysine residues, which could serve as targets for post-translational modifications such as acetylation or methylation. However, it is not known which residues of histone H4 are subject to acetylation and/or methylation, where in the nucleus these epigenetic marks are located, and what roles they play in the nuclear architecture. To address these questions, western blot (WB) analyses and immunofluorescence assays (IFAs) were performed using commercial antibodies against histone H4. Our data suggest that histone H4 is acetylated at lysine residues (K) K5, K8, K12 and K16 and that arginine 3 is mono-methylated. However, antibodies that recognize trimethylated K20 did not detect this epigenetic mark at histone H4. Furthermore, IFAs performed with antibodies directed against pan-acetyl histone H4 and monomethyl arginine 3 of histone H4 showed that these epigenetic marks associated with transcriptional activation are distributed throughout the nucleus. A similar distribution pattern was found using an antibody that detects DNA methylation (5-methyl cytosine). Taken together, these data indicate that unlike what has been reported in eukaryotes and other parasites, the nucleus of this parasite is not compartmentalized and contains two types of nuclear bodies: the nucleolus and speckles.

## Methods

### Cell cultures of *E. histolytica*

Trophozoites of *E. histolytica* strain HM1:IMSS were axenically cultured at 37 °C in TYI-S-33 medium and harvested from confluent cultures as described [9].

### Nuclear acid protein extracts

Nuclear proteins were obtained as previously described by Byers et al., 2005 [10] with some modifications. Briefly,  $8 \times 10^7$  log phase cells were chilled and centrifuged for 5 min at  $500 \times g$  and washed twice with ice-cold PBS. Trophozoites were resuspended in 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris pH 6.5, 27 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1 % Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM sucrose) and incubating at 4 °C for 10 min. Trophozoites were lysed by 25 strokes on a prechilled Douncer homogenizer and the sample was centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min at 4 °C. The supernatant containing the cytoplasmic fraction was recovered and kept at -80 °C. The nuclei were purified by sucrose gradient centrifugation. For this purpose, the nuclei were resuspended in 333  $\mu$ L ml of extraction buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 mM EGTA pH 8.0) and the resulting suspension was layered on 1 ml of extraction buffer containing 0.34 M sucrose. The sample was centrifuged at  $9600 \times g$  for 5 min at 4 °C. The supernatant was

discarded, whereas the pellet, corresponding to the nuclear fraction, was resuspended in 100  $\mu$ l of Tris-EDTA buffer (28.5 mM Tris pH 7.4, 37 mM EDTA) with 0.4 M of HCl and incubating overnight at 4 °C. The acid extract was centrifuged for 10 min at 21,000  $\times$  g. 800  $\mu$ L of ice-cold acetone was added to the supernatant, and the mixture was incubated overnight at -20 °C. Precipitated proteins were collected by centrifugation at 21,000  $\times$  g for 15 min, washed once with acetone and air dried. The pellet was resuspended in Tris-HCl pH 8.8 and stored at -20 °C. All buffers used in this protocol contained protease inhibitors (Complete, EDTA-free, Roche).

#### Nuclear proteins preparation

$8 \times 10^7$  log phase cells were lysed as described above, and the nuclear fractions were purified by sucrose gradient centrifugation. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS) keeping it on ice for 30 min, mixing occasionally. The sample was centrifuged at 21,000  $\times$  g for 20 min at 4 °C and the supernatant was recovered and stored at -20 °C. All buffers used in this protocol contained protease inhibitors (Complete, EDTA-free, Roche).

#### Mass spectrometry analysis of *E. histolytica* histones

Proteins were proteolytically digested in-gel after reduction in 10 mM DTT and alkylation in 55 mM iodoacetamide (both buffered in 50 mM ammonium bicarbonate). Sequencing grade trypsin (250 ng, Promega) in 50 mM ammonium bicarbonate was used to digest protein overnight at 37 °C. Digested peptides were analyzed by LC-MS/MS on a Thermo Scientific Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer in conjunction with an EASY-nLC II nano UHPLC and Proxeon nanospray source. The digested peptides were loaded on a 100 micron  $\times$  25 mm Magic C18 100 Å 5U reverse phase trap where they were desalted online before being separated using a 75 micron  $\times$  150 mm Magic C18 200 Å 3U reverse phase column. Peptides were eluted with an increasing percentage of acetonitrile over the course of a 60 min gradient with a flow rate of 300 nl/min. An MS survey scan was obtained for the m/z range 300–1600 and acquired with a resolution of 70,000 and a target of  $1 \times 10^6$  ions or a maximum injection time of 30 msec. MS/MS spectra were acquired using a top 15 method where the top 15 ions in the MS spectra were subjected to HCD (High Energy Collisional Dissociation). MS/MS spectra were acquired with a resolution of 17,500 and a target of  $5 \times 10^4$  or a maximum injection time of 50 msec. An isolation mass window of 1.6 m/z was used for precursor ion selection, charge states 2–4 were accepted, and a normalized collision energy of 27 % was used for fragmentation. A 5 s duration was used for dynamic exclusion.

Tandem mass spectra were extracted and charge state deconvoluted with Proteome Discoverer (Thermo Scientific) and searched using X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version Sledgehammer 2013.09.01.2)). X! Tandem was set to search all proteins in the Uniprot.org *E. histolytica* database (April 21 2015) plus the cRAP database of common laboratory contaminants (www.thegpm.org/crap/; 114 entries), and an equal number of reverse protein sequences (16,138 entries total). X! Tandem was searched with a parent ion mass tolerance of 20 PPM, a fragment ion tolerance of 20 PPM, and trypsin as the digestion enzyme with 1 maximum missed cleavage. Carbamidomethylation of cysteine was specified as a fixed modification. Deamidation of asparagine and glutamine, oxidation of methionine and tryptophan, and Glu- > pyro-Glu, Gln- > pyro-Glu, and ammonia loss of the n-terminus were specified as variable modifications.

Scaffold (version 4.4.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based protein and peptide identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0 % probability by the Scaffold Local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 79.0 % probability to achieve an FDR less than 2.0 % and contained at least 1 identified peptide. Actual protein and peptides FDRs were 0 %. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, Al et al., 2003) [11]. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Proteins sharing significant peptide evidence were grouped into clusters.

#### Immunofluorescence assays

Trophozoites in a logarithmic growth phase were harvested and transferred on glass coverslips coating with poly L - lysine and incubated for 3 h at 37 °C to let them attach to the glass surface. An indirect immunofluorescence assay was performed as follows. Amoebas were fixed and permeabilized with cold methanol-acetone 50:50 for 10 min at room temperature and washed twice with PBS buffer. After, trophozoites were incubated for 1 h with 1 % bovine serum albumin in PBS buffer and samples were reacted with anti-acetyl-histone H4 (Millipore 06-866) 1:1500, anti-histone H4 acetyl K12 antibody (Abcam ab61238) 1:300, anti-histone H4 mono methyl R3 antibody (Abcam ab17339) 1:200, anti-5-methylcytosine antibody (Abcam ab10805) 1:25, anti-lamin B1 antibody (Abcam ab16048) 1:200, anti C23 (H-250) antibody (Santa Cruz sc-13057) 1:100, anti-fibrillarlin 1:50 and anti-PRP6 1:50 overnight at 4 °C. Then washed with PBS and incubated for 1 h at 37 °C with Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen A11036) 1:200 and Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen A-

11001) 1:100. Nuclei were stained with 4,6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Vectashield Mounting (Vector H-1200) and samples were observed through a confocal microscope Fluoview Olympus FV300. Software 4.3.

### Western blot

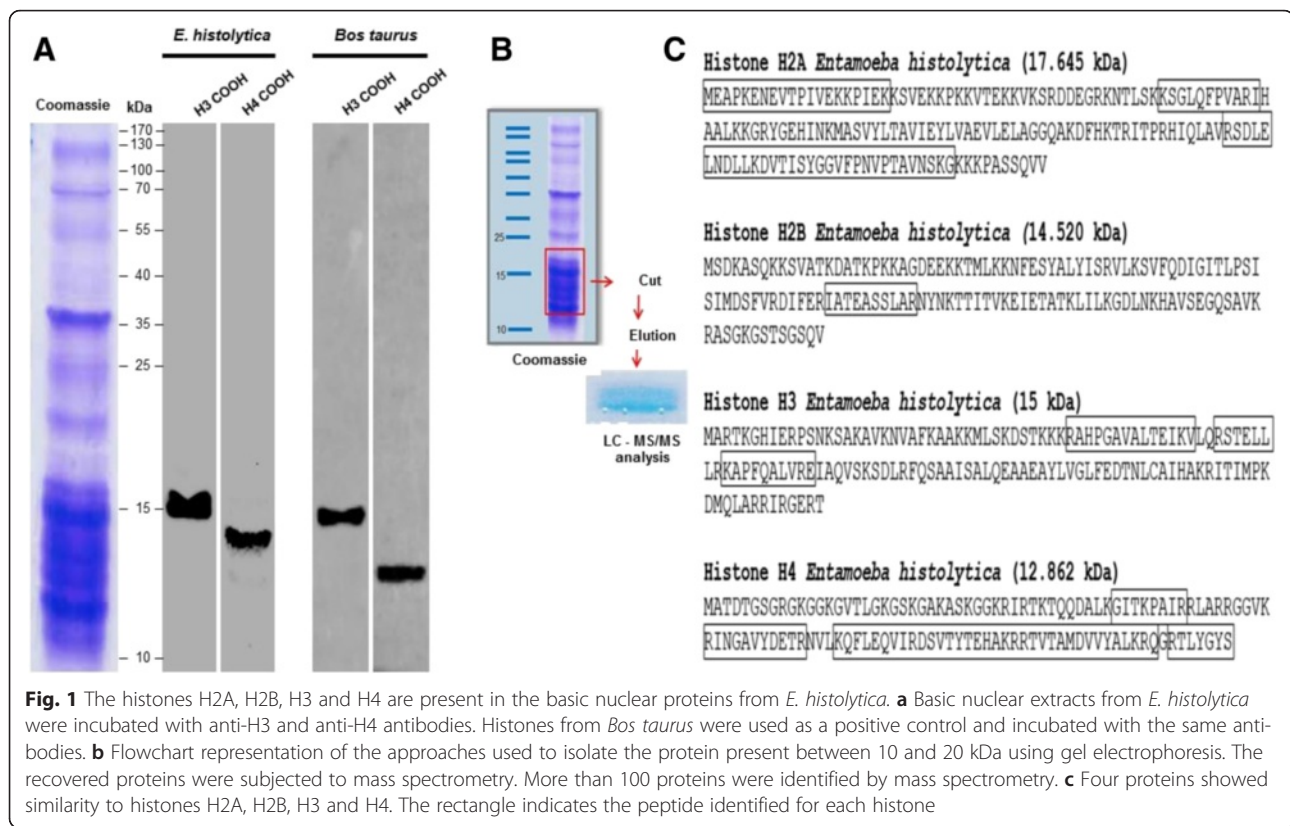
Nuclear acid proteins were separated on 18 % polyacrylamide SDS-PAGE gel while nuclear extract were separated on 10 % polyacrylamide SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane according to the protocol described by Towbin et al., 1979 [12]. The membrane was exposed to Ponceau S to verify the efficiency of the transfer. The membrane was blocked with 5 % milk in PBS buffer- Tween-20 0.05 % (PBS-T) for 2 h at room temperature and then incubated with the anti-histone H3 antibody (Abcam ab1791) 1:5000, anti-histone H4 antibody (Santa Cruz sc-8658-R) 1:2000, anti-acetyl-histone H4 (Millipore 06-866) 1:4000, anti-histone H4 acetyl K12 antibody (Abcam ab61238) 1:2000, anti-histone H4 mono methyl R3 antibody (Abcam ab17339) 1:500, anti-trimethyl-histone H4 (Lys20) antibody (Millipore 07-463) 1:500, anti-lamin B1 antibody (Abcam ab16048) 1:5,000, anti-fibrillarin 1:3,000, anti-PRP6 1:500, all diluted with 2 % milk PBS-T overnight at 4 °C. The membranes were rinsed 3 times with PBS-T and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Thermo Fisher Scientific G-21234) 1:7,500 or goat anti-mouse IgG antibody (Thermo Fisher Scientific G-21040) 1:7,500 diluted in 2 % milk PBS-T. The antibody staining reaction on the membranes were developed by SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific 34095).

### Results

In eukaryotes, the NH<sub>2</sub>-terminus of histone H4 can undergo various post-translational modifications (PTMs), such as the acetylation of lysine residues 5, 8, 12 and 16, which are associated with transcriptional activation, and the trimethylation of lysine 20 of histone H4 (H4K20me<sub>3</sub>), which is associated with transcriptional repression [13]. To determine whether the amino-terminus of *Entamoeba* histone H4 also exhibits these PTMs, we initially obtained a crude preparation of histones. For this purpose, the nuclei of trophozoites were obtained, and an acid extraction was performed to obtain basic proteins, including histones. This preparation was separated using 18 % SDS-PAGE, and an enrichment of the fraction from 10 to 20 kDa was observed (Fig. 1a), suggesting that histones of *E. histolytica* were most likely present in this region. To confirm this assumption, WB assays were performed using commercial antibodies recognizing the COOH-terminus of histones H3 and H4. In the case of histone H3, a signal of approximately 15 kDa was observed, and in the case of histone H4, the antibody

identified a protein of approximately 13 kDa. As a positive control for both antibodies, they were incubated with *Bos taurus* thymus histones. As expected, the antibodies recognized a 15 kDa band for histone H3 and band of 11.33 kDa for histone H4. These data indicate that the histones of this parasite are indeed present in the obtained preparation of basic nuclear proteins. To confirm that this preparation contained not only *E. histolytica* histones H3 and H4 but also histones H2A and H2B, we proceeded to recover proteins in the range of 10 to 17 kDa from the SDS-PAGE gel, which were then analyzed via mass spectrometry (Fig. 1b). The results revealed that the sample did include histones H2A, H2B, H3 and H4 (Fig. 1c). All of these data indicated that this basic nuclear preparation contained the four canonical histones [14]; none of the histone variants previously identified in other eukaryotes and protozoans were observed in this analysis [14, 15].

As stated previously, the amino-terminus of histone H4 exhibits three insertions compared with the primary structure of eukaryotic histone H4 (Additional file 1: Figure S1A). However, when these inserts are removed, the amino-terminus of *E. histolytica* shows a high homology (~81 %) with the amino-terminus of yeast and human histone H4 (Additional file 1: Figure S1B). Taking this into account, we decided to identify post-translational modifications occurring on histone H4 of this parasite using commercial antibodies. Alignment (Additional file 1: Figure S1C) of the peptides used to obtain a pan-acetyl antibody for *Tetrahymena thermophilus* with the N-terminal region of histone H4 from *E. histolytica* and *Homo sapiens* showed that lysines 5, 8, 12 and 16 are conserved at the amino-terminus of histone H4 of *E. histolytica* (Additional file 1: Figure S1C). Thus, we decided to use this antibody to perform WB assays. The basic nuclear preparation was incubated with the pan-acetyl antibody, and a 13 kDa band was identified (Fig. 2b). *Bos taurus* histones were used as a positive control for the pan-acetyl histone antibody, which recognized an 11 kDa band (Fig. 2b). These results suggest that *E. histolytica* histone H4 is acetylated on one or more of the lysines located at positions 5, 8, 12 and 16. Another modification that occurs at the amino-terminus of histone H4 is the monomethylation of arginine 3 (H4R3me<sub>1</sub>) (Fig. 2a). Thus, the basic nuclear proteins obtained from *E. histolytica* were incubated with a polyclonal antibody against this epigenetic marker. As shown in Fig. 2b, this antibody again recognized a 13 kDa protein, corresponding to the previously established molecular weight of histone H4 and indicating that this marker exists on arginine 3 of this parasite, as observed in eukaryotes. In addition, this antibody also identified H4R3me<sub>1</sub> among the histones of *Bos taurus*, with a weight of 11 kDa, as expected. In mammalian cells, the majority of histone H4 methylation

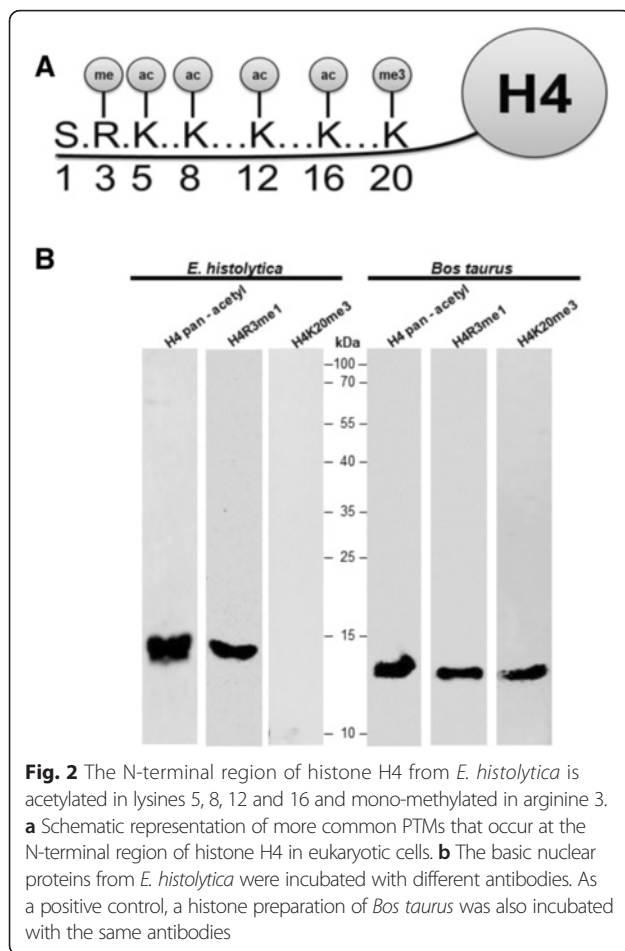


is detected in the N-terminal tail on lysine 20 (H4K20) (Fig. 2a). This methylation mark is evolutionarily conserved from yeast to human and exists in three distinct states as mono-, di- and trimethylation. Each of these states results in distinct biological outputs: Mono- (H4K20me1) and dimethylated H4K20 (H4K20me2) are involved in DNA replication and DNA damage repair, whereas trimethylated H4K20 (H4K20me3) is a hallmark of silenced heterochromatic regions [16]. Because we are interested in identifying one heterochromatin marker in *E. histolytica* we proceeded to determine the presence of this PTM in the histone H4 of this parasite. Unexpectedly, no signal was found in extracts from *E. histolytica* (Fig. 2b), but there was a signal in the histones from *Bos taurus*. This result suggests that the H4K20me3 epigenetic repressive mark is likely not present in this parasite [17], because this epigenetic mark is enriched in telomeric region in eukaryotic cells and up to now the telomere in *E. histolytica* has not been identified. In conclusion, taking into account all of these data, we propose that the amino-terminus of histone H4 of *E. histolytica* harbors epigenetic marks associated with transcriptional activity, whereas no post-translational modification previously associated with transcriptional repression was identified.

### In the *E. histolytica* nucleus the activation and transcriptional repression marks converge

To determine if the previously identified lysine acetylation or mono-methylation of arginine 3 in histone H4 were located in different regions within the nucleus, immunofluorescence assays were performed using the pan-acetyl histone H4 antibody. The results show that this signal is present in all trophozoites, and when merged with DAPI, we found that this signal was located in the nucleus of all trophozoites (Fig. 3a). The amplification (300×) of one trophozoite image revealed that the acetylated lysines of histone H4 were distributed throughout the nucleus (Fig. 3a). Subsequently, an immunofluorescence assay was performed to determine whether each of the lysines identified by the pan-acetyl antibody (K5, K8, K12, and K16) was located in a specific region of the nucleus, such that the observed signals corresponded to the addition of each of the acetylated lysines. For this immunofluorescence assay, an antibody that specifically recognizes K12 of histone H4 was used. We again found that the signal for the acetylated K12 of histone H4 is present in all trophozoites. However, similar to the results obtained with the pan-acetyl H4 antibody, it was located throughout the nucleus (Fig. 3a). To assess whether the other epigenetic mark identified through WB (the mono-methylation of arginine 3 of histone H4,





which has been shown to be associated with transcriptional activation) was also distributed throughout the nucleus or was included among the acetylated lysines, IFA was performed (Fig. 3a). Once again, the signal obtained with this antibody was present in all nuclei, showing a distribution throughout the nucleus when observed at a higher resolution (300×) (Fig. 3a). All of these data suggest that activation marks (such as acetylation and/or methylation) present in this parasite are distributed throughout the *E. histolytica* nucleus.

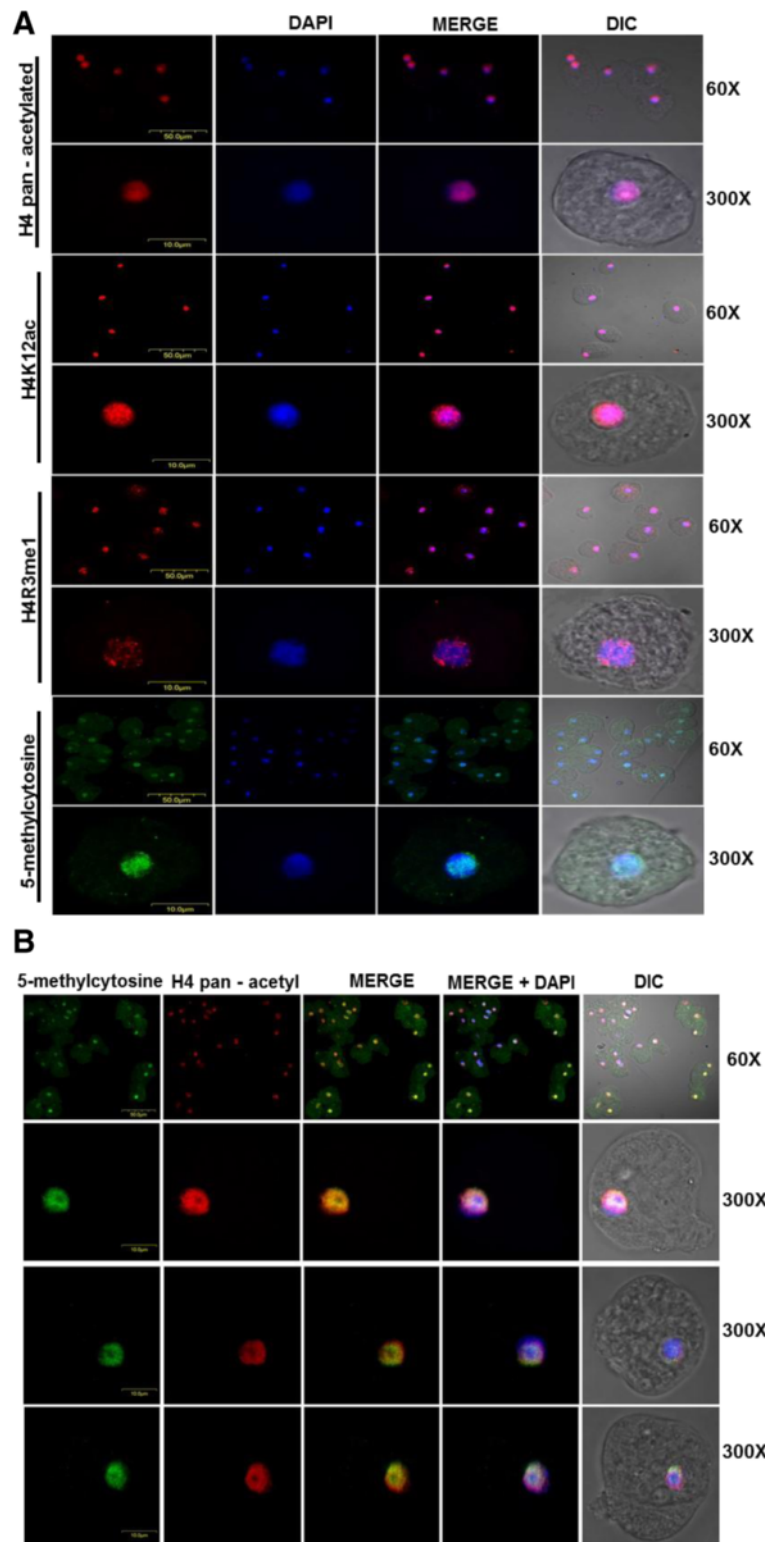
Because our WB assays with the anti-H4K20me3 antibody resulted in no signal, we were not able to use this antibody to identify heterochromatin regions in this parasite [17]. For this reason and considering that histone methylation and DNA methylation are mechanisms that act in concert and that the presence of DNA methylation has previously been demonstrated in this parasite [18], we decided to use an antibody that recognizes methylated cytosines (anti-5-methyl cytosine) to indirectly locate transcriptionally inactive regions in amoebas (Fig. 3a). Our data indicated that this mark was present in most trophozoites, and merging with DAPI showed that it was also present in the nucleus. Unexpectedly,

the amplification of some of these signals (300×) from three independent experiments showed that the methylated DNA was distributed throughout the nucleus (Fig. 3a). In order to establish if the euchromatin marks (pan-acetyl histone H4) and DNA methylation marks overlapped, IFAs were performed with anti-pan-acetyl histone H4 and anti-5-methyl-cytosine histone H4 antibodies. The results of the immunofluorescence analyses indicated that the activation and transcriptional repression marks co-localize in *E. histolytica* (Fig. 3b).

### The *E. histolytica* nucleus contains at least two types of nuclear bodies

Studies aimed at determining how the nucleus is physically and functionally organized have revealed that it is very organized and highly dynamic. A prominent feature of the nuclear landscape is its ability to harbor a variety of discrete subnuclear organelles, collectively referred to as nuclear bodies. Nuclear bodies spatially compartmentalize the nuclear environment and create different sites where proteins and RNAs concentrate, which streamlines biological processes such as replication, DNA repair and messenger RNA maturation [19].

To determine whether there are also nuclear bodies in the *E. histolytica* nucleus, we employed antibodies against two proteins specific to the nucleolus: fibrillarin (which was kindly provided by Dr. Miguel Ángel Vargas) and nucleolin. Initially, nuclear *E. histolytica* trophozoite extracts were assessed via WB to validate the anti-fibrillarin antibody. A protein of the expected size of approximately 35 kDa was identified (Fig. 4a). Based on these results, both antibodies were used to perform IFAs. Figure 4b and c show that the anti-nucleolin and anti-fibrillarin antibodies produced three types of signals. One of the signal patterns, identified in 50 of 100 parasite cells, showed fibrillarin and nucleolin to be largely located at the periphery of the nucleus. In 35 of the cells, the two proteins were instead located at both poles of the nucleus, and in 15 of the cells, the proteins were located at just one end of the nucleus (Fig. 4b and c). For nucleolin, in addition to producing three types of signals, as was observed for fibrillarin (Fig. 4c), other signals could also be identified because this protein is not only a constituent of the nucleolus in eukaryotic organisms but also performs other functions in the nucleus [20]. Therefore, IFAs were performed to determine if nucleolin and fibrillarin co-localize. The overlap of the two proteins corroborated the existence of a nucleolus not only at the periphery of the nucleus of *Entamoeba* (Fig. 4d), but also in one or two poles of the nucleus, two patterns not described previously (Fig. 4d) [21]. Finally, a mouse anti-lamin B1 antibody was used to demonstrate that the nucleolus is located at the nuclear periphery. Initially, we decided to determine whether the mouse anti-lamin B1 antibody recognized a lamin-like protein in *E.*



**Fig. 3** (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Fig. 3** Nuclear localization of activation and repressive epigenetic marks in *E. histolytica* trophozoites. **a** Immunofluorescence assays with histone modification antibodies. IFAs were carried out with antibodies against specific histone modifications associated with transcriptional activation (H4 pan-acetylated, anti-H4K12ac, H4R3me1) and transcriptional repression (5-methyl-cytosine). Nuclei were stained with DAPI. The bar scale is indicated in each image. **b** Double IFAs using anti-mouse 5-methyl-cytosine (green) and pan-acetylated anti-rabbit H4 (red). 5-Methyl-cytosine signals were distributed in the nucleus and found to co-localize with anti-H4 pan-acetylated histone (yellow). The scale bar is given in each figure. A representative image from three independent experiments is shown

*histolytica* nuclear extracts via WB assays (Fig. 4e). The mouse anti-lamin B1 antibody recognized a protein of approximately 78 kDa in the nuclear extracts of *E. histolytica* (Fig. 4e). Thus, we proceeded to use this antibody in further IFAs: the signal obtained with the anti-lamin B1 antibody was located across the entire surface of the nucleus, and when superimposed on the image of nuclei stained with DAPI, we could clearly distinguish the nucleus from the cytoplasm (Fig. 4f). More importantly, the signal suggested the existence of a lamin-B-like protein in the amoeba. Finally, a co-localization assay was performed with anti-lamin B1 and anti-fibrillarin, which revealed that the two signals co-localized at the periphery of the *E. histolytica* trophozoite nucleus (Fig. 4g). This finding confirmed that the nucleolus shows the perinuclear localization in the amoeba.

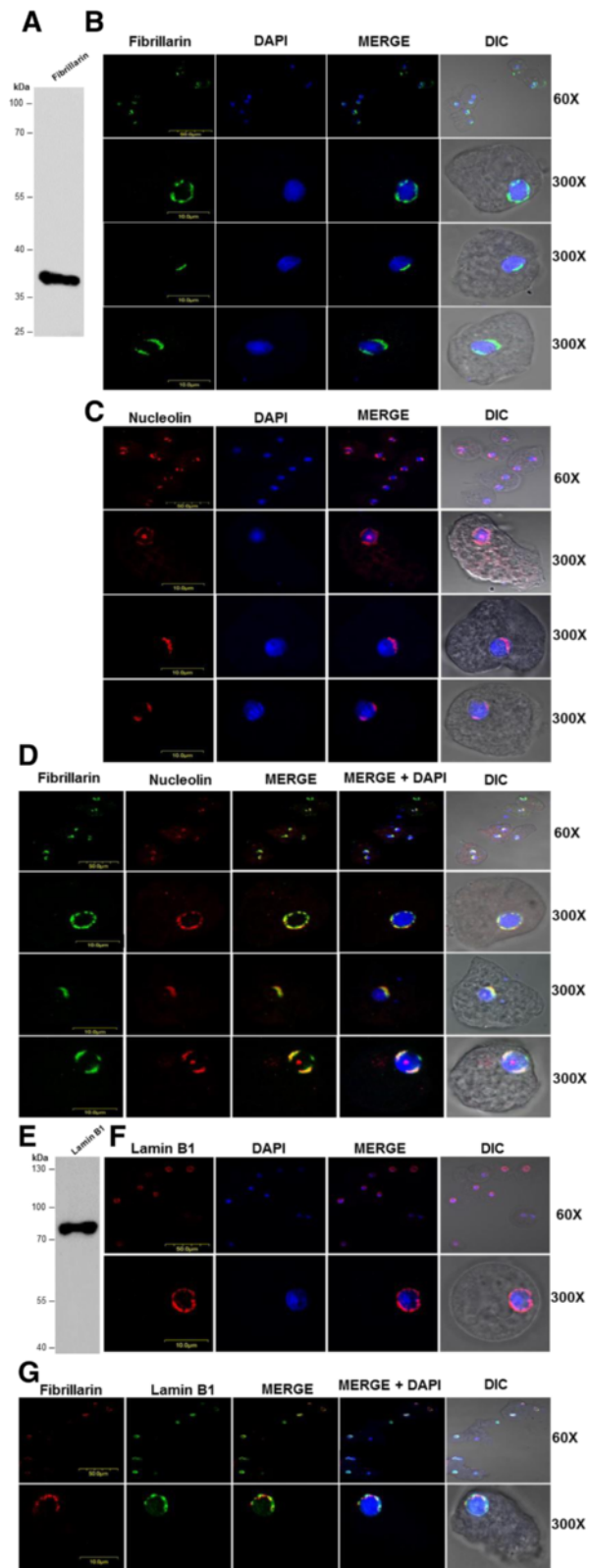
#### The *E. histolytica* nucleus contains at least two types of nuclear bodies

To identify other common types of non-membranous nuclear bodies that are present in many eukaryotic organisms, such as speckles which are nuclear domains enriched in pre-mRNA splicing factors, we decided to use RNA processing proteins (PRPs), a type of organelle-specific protein. The *E. histolytica* PRP6 protein was described in 2000 by the group of Dr. Vargas Mejia, and we employed the antibody obtained in that study to perform WB assays and verify its functionality [22]. The anti-PRP6 antibody recognized a protein of the expected size of approximately 105 kDa (Fig. 5a), as previously described [22]. Thus, this antibody was used in further immunofluorescence assays. The signal corresponding to anti-PRP6 (speckled structures) was present in all trophozoite nuclei. However, amplification of some of the obtained images (300×) showed that this protein presented three types of signals. One signal type occurred both within the nucleus and at the periphery (40 %), the second signal type was observed only at the periphery (40 %), and the third signal type was only present within the nucleus (20 %), (Fig. 5b). To demonstrate that the signal was effectively both inside and at the periphery of the nucleus, but not in the cytoplasm, another immunofluorescence assay was performed using the anti-PRP6 and anti-lamin B1 antibodies. The result indicated that the PRP6 signal was both within the nucleus and at its periphery (Fig. 5c).

Lastly, to establish whether the nucleolus and speckles occupied different locations within the nucleus, IFAs using the anti-PRP6 and anti-nucleolin antibodies were performed. Figure 5d shows that PRP6 and nucleolin occupied a different site within the nucleus only when PRP6 was located inside the nucleus (Fig. 5f). However, when PRP6 was located in the nuclear periphery and also in the nucleus (Fig. 5d) or only in the nuclear periphery (Fig. 5e), it co-localized with nucleolin. Taking these data together, we can suggest that there are at least two dynamic nuclear bodies in the *E. histolytica* nucleus: the nucleolus and speckles.

#### Discussion

To complete its life cycle, *E. histolytica* must differentiate into a mobile and invasive form, the trophozoite, and an infectious form, the cyst. During its differentiation process, the parasite must regulate genes in a phase-specific manner to allow it to complete its life cycle. However, the molecular mechanisms that regulate *E. histolytica* gene expression have been poorly studied. Transcription has been shown to represent a significant control point in higher eukaryotes, where chromatin is involved in the regulation of gene expression [23]. Experimental evidence indicates that chromatin may also regulate gene expression in *E. histolytica*, as it has been demonstrated that *E. histolytica* DNA is organized into chromatin and that the nucleosome (the fundamental unit of chromatin) consists of four canonical histone dimers. In addition, *E. histolytica* produces proteins that acetylate, deacetylate and methylate histones [6, 8, 24], which are responsible for chromatin structure modifications. Post-translational modifications of histones and DNA methylation are two of the epigenetic mechanisms that have been best studied in eukaryotic organisms. Both mechanisms have already been described in *E. histolytica*. However, the residues of histones H3 or H4 upon which these post-translational modifications occur as well as their localization in the nucleus of this parasite are unknown. To answer these questions, a crude preparation of histones from this parasite was obtained, but despite using protocols and resins previously employed in other eukaryotes and other parasites, a pure preparation of histones that would allow us to perform mass spectrometry assays and to identify post-translational modifications of amoeba histones could not be recovered.



**Fig. 4** (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

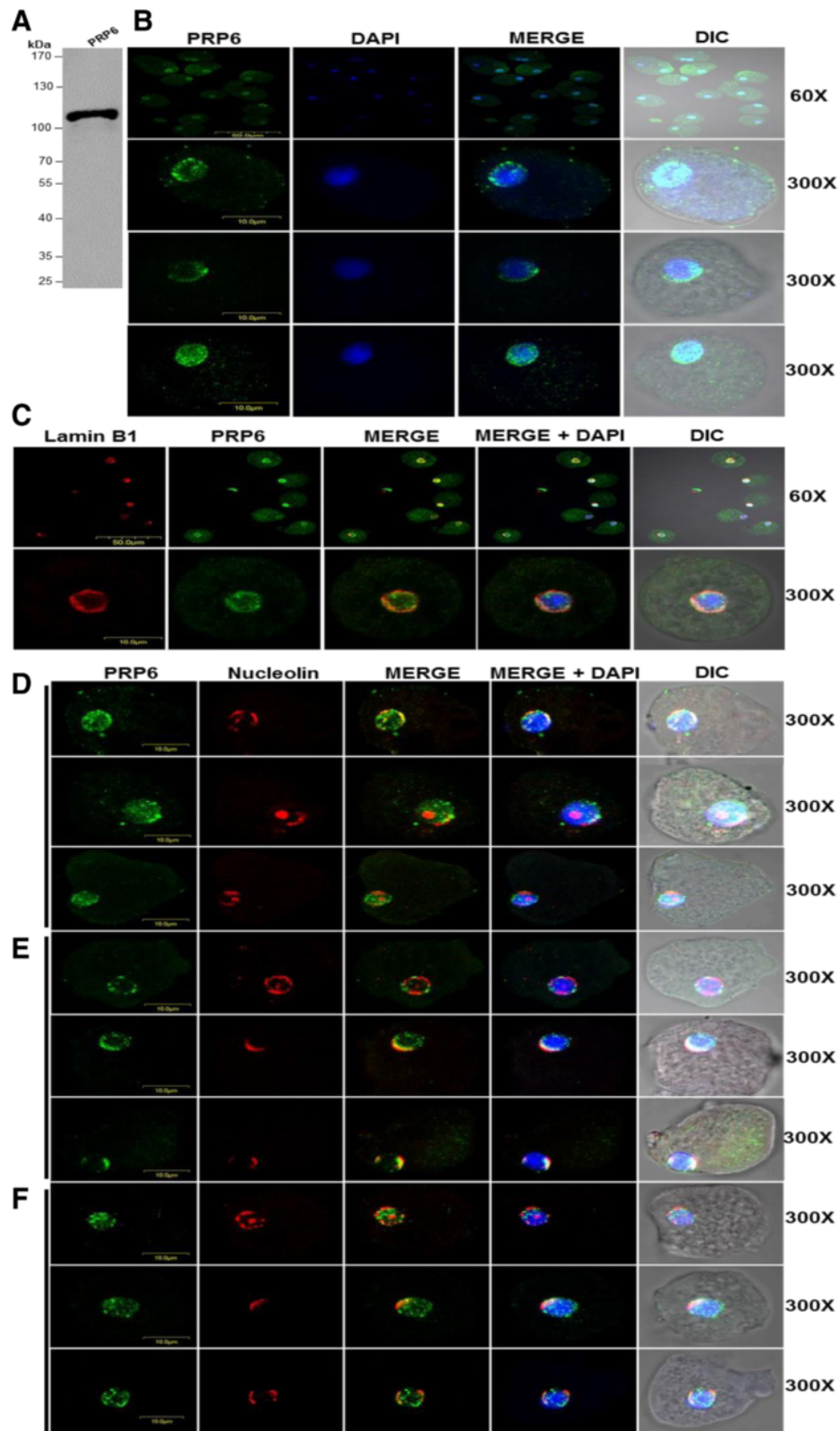
**Fig. 4** The nucleolus is a nuclear body located at the nuclear periphery of *E. histolytica*. **a** Anti-fibrillar antibody was incubated with nuclear extract from *E. histolytica*. A protein of approximately 35 kDa was identified. **b** Indirect Immunofluorescence assays (IFAs) were performed using anti-fibrillar antibody (green), and the nuclei were stained with DAPI (blue). Three different signal patterns were obtained with this antibody. In the first, the nucleus was found to be located in the periphery of the nucleus. In the second, the fibrillar was located to one side of the nucleus, while in the third, the fibrillar was found in two poles of the nucleus. Representative IFAs of the three types of signals are shown. **c** IFA analysis of nucleolin. The nucleolin antibody displays three different patterns: in the majority of trophozoites (50 %), the nucleolin is present at the nuclear periphery. In other images (35 %), the nucleolin is present at one pole of the nucleus. Finally, in the remaining trophozoites, the nucleolin is located on 2 sides of the nucleus (15 %). The nucleus was detected by DAPI staining (blue). The scale bar is indicated in each image. **d** Dual-color IFA with anti-mouse fibrillar (green) and anti-rabbit nucleolin (red). Fibrillar and nucleolin co-localize in the nucleus of *E. histolytica* in the three types of signals (yellow). **e** Western blot assay. Anti-lamin B1 antibody was incubated with nuclear extracts from *E. histolytica* and recognized a protein of approximately 78 kDa. **f** IFAs were carried out with antibodies against lamin B1. The nuclei were stained with DAPI (blue). The IFA showed that lamin is located around the nucleus in *E. histolytica*. **g** Fibrillar (red) and anti-lamin B1 (green) co-localize (yellow) at the nuclear periphery in *E. histolytica* only when the fibrillar is present around the nucleus. The scale bar is indicated in each figure. A representative image of three independent experiments is shown

We believe that the differences in the isoelectric point of the *Entamoeba* histones (as they are less basic, according to the Compute Pi/Mw tool program) compared with those of humans could have interfered with the purification of the *E. histolytica* histones. Another unexpected result was that only peptides corresponding to the 4 canonical histones were identified through the mass spectrometry analysis of the crude preparation of *E. histolytica* histones, and no histone variants were identified. In addition, an *in silico* analysis of the data bank for this parasite did not return any results. Thus, it is necessary to establish an improved methodology for purifying the histones of this parasite, which would allow not only the identification of post-translational modifications occurring at the terminal ends of *Entamoeba* histones but also the enrichment of histone variants from this parasite (if any exist). If no such variants are found, it would indicate that *E. histolytica* only exhibits canonical histones. This contrasts with previous reports on other parasites, such as *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*, in which histone variants have been identified (e.g., H.3.3, CenH3, H2AZ and histone H2AX) and their role in regulating gene expression subsequently demonstrated [15, 25–28].

Interestingly, in this study, we found that when the insertions present at the amino-terminus of histone H4 of *E. histolytica* were removed, this histone was virtually identical (81 %) to that of *Saccharomyces cerevisiae*. Considering that this histone exhibits lysine residues at positions 5, 8, 12 and 16 that can be acetylated [13], we decided to use a pan-acetyl antibody. This demonstrated for the first time that the amino-terminus of histone H4 is acetylated at lysines 5, 8, 12 and 16 and monomethylated at arginine 3. In contrast, commercial antibodies recognizing tri-methylated lysine 20 failed to identify this mark. However, the absence of this PTM could be due to the enrichment of H4K20me3 in telomeric heterochromatin [29, 30]. The fact that *E. histolytica* chromosomes are circular and linear and that telomeric sequences have not been identified in the linear chromosomes could explain the absence of this epigenetic mark.

In this study, the nuclear localization of the identified epigenetic marks was also determined. The obtained data on the *E. histolytica* marks suggest that the activation and repression signals converge. This finding is in contrast to previous descriptions in many organisms, from yeast to humans, as well as in two of the best-studied parasites, *P. falciparum* and *T. brucei*, and suggests that there is no compartmentalization in the nucleus of *E. histolytica*. This finding is very interesting because in the case of *P. falciparum*, it has been reported that the nucleus is compartmentalized into a central region rich in epigenetic marks associated with transcriptional activation (H3K4me3 and pan-acetyl histone H4), a perinuclear repression center region enriched in marks of repression such as H3K9me3 and histone deacetylase *PfSir2*, and the site of expression of *var* genes and the nucleolus [31, 32]. A similar situation has been established in *T. brucei*, which also exhibits a compartmentalized nucleus [33]. This compartmentalization is involved in regulating the expression of genes involved in antigenic variation, as observed in *P. falciparum*; these genes are VSG for *T. brucei* and PfEMP-1 for *P. falciparum*. Thus, if these data are corroborated, the nuclear architecture may not function as another epigenetic mechanism that regulates gene expression in *E. histolytica*. This could be because *E. histolytica* diverged very early and nuclear compartmentalization may have arisen later as parasite life cycles became more complex, requiring more finely regulated expression of their genes in a host, organ-specific manner.

Another interesting finding involved the identification of a possible lamin B1 in *E. histolytica*. Lamin plays important roles in many nuclear processes, including transcription, DNA replication, cell cycle control and DNA repair [23]. For quite some time, it was believed that lamin was an exclusive metazoan compartment. However, a protein similar to lamin, designated Nup-1, was recently identified in *T. brucei* [34], *E. invadens*, *Gregarina melanopli*, *Euglena gracilis*, *Giardia* and *Trichomonas*, indicating that lamin is not exclusive to metazoans [35]. Thus, the 78 kDa protein identified in *E.*



**Fig. 5** (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Fig. 5** Nucleolus and speckles are present in the nucleus of *E. histolytica*. **a** Western blot analysis of nuclear extracts from *E. histolytica* with anti-PRP6 antibody. **b** IFA analysis of PRP6 (green) is observed as a punctuated pattern. The nucleus was detected by DAPI (blue) staining. Anti-PRP6 antibodies give three different signals. In the first, PRP6 is located in the nuclear periphery and also in the nucleus (40 % of trophozoites). The second signal is found in the nuclear periphery (40 %), and the last signal is distributed only into the nucleus (20 %). The scale bar is indicated in each image. **c** IFAs were carried out with antibodies against lamin B1 (red) and PRP6 (green). The nuclei were stained with DAPI (blue). Co-localization signals (yellow) indicate that the PRP6 signal is located inside and around the nucleus (300×). **d** Dual color IFA with anti-mouse PRP6 (green) and anti-rabbit nucleolin (red). The PRP6 signal (green) is present around and inside the nucleus. The nucleolin signal is found at the nuclear periphery but also in one or both poles of the nucleus. The PRP6 and nucleolin signals co-localized only when PRP6 is distributed around the nucleus (yellow). **e** The PRP6 signal (green) is located mainly at the nuclear periphery and co-localized with nucleolin (red) when it is distributed around the nucleus or in one or both poles of the nucleus (yellow). **f** The PRP6 signal (green) is found inside the nucleus and is not co-localized with the nucleolin (red) signal when it is situated at the nuclear periphery in one or both poles of the nucleus

*histolytica* in this study that might be lamin-like may also be involved in regulating gene expression by interacting with chromatin, as reported in eukaryotes and *T. brucei*. Therefore, the development of parasites in which this protein is knocked down will be necessary to allow us to elucidate their participation in genome organization and, thus, in regulating gene expression in *E. histolytica*. Additionally, techniques such as chromatin conformation capture (3C) must be implemented to map the contact between chromatin and this lamin B-like protein.

In this study, two functionally distinct types of nuclear bodies were also visualized: the nucleolus and speckles. The presence of a nucleolus was previously demonstrated at the nuclear periphery in *E. histolytica* [21]. In the present study, two signals, plus one signal located at one end of the nucleus and another located at both ends of the nucleus, were identified. Cell cycle-dependent dynamic organization of the nucleolus has been demonstrated in *P. falciparum*, in which the rDNA is located at one end of the nucleus during the ring stage. However, during the replication stages, the rDNA disintegrates into individual units and is observed as multiple foci in the nucleolus. This demonstrates that rDNA clustering is cell cycle-dependent [36]. Thus, we propose that the nucleolus of *E. histolytica* is also a highly dynamic cell- and cycle-dependent type of nuclear body. Speckles are another highly conserved type of nuclear body. In eukaryotic organisms, speckles are subnuclear structures that act as compartments that can provide splicing factors to active transcription sites, which are observed in the nucleus as irregular dotted structures that vary in size and shape [37]. Considering that speckles are highly conserved nuclear bodies, we decided to determine whether speckles might be present in the nucleus of *Entamoeba*, as it was previously found that *E. histolytica* has 3000 introns among 9938 identified genes [38]. In addition, some of the factors that constitute the spliceosome of this parasite have been recently reported [39]. These results suggest the existence of this nuclear body, which could provide the splicing factors needed to remove introns from *E. histolytica* mRNA. We are currently attempting to demonstrate the relationship

between this nuclear body and the RNA pol II transcription machinery using 5-bromouridine 5-triphosphate (BrUTP) incorporation assays. Finally co-localization assays between nucleolin and PRP6 indicate that when PRP6 is inside the nucleus, it is not co-localized with nucleolin (nucleolus). However, when the PRP6 signal is located in the nuclear periphery or in a pole of the nucleus, both proteins co-localize. These results suggest that while the nucleolus and speckles identified through these proteins are two nuclear bodies, the proteins that constituted both nuclear bodies are highly dynamic and may follow specific pathways between different nuclear bodies prior to activation. Indeed, recent experimental evidence suggests that specific proteins of an organelle may not only reside in the nuclear body in which they work but also travel between different nuclear bodies [40, 41].

## Conclusions

In this work, we demonstrated for first time that lysines 5, 8, 12 and 16 of *E. histolytica* histone H4 are acetylated and that arginine 3 is monomethylated. The location of these marks in the nucleus of this parasite suggest (but are not conclusive), that unlike other protozoans and eukaryotes, the activation and repression marks co-localized. Finally, the presence of at least two types of nuclear bodies, nucleolus and speckles, was demonstrated. Thus, this study provides new tools that can be used in various tests, such as chromatin-immunoprecipitation (ChIP), to determine which genes are regulated by pan-acetyl histone H4 and to study the role of lamin in processes such as replication, cell division and the organization of chromatin via 3C assays. The challenge is now to understand how these epigenetic marks affect chromatin and how the nuclear bodies work together to regulate gene expression in this parasite.

## Additional file

**Additional file 1: Figure S1.** The N-terminal region of histone H4 of *E. histolytica* is conserved among different eukaryotic cells. A) Alignment of the N-terminal region of histone H4 from *E. histolytica* (Eh), *P. falciparum* (Pf), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Drosophila melanogaster* (Dm), and

*Homo sapiens* (*Hs*). (\*). Identical residues; (:) compensatory changes. Three insertions present in the N-terminal region of histone H4 of *E. histolytica* are indicated in red letters. B) Elimination of the three insertions present in the N-terminal region of histone H4 of *Eh* (indicated by lines) generates a highly conserved N-terminal region among *Eh*, *Pf*, *Sc*, *Dm* and *Hs*. Alignment of the H4 N-terminal region of *Eh*, *Pf*, *Sc*, *Dm* and *Hs* with H4 pan-acetylated peptide from *Tetrahymena thermophiles* and a H4 arginine 3 mono-methylated peptide are shown. Rectangle indicated the most conserved residues identified for both peptides. Lysines and arginine amino acids susceptible to be acetylated are indicated in bold. (DOCX 27 kb)

### Abbreviations

ChIP: Chromatin-Immunoprecipitation; BrUTP: 5-bromouridine 5-triphosphate; H3K4me3: Histone 3 lysine 4 trimethylation; H3K27me2: Histone 3 lysine 27 dimethylation; H4R3me2: Histone 4 arginine 3 dimethylation; H4K20me3: Histone 4 lysine 20 trimethylation; HATs: histone acetyltransferases; HKMTs: lysine methyl transferases; PRMTs: arginine methyl transferases.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

DLA conceived and carried out the experiment, analyzed the data and drafted the manuscript; AMHS analyzed the data and drafted the manuscript; JV analyzed the data and drafted the manuscript; LAL captured the microscopy images and analyzed the data; MJIB carried out some IFAs; ELR produced and provided us with the fibrillar antibodies; MAV analyzed the data and drafted the manuscript; RHR conceived and designed the study, analyzed the data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [45687/A-1] and the French-Mexican collaborative program [ANR-CONACYT Paractin 140364]. Daniela Lozano Amado is a recipient of a CONACYT fellowship (397342).

### Author details

<sup>1</sup>Molecular Biomedicine Department, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508, Apartado postal 14-740, 07360 D. F. Mexico, México.  
<sup>2</sup>Biochemistry Department, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508, Apartado postal 14-740, 07360 D. F. Mexico, México.

Received: 25 September 2015 Accepted: 6 January 2016

Published online: 14 January 2016

### References

- Debnath A, Parsonage D, Andrade RM, He C, Cobo ER, Hirata K, et al. A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nat Med*. 2012;18(6):956–60.
- Ehrenkauf GM, Haque R, Hackney JA, Eichinger DJ, Singh U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol*. 2007;9(6):1426–44.
- Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodriguez MA. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:726045.
- Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;45(1):121–30.
- Binder M, Ortner S, Plaimauer B, Fodinger 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;71(2):243–7.
- 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;138(2):205–16.
- Mirelman D, Anbar M, Bracha R. Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*. *IUBMB Life*. 2008;60(9):598–604.
- Foda BM, Singh U. Dimethylated H3K27 is a repressive epigenetic histone mark in the protist *Entamoeba histolytica* and is significantly enriched in genes silenced via the RNAi pathway. *J Biol Chem*. 2015;290(34):21114–30.
- 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.
- Byers J, Faigle W, Eichinger D. Colonic short-chain fatty acids inhibit encystation of *Entamoeba invadens*. *Cell Microbiol*. 2005;7(2):269–79.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2003;75(17):4646–58.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350–4.
- Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*. 2007;131(4):822.
- Dalmasso MC, Sullivan Jr WJ, Angel SO. Canonical and variant histones of protozoan parasites. *Front Biosci*. 2011;16:2086–105.
- Sullivan Jr WJ, Naguleswaran A, Angel SO. Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 2006;8(12):1850–61.
- Jorgensen S, Schotta G, Sorensen CS. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):2797–806.
- Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, et al. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2491–501.
- 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;32(1):287–97.
- Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet*. 2011;27(8):295–306.
- Durut N, Saez-Vasquez J. Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription. *Gene*. 2015;556(1):7–12.
- Jhingan GD, Panigrahi SK, Bhattacharya A, Bhattacharya S. The nucleolus in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* is located at the nuclear periphery. *Mol Biochem Parasitol*. 2009;167(1):72–80.
- Hernandez-Rivas R, Ramirez C, Guillen N, Vargas M. DNA cloning of the *Entamoeba histolytica* PRP6 gene: a putative U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP). *Arch Med Res*. 2000;31(4 Suppl):S294–5.
- Meier K, Brehm A. Chromatin regulation: how complex does it get? *Epigenetics*. 2014;9(11):1485–95.
- Borbolla-Vazquez J, Orozco E, Betanzos A, Rodriguez MA. *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasit Vectors*. 2015;8:219.
- Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*. 2009;23(9):1063–76.
- Lowell JE, Kaiser F, Janzen CJ, Cross GA. Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 24):5721–30.
- Petter M, Selvarajah SA, Lee CC, Chin WH, Gupta AP, Bozdech Z, et al. H2A.Z and H2B.Z double-variant nucleosomes define intergenic regions and dynamically occupy var gene promoters in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2013;87(6):1167–82.
- Petter M, Lee CC, Byrne TJ, Boysen KE, Volz J, Ralph SA, et al. Expression of *P. falciparum* var genes involves exchange of the histone variant H2A.Z at the promoter. *PLoS Pathog*. 2011;7(2):e1001292.
- Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, et al. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell*. 2002;9(6):1201–13.
- Sarg B, Koutzamani E, Helliger W, Rundquist I, Lindner HH. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39195–201.
- Lopez-Rubio JJ, Mancio-Silva L, Scherf A. Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2009;5(2):179–90.
- Issar N, Ralph SA, Mancio-Silva L, Keeling C, Scherf A. Differential sub-nuclear localisation of repressive and activating histone methyl modifications in *P. falciparum*. *Microbes Infect*. 2009;11(3):403–7.
- Navarro M, Penate X, Landeira D. Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol*. 2007;15(6):263–70.



34. DuBois KN, Alsford S, Holden JM, Buisson J, Swiderski M, Bart JM, et al. NUP-1 is a large coiled-coil nucleoskeletal protein in trypanosomes with lamin-like functions. *PLoS Biol.* 2012;10(3):e1001287.
35. Kollmar M. Polyphyly of nuclear lamin genes indicates an early eukaryotic origin of the metazoan-type intermediate filament proteins. *Sci Rep.* 2015;5: 10652.
36. Mancio-Silva L, Zhang Q, Scheidig-Benatar C, Scherf A. Clustering of dispersed ribosomal DNA and its role in gene regulation and chromosome-end associations in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15117–22.
37. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:2.
38. Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* 2005; 433(7028):865–8.
39. Valdes J, Nozaki T, Sato E, Chiba Y, Nakada-Tsukui K, Villegas-Sepulveda N, et al. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. *J Proteomics.* 2014;111:30–45.
40. Pederson T. Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nat Cell Biol.* 2000;2(5):E73–4.
41. Carmo-Fonseca M, Platani M, Swedlow JR. Macromolecular mobility inside the cell nucleus. *Trends Cell Biol.* 2002;12(11):491–5.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

