



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Participación de la metiltransferasa de lisina EhPKMT2 en la virulencia y
respuesta a estrés de *Entamoeba histolytica*”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. SUSANA MUNGUÍA ROBLEDO

Para obtener el grado de

Doctora en ciencias
en Infectómica y Patogénesis molecular

Director de tesis:

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco al CINVESTAV y al Departamento de infectómica y patogénesis molecular por brindarme un lugar dentro de sus aulas y laboratorios.

Agradezco al Dr. Mario Alberto Rodríguez por haberme aceptado en su laboratorio desde hace poco más de 8 años, al iniciar el programa de maestría y continuar con el doctorado. Gracias por todo el apoyo a mi proyecto, por creer en mí incluso cuando yo misma ya no creía en mí. Gracias también por entender qué era lo que yo necesitaba tanto a nivel académico como a nivel personal. Y nunca me van a alcanzar las palabras para agradecer que a pesar de todo siga creyendo en mí y pensando que tengo un gran camino por delante en el área de la investigación.

Agradezco también a mis asesores, la Dra. Abigail Betanzos quien acepto asesorar mi trabajo de último momento, pero que siempre tiene sugerencias apropiadas y mucho cariño para sus estudiantes. A la Dra. Patricia Talamás que siempre está pendiente de sus alumnos asesorados. Al Dr. Jesús Valdés, quien siempre tiene ideas asertivas para nuestros trabajos. A la Dra. Jessica Borbolla, de quien recibí mucho apoyo técnico a la distancia durante los primeros años. Y a la Dra. Bibiana Chávez, quien no pudo observar la culminación de este trabajo, pero que los primeros años estuvo presente con todo su apoyo.

Agradezco el apoyo técnico brindado por el QBP Carlos Vásquez Calzada, tanto en el laboratorio como en el microscopio confocal; a Mario Rodríguez Nieves por su apoyo técnico en el laboratorio; a la Dra. Guillermina García Rivera por todo su apoyo con la transfección de las amibas; a la Dra. Miriam Huerta por todo su apoyo técnico durante los

primeros años de formación y de quien mas he aprendido respecto a disciplina y control; a la Biól. Lizbeth Iliana Salazar Villatoro por su apoyo técnico con el trabajo con amibas, sobre todo *e. invadens*; a la Dra Jeni Bolaños, porque gracias a ella aprendí una gran cantidad de técnicas y trabajo día a día conmigo con mucho amor y respeto.

DEDICATORIA

A mis compañeros de laboratorio con los que inicié. A Chris y a Martha que fueron los primeros en enseñarme las técnicas y el trabajo con amibas; a Jeni, sabes que más del 50% de este trabajo fue gracias a ti y tu apoyo; a Ramón de quien aprendí muchas cosas que incluso van más allá de lo técnico en el laboratorio, Moncho, sabes que te quiero mucho y me siento feliz de poderte llamar amigo; a Josué, gracias por permitirme colaborar contigo y aprender un mundo que va mucho más allá de las amibas, gracias por todas las risas y todos los buenos momentos. Todos ustedes se convirtieron en mis amigos y gracias a las risas, los jueves agropecuarios, los roles y la Carnation, los jueves de salsa, las comidas y las salidas de vez en cuando, me enseñaron que de pronto la vida va más allá de lo académico.

Al grupo de trabajo que dejó hoy en el laboratorio: a Rigo, a Lesli, a Leo, a Dorian, a Yun y a Brian. Gracias chicos por permitirme enseñarles aunque sea sólo un poco de lo que yo sé. Ahora el laboratorio queda en sus manos para sacar adelante todos los proyectos que ahí se trabajan.

A Carlitos, tengo tanto que agradecerte, todo el cariño que me has brindado y todas las lecciones que de ti he recibido, no sólo con tus palabras, sino con tus mismas acciones. Espero que sigas siendo un ejemplo para muchas generaciones más en el laboratorio.

A Mario, muchas gracias también por el cariño y por hacerme sentir tan apreciada dentro del lab.

Al grupo de trabajo de la Dra. Esther y la Dra. Abigail. Sobre todo a Ausencio y a Joss que durante la pandemia me brindaron todo su apoyo y su amistad. A Guile y a Miri, quienes son un gran ejemplo en mi vida.

A mis amigos, que en estos últimos años de manera sorpresiva han cambiado, a los viejos (aun a quienes se fueron) y a los nuevos que llegaron. En especial a Helena y Raul, quienes me han acompañado estos últimos 15 años. Gracias por escucharme todas las veces, por todos los dramas, por ser mi fuerza en los momentos de debilidad. Gracias por darme su

soporte y poder platicar con ustedes desde lo mas trivial, hasta las cosas mas importantes de mi tesis. Sin ustedes, estaría perdida. Si el amor de mi vida existe, estoy segura que son ustedes dos.

A Dulce, a Arely y a Monse, que en este último par de años se han vuelto un motor para no rendirme y para poderme ver a través de otros ojos. Por enseñarme que mi propio juicio puede ser más ligero de cargar y porque a través de ustedes, puedo ver todo lo bonito que hay en mí.

En especial, esta tesis va dedicada a mi familia, que sepan que soy el reflejo de lo mejor que hay en cada uno de ellos. Sé que soy fuerte porque tengo raíces fuertes.

Papi: gracias por estar detrás de mí en cada paso, en cada decisión y en cada momento. Gracias por dejarme experimentar también la libertad de ser quien quiero llegar a ser. Somos el mejor blue team para siempre.

Mami: gracias porque todo lo que he avanzado es porque tu has cuidado de mi con todo el amor y el sacrificio. Jamás hubiera llegado hasta donde estoy si no fuera por ti. Gracias por apoyarme en cada decisión, incluso cuando estuve a punto de desertar. Nunca me hiciste sentir que valiera menos por eso. Este trabajo esta dedicado para ti con todo mi amor.

Charly: hermano, cada día quiero y me esfuerzo por ser un poco más como eres tú. Eres un gran ejemplo de valentía y coraje, de dedicación y esfuerzo, y a pesar de todas las dificultades que la vida puso en tu camino, no te he visto rendirte ni un solo día. Gracias por todo el amor y todo el respeto que tienes para mí. Nunca nadie va a tener un mejor hermano que el mío. Te amo mucho.

Lau: tu fuiste mi primera maestra y mira, ahora estoy concluyendo un doctorado. Ahora tenemos más palabras graciosas para reírnos que no vienen en el diccionario. Gracias porque a pesar de estar lejos, ni un solo momento hemos estado separadas. Te amo mucho. Y a Omar y Elisa que se han sumado en mi vida, porque Omar es también un

ejemplo de perseverancia y disciplina y para Elisa queremos convertirnos en apoyo y ejemplo también.

*“Adquiere sabiduría, adquiere inteligencia;
No te olvides ni te apartes de las razones de mi boca;
No la dejes, y ella te guardará;
Ámala, y te conservará.
Sabiduría ante todo; adquiere sabiduría;
Y sobre todas tus posesiones adquiere inteligencia.
Engrandécela, y ella te engrandecerá;
Ella te honrará, cuando tú la hayas abrazado.
Adorno de gracia dará a tu cabeza;
Corona de hermosura te entregará.”
Proverbios 4:5-9*

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

ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción	1
• Epidemiología	1
• Características morfológicas	4
• Ciclo de vida	6
• Cuadro clínico	8
• Diagnóstico	10
• Tratamiento	11
• Patogénesis y factores de virulencia	12
Antecedentes	19
• Modificaciones postraduccionales	19
• Metilación de lisinas	20
• Metiltransferasas de lisina en <i>E. histolytica</i>	25
Justificación	27
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Diseño experimental	29
Metodología	31
• Análisis bioinformático	31
• Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	31
• Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	32
• Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida	32

• Western blot	33
• Inmunofluorescencia y microscopía confocal	34
• Obtención de DNA genómico	34
• Obtención de DNA plasmídico	35
• Diseño de iniciadores	36
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
• Electroforesis en geles de agarosa	38
• Purificación del DNA a partir de geles de agarosa	38
• Clonación en vector de tránsito pCRII TOPO	38
• Digestión	40
• Ligación en el vector pSA8	40
• Obtención de bacterias <i>Escherichia coli</i> DH5a competentes	40
• Transformación de células competentes	41
• Transfección de trofozoítos amibianos	41
• Curva de crecimiento	42
• Eritrofagocitosis	42
• Migración	42
• Efecto citopático	43
• Choque térmico	43
• Estrés oxidativo	44
• Depleción de glucosa	44
• Análisis estadístico	44
Resultados	45
• EhPKMT2 tiene homólogos en otras especies del género <i>Entamoeba</i> y está relacionada con proteínas de la familia SMYD y con AKMT.	45

• EhPKMT2 presenta cambios en la expresión y localización durante el choque térmico, el estrés oxidativo y el estrés nutricional.	53
• El knockdown de <i>Ehpkmt2</i> modifica la proliferación celular.	63
• El knockdown de <i>Ehpkmt2</i> afecta diferentes factores de virulencia y de respuesta a estrés de <i>E. histolytica</i> .	65
Discusión	68
Conclusiones	76
Perspectivas	77
Bibliografía citada	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de amibiasis en México del año 1995 al año 2020.	3
Figura 2. Incidencia de amibiasis intestinal por grupo de edad y sexo en población mexicana en el periodo de 2015-2019.	3
Figura 3. Morfología de <i>E. histolytica</i> .	5
Figura 4. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	7
Figura 5. Metilación de residuos de lisina.	20
Figura 6. Ejemplos representativos de estructuras que contienen el dominio SET.	22
Figura 7. Vector pSA8 (modificado)	36
Figura 8. Vector pCRII-TOPO	39
Figura 9. Comparación <i>in silico</i> de las proteínas EhPKMTs con proteínas de la familia SMYD.	46
Figura 10. Modelo tridimensional de EhPKMT2	49
Figura 11. Identidad estructural de EhPKMT2 con AKMT y SMYD1.	50
Figura 12. Comparación filogenética de PKMTs del género <i>Entamoeba</i> .	52
Figura 13. Viabilidad de <i>E. histolytica</i> y expresión de EhPKMT2 durante choque térmico a 42 °C.	54
Figura 14. Localización de EhPKMT2 durante el choque térmico.	56
Figura 15. Viabilidad de <i>E. histolytica</i> y expresión de EhPKMT2 durante el estrés oxidativo.	58
Figura 16. Localización de EhPKMT2 durante el estrés oxidativo.	59
Figura 17. Viabilidad de <i>E. histolytica</i> y expresión de EhPKMT2 durante la disminución de glucosa.	61
Figura 18. Localización de EhPKMT2 durante la disminución de glucosa.	62
Figura 19. Knockdown de <i>Ehpkmt2</i> .	64

Figura 20. Efecto del <i>knockdown</i> de <i>Ehpkmt2</i> en la proliferación, choque térmico y virulencia in vitro de <i>E. histolytica</i> .	67
Figura 21. Modelo propuesto para el papel de EhPKMT2 en <i>E. histolytica</i> .	75

Tabla 1. Diseño de iniciadores utilizados para el silenciamiento del gen <i>Ehpkmt2</i>	37
Tabla 2. Condiciones para PCR de punto final.	37

RESUMEN

Entamoeba histolytica posee diferentes proteínas consideradas como factores de virulencia, los cuales deben ser regulados para poder provocar enfermedad en el hospedero. Las modificaciones postraduccionales de las proteínas son un mecanismo que regula la actividad, localización y/o la estabilidad de las proteínas. Entre estas modificaciones se encuentra la metilación en los residuos lisina, que en otros protozoarios se ha relacionado con la virulencia, el cambio de estadio y la motilidad.

Las enzimas responsables de llevar a cabo la metilación de lisinas se denominan metiltransferasas de lisina (PKMTs), de las cuales, *E. histolytica* tiene cuatro (EhPKMT1-4). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce su participación en la resistencia a estrés y la virulencia del parásito. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue determinar la participación de EhPKMT2 en su virulencia y en su respuesta a estrés, así como el efecto del *knockdown* de la proteína sobre estos eventos.

Para realizar este objetivo, primero se realizó una comparación *in silico* de EhPKMT2 con otras metiltransferasas de lisina y se encontró una mayor relación estructural con la proteína AKMT del parásito *Toxoplasma gondii* y con SMYD1 de humano. Posteriormente se evaluó la expresión y la localización de EhPKMT2 en trofozoítos sometidos a choque térmico, estrés oxidativo y estrés nutricional. Se observó que, en los tres casos, la expresión de la proteína disminuyó y en el choque térmico, además se observó un cambio en su localización celular. Finalmente, se encontró que el *knockdown* de EhPKMT2 afecta eventos celulares relacionados a la virulencia, como la proliferación celular, la eritrofagocitosis, el efecto citopático, la migración y la respuesta al choque térmico, por lo tanto, sugerimos que esta proteína participa en la regulación de la respuesta a estrés y de la virulencia.

ABSTRACT

Entamoeba histolytica possesses many proteins considered as virulence factors, which might be regulated to cause disease in the host. Posttranslational modifications are mechanisms that regulate activity, localization and stability of proteins. Among these modifications, which include methylation on lysine residues, it has been observed that this modification is related to the activation and repression of virulence genes, morphological differentiation and motility in other parasites.

The enzymes that catalyze the lysine methylation are named Protein Lysine Methyltransferases (PKMTs), and *E. histolytica* has four of them (EhPKMT1-4). However, until now their participation on stress response and virulence are unknown. For this reason, the aim of this study was to determine the role of EhPKMT2 on virulence and stress response and to evaluate the effect of the *knockdown* on these events.

To achieve this objective, an *in silico* analysis was performed. The EhPKMT2 structure was compared with other methyltransferases, finding this protein is related to AKMT of *Toxoplasma gondii* and with human SMYD1. Afterwards, the expression and localization of EhPKMT2 was analyzed under heat shock and oxidative and nutritional stress. Under these conditions, the protein expression decreased, and besides, the subcellular localization of the protein changed during heat shock. Finally, the protein *knockdown* affected some virulence events, such as cellular proliferation, erythrophagocytosis, cytopathic effect, migration and heat shock response. Taking these results together, we suggest that EHPKM2 is involved in the regulation of the stress response and virulence of the parasite.

Participación de la metiltransferasa de lisina EhPKMT2 en la virulencia y respuesta a estrés de *Entamoeba histolytica*

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario que pertenece al phylum *Amebozoa*, clase *Lobosa*, orden *Amoebida*, y familia *Entamoebidae* (COL, nd). Este microorganismo fue descrito por primera vez en 1875 por Friedrich Lösch en San Petersburgo, Rusia, a partir de un paciente con disentería (Gómez *et al*, 2007; Botero & Restrepo, 2012). La organización Mundial de la Salud (OMS) lo describe como el agente etiológico de la amibiasis intestinal (WHO, 1997), aunque puede presentar otras manifestaciones clínicas como el absceso hepático amibiano (Samie, 2012; Stanley, 2003).

- **Epidemiología**

El único hospedero natural de *E. histolytica* es el humano (Flisser & Pérez-Tamayo, 2006; Ximénez *et al*, 2011), en el cual coloniza la mucosa del intestino grueso; sin embargo, es capaz de invadir el tejido y diseminarse a otros órganos como hígado, pulmones y cerebro, entre otros (WHO, 1997; Asociación de Médicos de Sanidad Exterior, 2012; CDC, 2013). Sin embargo, ya se ha reportado la presencia de especies del género *Entamoeba*, incluyendo la especie *E. histolytica*, en muestras de primates no humanos en cautiverio, lo cual vuelve incierto el papel de estos primates como reservorios zoonóticos (Levecké, *et al*, 2010)

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

La obtención de datos epidemiológicos se dificulta debido al diagnóstico inapropiado, a la carencia de servicios médicos y a la omisión del reporte de esta enfermedad; además, en los últimos años, la epidemiología de la amibiasis ha sufrido cambios, debido a la descripción de las especies no patógenas *Entamoeba dispar* y *Entamoeba moshkovskii*, las

cuales son morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica* (Ali *et al*, 2008; Ximénez *et al*, 2009; Samie *et al*, 2012). Sin embargo, antes de la descripción de la separación de especies patógenas y no patógenas, Walsh (Walsh, 1986) estimó que *E. histolytica* infecta alrededor de 50 millones de personas en el mundo, lo que causa aproximadamente entre 40 a 100 mil muertes al año (Walsh, 1986), representando la cuarta causa de muerte debida a infección por protozoarios, después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis; y la 3ª causa de morbilidad, después de la malaria y la tricomoniasis (Gómez *et al*, 2007). De todos los casos de amibiasis, el 90 % son asintomáticos y sólo el 10 % presenta manifestaciones clínicas (Ximénez *et al*, 2009; Samie *et al*, 2012); además se estima que sólo el 10% de los pacientes que presentan colitis amibiana desarrollan absceso hepático (Stanley & Reed, 2001; Ximénez *et al*, 2009).

En países desarrollados, la población afectada corresponde a personas de la tercera edad, viajeros a lugares endémicos y homosexuales, además de tener brotes de manera esporádica debido a la contaminación de fuentes de agua (Gómez *et al*, 2007). Por otro lado, en países en vías de desarrollo, la distribución en la población es general (Gómez *et al*, 2007, Samie *et al*, 2012) y se considera endémica en México, India, países del sur de África, centro y sur de América, así como países Asiáticos del Pacífico (Ximénez *et al*, 2009; Bello-López *et al*, 2023).

En México, el número de casos de amibiasis ha disminuido de manera drástica en los últimos 20 años (Figura 1), y pasó de ser la 3ª causa de enfermedad en 1995, a ser la 20ª en el año 2020 (Anuario de morbilidad nacional, 1984-2021). Esta disminución puede relacionarse con el aumento al acceso de agua potable y servicios sanitarios, así como el tratamiento médico oportuno (Gómez *et al*, 2007; Gutiérrez-Gutiérrez & Palomo-Ligas, 2023).

Por otro lado, se ha observado que en México la población más afectada por la amibiasis, es la población infantil en niños de 1 a 9 años de edad, y que el mayor número de casos se presenta en mujeres en todos los grupos etarios (Figura 2) (Gutiérrez-Gutiérrez & Palomo-Ligas, 2023)

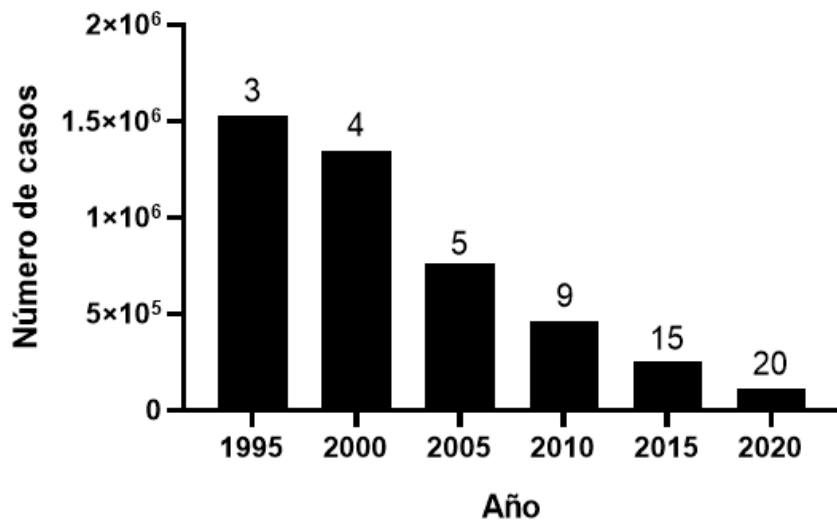


Figura 1. Número de casos de amebiasis en México del año 1995 al año 2020. Número de casos de amebiasis reportados al año y su morbilidad en México. En cada barra se indica el número que ocupa de las 20 principales causas de morbilidad en México.

Fuente: www.epidemiología.salud.gob.mx

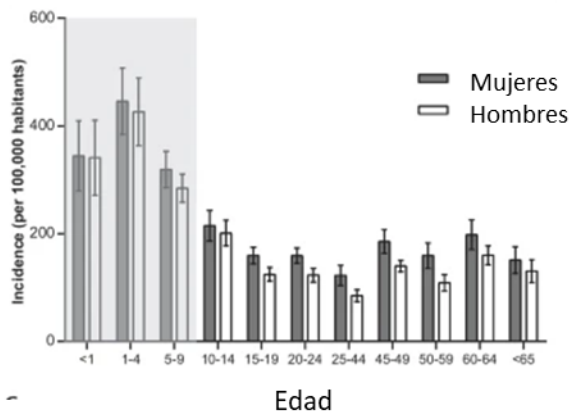


Figura 2. Incidencia de amebiasis intestinal por grupo de edad y sexo en población mexicana en el periodo de 2015-2019. Se observa que la población con mayor incidencia de amebiasis intestinal son los niños de 1 a 9 años de edad y que en todos los grupos etarios, las mujeres tienden a presentar mayor incidencia.

Fuente: Modificado de Gutiérrez-Gutiérrez & Palomo-Ligas, 2023.

- **Características morfológicas.**

E. histolytica presenta dos estadios durante su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste (Figura 3).

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

Los quistes son estructuras redondeadas u ovaladas que miden de 10 a 16 μm de diámetro. Poseen una pared gruesa de quitina y en su interior se encuentran cuatro núcleos esféricos con las mismas características morfológicas que los trofozoítos. El quiste maduro, contiene ribosomas ensamblados que se denominan “cuerpos cromatoides” (Stanley, 2003; Gómez *et al*, 2007; Ximénez *et al*, 2011). Los quistes se mantienen viables durante 8 días en heces o suelo a temperatura ambiente, aunque bajo condiciones de temperatura y humedad favorables pueden mantenerse viables hasta por 12 días, mientras que en agua se mantienen viables hasta por 30 días. Son resistentes al cloro, sin embargo, son sensibles a la desecación y a temperaturas menores a 5 °C y mayores a 40 °C (Flisser & Pérez-Tamayo, 2006; Samie *et al*, 2012). Debido a estas características de resistencia medioambientales, su estabilidad y la fácil diseminación de los quistes tanto por agua como por alimentos, el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID por sus siglas en inglés) lo ha clasificado en el grupo B de prioridad de biodefensa contra patógenos (Shirley *et al*, 2018; NIAID, 2018).

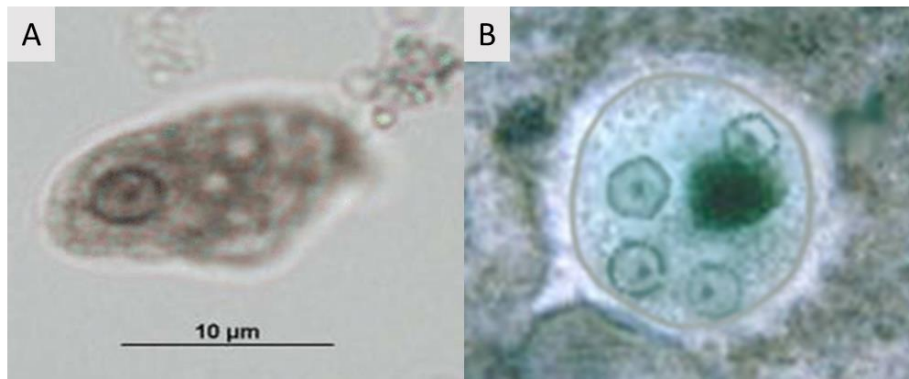


Figura 3. Morfología de *E. histolytica*. A) Trofozoíto, en el cual se observa su núcleo con cromatina de distribución periférica y regular y nucléolo central. B) Quiste tetranucleado. (Tomado de: A) García M. I. et al, 2008. B) https://www.stepwards.com/?page_id=5948)

- **Ciclo de vida**

El ciclo de vida (Figura 4) comienza con la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes maduros, que es la fase infectiva. Se ha reportado que la dosis infectiva de quistes es aproximadamente de 1000, mientras que en promedio una persona infectada puede liberar hasta 45 millones de quistes en las heces en un día (Cornick & Chadee, 2017).

En el estómago, el ácido estomacal debilita la pared del quiste y las condiciones alcalinas en el intestino delgado terminan de debilitar la pared quística, permitiendo que se liberen cuatro trofozoítos, los cuales posteriormente se dividen, dando lugar a ocho trofozoítos metacíclicos, los cuales migran al intestino grueso, donde se sitúan en la mucosa o la superficie de las glándulas de Lieberkühn (Ximénez *et al*, 2011). Posteriormente, los trofozoítos pueden alcanzar la submucosa y los vasos sanguíneos, por donde se diseminan hacia el hígado, pulmones, piel u otros órganos en donde son incapaces de enquistarse y por ende transmitirse hacia un nuevo hospedero (Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012; CDC, 2013).

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

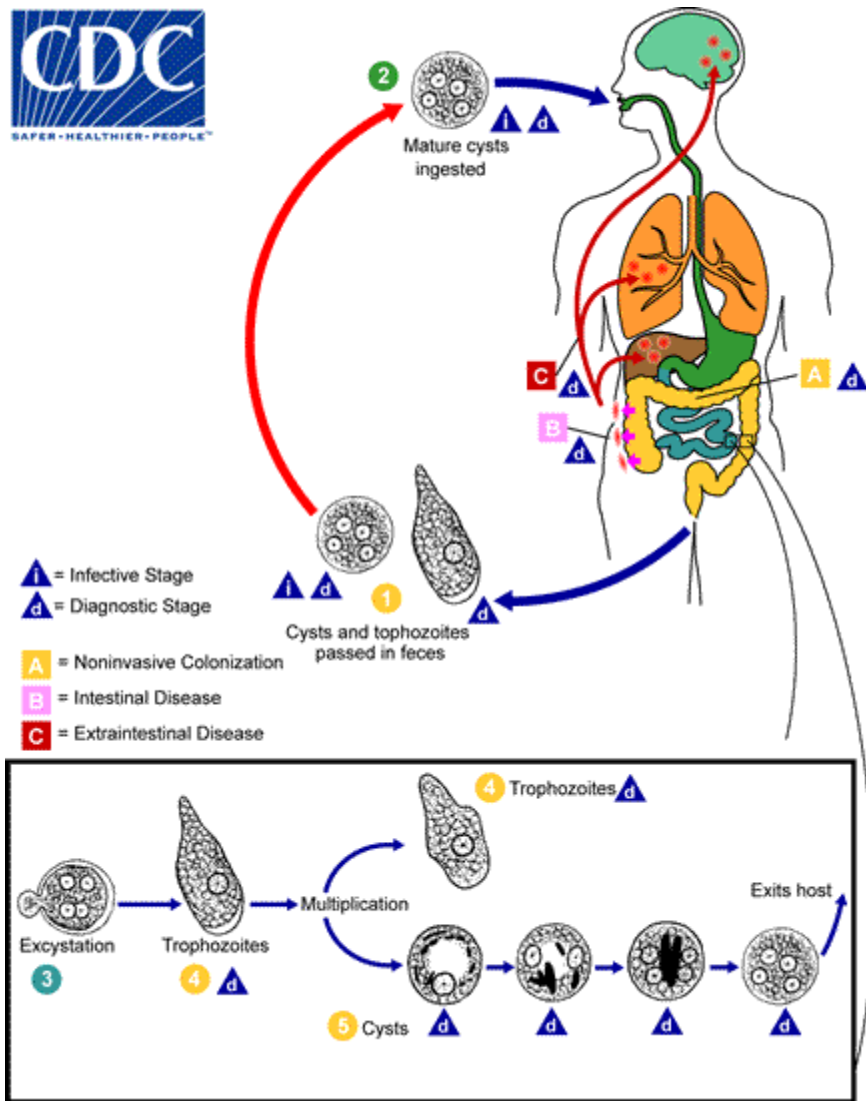


Figura 4. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El ciclo de vida comienza con la ingestión de un quiste maduro, el cual pierde la pared durante su paso por el estómago y el intestino delgado, y coloniza el intestino grueso, donde se divide por fisión binaria; en algunos casos, los trofozoítos pueden invadir otros órganos además del colon. En el colon, los trofozoítos comienzan el proceso de enquistamiento y son desechados junto con las heces.

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

- **Cuadro clínico**

La amibiasis puede clasificarse dependiendo de las manifestaciones clínicas y de la invasividad, en asintomática o invasiva en su forma aguda y crónica; o por el sitio de la infección en intestinal y extraintestinal (Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012).

La amibiasis asintomática se presenta cuando se observa en un examen coprológico que un individuo libera quistes mediante las heces, pero éste no presenta ninguna sintomatología. Esta forma es no invasiva y es de gran importancia, debido a que estos individuos contribuyen a la diseminación de la enfermedad (Botero & Restrepo, 2012; Cornick & Chadee, 2017).

La amibiasis intestinal aguda dura de una a cuatro semanas (Ximénez *et al*, 2009) y se caracteriza por la presencia de dolor abdominal, diarrea con moco y/o sangre (disentería), pujo y tenesmo; por otro lado, los síntomas sistémicos como fiebre y otros, son muy poco frecuentes (Ximénez *et al*, 2011; Botero & Restrepo, 2012). Si no se recibe tratamiento durante esta etapa, la amibiasis puede evolucionar a un estado grave (Botero & Restrepo, 2012), especialmente en niños menores de 5 años, mujeres embarazadas, personas de la tercera edad, particularmente si padecen alguna otra enfermedad crónica, como diabetes mellitus, o pacientes inmunodeprimidos o inmunosuprimidos (Stanley, 2003; Ximénez *et al*, 2012; Chou & Austin, 2022). Las formas graves de la enfermedad incluyen ameboma (masa amibiana que puede obstruir el conducto intestinal), colitis amibiana fulminante y colon megatóxico. Algunos de los síntomas que se pueden presentar en las formas complicadas de la amibiasis son dolor abdominal severo, tenesmo intenso (con hasta 20 episodios de deposición diarreica con sangre al día); además puede haber algunos síntomas sistémicos como son fiebre, taquicardia e hipotensión (Ximénez *et al*, 2009). El pronóstico de esta enfermedad es grave, especialmente si hay perforación intestinal. La mortalidad de la disentería es del 1%, pero se incrementa hasta el 75% en las complicaciones (Ximénez *et al*, 2009).

La amibiasis crónica (colitis no disentérica) es la forma más frecuente en individuos de todas las edades y es de evolución prolongada. Se caracteriza por tener síntomas no

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

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

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

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

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

- **Diagnóstico**

Debido al cuadro clínico que se presenta durante la amibiasis intestinal, es necesario que se diferencie de otras enfermedades similares, especialmente con aquéllas que producen diarrea, ya sean causadas por virus (Rotavirus), bacterias (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*) u otros parásitos intestinales (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Trichuris*, *Strongyloides*, *Schistosoma*) (Botero & Restrepo, 2012; Chou & Austin, 2022). Además, el diagnóstico preciso es importante no sólo en los pacientes con disentería, sino en los portadores asintomáticos que pueden seguir diseminando la enfermedad (Tanyuksel & Petri, 2003).

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

trofozoítos se lisan en 30 minutos), especialmente si no se usa un fijador o no se conserva la muestra a 4 °C (Tanyuksel & Petri, 2003; Botero & Restrepo, 2012; Samie *et al*, 2012).

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

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

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

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

- **Tratamiento**

Los fármacos que existen para el tratamiento de la amibiasis se dividen en tres: amebicidas luminales, que actúan principalmente contra los parásitos que colonizan la mucosa intestinal; los amebicidas sistémicos, los cuales afectan a los parásitos invasivos y, los amebicidas mixtos, que actúan tanto a nivel luminal como extraintestinal (Barquero &

Sáenz, 1996; OMS, 1996), por lo cual, el tratamiento depende del cuadro clínico del paciente.

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

A los pacientes con colitis amibianas, así como a aquéllos con formas invasivas de la enfermedad, primero debe tratárseles con un amebicida sistémico, seguido de uno luminal, para eliminar cualquier microorganismo que pudiera sobrevivir a nivel intestinal (OMS, 1996; Stanley, 2003). En caso de perforación intestinal o colitis amibiana fulminante, se administran también antibióticos para tratar de reducir las infecciones secundarias causadas por la microbiota intestinal (Stanley, 2003). Los fármacos sistémicos que se utilizan en la actualidad son los derivados de los 5-nitroimidazoles, entre los cuales se encuentran el metronidazol, ornidazol, timidazol y secnidazol; de los cuales, el más utilizado es el metronidazol (Upcroft *et al*, 1999; Stanley, 2003).

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

- **Patogénesis y factores de virulencia**

Mientras que la patogénesis de un organismo hace referencia a la capacidad para provocar daño, la virulencia es una característica que indica la severidad del daño provocado por el mismo parásito. En el caso de *E. histolytica*, se considera que es patógena debido a su capacidad para provocar amibiasis en su hospedero, que es el humano, mientras que su virulencia está relacionada con su capacidad de adherirse, colonizar e invadir un tejido, así como la evasión e inhibición del sistema inmune (Faust & Guillen, 2012). Diferentes estudios *in vitro* indican que el proceso patogénico de *E. histolytica* de

manera general consiste en la adhesión, lisis y fagocitosis de las células del hospedero (Stanley, 2001), así como la evasión a la respuesta inmune (Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016)

Se considera que el primer paso en la invasión es la adherencia de los trofozoítos a las células epiteliales del colon (Stanley & Reed, 2001). Para que esto suceda, el trofozoíto debe cruzar la barrera de moco que se encuentra recubriendo el epitelio intestinal, la cual está compuesta principalmente por agua y mucinas (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Las mucinas se encuentran altamente glicosiladas, lo que las protege de la degradación proteolítica y además funcionan como un señuelo para permitir que los patógenos se unan como si fuera su célula blanco (Cornick & Chadee, 2017). *E. histolytica* posee una gran cantidad de glicosidasas que podrían degradar a la capa de mucina, como son la sialidasa, N-acetilgalactosaminasa y N-acetilglucosaminasa; sin embargo, lo que se ha observado es que el parásito se une a la capa de moco a través de la lectina que se une a residuos de galactosa y N-acetil-D-galactosamina (conocida como lectina Gal/GalNAc) y comienza su degradación a través de la secreción de cisteína proteasas (CPs) (Cornick & Chadee, 2017). Además, la degradación de la mucina es una señal para que las células de Goblet hipersecreten mucina, induciendo al inicio un efecto paradójico de hiperproducción de moco, el cual eventualmente va a agotar al sistema, provocando que estas células sean incapaces de restablecer la capa de mucina, y por lo tanto, dejan desprotegidas y susceptibles a las células epiteliales a la invasión (Espinosa-Cantellano & Martínez Palomo, 2000; Moncada *et al*, 2003; Huston, 2004; Gómez *et al*, 2007; Cornick *et al*, 2016; Cornick & Chadee, 2017).

Una vez que se ha eliminado la barrera de mucinas, *E. histolytica* alcanza los enterocitos superficiales y se une a ellos a través de la lectina Gal/GalNAc (Espinosa-Cantellano & Martínez Palomo, 2000; Huston, 2004; Gómez *et al*, 2007); la cual se ha observado que está relacionada con el evento de citólisis dependiente de contacto (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Otras moléculas que participan en la adhesión de *E. histolytica* son una lectina de 220 kDa con capacidad de unión a oligosacáridos de N-acetilglucosamina, el complejo EhCPADH, una proteína rica en serinas (SREHP) y el lipofosfoglicano de superficie, entre otras (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Huston, 2004).

Una vez que se ha logrado la adhesión y el contacto con la célula blanco, ocurre una lisis celular, no sólo de las células blanco, sino también de linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Gómez *et al*, 2007). A través de diversos estudios se ha observado que para provocar la muerte celular se requiere del contacto con las células, influjo de calcio, la desfosforilación de tirosinas y la activación de la caspasa 3 de las células del hospedero, así como una remodelación del citoesqueleto de la amiba, aunque el mecanismo aún no se comprende de manera precisa (Ralston & Petri Jr, 2011). Uno de los grupos de proteínas que se ha observado que participan en la lisis celular son los “amebaporos”, los cuales son péptidos de 77 aminoácidos con capacidad de formar poros en la membrana. Existen tres isoformas, A, B y C, de las cuales la primera es la más abundante (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000), mientras que la última es la que presenta mayor actividad (Gómez *et al*, 2007). Este péptido es soluble en agua, pero rápidamente puede insertarse en la membrana, permitiendo el intercambio de agua, iones y otras moléculas pequeñas, lo cual provoca la lisis celular. Sin embargo, no se ha logrado demostrar su participación en el proceso de citólisis, ya que no son secretados de manera espontánea (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

Por otra parte, la descamación de capas superficiales de la mucosa deja particularmente susceptible a la invasión a las capas más profundas; esta invasión se da gracias al desplazamiento de la amiba mediante la extensión de pseudópodos hacia las capas basales del epitelio. Además, durante esta invasión, los trofozoítos deben lisar a las células adyacentes y degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC). Se cree que estos eventos están relacionados entre sí y posiblemente ocurre en ciclos de anclaje a la MEC, desplazamiento del trofozoíto y degradación de la MEC (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). La interacción de los trofozoítos con fibronectina y otros sustratos de la MEC provoca la reorganización del citoesqueleto de actina, induciendo la formación de placas de adhesión; este reconocimiento parece involucrar una proteína de unión a fibronectina de 37 kDa y un receptor tipo integrina de 140 kDa (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Por otro lado, las placas de adhesión están compuestas principalmente por filamentos de actina y cuatro proteínas de unión a actina: vinculina, α -

actinina, tropomiosina y miosina I (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Estas placas de adhesión no solamente son importantes en la adhesión y locomoción, sino que aparentemente participan también en la degradación de los componentes de la MEC, ya que se ha observado la presencia de actividad proteolítica en ellas (Vázquez *et al*, 1995). Otro mecanismo que influye en el proceso de invasión es el debilitamiento de las uniones estrechas del epitelio debido a la degradación de proteínas como ocludina, ZO1 y ZO2, provocado por un grupo de proteínas amibianas, entre las que se incluyen al complejo EhCPADH, EhCPs, EhSPs, EhPGE₂ y una proteína ocludina like (Betanzos *et al*, 2019).

Las cisteína-proteasas son las proteasas más abundantes en el parásito (EhCPs). Se han identificado 80 genes que codifican para proteasas, de las cuales, 50 son CPs (Faust & Guillen, 2012), y el 90 % de la actividad se debe a las EhCP1, 2 y 5 (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Stanley, 2001). Las EhCPs tienen actividad frente a una gran cantidad de sustratos, entre los que también se encuentran los componentes de la MEC (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000). Las EhCPs son secretadas por el trofozoíto y suelen encontrarse en grandes cantidades especialmente en el absceso hepático amibiano (Stanley, 2003). Por otro lado, se ha observado que EhCP5 participa en la inducción y activación de IL-8 e IL-1 β , que son citocinas proinflamatorias relacionadas con la inflamación y el daño tisular; así como en la disminución de la permeabilidad en monocapas celulares (Stanley, 2001).

Otra forma que tienen las amibas de provocar la muerte de las células es mediante la inducción de la apoptosis, lo cual además facilita la fagocitosis (Huston *et al*, 2003; Begum *et al*, 2015). Se sugiere que la apoptosis en las células del hospedero está mediada por la activación de la caspasa 3 en una manera dependiente de contacto, pero que es independiente a la activación de las caspasas 8 y 9 (Huston *et al*, 2003; Ralston & Petri Jr, 2011)

Una vez que se ha llevado a cabo la adhesión y la muerte celular, el siguiente factor de virulencia de importancia involucrado en el proceso patogénico es la fagocitosis. Particularmente *E. histolytica* es conocida por su gran capacidad fagocítica, ya que puede ingerir microorganismos que se encuentren en el intestino, así como células del hospedero,

ya sean de origen epitelial, del sistema inmune o del órgano en el cual se encuentren invadiendo (Okada & Nozaki, 2006). Desde el año 1983, Orozco y colaboradores encontraron que *E. histolytica* reducía considerablemente su virulencia si se reducía su capacidad de fagocitar eritrocitos (Orozco *et al*, 1983). Para que la fagocitosis se lleve a cabo, hay una serie de pasos bien coordinados, que inician con el reconocimiento de las partículas o células al receptor de superficie de la amiba; cuando esto sucede, los receptores activan una serie de eventos que incluyen la reorganización del citoesqueleto y la formación de pseudópodos, lo cuales se cierran alrededor del ligando y forman un fagosoma, el cual debe transportarse hacia el interior de la célula a través de la vía endocítica, para finalizar con la fusión con los lisosomas que permitirán la digestión de las partículas fagocitadas (Voigt & Guillen, 1999; Stanley & Reed, 2001; Okada & Nozaki, 2006).

Otro mecanismo patogénico relacionado con la ingestión de células es la denominada trogocitosis. Durante este fenómeno, las amibas ingieren pequeños pedazos de la membrana de su célula blanco, como si fueran “mordidas”, antes de provocar la muerte celular. Durante este proceso se ha observado que participan la lectina Gal/GalNAc, EhC2PK y la vía de señalización PI3K (Ralston, 2015).

Por otro lado, durante la invasión en el tracto digestivo se desencadena una respuesta inmune inflamatoria muy agresiva, lo que provoca daño tisular, el cual participa en la patogénesis de la amiba (Begum *et al*, 2015; Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016).

A pesar de que los mecanismos mediante los cuales, *E. histolytica* es capaz de evadir la respuesta inmune no se conocen completamente, se han descrito algunos que ayudan a entender este fenómeno. Por ejemplo, cuando las amibas destruyen la capa de mucina gracias a la participación de cisteína proteasas, y entran directamente en contacto con las células epiteliales del intestino, se desencadena una respuesta inflamatoria mediada por interleucinas como IL-1 β , IL-8 y TNF α , las cuales reclutan en el sitio de invasión a neutrófilos y macrófagos principalmente (Yu & Chadee, 1997). Los neutrófilos son activados por IFN γ , lo cual permite la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*), mientras que los macrófagos al activarse producen óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés *nitric oxide*). Sin embargo, el parásito es capaz de inhibir el

estallido respiratorio de los neutrófilos, además posee superóxido dismutasa y flavinóxidoreductasa que permiten destoxificar a las ROS, formando H₂O₂ (Sim *et al*, 2005); además posee una peroxiredoxina de superficie de 29 KDa con actividad antioxidante (Sim *et al*, 2005). La formación de NO por parte de los macrófagos es inhibida gracias a la presencia de una arginasa en la amiba que compite por el sustrato L-arginina para convertirlo en L-ornitina, disminuyendo la producción de NO (Elnekave *et al*, 2003). Otra característica de la evasión de la respuesta inmune es la capacidad de las amibas para producir apoptosis en las células de sus hospederos, así como de fagocitarlas o trogocitarlas (Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016). Finalmente, otro mecanismo de evasión a la respuesta inmune es la inhibición del sistema del complemento mediante la lectina GalGal/Nac, similar al CD59, que es un inhibidor natural del complejo de ataque a la membrana (MAC por sus siglas en inglés membrane attachment complex) (Begum *et al*, 2015). Las EcCPs también son capaces de degradar algunos elementos del sistema del complemento como C3a y C5a, los cuales además poseen propiedades proinflamatorias, reduciendo así también esta respuesta (Begum *et al*, 2015). Otro elemento que pueden degradar las CPs, son las inmunoglobulinas, ya sea IgA en la mucosa o IgG en circulación, lo cual le permite a las amibas colonizar el tracto digestivo, así como invadir a otros órganos; además, al eliminar a las IgGs de circulación, se disminuye también la activación del complemento por la vía clásica. Otro mecanismo que se ha descrito en *E. histolytica* para evadir la respuesta inmune es el *capping*, en el cual los anticuerpos que se unen a la membrana de la amiba, se organizan en parches y posteriormente son movilizados hacia el polo posterior del parásito, en una estructura que se denomina como uroide. Una vez que se encuentran ahí, los anticuerpos unidos a la superficie, de manera espontánea, son liberados hacia el medio extracelular como membranas vesiculares, y una pequeña parte de este cap es endocitado (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 1994; Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016).

Los eventos que se explicaron anteriormente son los de mayor relevancia en el proceso patogénico de la amiba, sin embargo, no son los únicos eventos relacionados. Por ejemplo, se ha observado que la respuesta al estrés y la respuesta a la depleción de glucosa también afectan a la virulencia de este parásito, aunque quizás de una manera menos directa (Faust

& Guillén, 2012). Por ejemplo, en 2006 Weber y colaboradores a través de un microarreglo observaron que existen diferentes genes que se regulan durante el choque térmico, entre los cuales se encuentran aquellos que codifican para las proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70 y de manera interesante se encontró también aumento en la expresión de algunas CPs como la 6 y la 4, mientras que otras disminuyeron su expresión como la 1, 2, 3 y 8 (MacFarlane *et al*, 2005; Weber *et al*, 2006; Tillack *et al*, 2007). En otros ensayos se observó que HSP70 aumenta su expresión tras el tratamiento con especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno como O₂, H₂O₂ y NO, lo cual permite la sobrevivencia de la amiba, pero no sólo eso, sino que también se ve aumentada su expresión durante la formación de abscesos hepáticos, relacionando a esta proteína con la capacidad de la amiba de producir daño en algunos tejidos (Guillén, 2023). Otro evento que está relacionado con la expresión de HSPs es la fagocitosis y se ha observado que cuando HSP90 es bloqueada por medio de fármacos, la capacidad fagocítica de la amiba disminuye hasta en un 60% (Singh *et al*, 2015); además esta misma proteína se acumula en los pseudópodos y en las copas fagocíticas, sugiriendo que puede participar en la motilidad y el inicio de la fagocitosis (Singh *et al*, 2015). Finalmente, en otro estudio Tovy y colaboradores observaron que las amibas que se encuentran en condiciones limitantes de azúcar presentan un incremento en la capacidad hemolítica, el efecto citopático y en la adherencia a las células, sugiriendo que, bajo estas condiciones de estrés, la amiba incrementa su virulencia para poder sobrevivir (Tovy *et al*, 2011).

ANTECEDENTES

- **Modificaciones postraduccionales**

Se define como modificación postraducciona (PTM por sus siglas en inglés posttranslational modification) al procesamiento de una proteína después de haber sido sintetizada, lo cual produce un cambio en su estructura y dinámica. Estas modificaciones pueden tener como resultado un cambio en su actividad, localización, estabilidad e interacción con otras proteínas y con ácidos nucleicos (Mann & Jensen, 2003; Ramazi & Zahiri, 2021).

Las PTMs se consideran irreversibles, cuando el cambio se produce en una sola dirección, como lo es el caso de cortes proteolíticos, donde una vez que se escinde una porción de la cadena peptídica, no hay forma de recuperar ese enlace (Ramazi & Zahiri, 2021). Ejemplo de este tipo de modificación se da en los zimógenos, que son formas inactivas de las enzimas que se activan por medio del corte de un polipéptido (Saraswathy & Ramalingam, 2011). Por otra parte, también existen las PTMs reversibles, que generalmente abarcan a todas las modificaciones dadas por la formación de un enlace covalente con un grupo funcional adicional (por ejemplo, un grupo fosfato, acetilo, metilo y ubiquitina, entre otros), el cual se puede agregar sobre uno o varios residuos de aminoácidos en la proteína blanco (Ramazi & Zahiri, 2021). Se ha descrito que existen más de 400 PTMs (Khoury *et al*, 2011), de las cuales la metilación se encuentra entre las 24 principales (Ramazi & Zahiri, 2021).

La metilación es una PTM reversible, que se ha relacionado con diversas funciones celulares, entre las que destacan vías de señalización que regulan el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y el destino celular y en algunos casos se relaciona con procesos patológicos como el cáncer (Biggar & Li, 2015). En esta modificación se transfieren grupos metilo desde un donador (regularmente S-adenosil-metionina; SAM por sus siglas en inglés) a un residuo aminoacídico de una proteína, el cual puede ser lisina, arginina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glicina, ácido glutámico, glutamina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina y prolina; sin embargo, los residuos de lisina y arginina son los principales blancos de esta modificación (Schubert *et al*, 2003; Ramazi & Zahiri, 2021).

- **Metilación de lisinas**

Las enzimas encargadas de la transferencia de grupos metilo desde el SAM hasta los residuos de lisina, se denominan metiltransferasas de lisina (PKMTs por sus siglas en inglés *protein lysine (K) methyl transferases*) y se agrupan dentro de la clase V de metiltransferasas (Schubert *et al*, 2003). Las PKMTs pueden transferir de uno a tres grupos metilo en el grupo amino ϵ de los residuos de lisina (Figura 5) (Luo, 2018). Estructuralmente, las PKMTs poseen un dominio SET, a excepción de las proteínas Dot1/Dot1L, que metilan la lisina 79 de la región globular de la histona 3 y que estructuralmente no están relacionadas con la familia SET (Dillon *et al*, 2005; Lee *et al*, 2005).

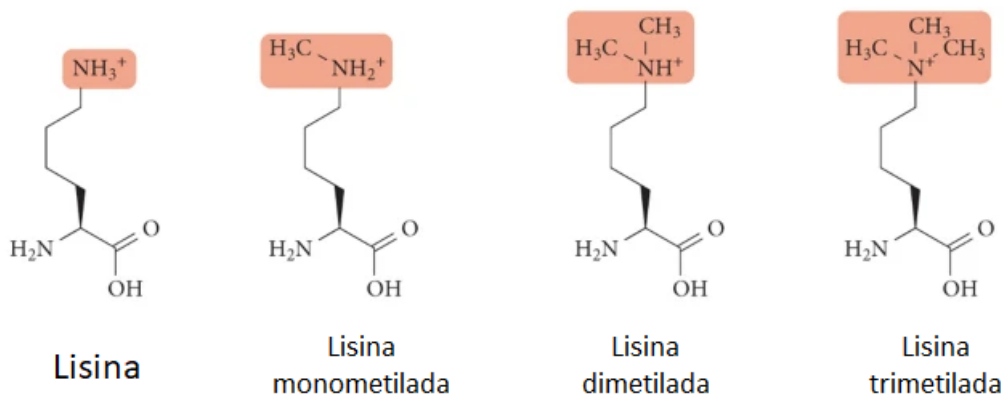


Figura 5. Metilación de residuos de lisina.

La metilación de lisinas se lleva a cabo en el nitrógeno del grupo amino ϵ , y puede ocurrir en tres niveles diferentes dependiendo el número de grupos metilo que se adicionen, que pueden ser uno, dos o tres.

Modificado de: Biggar & Li, 2015.

El dominio SET se describió por primera vez como una secuencia conservada en tres proteínas de *Drosophila melanogaster*: el supresor de variegación 3-9 (Su(var)3-9), que es un modificador de posición-efecto de variegación, el potenciador de Zeste (E[z] por sus siglas en inglés) que es un regulador de cromatina del grupo polycomb; y trithorax (Trx), que es un regulador de cromatina del grupo de trithorax (Qian & Zhou, 2006). El dominio SET se han encontrado en todos los organismos eucariontes que se han estudiado y está conformado por aproximadamente 130 aminoácidos (Dillon *et al*, 2005). Dentro del dominio SET, se encuentran tres motivos conservados: GxG, NHxCxPN y ELxFDYI (Qian & Zhou, 2006), que le sirven a la proteína para llevar a cabo su actividad catalítica. La familia SET, se puede clasificar en siete subfamilias de acuerdo con los motivos que se encuentran flanqueando al dominio SET (Dillon *et al*, 2005). Estos motivos son preSET (o nSET), el cual ayuda a mantener la estabilidad estructural, interactuando con diferentes superficies del dominio SET; y el dominio postSET (o cSET), el cual puede formar parte del sitio activo catalítico, a través de la interacción con un residuo aromático que genera un canal hidrofóbico (Qian & Zhou, 2006). Sin embargo, estos motivos no se encuentran conservados e incluso pueden estar ausentes en las proteínas con dominio SET (Dillon *et al*, 2005; Qian & Zhou, 2006).

La estructura de las proteínas de la familia SET (Figura 6) se ha determinado con base en los cristales de dos miembros de la familia SUV39 (DIM-5 de *Neurospora crassa*, y CLR4 de *Schizosaccharomyces pombe*). Dicha estructura revela la presencia de un pliegue β que no se había descrito previamente, el cual tiene una serie de cadenas β curvadas que forman varias hojas pequeñas empacadas junto con los dominios pre- y post-SET (Dillon *et al*, 2005).

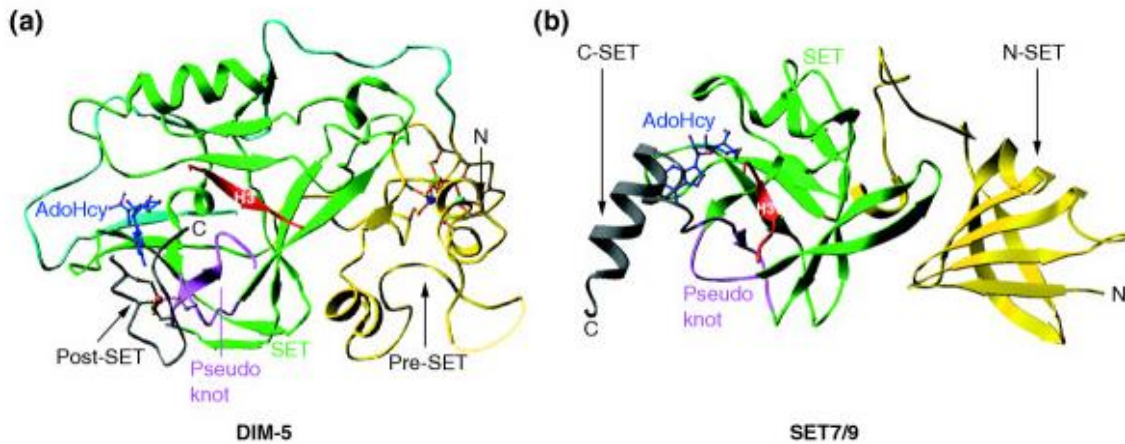


Figura 6. Ejemplos representativos de estructuras que contienen el dominio SET.

(a) DIM-5 de *Neurospora crassa* (código 1PEG.pdb de Protein DataBank)

(b) SET 7/9 humana (1O9S.pdb).

Se indican los dominios pre-SET, SET y post-SET en DIM-5 y los dominios N-SET, SET y C-SET de SET7/9. Se ilustran el pseudonudo formado por dos motivos conservados de SET y el péptido unido de histona 3. El bioproducto de la reacción AdoHcy se representa adherido y los iones de Zinc se muestran como pelotas. N: amino terminal, C: carboxilo terminal.

(Tomado de: Dillon *et al*, 2005)

Durante sus primeros años de estudios, se creía que las PKMTs eran específicas de histonas y los estudios se centraban en caracterizar los efectos que tenían estas modificaciones sobre la regulación de genes; sin embargo, años después se describió que existen otras proteínas que son blancos de metilación y cuya función se relaciona con una gran cantidad de procesos celulares (Moore & Gozani, 2014; Wu *et al*, 2017).

La metilación de histonas está relacionada con la regulación epigenética, la cual se define como la regulación de genes por cambios en la estructura de la cromatina, lo cual modifica la accesibilidad de los complejos transcripcionales y polimerasas a la cromatina, ya sea por la modificación del DNA o de las proteínas asociadas a este, principalmente las histonas. Las histonas pueden sufrir cambios postraduccionales para formar eucromatina (cromatina abierta y accesible para la transcripción) o heterocromatina (cromatina compacta e inaccesible para la transcripción) (Croken et al, 2012).

Las histonas son proteínas que forman octámeros alrededor de los cuales se enrolla el DNA (nucleosoma) para darle estabilidad (Recillas & Escamilla, 2004; Croken et al, 2012). Generalmente en las histonas, el extremo amino terminal sobresale del nucleosoma y por lo tanto es blanco de varias PTMs (Rice & Allis, 2001). Las histonas poseen más de 50 sitios de modificación y éstas pueden ser metilación, citrulinación, acetilación, fosforilación, sumoilación y ADP-ribosilación, entre otras (Arzate-Mejía et al, 2011; Leinhart & Brown, 2011). La combinación de diferentes modificaciones postraduccionales de histonas, dan lugar a un “código de histonas” y resultan en diferentes eventos nucleares (Leinhart & Brown, 2011). Las funciones de varias modificaciones postraduccionales de histonas parecen ser conservadas. En general, la acetilación de histonas está relacionada con la activación de genes y la metilación está asociada tanto con la activación como con la represión de genes, dependiendo el residuo de la histona que se metile (Croken et al, 2012). En contraste con otras enzimas que modifican las histonas, las metiltransferasas de lisina tienen una alta especificidad por los residuos que metilan (Völkel & Angrand, 2007). En general se ha observado que las marcas epigenéticas en H3K4 (histona 3, lisina 4), H3K36 (histona 3, lisina 36) y H3K79 (histona 3, lisina 79) están relacionadas con los genes transcripcionalmente activos, mientras que las marcas H3K9 (histona 3, lisina 9), H3K27

(histona 3, lisina 27) y H4K20 (histona 4, lisina 20) se relacionan con represión transcripcional (Völkel & Angrand, 2007; Leinhart & Brown, 2011).

Sin embargo, cabe resaltar que existen datos en mamíferos que indican que las metiltransferasas de lisina pueden tener otros sustratos además de las histonas y que esto cumple diferentes funciones, principalmente de regulación (Paik & Kim, 1971; Lanouette, 2014; Zhang *et al*, 2012; Cao *et al*, 2013). Entre estos sustratos se encuentran algunas proteínas relacionadas con la transcripción, como p53, E2F1, TAF10, el receptor de andrógenos (AR), p65 y Rel A (relacionados con activación de NF β B) y GATA, entre otros; proteínas que regulan la cromatina, moléculas que regulan la síntesis de proteínas, como EF1 α 1, metiltransferasas y desmetilasas como DNMT1 y 3, G9a y GLP; chaperonas como HSP90 y 70; y otras proteínas como calmodulina, RUBISCO (en plantas), y citrato sintasa (Huang & Berger, 2008; Donlin *et al*, 2012; Cao *et al*, 2013; Lanouette, 2014; Vermillion *et al*, 2014; Giaccia, 2016). Además, se tiene evidencia de la metilación de proteínas del citoesqueleto y la participación de diferentes metiltransferasas en la estructuración del mismo. Por ejemplo, se ha visto que en linfocitos T existe un complejo citosólico donde la PKMT Ehz2, regula la polimerización de actina y se ha relacionado con la activación de este tipo de células (Su *et al*, 2005). Otros estudios han demostrado que, en humano, la tubulina se encuentra metilada por SETD2 (Park *et al*, 2005). Finalmente, en otro trabajo se demostró que Smyd2 metila a la proteína chaperona Hsp90, la cual a su vez forma un complejo con la titina en el sarcómero (Donlin *et al*, 2012).

La metilación de proteínas no histonas también se ha observado en parásitos. Por ejemplo, se ha observado que en *Acanthamoeba castellani* la actina se encuentra dimetilada (Weihsing & Korn, 1970). Por otro lado, en *Toxoplasma gondii* se ha observado que una metiltransferasa de lisina (AKMT) está involucrada en la motilidad del parásito, metilando alguna proteína en el citoplasma, aunque hasta la fecha no se ha logrado reconocer a su sustrato (Heaslip, 2011; Sivagurunathan, 2013).

- **Metiltransferasas de lisina en *E. histolytica***

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

En 2016, Borbolla y colaboradores (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016) encontraron en el genoma de *E. histolytica*, cuatro genes que codifican para metiltransferasas de lisina, las cuales llamaron EhHKMT1, EhHKMT2, EhHKMT3 Y EhHKMT4 (actualmente se usa la nomenclatura EhPKMT1-4). Las cuatro PKMTs se expresan en los trofozoítos y al menos EhPKMT1, 2 y 4 se encuentran en el núcleo y dispersas en el citoplasma (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016), así como en prolongaciones citoplásmicas (Munguía-Robledo, 2018). Mediante ensayos *in vitro* utilizando EhPKMTs recombinantes y como sustrato histonas comerciales, se encontró que EhPKMT1 cataliza la dimetilación de la lisina 20 de la histona 4, EhHPMT2 cataliza la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3, y EhPKMT4 cataliza la trimetilación de la lisina 20 de la histona 4 (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016). Sin embargo, no se ha confirmado aún si estas enzimas realizan las mismas modificaciones en las histonas amibianas.

Adicionalmente, se encontró que EhPKMT2 y EhPKMT4 se relocalizaron hacia las bocas y las vacuolas fagocíticas después de 20 minutos de fagocitosis y además cambian los niveles de expresión de estas proteínas durante este evento (Munguía-Robledo, 2018). En un análisis *in silico* del interactoma realizado con PKMTs de humano (*Homo sapiens*) homólogas a las PKMTs de *E. histolytica*, se encontró que estas pueden interactuar, entre otras proteínas,

con la actinina (Hernández-Acatitla, 2017), que es una proteína de unión a actina y a varias proteínas asociadas al citoesqueleto (Sjöblom et al, 2008). También se hizo un experimento de co-localización de estas dos metiltransferasas con EhADH, proteína que también es reclutada a los 20 minutos de fagocitosis alrededor de los fagosomas, y se observó que, en efecto, estas enzimas co-localizan, lo que sugiere que estas enzimas están involucradas en la formación de fagosomas (Borbolla-Vázquez, 2016).

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

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el estudio de la metilación de lisinas tanto en histonas como en otras proteínas ha tomado importancia, debido a que estas modificaciones postraduccionales regulan diversas funciones celulares en varios organismos, ya sea mediante el control epigenético o a través de la metilación de proteínas en el citoplasma. En algunos parásitos se ha observado que dentro de las funciones en las que están involucradas las metiltransferasas de lisina se encuentran la regulación del ciclo celular, la expresión de genes de virulencia y la participación en la motilidad y resistencia a estrés oxidativo.

En nuestro grupo de trabajo se describió previamente la presencia de cuatro metiltransferasas de lisina en *E. histolytica* (EhPKMT1-4), de las cuales EhPKMT2 previamente se ha demostrado su participación en eventos patogénicos como la eritrofagocitosis. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la función de esta enzima en este microorganismo. El estudio del papel de estas enzimas en este protozooario resultaría importante, no sólo para comprender la biología del parásito, sino también para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

HIPÓTESIS

Debido a su localización nuclear y citoplásmica, EhPKMT2 está involucrada en los mecanismos de virulencia y respuesta a estrés en *E. histolytica*.

OBJETIVO GENERAL

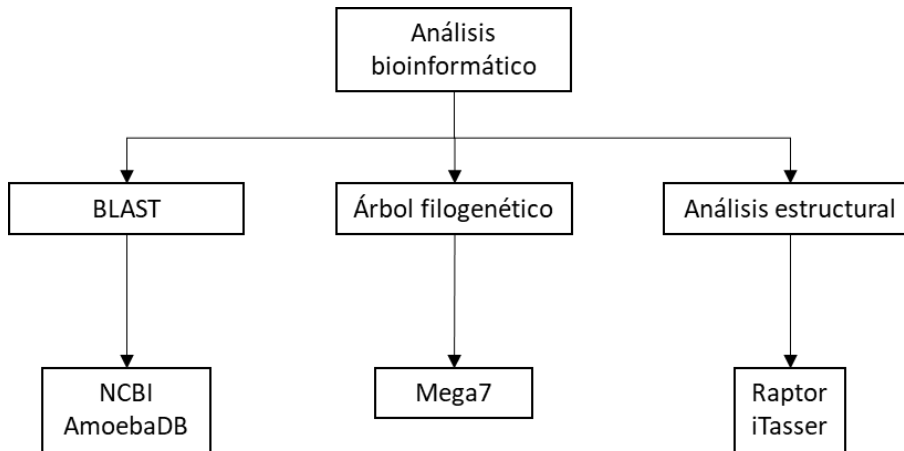
Analizar la participación de EhPKMT2 en los mecanismos de virulencia y respuesta a estrés de *Entamoeba histolytica*

OBJETIVOS PARTICULARES

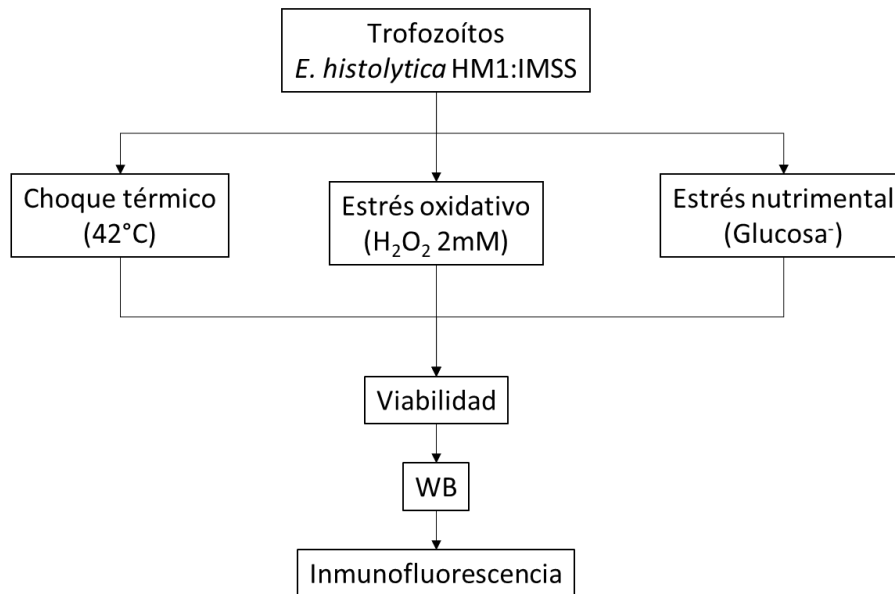
1. Realizar un análisis bioinformático de la proteína EhPKMT2.
2. Evaluar la expresión de la proteína EhPKMT2 bajo condiciones de estrés.
3. Determinar el efecto del silenciamiento de *Ehpkmt2* sobre algunos mecanismos de respuesta al estrés y de virulencia de *E. histolytica*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

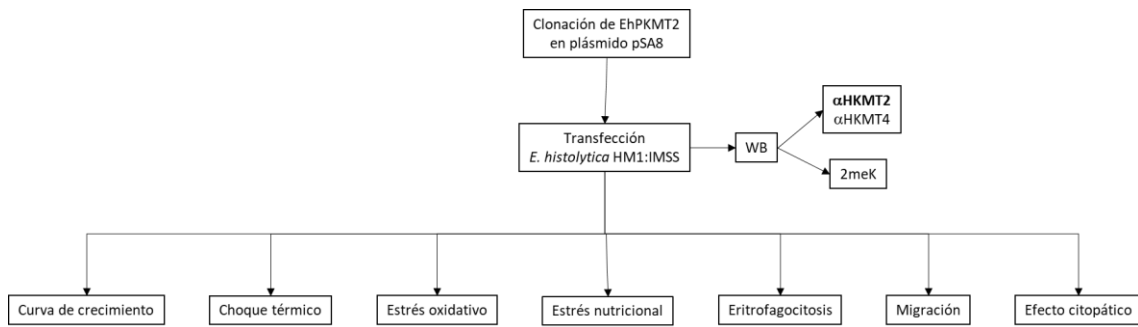
Objetivo 1. Realizar un análisis bioinformático de la proteína EhPKMT2.



Objetivo 2. Evaluar la expresión de la proteína EhPKMT2 bajo condiciones de estrés.



Objetivo 3. Determinar el efecto del silenciamiento de *Ehpkmt2* sobre algunos mecanismos de respuesta al estrés y virulencia de *E. histolytica*.



METODOLOGÍA

- **Análisis bioinformático**

El análisis bioinformático se inició por medio de un BLAST en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando como secuencia molde la proteína EhPKMT2 para buscar a las proteínas más relacionadas y a partir de estos datos se construyó un árbol filogenético con el programa Mega7 (<https://www.megasoftware.net/>). Posteriormente con la misma secuencia molde, se realizó un BLAST en la base de datos AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>) para buscar las proteínas relacionadas en otras especies del género *Entamoeba* y con ello construir otro árbol filogenético, utilizando también el programa Mega7. Los alineamientos se llevaron a cabo con el programa Clustal Omega, disponible en línea (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), mientras que la búsqueda de dominios se llevó a cabo con el programa SMART, disponible en línea (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Los análisis estructurales se realizaron con el software en línea RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y el programa I-Tasser, también disponible en línea (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Las estructuras tridimensionales se observaron y se analizaron utilizando el software UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu>) y el software Ramachandran Plot (<https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/ramaplot.html>).

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

Los trofozoítos de la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica* se cultivaron de forma axénica a 37 °C en medio TYI, suplementado con suero bovino al 15 % inactivado a 56 °C durante 30 min, 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (KC Biologica), 40 UI de penicilina/ml (Lakeside) y 57 µg/ml de estreptomicina (Lakeside) (medio TYI-S-33). Los trofozoítos se cosecharon a partir de cultivos confluentes, los cuales se incubaron durante 10 min a 4 °C para desprender las células de la caja de cultivo. Después, los parásitos se recolectaron en tubos y se centrifugarán a 1000 x *g* por 5 min. Una vez centrifugado, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7

mM; Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 10 mM, pH 6.8) frío y estéril. Este paso se repitió dos veces más para lavar los trofozoítos.

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

Los trofozoítos se cosecharon y se resuspendieron en PBS frío y estéril como se describió anteriormente. Posteriormente se les añadió 15 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (2 mM benzamidina, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml pepstatina A, 5 µg/ml leupeptina y 10 µg/ml E-64). La suspensión celular se congeló en nitrógeno líquido por 3 min y se agitó vigorosamente por 2 min en el vórtex, para lisar a las células. Este proceso se repitió 2 veces más, hasta que la muestra se lisó completamente. La cuantificación de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) y las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE.

- **Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida**

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

- **Western blot**

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), previamente equilibradas en solución de transferencia, en una unidad de electrotransferencia (Bio-Rad), de la siguiente manera: ánodo, esponja, papel filtro Whatman, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman, esponja y cátodo. A la cámara se le añadió solución de transferencia fría y se colocó en un baño de hielo para transferir las proteínas a 250 mA por 2 h. Pasado este tiempo, se desmontó la cámara de electrotransferencia y la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% y ácido acético 1%), para verificar la transferencia de las proteínas. A continuación, la membrana se incubó con solución bloqueadora (leche al 3% en PBS) toda la noche a 4°C en agitación. Para la inmunodetección de PKMTs, se utilizaron anticuerpos generados utilizando a los péptidos específicos como antígenos (Borbolla-Vázquez, 2016) a una dilución de 1:500 en PBS leche 1%. Para la detección de actina, como control de carga, se usó un anticuerpo comercial (Santa Cruz), a una dilución 1:3000 en TBS con leche al 1%. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación. Posteriormente se realizaron cinco lavados de 10 min, con PBS-Tween 0.5 %. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario α conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1:10000 en leche al 3% en PBS-Tween 0.5 % o un anticuerpo α -ratón acoplado a peroxidasa 1:5000 en TBS, según corresponda. Al término de la incubación se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 0.5 %, como se describió anteriormente. La unión antígeno-anticuerpo se reveló con el método quimioluminiscente (ECL, Amersham), con el protocolo recomendado por el fabricante en un documentador de proteínas (MicroChemie, DNR Bio-Imaging system). El análisis densitométrico para la cuantificación de proteínas se realizó con el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>).

- **Inmunofluorescencia y microscopía confocal.**

Para evaluar la localización de EhPKMT2 en cada una de las condiciones, los trofozoítos fueron tratados como correspondía para cada ensayo. Una vez realizado el estímulo, las células se fijaron con metanol frío durante 5 min y la reacción se detuvo con la adición de 1 ml de PBS. El tubo se centrifugó a 5000 x g por 10 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente la suspensión se lavó 2 veces con PBS y se eliminó el sobrenadante. Para bloquear los sitios de unión inespecíficos, las laminillas se incubaron con suero fetal bovino al 10% en PBS durante 1h a 37 °C. A continuación, se lavó el paquete celular dos veces con PBS, después se le agregó el anticuerpo primario (α EhPKMT2) a una dilución de 1:50 y se incubó durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se lavó dos veces con PBS y después se incubó con el anticuerpo secundario α -conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich) durante 1.5 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se lavó dos veces con PBS y se tomó una alícuota de 10 μ l que se mezcló con 10 μ l solución de montaje DABCO-PVA (DABCO 2.5%, PVA 10%, glicerol 5% y Tris 25 mM pH 8.7) con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), la cual se montó en un portaobjetos. Las muestras se examinaron por microscopía confocal en un microscopio Carl Zeiss LSM 700. Aproximadamente 20 secciones ópticas de grosor variable fueron documentadas y analizadas con el software ZEN 2009 software (Carl Zeiss).

- **Obtención de DNA genómico**

La obtención del DNA genómico de *E. histolytica* se realizó utilizando el kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm y la integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1%.

- **Obtención de DNA plasmídico**

El vector de silenciamiento para *E. histolytica* pSA8 modificado (Ankri *et al*, 1998) (Figura 7), amablemente proporcionado por el Dr. Serge Ankri de la Facultad de Medicina del Technion de Haifa, Israel, así como las construcciones que se generaron en este trabajo se obtuvieron mediante la técnica de lisis alcalina. Para esto, se tomó una colonia de *E. coli* DH5 α transformada con cada plásmido y se inoculó en 10 ml de medio LB adicionado con 10 μ l de ampicilina (100 μ g/ μ l), el cual se incubó a 37 °C a 180 rpm durante 16 a 18 h. Las células se transfirieron a un microtubo y se centrifugaron a 13,000 x g a 4 °C durante 5 min; el sobrenadante se desechó y se repitió este paso con todo el volumen del cultivo, hasta obtener una pastilla de células, la cual se resuspendió en 100 μ l de solución GTE (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) fría. Después se le adicionaron 200 μ l de solución de lisis alcalina (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se agitó suavemente y se incubó 5 min a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 150 μ l de solución de acetato de potasio 5 M, el cual se mezcló por inversión suave y se incubó 5 min más a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 14000 x g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio, se le adicionaron 400 μ l de solución de fenol saturado/cloroformo (1:1 v/v) y se centrifugó a 14000 x g a 4°C durante 2 min y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío, se incubó 1 h a temperatura ambiente, se centrifugó a 14000 x g durante 5 min a 4°C y se decantó el etanol. El DNA plasmídico se lavó 2 veces con 1 ml etanol al 70% frío y se centrifugó a 14 000 x g durante 5 min. De nuevo se decantó el alcohol y la pastilla se dejó secar hasta que todo el etanol se evaporó. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 μ l de agua estéril y se almacenó a – 20 ° C hasta su uso. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm. La integridad del DNA plasmídico se confirmó en geles de agarosa al 1%.

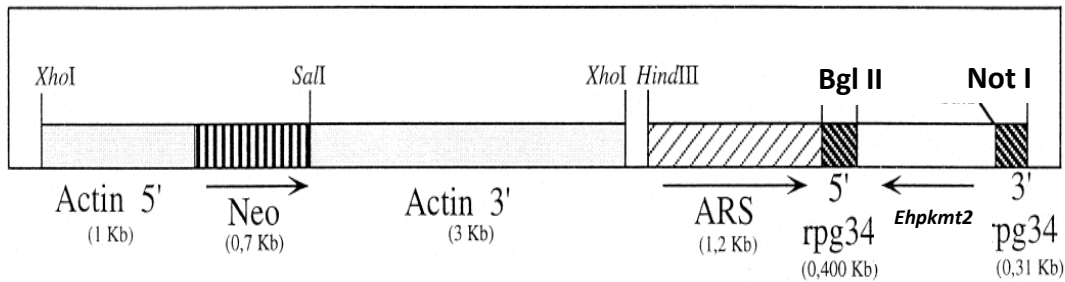


Figura 7. Vector pSA8 (modificado). Mapa del vector (Ankri *et al*, 1998) que se utilizó para el silenciamiento de *Ehpkm2*. Actin 5' y Actin 3', región ría arriba y río abajo, respectivamente, del gen de actina de *E. histolytica*. Neo, gen de resistencia a neomicina. ARS, sitio de replicación autónoma. rpg34 5'y rpg34 3', región ría arriba y río abajo, respectivamente, del gen de la proteína ribosomal rpL21 (copia rpg34) de *E. histolytica*.

- **Diseño de iniciadores**

Para el silenciamiento del gen *Ehpkm2* (EHI_0698080, 1317 pb) se diseñaron iniciadores con la ayuda del sitio de internet <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx> y del programa Oligo Explorer, con las siguientes características:

- 1) El cebador sentido contiene las primeras 22 bases codificantes del gen, la secuencia de corte reconocida por la enzima *Not I* (GCGGCCGC), y cuatro bases más (CCCC) para el adecuado posicionamiento de la enzima de restricción (Tabla 1).
- 2) El cebador anti-sentido contiene la secuencia complementaria a los últimos 7 codones del gen, la secuencia de corte reconocida por la enzima *Bgl II* (AGATCT), y cuatro bases más (CCCC) para el adecuado posicionamiento de la enzima (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de iniciadores utilizados para el silenciamiento del gen *Ehpkmt2*

Iniciadores	Secuencia
<i>Ehpkmt2</i> -sil sentido	5'-CCCCGCGGCCGCATGGATTTTTTCGTTAAAATATC-3'
<i>Ehpkmt2</i> -sil antisentido	5'-CCCAGATCTATACTCAACATATTCAGTATA-3'

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

La PCR de punto final de los genes de interés se realizó utilizando DNA genómico amibiano o DNA plasmídico como molde y los iniciadores previamente diseñados. Se utilizaron 300 ng de DNA genómico o 30 ng de DNA plasmídico, 10 mM de oligonucleótidos, 10 mM dNTP's (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5 µl de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 1 U de enzima Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) y agua libre de nucleasas, para completar un volumen final de 50 µl. Como control negativo se utilizó la misma mezcla de reacción, pero sin DNA molde. La amplificación se realizó en un termociclador (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems), bajo las condiciones que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para PCR de punto final.

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

- **Electroforesis en geles de agarosa**

Para visualizar el DNA, se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1%, preparados con TAE (40 mM Tris acetato y 1mM EDTA, pH 8.0). A las muestras se les adicionó amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y la electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 70 V por 60 min. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante 2 min, se lavaron con agua bidestilada y el DNA se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV (UVP, USA).

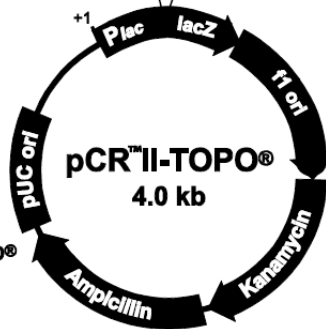
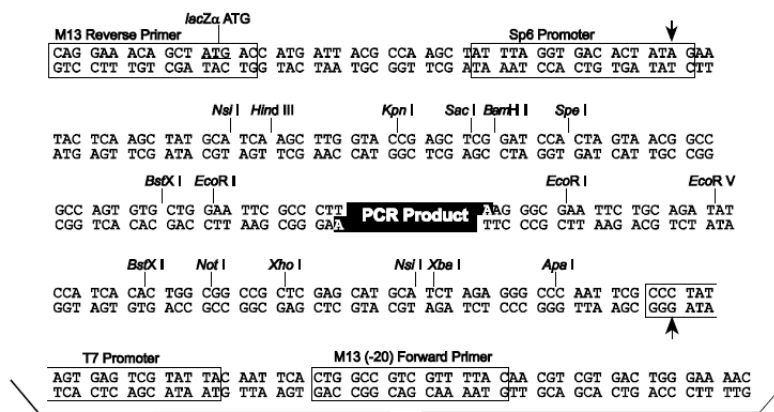
- **Purificación del DNA a partir de geles de agarosa**

Las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA de interés se purificaron con el kit Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) bajo las condiciones del fabricante, que se explican brevemente. Los fragmentos de DNA se cortaron del gel de agarosa y se pesaron. Posteriormente se añadieron tres volúmenes de amortiguador QG por cada volumen de gel y las muestras se incubaron a 50 °C por 10 min para disolver la agarosa. Después, se añadió un volumen de isopropanol igual al volumen del gel, se mezcló y se transfirió a una columna Qiaquick spin column (Qiagen), la cual se centrifugó a 18000 x g durante 60 s. La columna se lavó con 0.5 ml de amortiguador QG, se centrifugó y se añadieron 0.75 ml de amortiguador PE, este paso se repitió dos veces para remover los residuos de etanol y del amortiguador PE. El DNA se eluyó con 50 µl de agua estéril y se centrifugó a 18000 x g. Finalmente, el DNA se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

- **Clonación en vector de tránsito pCRII TOPO**

El gen de interés (*Ehpkmt2*) se clonó en el vector de tránsito pCRII TOPO (Invitrogen) (Figura 8). Para esto, primero se llevó a cabo una PCR como se describió anteriormente, para obtener el gen de interés y se corrió en un gel de agarosa al 1%, para purificar la banda

del tamaño esperado. Una vez purificado el DNA, se mezclaron de 0.5 a 4 μ l del producto de PCR, 1 μ l de solución de sales (NaCl 1.2 M y MgCl₂ 60 mM) y se adicionó agua hasta un volumen final de 5 μ l. Posteriormente, a esta mezcla de reacción se le adicionó 1 μ l de del vector y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Esta mezcla se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α .



**Comments for pCRII-TOPO®
3973 nucleotides**

- LacZ α* gene: bases 1-589
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-383
- T7 promoter: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- f1 origin: bases 590-1027
- Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
- Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033

Figura 8. Vector pCRII-TOPO. Mapa del vector de tránsito, donde se indica el sitio de inserción del gen de interés. Posee un gen para resistencia a ampicilina y otro para resistencia a kanamicina.

- **Digestión**

El plásmido de silenciamiento pSA8, así como el vector de tránsito pCRII TOPO-*pkmt2*, se sometieron a una doble digestión con las enzimas *NotI* y *BglII* para la liberación de los insertos. Para esto se incubó 1 µg de DNA plasmídico con 1 ml de cada una de las enzimas y su amortiguador correspondiente, en un volumen final de 50 µl. Las mezclas se incubaron por 4 h a 37 °C. Los productos digeridos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y las bandas de interés se purificaron como se describió previamente.

- **Ligación en el vector pSA8**

Los fragmentos de DNA digeridos y purificados se ligaron en una proporción de 1:3 (vector: inserto). La mezcla de ligación se realizó en un volumen final de 10 - 15 µl, conteniendo 50 ng del plásmido previamente digerido y la cantidad necesaria del inserto para tener la relación molar deseada, 1 µl (100 unidades) de T4 DNA ligasa (Invitrogen), 2 µl de amortiguador T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen) y agua libre de nucleasas para completar el volumen de reacción. La reacción se incubó de 16-18 h a 16 °C. En este ensayo se utilizó como control negativo la misma reacción, pero sin el inserto. Después de la reacción, las mezclas se utilizaron para la transformación de bacterias *E. coli* DH5α. A las colonias que crecieron en el medio selectivo se les extrajo el DNA plasmídico y éste se analizó mediante PCR y a través de la digestión con las enzimas respectivas para confirmar la clonación del gen de interés.

- **Obtención de bacterias *Escherichia coli* DH5a competentes**

A partir de un cultivo de *E. coli* DH5α, se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de medio LB, se incubó a 37 °C en agitación durante 16 a 18 h. Posteriormente, 500 µl de este cultivo se inoculó en 40 ml de medio LB, el cual se incubó a 37 °C a 180 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4 - 0.5, a 600 nm. Una vez obtenida esta DO, se colectó el cultivo en un tubo limpio y estéril que se mantuvo a 4 °C por 10 min. Posteriormente, los tubos se

centrifugaron a 800 x g durante 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl₂ 50 mM estéril y frío y se incubó durante 20 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo, el tubo se volvió a centrifugar a 800 x g durante 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 4 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril. Las células se almacenaron a 4 °C hasta por 7 días o en alícuotas, que contenían 15% de glicerol a -70 °C.

- **Transformación de células competentes**

Para la transformación de bacterias, se utilizaron 200 µl de células competentes, a las cuales se les adicionó 5 µl de plásmido (con o sin inserto) y se dejaron incubando a 4 °C durante 30 min. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C durante 90 s e inmediatamente después se colocaron a 4 °C durante 3 min. Después, se les adicionó 500 µl de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37 °C y a 250 rpm, para permitir que se recuperaran. Posteriormente, se sembraron en cajas Petri con agar LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 12 a 18 h.

- **Transfección de trofozoítos amibianos**

Para llevar a cabo la transfección se mezclaron 20 µl de lipofectamina Superfect (Qiagen), 20 µg de plásmido con o sin inserto (control negativo) y 100 µl de medio M199 (Sigma). La mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió esta mezcla a una suspensión de 5×10^5 trofozoítos en 1.5 ml de medio M199, suplementado con 15% de suero bovino de adulto. Entonces, las mezclas se colocaron en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 4 h. Pasado el tiempo, las amibas se transfirieron a un tubo con medio TYI-S-33 y después de 48 h de incubación a 37 °C se les agregó 1 µg/ml de G418. La dosis de fármaco se incrementó progresivamente cada dos días, hasta que alcanzó una concentración de 40 µg/ml.

- **Curva de crecimiento**

Para realizar la curva de crecimiento, se inocularon 2×10^5 trofozoítos transfectados con la construcción correspondiente o sin transfectar en 3 tubos que contenían 10 ml de medio TYI-S-33 y se incubaron a 37 °C. Cada 24 h se tomó una alícuota de 10 μ l en condiciones asépticas y se mezcló con 10 μ l de azul tripano y se colocaron en una cámara de Neubauer para su conteo. La viabilidad se evaluó por criterio de exclusión de azul tripano.

- **Eritrofagocitosis**

Se obtuvo una muestra de sangre humana (tipo O+) por punción venosa, utilizando como anticoagulante la solución de Alsever (ácido cítrico 0.55 %, citrato de sodio 0.8%, NaCl 0.42%, glucosa 0.1 M, pH 6.1). La muestra se centrifugó a 5 000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante que contiene los leucocitos y la pastilla con los eritrocitos se lavó dos veces con la misma solución. Posteriormente, los eritrocitos se pusieron en contacto con una suspensión de trofozoítos en medio TYI sin suero, para quedar a una proporción de 1:50 (trofozoítos: eritrocitos) y se incubaron a 37 °C durante 0, 10, 20 y 30 min. Transcurrido el tiempo, las muestras se incubaron por 10 min con agua destilada, para lisar a los eritrocitos que no fueron ingeridos. Los trofozoítos se recuperaron por centrifugación a 400 x g durante 5 min a 4 °C y se lavaron tres veces con PBS. Después, los trofozoítos se lisaron con 1 ml de ácido fórmico, y se cuantificó la hemoglobina de los eritrocitos ingeridos por espectrofotometría a 400 nm, utilizando como blanco ácido fórmico. Los ensayos se realizaron por triplicado, de manera independiente.

- **Migración**

Para el ensayo de migración celular se utilizaron 75,000 trofozoítos amibianos, los cuales se colocaron en la cámara superior de un transwell (Millipore) con medio TYI sin suero. En la cámara inferior se colocaron 500 μ l de medio TYI-S-33 (adicionado con 15% de suero). Las placas se incubaron por 4 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró la cámara superior

del transwell y la cámara inferior se colocó en hielo durante 10 min. Los trofozoítos que migraron a esta cámara inferior se contaron en un microscopio óptico

- **Efecto citopático**

Se cultivaron células epiteliales de la línea MDCK en placas de 24 pozos a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando las monocapas alcanzaron el 90% de confluencia celular, los trofozoítos se lavaron con PBS y se adicionaron 1 x 10⁵ a cada pozo, en medio TYI sin suero. La interacción celular se mantuvo a 37 °C durante 2 h. Para detener la acción citopática de las amibas, las placas se incubaron a 4 °C durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS. Entonces, las células epiteliales restantes se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS frío. Para evaluar la destrucción de las monocapas, las células remanentes se incubaron 10 min con 200 µl de azul de metileno al 1% en solución de boratos (BB) 0.01 M, pH 8.7 (100 ml de ácido bórico 0.2 M y 150 ml de tetraborato de sodio 0.05 M). Las células se lavaron tres veces con BB y el colorante captado por las células se extrajo con 1 ml de HCl 0.01 N durante 30 min a 37 °C. El colorante extraído se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm; estos experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes. Los valores de absorbancia de las monocapas celulares que no tuvieron contacto con los trofozoítos se consideraron como el 0% de destrucción, mientras que los valores de absorbancia de las monocapas que estuvieron en contacto con los trofozoítos sin transfectar se consideraron como el 100 % de destrucción.

- **Choque térmico**

Para el ensayo de choque térmico, los trofozoítos se lavaron como se describió anteriormente y se resuspendieron en PBS a una concentración de 5 x 10⁵ amibas/ml. Posteriormente, las amibas se incubaron a 42 °C durante 15, 30 y 60 min. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron 10 µl de la suspensión amibiana, se le adicionó 10 µl

de azul tripano y se realizó la cuenta de trofozoítos viables en cámara de Neubauer. Este experimento se llevó a cabo en tres experimentos independientes por triplicado.

- **Estrés oxidativo**

Para evaluar la resistencia al estrés oxidativo, se obtuvieron trofozoítos y se lavaron como se describió anteriormente. Posteriormente se colocaron 5×10^5 amibas en medio TYI sin suero con H_2O_2 2mM y se incubó a 37 °C a 15, 30, 45 y 60 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las amibas con PBS y se contó el número de células viables con la técnica de azul tripano que se describió anteriormente.

- **Depleción de glucosa**

Para evaluar la respuesta ante la disminución de glucosa, se obtuvieron trofozoítos y se lavaron como se describió anteriormente. Posteriormente se colocaron 5×10^5 amibas en medio TYI sin glucosa adicionado con suero y se incubaron a 37 °C durante 12, 24, 48 y 72 h. Transcurrido el tiempo correspondiente, se tomó una alícuota de 10 μ l en condiciones asépticas, se mezcló con 10 μ l de azul tripano y se contaron los trofozoítos viables en una cámara de Neubauer.

- **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se graficaron con el programa GradPad Prism V 5.01 y los valores representan la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat 3.5 y se empleó la prueba de ANOVA de una o 2 vías, donde la significancia fue de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

- *EhPKMT2* tiene homólogos en otras especies del género *Entamoeba* y está relacionada con proteínas de la familia SMYD y con AKMT

En 2016 Borbolla-Vázquez y colaboradores describieron la presencia de cuatro metiltransferasas de lisina putativas en el genoma de *E. histolytica*, las cuales poseen un dominio SET, el cual se analizó y se comparó con diferentes representantes de cada una de las 7 familias de proteínas con dominio SET descritas en mamíferos (Dillon, 2005). Ellos observaron que 3 de las 4 proteínas (*EhPKMT1*, 2 y 3) tienen una mayor relación filogenética con el miembro de la familia SMYD (por sus siglas en inglés *SET and MYND domain-containing proteins*) utilizado en ese análisis, mientras que *EhPKMT4* está más relacionada con *HsPRDM1* (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016).

Se sabe que las proteínas de la familia SMYD se caracterizan por metilar a la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), aunque también se ha observado que algunos de sus miembros metilan a la lisina 36 de la histona 3 (H3K36) y a la lisina 20 de la histona 4 (H4K20) (Tracy, *et al*, 2018). Por otra parte, a través del uso de proteínas recombinantes, se observó que *EhPKMT2* genera la marca de metilación H3K4me3 sobre histonas comerciales, mientras que *EhPKMT1* genera la marca H4K20me2 y *EhPKMT4* genera la marca H4K20me3 (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016). Por lo tanto, se decidió profundizar en la relación que existe entre las cuatro *EhPKMTs* y los cinco miembros de la familia SMYD. Para ello, se realizó un alineamiento del dominio SET de esas proteínas y se encontró que todos ellos tienen conservados los motivos GxG, NHxCxPN y ELxFDYI, característicos del dominio SET (Figura 9a) (Dillon *et al*, 2005; Qian & Zhou, 2006). Posteriormente, con la secuencia de las proteínas completas, se realizó un análisis filogenético, para ver si existía alguna relación particular entre las *PKMTs* de *E. histolytica* con las *PKMTs* de humano, sin embargo, no se observó ninguna relación específica entre estas proteínas (Figura 9b).

De las cuatro EhPKMTs, se decidió trabajar con EhPKMT2 debido a que en estudios previos se ha observado una posible relación con algunos factores de virulencia de la amiba como la eritrofagocitosis (Borbolla-Vazquez *et al*, 2016; Munguía-Robledo, 2018).

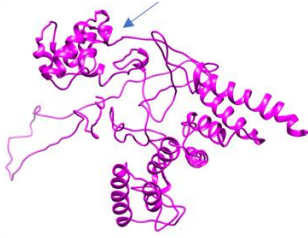
Así, para continuar con la caracterización de EhPKMT2, se realizó un análisis comparativo de su estructura tridimensional con otras proteínas estructuralmente similares, ya que se ha propuesto que la similitud estructural se puede relacionar con la función de las proteínas (Gherardini & Helmer-Citterich, 2008). La estructura tridimensional, así como las proteínas más relacionadas, se obtuvieron a través del software en línea iTasser y se analizaron por medio del programa Chimera y Ramachandran plot server. En la figura 10a se muestra la estructura de EhPKMT2, donde se observa que mantiene la estructura general de las proteínas con dominio SET, es decir, que poseen 7 láminas β , formando dos lóbulos y el dominio SET se encuentra en medio del lóbulo que contiene al extremo amino (Dillon *et al*, 2005; Schubert *et al*, 2006; Qian & Zhou, 2006). En la figura 10b se presenta el gráfico de Ramachandran, el cual muestra que 81.9% de los aminoácidos se encuentran dentro de las regiones favorecidas, quedando por debajo del 90%, que es el límite de calidad para tener un buen modelo (Laskowsky *et al*, 1993); sin embargo, este es el modelo que presentó el mayor porcentaje, dejando esta estructura como la que representa la mejor predicción estructural de la proteína.

Posteriormente, se realizó la comparación de la estructura putativa de EhPKMT2 con los cristales disponibles de PKMTs de otras especies, que presentaban la mayor relación estructural. El cristal con el que el modelo 3D de EhPKMT2 presentó mayor similitud fue el de la proteína llamada AKMT (por sus siglas en inglés *Apical Complex Lysine Methyltransferase*), la cual es una metiltransferasa atípica con dominio SET del parásito *Toxoplasma gondii* (Pivovarova *et al*, 2018) con un 15.5% de identidad estructural de la proteína completa y 19.1% de identidad estructural en el dominio SET (Figura 11a). El siguiente cristal con el que se presentó relación estructural fue con el de la proteína de mamífero SMYD1, con un 11.64% de identidad estructural de la proteína completa y un 14.02% de identidad con el dominio SET (Figura 11b). Como ya se mencionó anteriormente, la proteína AKMT es una metiltransferasa del parásito protozoario *T. gondii*, que regula la

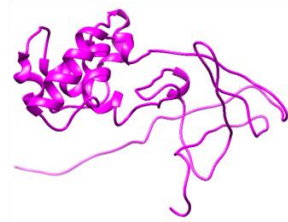
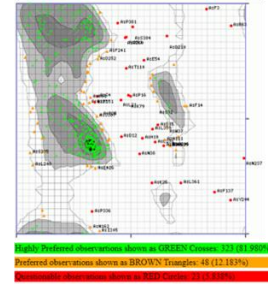
motilidad y controla la transición entre el comportamiento móvil e inmóvil del parásito (Heaslip *et al*, 2011). Por su parte, la proteína SMYD1 se encuentra involucrada en una amplia variedad de procesos biológicos, entre los que se destaca la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4) en el núcleo, aunque también participa en otros procesos como la función cardíaca y la migración endotelial durante la angiogénesis (Rueda-Robles, 2021). A pesar de la baja identidad estructural entre las proteínas, que es menor al 20%, no hay otras proteínas que presenten mayor identidad, por lo cual, es posible que EhPKMT2 esté relacionada con la motilidad del parásito, quizás a través de la metilación de proteínas citoplásmicas; pero también puede relacionarse con otros eventos de virulencia, a través de la generación de marcas epigenéticas.

A

Proteína completa



Dominio SET

**B****Figura 10. Modelo tridimensional de EhPKMT2.**

En la figura se muestra el modelo tridimensional predicho utilizando el programa iTasser.

(A) En el panel izquierdo se presenta el modelo de la proteína completa, indicando con una flecha la localización del dominio SET dentro de la proteína. En el panel derecho, se encuentra la estructura únicamente del dominio SET. (B) El gráfico de Ramachandran para el modelo de EhPKMT2 muestra en verde los aminoácidos que se encuentran dentro de las regiones más favorecidas, con anaranjado los residuos dentro de regiones favorecidas y con rojo aquellos aminoácidos que no están favorecidos.

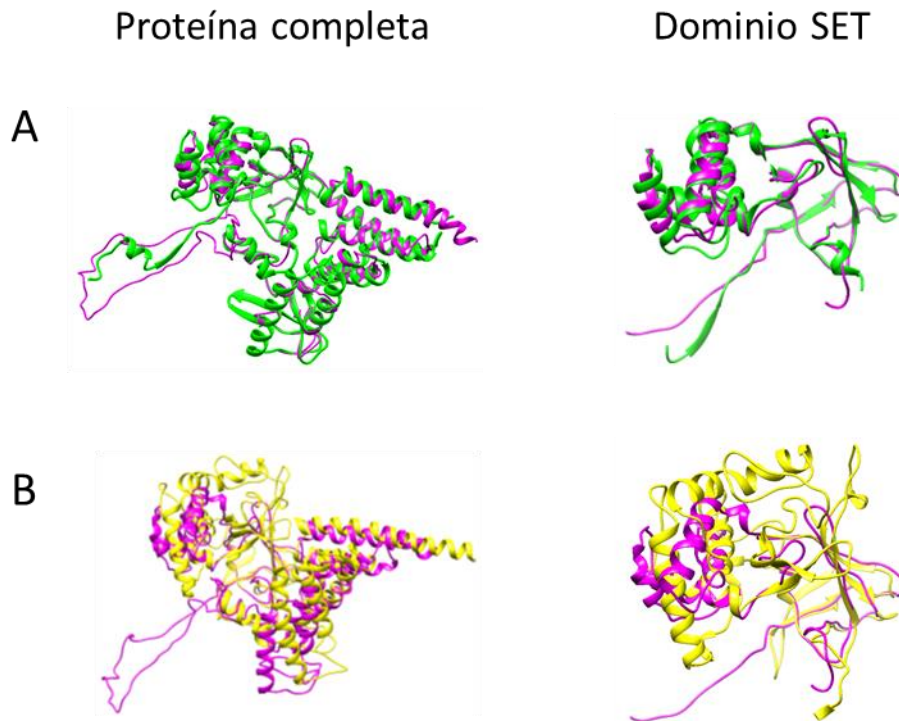


Figura 11. Identidad estructural de EhPKMT2 con AKMT y SMYD1.

El cristal putativo de EhPKMT2 se obtuvo a través del software en línea iTASSER y los alineamientos se realizaron a través del programa UCSF Chimera

(A) Alineamiento del cristal putativo de EhPKMT2 con el cristal de la proteína AKMT de *T.a gondii* (PDB: 6FND). En el panel izquierdo se muestra el alineamiento de la proteína completa con un 15.5% de identidad estructural y en el panel derecho se muestra el alineamiento del dominio SET, con el cual presenta un 19.1% de identidad.

(B) Alineamiento del cristal putativo de EhPKMT2 con el cristal de la proteína SMYD1 de mamífero (PDB: 3N71). En el panel izquierdo se muestra el alineamiento de la proteína completa con un 11.64% de identidad estructural y en el panel derecho se muestra el alineamiento del dominio SET con el que presenta un 14.02 % de identidad estructural.

De manera adicional, se realizó una búsqueda *in silico* de homólogos de EhPKMT2 en otras especies del género *Entamoeba*, siendo de particular interés *Entamoeba invadens*, ya que es el modelo de enquistamiento del género, debido a que hasta ahora no se ha podido enquistar *in vitro* a *E. histolytica* (De Cadiz et al, 2013; Herman et al, 2017). Así de manera indirecta se puede estudiar si EhPKMT2 participa en algún evento de enquistamiento, como ya se ha observado en otros parásitos como *G. lamblia* y *T. gondii* (Dixon et al, 2010; Salusso et al, 2017). Para ello, se realizó un BLAST en la base de datos AmoebaDB con el dominio SET de EhPKMT2 en todas las especies de *Entamoeba*. En la figura 12 podemos observar que todas las especies de *Entamoeba* cuentan con un homólogo de cada una de las cuatro metiltransferasas de lisina que ya se han descrito previamente en *E. histolytica* (Borbolla-Vázquez et al, 2016). Excepto *E. invadens*, pues es la única especie que no cuenta con un homólogo de EhPKMT2, pero posee una PKMT sin homólogos en ninguna de las otras especies del género (por lo cual se le ha denominado PKMTx). Por lo tanto, no fue posible hacer inferencias sobre la participación de EhPKMT2 en el enquistamiento, debido a que *E. invadens* no cuenta con un homólogo.

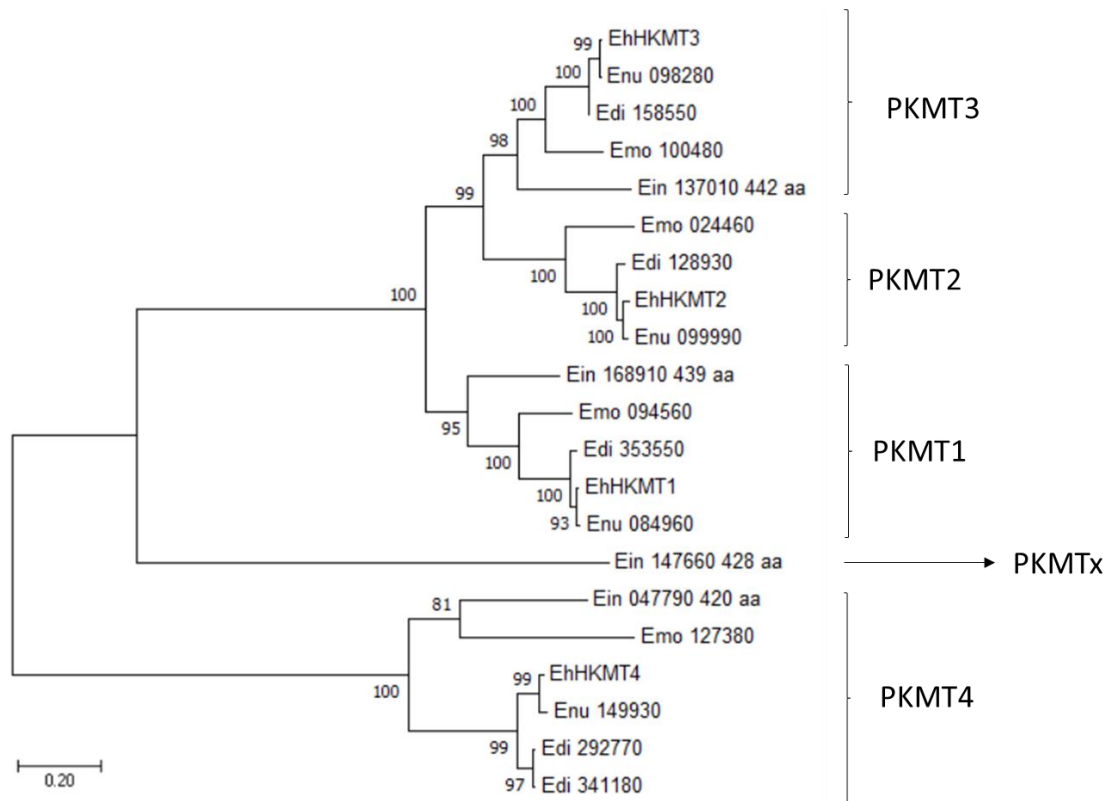


Figura 12. Comparación filogenética de PKMTs del género *Entamoeba*.

A través de la base de datos de Amoeba DB se realizó la búsqueda de proteínas con dominio SET en las especies del género *Entamoeba*. El árbol filogenético se construyó utilizando el programa MEGA7 con la opción Test Neighbor-Joining Tree con un Bootstrap de 1000.

Eh: *E. histolytica*; Ein: *E. invadens*; Edi: *E. dispar*; Enu: *E. nutalli*; Emo: *E. moshkovskii*. EhHKMT es la nomenclatura utilizada anteriormente para EhPKMT.

- *EhPKMT2 presenta cambios en la expresión y localización durante el choque térmico, el estrés oxidativo y el estrés nutricional.*

La patogenicidad de *E. histolytica* está relacionada con su capacidad de adherirse y lisar a las células del epitelio intestinal y con su habilidad para diseminarse a otros órganos como hígado, pulmones y cerebro (Kantor *et al*, 2018). Este proceso patogénico está determinado por la presencia de diversas proteínas como las adhesinas, las cisteína-proteasas y los amebaporos (Baxt & Singh, 2008; Kantor *et al*, 2018), su gran capacidad fagocítica (Somlata & Bhattacharya, 2015) y la evasión al sistema inmune (Nakada-Tsukui & Nozaki, 2016). Sin embargo, estos mecanismos no son los únicos responsables de la patogenicidad, ya que en los últimos años también se ha demostrado que algunos elementos de la respuesta a estrés también participan en la virulencia de la amiba (Santos *et al*, 2015; Guillén, 2022).

Debido a esta relación entre la virulencia de las amibas y la respuesta a estrés, se decidió investigar si existía correlación entre algunos eventos de estrés en la amiba y la expresión de EhPKMT2.

El primer evento de estrés que se analizó fue el choque térmico, para lo cual, las amibas fueron incubadas a una temperatura de 42 °C durante 15, 30 y 60 min. En la figura 13a, se muestra una curva de sobrevivencia a este estímulo, donde se observa una disminución de la población en un 20% a los 15 min de incubación, la cual disminuye hasta un 40% tras 60 min de exposición. En la figura 13b se muestra un Western blot donde se observa que durante los primeros 15 min de exposición, la expresión de EhPKMT2 parece mantenerse, pero a los 30 y 60 min de exposición, hay una disminución de su expresión. Al hacer el análisis densitométrico de la banda reconocida por el anticuerpo específico y normalizarlo respecto a la banda de actina, se observa que después de 30 min de incubación a 42°C, hay una reducción de aproximadamente un 30% en la expresión de EhPKMT2 (Figura 13c).

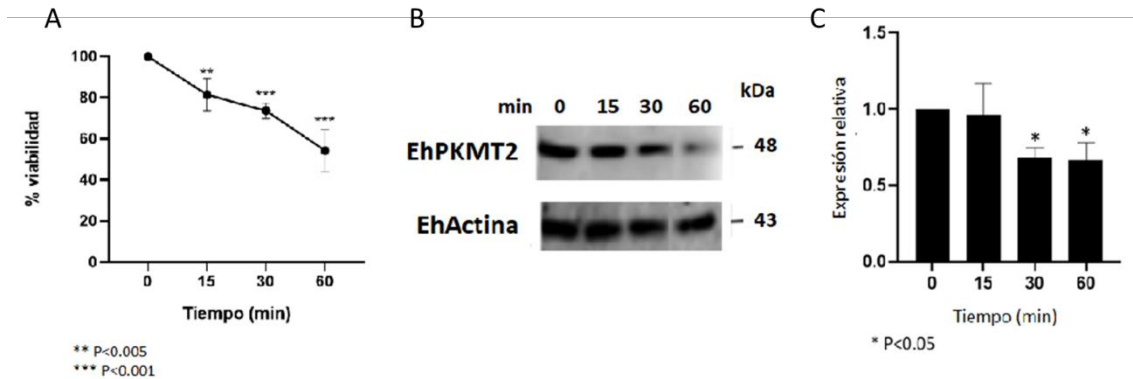


Figura 13. Viabilidad de *E. histolytica* y expresión de EhPKMT2 durante un choque térmico de 42°C.

(A) Curva de viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* incubados a 42 °C utilizando el método de exclusión del colorante azul tripano.

(B) Utilizando extracto total de amebas incubadas a 42 °C durante diferentes tiempos y usando como control amebas incubadas en condiciones normales de 37°C, se realizaron ensayos de Western blot empleando el anticuerpo α -EHPKMT2; como control de carga se utilizó el anticuerpo α -actina.

(C) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western blot utilizando el programa ImageJ, donde se utilizó actina para normalizar la concentración de las proteínas. La expresión relativa al tiempo 0 (37°C) se consideró como 1. Los datos expresados representan la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes.

Además de la cuantificación de las proteínas, se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia, la localización de la proteína dentro de la célula al ser expuesta a choque térmico. Lo que se observa en la figura 14 es que, en condiciones basales, la proteína se encuentra dispersa en el citoplasma y alrededor de los núcleos, mientras que en algunas amibas podemos verla cerca de la membrana plasmática, especialmente en regiones donde hay emisión de pseudópodos. Sin embargo, a los 15 min de incubación a 42 °C y en adelante, la proteína se relocaliza hacia la membrana plasmática, especialmente en los pseudópodos. De manera adicional se observó que, a los 30 min de incubación, la proteína además se encuentra no sólo alrededor, sino dentro del núcleo. Esta relocalización durante el choque térmico sugiere la participación de EhPKMT2 en la respuesta a este estímulo, posiblemente metilando tanto proteínas citoplásmicas como nucleares, regulando así algunas funciones celulares bajo esta condición de estrés.

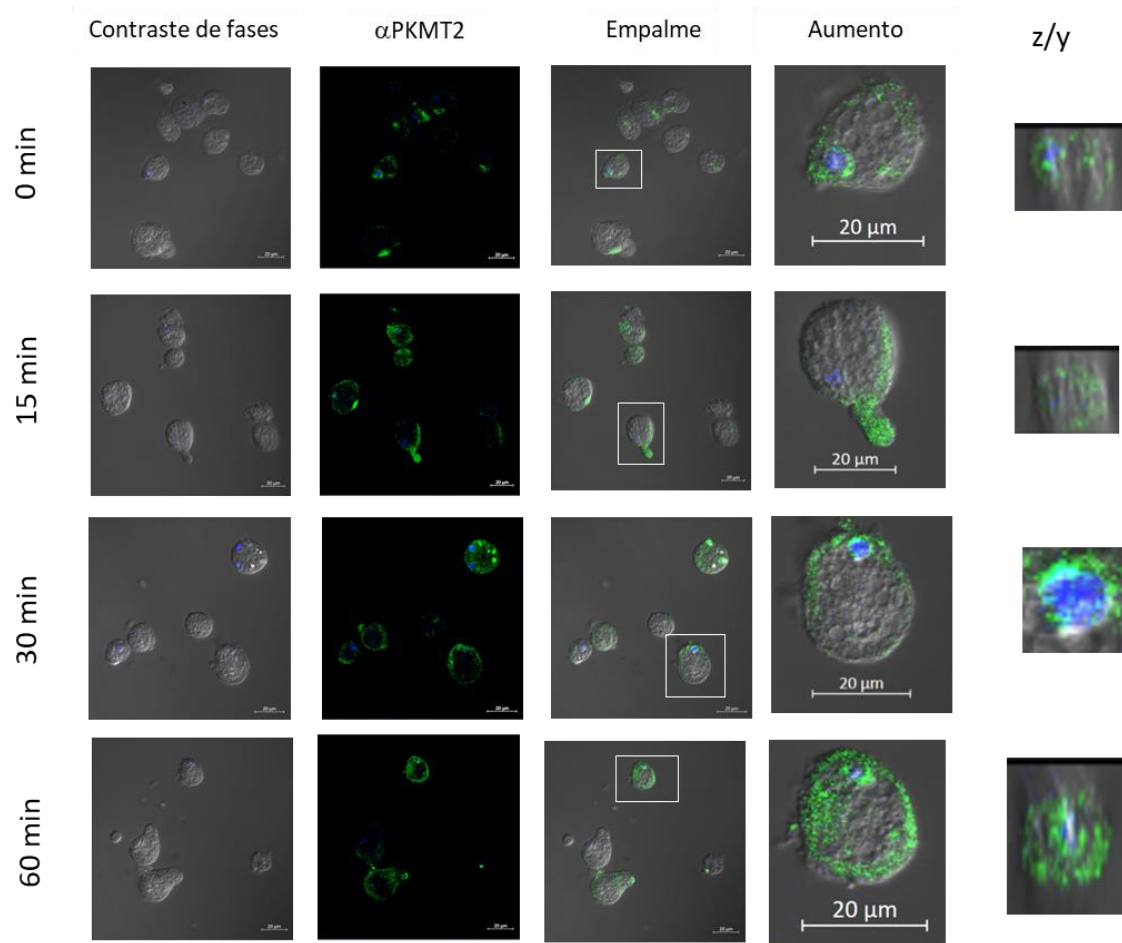


Figura 14. Localización de EhPKMT2 durante el choque térmico.

Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron durante 15, 30 y 60 min a 42 °C, se fijaron con metanol y los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 10%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo α -EhPKMT2 y después con un anticuerpo secundario acoplado a ALEXA 488 (verde). Para teñir los núcleos se utilizó DAPI (azul). Las imágenes fueron analizadas por microscopía confocal principalmente en el plano *xy*.

Las amibas que se encuentran dentro del recuadro, se amplificaron para analizar la localización intracelular de la proteína y se realizaron cortes en el plano *z/y* para observar la localización de la proteína dentro del núcleo.

Otro evento que se ha relacionado a la virulencia de la amiba es la respuesta al estrés oxidativo (Pineda & Pardomo, 2017). Por lo cual también se evaluó su sobrevivencia bajo condiciones oxidativas, incubando los trofozoítos con H_2O_2 2 mM durante 15, 30, 45 y 60 min. En la figura 15a se observa que a los 15 min de exposición hay una pérdida de la viabilidad en un 40% y a los 60 min, sólo sobreviven en 20% de las amibas. Al hacer el análisis de la expresión de EhPKMT2 a través de Western blot se observó que, desde los 15 min de exposición, la expresión de la proteína disminuye drásticamente y ésta se mantiene hasta los 60 min (Figura 15b), lo cual se comprueba al hacer el análisis densitométrico (Figura 15c), el cual fue normalizado con actina.

Para confirmar estos datos, también se realizaron ensayos de inmunofluorescencia bajo condiciones de estrés oxidativo. En condiciones basales se observó la localización esperada de la proteína alrededor del núcleo y dispersa en el citoplasma con tendencia a localizarse en los pseudópodos; pero desde los 15 min de exposición, la señal de la proteína disminuyó de manera drástica, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Western blot. Los tiempos posteriores ya no se muestran en la figura, dado que la proteína EhPKMT2 no se observó (Figura 16). Estos datos sugieren que EhPKMT2 podría regular proteínas necesarias para resistir el estrés oxidativo.

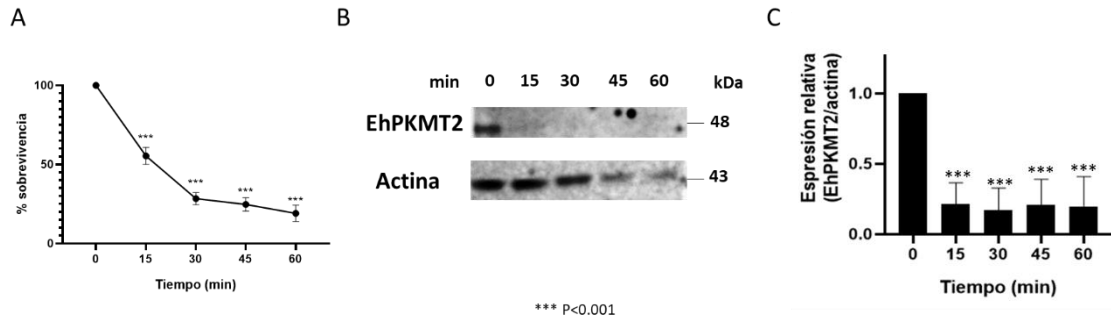


Figura 15. Viabilidad de *E. histolytica* y expresión de EhPKMT2 durante el estrés oxidativo.

(A) Curva de viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* incubados con H₂O₂ 2mM, empleando el método de exclusión del colorante azul tripano.

(B) Utilizando extracto total de amibas incubadas con H₂O₂ durante diferentes tiempos y empleando como control amibas en condiciones basales, se realizaron ensayos de Western blot usando el anticuerpo α -EHPKMT2; como control de carga se utilizó un anticuerpo α -actina.

(C) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western blot utilizando el programa ImageJ, donde se utilizó actina para normalizar la concentración de las proteínas. La expresión relativa al tiempo 0 (sin H₂O₂) se consideró como 1. Los datos expresados representan la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes.

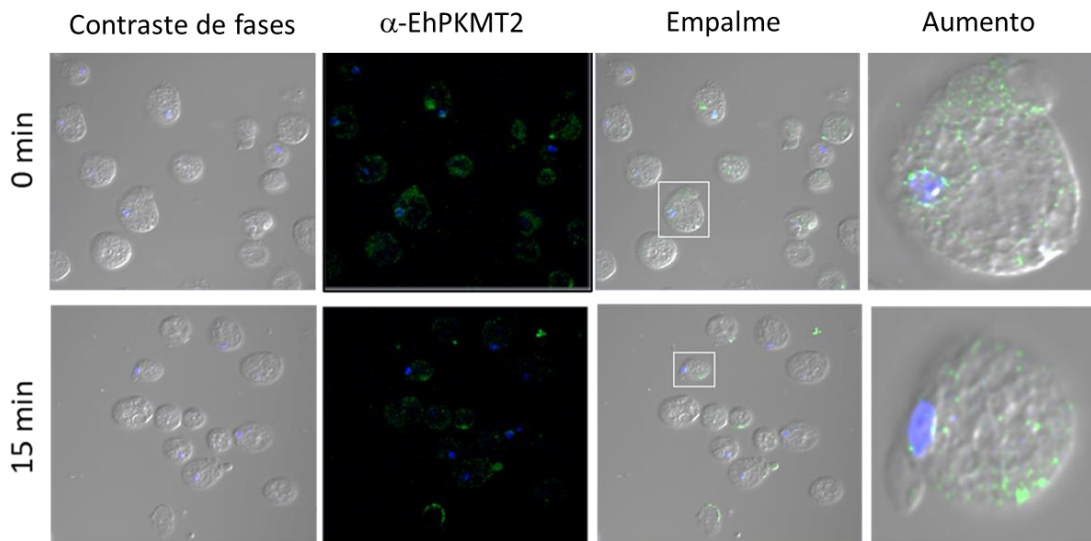


Figura 16. Localización de EhPKMT2 durante el estrés oxidativo.

Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron durante 15, 30, 45 y 60 min con H_2O_2 2 mM, se fijaron con metanol y los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 10%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo α -EhPKMT2 y después con el anticuerpo secundario acoplado a ALEXA 488 (verde). Para teñir los núcleos se utilizó DAPI (azul). Las imágenes fueron analizadas por microscopía confocal.

La depleción de glucosa también se ha relacionado a la virulencia del parásito, ya que vuelve a las amibas más móviles, con mayor capacidad de adhesión y aumenta el efecto citopático y hemolítico (Tovy *et al*, 2011). Es por ello que también se evaluó la expresión de EhPKMT2 y su localización intracelular durante esta condición de estrés.

Para analizar el efecto de la falta de glucosa en el medio, se evaluó la viabilidad de los trofozoítos durante 12, 24 y 48 h de incubación en este medio. En la figura 17A se observa que, a pesar de la falta de glucosa, los trofozoítos se mantienen viables hasta las 48 h, pero no se observa un crecimiento del cultivo, en comparación con los trofozoítos que fueron incubados con medio TYI completo (tiempo 0). Bajo estas condiciones entonces se analizó la expresión de EhPKMT2 y en la figura 17b se demuestra que la concentración de la proteína disminuye entre el 20 y 30% desde las 12 h de incubación y hasta las 48 h con respecto al tiempo 0, lo cual corresponde con el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el Western blot (Figura 17c).

También se analizó la localización de la proteína ante la falta de glucosa, sin embargo como se muestra en la figura 18, durante las 48 h de incubación no se observó un cambio aparente en la localización de la proteína, la cual se mantiene alrededor del núcleo y dispersa en el citoplasma. Aunque si se detecta una aparente disminución de la fluorescencia a las 24 y 48 h de incubación (figura 18). Por lo tanto, los resultados sugieren una regulación negativa del crecimiento celular en la condición de depleción de glucosa.

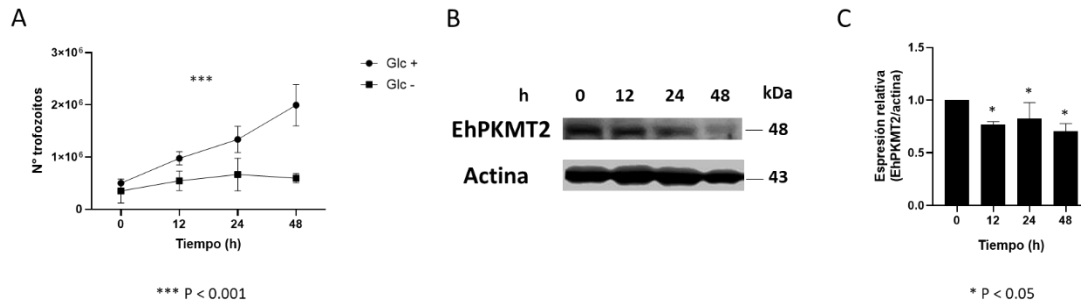


Figura 17. Viabilidad de *E. histolytica* y expresión de EhPKMT2 durante la disminución de glucosa.

(A) Curva de viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* incubados con medio TYI sin glucosa, utilizando el método de exclusión del colorante azul tripano.

(B) Empleando extracto total de amebas incubadas en medio TYI sin glucosa durante diferentes tiempos y usando como control amebas incubadas con medio TYI completo (tiempo 0), se realizaron ensayos de Western blot con el anticuerpo α -EHPKMT2; como control de carga se utilizó un anticuerpo α -actina.

(C) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western blot utilizando el programa ImageJ, donde se utilizó actina para normalizar la concentración de las proteínas. La expresión relativa al tiempo 0 se consideró como 1. Los datos expresados representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

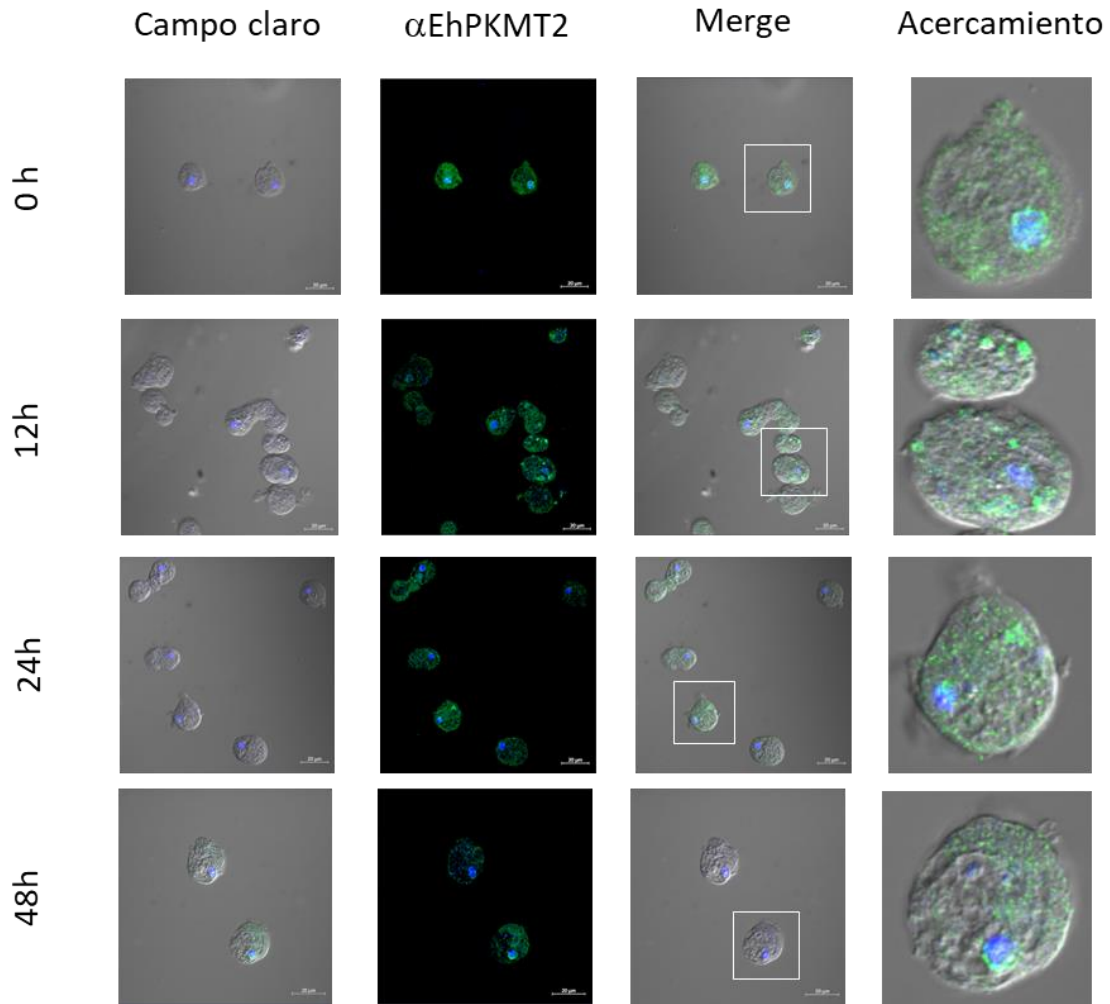


Figura 18. Localización de EhPKMT2 durante la disminución de glucosa.

Trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados durante 12, 24 y 48h en medio TYI sin glucosa, se fijaron con metanol y los sitios inespecíficos fueron bloqueados con BSA al 10%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo α -EhPKMT2 y después con un anticuerpo secundario acoplado a ALEXA 488 (verde). Para teñir los núcleos se utilizó DAPI (azul). Las imágenes fueron analizadas por microscopía confocal.

- *El knockdown de Ehpkm2 aumenta la proliferación celular.*

Hasta este momento se observó que la expresión de EhPKMT2 se modula en respuesta a estrés. Sin embargo, para comprender mejor la participación de esta proteína en la biología del parásito, se realizó el knockdown (KD) del gen completo de *Ehpkm2* utilizando el plásmido de silenciamiento pSA (Ankri *et al*, 1998) (Figura 7). Este plásmido se transfectó en trofozoítos de *E. histolytica*, y se analizó la expresión de la proteína a concentraciones crecientes de G-418, que funciona como un agente selectivo de las transfectantes. A concentraciones de 5, 10 ó 20 $\mu\text{g/ml}$ no se observó un cambio significativo en la expresión de la proteína; sin embargo, a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ se determinó que EhPKMT2 disminuía en forma considerable (Figura 19a). Al hacer el análisis densitométrico, se corroboró a esta concentración de antibiótico, se presenta una reducción de aproximadamente 30%, con respecto a los trofozoítos transfectados con el vector vacío (Mock) (Figura 19b). Para confirmar que el KD de *Ehpkm2* (EhPKMT2-KD) es específico, se evaluó la expresión de otra metiltransferasa (EhPKMT4), la cual no presentó cambios en su expresión (Figura 19), con lo cual se concluye que el KD en efecto es específico para el gen blanco.

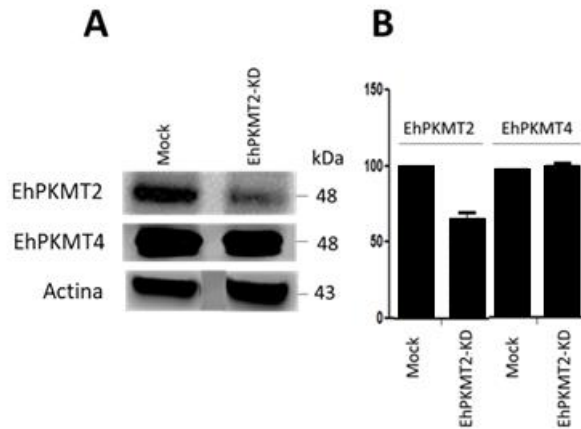


Figura 19. Knockdown de *Ehpkmt2*.

El gen completo *Ehpkmt2* se clonó en antisentido en el plásmido pSA y éste fue transfectado en trofozoítos de *E. histolytica*. Se utilizaron trofozoítos transfectados con un vector vacío (Mock) como control.

(A) Western blot de extracto total de amibas transfectadas con EhPKMT2-KD y Mock, utilizando los anticuerpos α -EhPKMT2, α -EhPKMT4 y α -actina.

(B) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western blot, utilizando el programa ImageJ. Los datos se normalizaron con la expresión de actina y se representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

En seguida, con los trofozoítos transfectados, se realizó una cinética de crecimiento en medio TYI-S-33 completo y se observó que la proliferación celular se incremento casi dos veces con respecto a las células Mock (Figura 20a), lo que sugiere que EhPKMT2 regula negativamente el proceso de proliferación celular.

- *El knockdown de Ehpkm2 afecta diferentes factores de virulencia y de respuesta a estrés de E. histolytica.*

Con los antecedentes y los resultados obtenidos hasta el momento, se ha sugerido que EhPKMT2 puede participar en algunos eventos de virulencia como eritrofagocitosis y respuesta al estrés. Para analizar con detalle esto, se evaluaron diferentes eventos como respuesta a choque térmico, eritrofagocitosis, motilidad y efecto citopático cuando la proteína se encuentra disminuida.

En los ensayos para evaluar la respuesta a estrés térmico, se observó que los trofozoítos con *knockdown* (KD) presentaron una mayor sobrevivencia a los 30 min de exposición a temperaturas elevadas (42 °C), en comparación con el Mock (Figura 20b). A pesar de que a los 45 y 60 min ya no se detectó diferencia significativa entre los trofozoítos con *knockdown* y los Mock, se observó una tendencia de la población *KD* a ser más resistente a esta condición de estrés (Figura 20b). Con esto, se sugiere que la proteína EhPKMT2 regula negativamente a proteínas involucradas en la respuesta a estrés y por lo tanto, cuando su expresión es baja, se favorece la respuesta a temperaturas elevadas.

Por otra parte, se evaluó la capacidad fagocítica de la amiba *KD* utilizando eritrocitos como célula blanco, y se encontró que a los 10 min de interacción, la ingesta de eritrocitos disminuyó aproximadamente en un 30%, en comparación con el Mock; sin embargo, a los 20 y 30 min, la actividad es similar a los parásitos control (Figura 20c), lo cual sugiere que esta proteína participa en etapas tempranas de la fagocitosis.

Otro de los factores de virulencia evaluados fue la capacidad de producir daño sobre monocapas de células MDCK, observándose que la capacidad citopática de los trofozoítos *KD* disminuye de manera drástica, manteniendo únicamente un 10% de ésta (Figura 20d).

Finalmente se evaluó la capacidad de las amibas para migrar, detectando que la población *KD* aumentó su migración aproximadamente dos veces respecto a los trofozoítos Mock (Figura 20e), sugiriendo que EHPKMT2 regula negativamente genes relacionados con la migración celular.

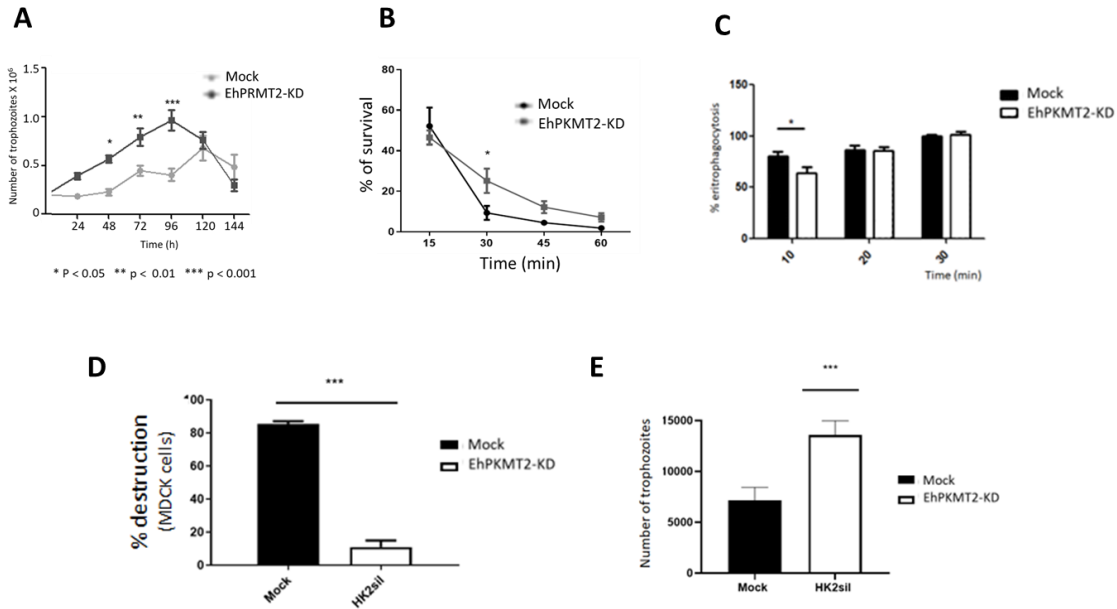


Figura 20. Efecto del *knockdown* de *Ehpkm2* en la proliferación, choque térmico y virulencia *in vitro* de *E. histolytica*.

(A) Proliferación celular de trofozoítos EhPKMT2-KD y Mock.

(B) Resistencia al choque térmico de trofozoítos EhPKMT2-KD y Mock. Los trofozoítos fueron incubados a 42°C durante 15, 30 y 60 min y se evaluó la viabilidad por medio de la técnica de azul tripano.

(C) Eritrofagocitosis de trofozoítos EhPKMT2-KD y Mock. Las amibas se incubaron con eritrocitos humanos (relación 1:25). A los 10, 20 y 30 min, los eritrocitos no ingeridos se lisaron hipotónicamente. Posteriormente los trofozoítos se lavaron y se lisaron para cuantificar por espectrofotometría la hemoglobina de los eritrocitos fagocitados.

(D) Efecto citopático de trofozoítos EhPKMT2-KD y Mock. Se incubaron monocapas de células MDCK con trofozoítos a 37°C durante 2 h. Posteriormente se eliminaron los trofozoítos y la monocapa restante de células MDCK se tiñó con azul de metileno para su cuantificación.

(E) Migración de trofozoítos EhPKMT2-KD y Mock. Los trofozoítos en medio TYI sin suero se colocaron en la cámara superior de un transwell, mientras que en la cámara inferior se colocó medio TYI-S-33 suplementado con suero al 10%, se incubaron 3 h a 37°C y se cuantificó el número de trofozoítos que migraron a la cámara inferior.

DISCUSIÓN

Las modificaciones postraduccionales se definen como cambios covalentes en las proteínas a través de cortes o la unión de grupos funcionales a las mismas, lo cual provoca cambios en la estructura y la dinámica de la proteína (Ramazi & Zahiri, 2021). Estas modificaciones se pueden dar en proteínas ubicadas en diferentes sitios de la célula, como puede ser el núcleo, el citoplasma, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi; por lo que las funciones en las que participan estas modificaciones son muy variadas, entre las que destacan la transducción de señales, la regulación de la expresión génica, la reparación del DNA y el control del ciclo celular, entre otras (Ramazi & Zahiri, 2021).

Entre estas modificaciones se encuentra la metilación, la cual ocurre principalmente sobre residuos de argininas y lisinas (Ramazi & Zahiri, 2021). El estudio en la metilación de lisinas originalmente estaba centrado particularmente en histonas, y por lo tanto, sus funciones estaban relacionadas con eventos nucleares, como modificación en la estructura de la cromatina, transcripción de genes, replicación y reparación de DNA (Lanouette *et al*, 2014). Sin embargo, posteriormente se describió que además de las histonas, otras proteínas son blanco de metilación de lisinas (Paik & Kim, 1971; Lanouette, 2014; Zhang *et al*, 2012; Cao *et al*, 2013). De hecho, en el humano se ha descrito que existen aproximadamente 3000 proteínas sujetas a metilación en aproximadamente 5000 sitios diferentes (Hornbeck *et al*, 2014; Biggar & Li, 2015), lo cual indica que esta modificación podría estar relacionada con diversos eventos celulares a través de la interacción proteína-proteína y ácidos nucleicos-proteína, regulando así la actividad, la estabilidad y/o la localización subcelular de las proteínas blanco (Cornett *et al*, 2019).

La metilación de lisinas no se ha observado únicamente en el humano, también se ha observado en otros organismos, como hongos y parásitos, en los cuales cumple diferentes funciones, incluyendo su participación en la virulencia, ya sea a través de la metilación de histonas o de proteínas citoplásmicas. Por ejemplo, se ha observado que la metilación de H3K4 incrementa la virulencia en algunos hongos como *Fusarium graminearum* (Liu *et al*, 2015) *Candida albicans* (Kim J. *et al*, 2021) y *Beauveria bassiana* (Ren *et al*, 2021), entre otros. En parásitos como *Plasmodium falciparum* se ha observado que la metilación es

importante para invadir a los eritrocitos y para regular los genes relacionados con la virulencia (Jiang *et al*, 2013). En un estudio realizado por Kaur y colaboradores (2016) se identificaron 570 proteínas metiladas en *P. falciparum*, las cuales se encuentran principalmente distribuidas en el citoplasma y cuyas funciones se relacionan principalmente con el transporte y la proteólisis (Kaur *et al*, 2016). En otros estudios se ha observado la influencia de las marcas epigenéticas sobre la virulencia del parásito, las cuales presentan diversos cambios durante la fase eritrocítica asexual, lo cual sugiere que participa en el proceso de cambio de estadio (Cui *et al*, 2008). Otros ejemplos de regulación epigenética en este parásito se dan a través de la formación de marcas epigenéticas como H3K9me3, la cual participa en la represión de los genes *var*, que se relacionan a la variación antigénica de este parásito (Pérez-Toledo *et al*, 2009); mientras que la metilación de H3K4 realizada por la enzima PfSET10, se relaciona con la activación de estos genes y además participa en la memoria epigenética para que éstos se puedan activar en las células hijas (Volz *et al*, 2012). Por su parte, en *T. gondii* también se ha observado metilación, tanto a nivel de histonas en el núcleo, como en proteínas citoplásmicas. La metilación de histonas en este parásito está relacionada con el cambio de estadio, ya que se ha observado la presencia de la marca H4K20me1, generada por la enzima TgSET8, en la periferia del núcleo y dicha marca fluctúa durante el ciclo celular (Sautel *et al*, 2007). Además, esta misma enzima se encuentra activa en los quistes quiescentes y se ha especulado que participa en la represión de genes en los taquizoítos, lo cual permite el cambio de estadio y el mantenimiento de los bradizoítos (Dixon *et al*, 2010). Además de las metiltransferasas que generan modificaciones epigenéticas, *T. gondii* posee una metiltransferasa denominada AKMT, la cual está relacionada con la motilidad del parásito a través de la regulación de la dinámica del citoesqueleto; ya que al estar ausente, el parásito se mantiene inmóvil y por lo tanto pierde su capacidad de invadir nuevas células (Heaslip *et al*, 2007).

En *E. histolytica*, como ya se mencionó anteriormente que se han descrito cuatro metiltransferasas de lisina con dominio SET, las cuales al expresarse de manera recombinante presentaron actividad de metiltransferasas sobre histonas comerciales (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016); lo cual sugiere que pueden participar en la biología de la

amiba, a través de la regulación epigenética. Particularmente EhPKMT2 se detectó no solo en el núcleo, sino también en el citoplasma y alrededor de eritrocitos fagocitados (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016; Munguía Robledo, 2018), sugiriendo que esta enzima participa en la virulencia de la amiba, no sólo mediante la regulación epigenética, sino también a través de la interacción con proteínas en el citoplasma. Por lo cual, en este trabajo, para caracterizar con mayor profundidad a la proteína EhPKMT2 y describir su función en la amiba, se realizó un análisis tridimensional de la proteína, se estudió su expresión y localización en algunos eventos relacionados con la virulencia y el estrés y se evaluó el efecto del *knock down* de *Ehpkmt2* en estos eventos.

Previamente se ha descrito que la proteína EhPKMT2 está relacionada filogenéticamente con la familia de proteínas de humano SMYD, las cuales están involucradas en una amplia gama de procesos biológicos, entre los que se incluyen la remodelación de cromatina, la transcripción, la transducción de señales y el ciclo celular (Spellmon *et al*, 2015; Rueda-Robles, 2021). Estructuralmente, las proteínas que presentaron mayor homología con EhPKMT2 fueron AKMT de *T. gondii* y SMYD1 de humano. AKMT además de poseer un dominio SET, presenta un dominio post-SET y un dominio TPR-like en el extremo carboxilo (Pivovarova *et al*, 2018); mientras que SMYD1 cuenta con un dominio MYND, el cual tiene característica de un motivo de dedos de zinc modificados (Spellmon *et al*, 2015). Por su parte, EhPKMT2 carece de los dominios antes descritos para AKMT y SMYD1, lo cual podría explicar la disminución en el porcentaje de identidad estructural entre EhPKMT2 y esas proteínas; sin embargo, no hay otras proteínas que presenten un mayor porcentaje de identidad.

Debido a que en varios parásitos se ha observado que la metilación de proteínas está relacionada con el cambio de estadio (Cui *et al*, 2008; Dixon *et al*, 2010; Salusso *et al*, 2017), es posible que en *E. histolytica* también exista una relación. Para ello se buscaron proteínas con dominio SET en varios géneros de la especie *Entamoeba*, y se puso particular interés en los homólogos encontrados en *E. invadens*, que es el modelo de enquistamiento del género (De Cadiz *et al*, 2013). Esta especie cuenta con un homólogo para cada una de las PKMTs encontradas en *E. histolytica*, excepto para EhPKMT2, por lo cual, evaluar la participación

de esta amiba durante el enquistamiento *in vitro* no fue posible en este trabajo. Sin embargo esto abre nuevas perspectivas de búsqueda a través de análisis proteómicos y transcriptómicos.

Como parte de la caracterización de esta proteína, se realizó un análisis de su expresión bajo diferentes condiciones de estrés como el choque térmico, el estrés oxidativo y el estrés nutricional, los cuales se relacionan también con la virulencia de la amiba (Tovy *et al*, 2011; Santos *et al*, 2015; Pineda & Pardomo, 2017; Guillén, 2023). Durante el choque térmico se observó que la proteína no sólo disminuye su expresión, sino que también se detectó un cambio en la localización subcelular hacia la periferia de la célula, con una presencia importante dentro del núcleo a los 30 min de exposición a 42 °C. Estos hallazgos sugieren que la proteína puede tener actividad de regulación en el núcleo durante este tipo de estrés, y al mismo tiempo estar relacionada con otras proteínas extranucleares. Por otro lado, durante el estrés oxidativo, EhPKMT2 también redujo su expresión, de tal manera que incluso en las inmunofluorescencias ya no detectó. En el caso del estrés nutricional por disminución de glucosa de igual manera se observó una disminución en la expresión de la proteína, pero sin un cambio de localización subcelular. En conjunto, estos resultados sugieren que para que la amiba pueda responder a ciertas condiciones de estrés, debe disminuir la concentración de EhPKMT2, la cual entonces podría estarse comportando como un regulador negativo, ya sea a nivel citoplásmico o nuclear.

Para poder corroborar el papel de estas proteínas en la virulencia, se llevó a cabo un *knockdown* del gen *Ehpkmt2* y se observó el efecto que tenía en diferentes procesos patogénicos de la amiba. El primer evento en ser evaluado fue la proliferación celular, donde se observó un incremento en el crecimiento de las amibas silenciadas en comparación al mock. Debido a la relación estructural que existe con proteínas de la familia SMYD y la similitud en la marca epigenética H3K4 que generan (Borbolla-Vázquez *et al*, 2016; Tracy *et al*, 2018), cabía esperar que la función de ambas proteínas también fuera similar. Sin embargo, en otros estudios se ha observado que el *knockdown* de genes que codifican para las proteínas SMYD se relaciona con una decremento en la proliferación celular en cáncer cervical y gástrico (Wang *et al*, 2017; Sun *et al*, 2019). Existen otros

estudios donde se ha observado que en células de cáncer de ovario, la presencia elevada de la marca de metilación H3K4me3 tiene un efecto antiproliferativo (Han *et al*, 2020), lo cual correlaciona con la marca generada por EhPKMT2, pero con un efecto contrario. Aunque hay reportes de la metiltransferasas de lisina Set7/9, que también produce la marca epigenética H3K4, y que de manera adicional metila otras proteínas como β -catenina (K180), YAP1 (K499), STAT3 (K140) E2F1 (K181) y pRB (K810) y cuyo *knockdown* incrementa la expresión de la ciclina A2 y D1, lo cual promueve la acumulación de células en la fase S, y por consiguiente, un aumento en la proliferación celular (Daks *et al*, 2022). Por lo tanto, se sugiere que EhPKMT2 tiene un papel de regulación negativa en la proliferación celular, ya sea a través de la marca epigenética H3K4 o a través de la metilación de proteínas como las EhCiclinas.

Diferentes estudios han mostrado la relación que existe entre las modificaciones postraduccionales y las proteínas del citoesqueleto, entre ellas la metilación de lisinas. Por ejemplo, en un estudio proteómico de células neurales de la cresta se identificaron 182 proteínas metiladas en lisinas, de las cuales varias pertenecían a proteínas del citoesqueleto como β -actina y α -tubulina (Vermillion *et al*, 2014). En linfocitos T, la metiltransferasa EZH2 regula la polimerización de actina (Su *et al*, 2005) y además metila a la talina, que es una proteína de unión a actina y que es clave para la regulación entre la migración y la adhesión (Gunawan *et al*, 2015). SETD2 metila a la α -tubulina (K40) para regular la mitosis y la citocinesis (Park *et al*, 2016) y a β -actina (K68) para su polimerización (Seervai *et al*, 2020). Estas metilaciones en proteínas del citoesqueleto no sólo se han observado en proteínas de humano, ya que en el parásito *Acanthamoeba castellanii* la actina se encuentra dimetilada (Weihsing & Korn, 1970). Por lo tanto, es posible que en *E. histolytica*, la participación de las metiltransferasas como EhPKMT2 puedan estar involucradas en eventos que involucren a la estructuración del citoesqueleto, como lo puede ser la fagocitosis y la migración. Al respecto se observó que la fagocitosis se ve disminuida a los 10 minutos de interacción con los eritrocitos cuando las amibas tienen *knockdown* en *Ehpkmt2*; sin embargo, la actividad fagocítica se recupera a los 20 min, sugiriendo que la regulación provocada por EhPKMT2 sólo es necesaria durante los tiempos tempranos de fagocitosis.

El otro evento celular relacionado a la virulencia en el cual está involucrado el citoesqueleto de actina es la migración celular, ya que esto le permite a la amiba invadir y colonizar nuevos tejidos dentro de su hospedero (Sierra-Lopez *et al*, 2018; Ghosh *et al*, 2019). Al realizar el ensayo de migración celular se observó un incremento en la capacidad de la amiba para moverse durante el *knockdown* de *Ehpkmt2*. Esto es interesante, ya que las proteínas AKMT y SMYD también están relacionadas con la motilidad celular, pero se observa un efecto contrario. cuando AKMT se encuentra silenciada, se observa una pérdida de motilidad de los trofozoítos (Heaslip *et al*, 2011); por su parte también se han hecho ensayos de *knockdown* de *smyd3* en células de cáncer gástrico y se demostró que las células disminuyen su capacidad de migrar en ensayos de cierre de herida (Wang *et al*, 2017). Sin embargo, hay otras metiltransferasas como SET7/9, la cual al estar silenciada, promueve la migración celular en células NSCLC (Daks *et al*, 2021). Tomando estos resultados en conjunto podemos sugerir que a pesar de la similitud estructural y la relación filogenética de EhPKMT2 con las proteínas AKMT y SMYD, su función parece estar más relacionada con otras metiltransferasas de lisina como SET7/9.

Uno de los factores de virulencia más importantes de la amiba es su capacidad de lisar células, lo cual provoca la destrucción de tejidos y su diseminación hacia otros órganos (Sierra-Lopez *et al*, 2018). Esta capacidad recae en la gran capacidad proteolítica de la amiba gracias a proteínas como cisteína-proteasas y los amebaporos (Baxt & Singh, 2008). Durante el *knockdown* de *Ehpkmt2* se observó una disminución importante de la capacidad citopática de la amiba, lo cual sugiere que esta metiltransferasa podría participar en la regulación, ya sea en la expresión de estas proteínas o en los mecanismos de transporte para poderlas secretar.

Finalmente, se ha descrito que las proteínas relacionadas al choque térmico como HSP70 y HSP90 están relacionadas con algunos eventos de virulencia de la amiba (MacFarlane *et al*, 2005; Weber *et al*, 2006; Tillack *et al*, 2007), como expresión y represión de cisteínas proteasas durante el choque térmico (Weber *et al*, 2006) aunque también se han relacionado con la eritrofagocitosis, a través de la interacción de HSP90 con Actina (Singh *et al*, 2015). Durante el choque térmico de trofozoítos con *knockdown* de *Ehpkmt2* se

detectó una mayor tasa de sobrevivencia, y relocalización de la proteína hacia el núcleo y hacia la membrana citoplásmica, lo cual sugiere que EhPKMT2 participa en la respuesta a estrés y virulencia a través de la modulación de genes y probablemente alterando la estabilidad de proteínas de choque térmico de la amiba.

Tomando todos estos resultados en conjunto, se propone que EhPKMT2 está relacionada con la virulencia del parásito, a través de diferentes vías (Figura 21). En primer lugar, dado que las histonas son uno de los blancos mejor descritos para las metiltransferasas de lisina, es posible que participe en la regulación dentro del núcleo, ya sea activando o reprimiendo la expresión de genes involucrados en la virulencia. Sin embargo, también es muy probable que EhPKMT2 se encuentre involucrada en los eventos de virulencia a través de la regulación e interacción directa de proteínas citoplásmicas. Además, nuestros hallazgos sugieren que EhPKMT2 participa en la dinámica del citoesqueleto a través de la metilación de proteínas como la actina o tubulina, que están relacionadas con la migración celular. Asimismo, debido a la acumulación de esta proteína en las copas fagocíticas, es posible que pueda regular proteínas presentes en estas estructuras como adhesinas, Rabs y proteínas del complejo ESCRT (Okada, 2005), entre otras. Por otro lado, EhPKMT2 podría estar modulando tanto la expresión como la estabilidad de las proteínas de choque térmico como EhHSP70, lo cual a su vez, podría modificar el patrón de expresión de cisteína proteasas y por lo tanto, provocar una disminución en el efecto citopático.

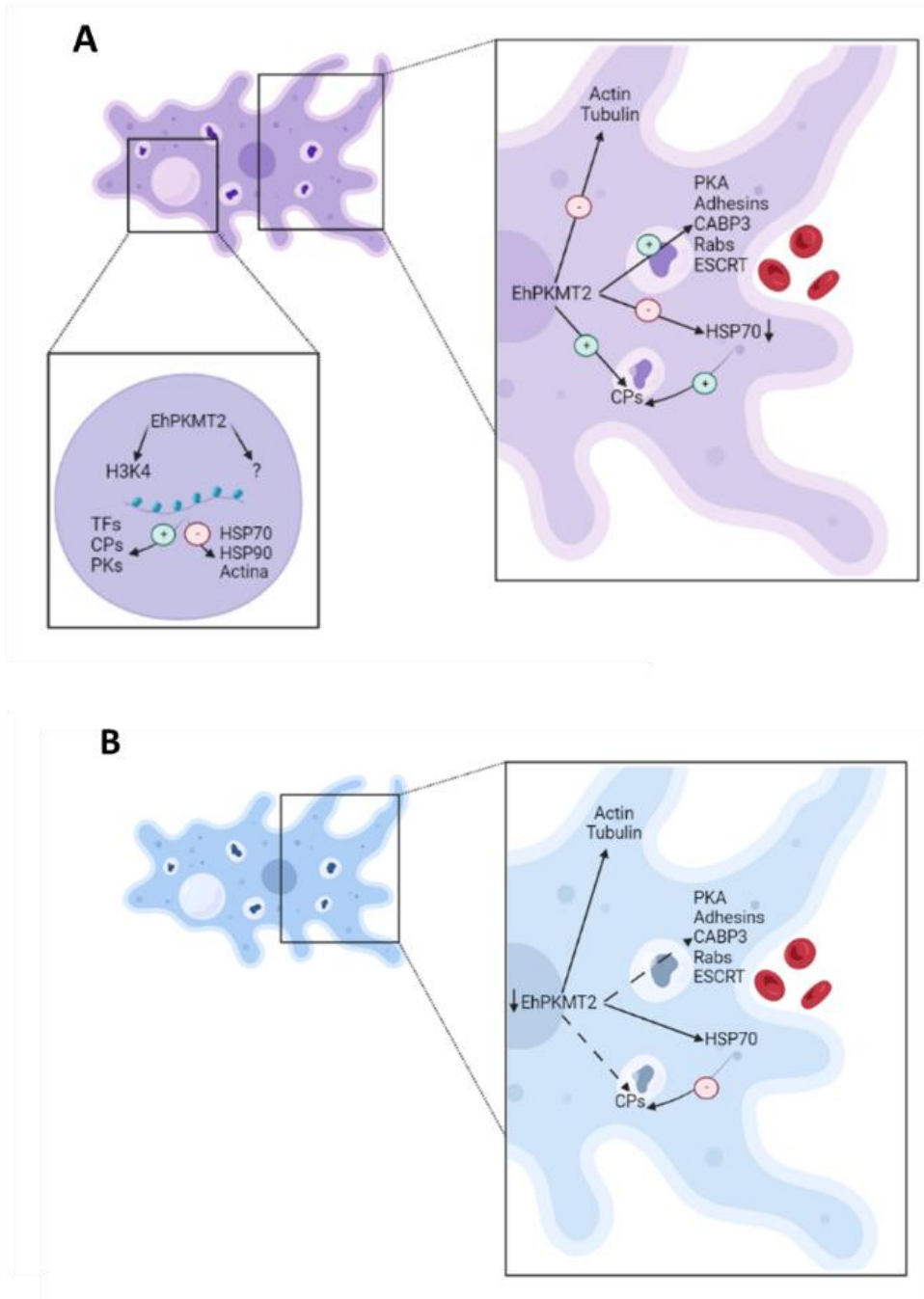


Figura 21. Modelo propuesto del papel de EhPKMT2 en *E. histolytica*.

(A) Posibles proteínas relacionadas con EhPKMT2 durante condiciones basales.

(B) Cambios en la regulación de los trofozoítos durante el *knockdown* de *Ehpkmt2*.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

- EhPKMT2 está relacionada filogenéticamente con la proteína AKMT de *T. gondii* y con la familia SMYD de humano.
- No hay un homólogo de EhPKMT2 en *E. invadens*.
- En condiciones de estrés como choque térmico, estrés oxidativo y estrés nutricional por disminución de glucosa, la expresión de EhPKMT2 disminuye.
- Durante el choque térmico, EhPKMT2 se relocaliza hacia el núcleo y hacia la periferia celular.
- En el estrés nutricional por disminución de glucosa, la proteína no presenta cambios en su localización.
- El *knockdown* de *Ehpkmt2* aumenta la proliferación celular, la capacidad de migración y la sobrevivencia al choque térmico, mientras que disminuye la capacidad de fagocitar eritrocitos en etapas tempranas de la fagocitosis, y la capacidad de producir daño sobre monocapa de células.

En general podemos afirmar que la metiltransferasa de lisina EhPKMT2, con similitud estructural a AKMT y SMYD1, regula de manera positiva o negativa diferentes funciones relacionadas con la virulencia de *E. histolytica*.

PERSPECTIVAS

Entre las investigaciones que pueden realizarse como perspectivas a este estudio son:

- Analizar el perfil de mono- di- y tri-metilación de lisinas en amibas en condiciones basales y de *knockdown* de *Ehpkmt2* para determinar si hay diferencia en el patrón de metilación.
- Evaluar el efecto del *knockdown* de *Ehpkmt2* en el estrés oxidativo y estrés nutricional por disminución de glucosa.
- Realizar ensayos de pull-down para identificar las proteínas que interactúan directamente con EhPKMT2
- Corroborar las interacciones de EhPKMT2 con posibles blancos proteicos relacionados con los eventos en los cuales se observa que interviene esta enzima, como HSPs o proteínas del citoesqueleto.
- Identificar las lisinas metiladas por EhPKMT2 en las proteínas blanco y determinar su efecto en la biología de este parásito.
- Analizar la posibilidad de utilizar EhPKMT2 como blanco terapéutico contra la amibiasis.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Ali I.K.M., Clark C.G. & Petro W. A. (2008). Molecular epidemiology of Amebiasis. *Infection, genetics and evolution*, 8 (5): 698-707.
2. Ankri S., Stolarsky T. & Mirelman D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteases de onot affect Entamoeba histolytica cytopathic or haemolythic activity but inhibits phagocytosis. *Molecular microbiology*, 28 (4) : 777-785.
3. Anuario de morbilidad (1984-2021). Morbilidad Nacional. Consultado en marzo de 2023 en: https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html
4. Arzate-Mejía R.G., Valle-García D. & Recillas-Targa F. (2011). Signaling epigenetics: Novel insights on cell signaling and epigenetics regulation. *Life*, 63 (10): 881-895.
5. Asociación de Médicos de Sanidad Exterior (2012). Amebiasis. Epidemiología y situación mundial. [Internet]. Consultado en enero 2019. Disponible en: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/133-amebiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial>
6. Barquero G. M., & Sáenz C. D. (1996). Parasitosis intestinal. Su manejo farmacológico. *Fármacos*, 9 (2): 116-122.
7. Baxt LA & Singh U. (2008) New insights into Entamoeba histolytica pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(5):489-94.
8. Bello-Lopez J.M., Cruz-Cruz C., Loyola-Cruz M.A., Quiroga-Vargas W., Martínez-Figueroa C., Cureño-Díaz M. A., Fernández-Sánchez V., Ibáñez-Cervantes G. & Durán-Manuel E. M. (2023). Epidemiology of the first seven years of national surveillance of amoebic liver abscesses in Mexico. *Parasitology international*, 92:102678
9. Betanzos A., Bañuelos C. & Orozco E. (2019). Host invasion by pathogenic amoebae: Epithelial disruption by parasite proteins. *Genes*, 10: 618
10. Biggar K. & Li S.C. (2015). Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature reviews molecular cell biology*, 16: 5-17.

11. Borbolla-Vázquez J., Orozco E., Medina-Gómez C., Martínez-Higuera A., Javier-Reyna R., Chavez B., Betanzos A. & Rodríguez M.A. (2016). Identification and characterization of lysine methyltransferases of *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology*, 101 (2) : 351-365
12. Borbolla-Vázquez J., Orozco E., Betanzos A. & Rodríguez M. (2015). *Entamoeba histolytica*: protein arginine transferase 1^a methylates arginine residues and potentially modify the H4 histone. *Parasites and vectors*, 8: 219
13. Botero D. & Restrepo M. (2012) *Parasitosis humanas*. 5^a Edición, Corporación para Investigaciones Biológicas
14. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7(72), 248-254.
15. Cao X., Arnaudo A.M. & García B.A. (2013). Large-scale global identification of protein lysine methylation *in vivo*. *Epigenetics*, 8 (5): 477-485
16. CDC (2013). Amebiasis. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/>
17. Chadee K., Petri W.A., Innes D.J. & Ravdin J. I.. (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *entamoeba histolytica*. *Journal of clinical investigation*, 80: 1245-1254
18. Chou A. & Austin R. L. (2022). *Entamoeba histolytica*. *Statpearls*. Versión on line consultada en marzo de 2023 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557718/>
19. COL. (nd). Catalogue of life, *Entamoeba histolytica*. COL identifier 6347Y. Consultado en enero de 2023 en <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/6347Y>
20. Cornett E. M., Ferry L., Defossez P- A. & Rothbart S. B. (2019). Lysine methylation regulators moonlighting outside the epigenome. *Molecular cell*, 75 (6): 1092-1101.
21. Cornick S. & Chadee K. (2017). *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue barriers*, 5(1): e11283386.

22. Cornick S., Moreau F. & Chadee K. (2016). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 evokes mucin exocytosis from colonic goblet cells via $\alpha 3$ integrin. *PLOS pathogens*, 12 (4):
23. Croken M. M., Nardelly, S.C. & Kim K. (2012). Chromatin modifications, epigenetics and how protozoan parasites regulate their lives. *Trends in parasitology*, 8 (5): 202-213.
24. Cui L., Fan Q., Cui L. & Miao J. (2008). Histone lysine methyltransferase and demethylases in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 38 (10): 1083-1097.
25. Daks A, Mamontova V, Fedorova O, Petukhov A, Shuvalov O, Parfenyev S, Netsvetay S, Venina A, Kizenko A, Imyanitov E & Barlev N. (2021) Set7/9 controls proliferation and genotoxic drug resistance of NSCLC cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1:(572):41-48.
26. De Cádiz A.E., Jeelani G., Nakada-Tsukui K., Caler E. & Nosaki T. (2013). Transcriptome análisis of encystation in *Entamoeba invadens*. *Plos one*, 8 (9).
27. Dillon S.C., Zhang, X., Trievel R.C. & Cheng X. (2005). The SET-domain protein superfamily: proteine lysine methyltransferases. *Genome biology*, 6 (8): 227.
28. Dixon S.E., Stilger K.L., Elias E.V., Naguleswaran A. & Sullivan Jr W.J. (2010). A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 173 (1): 1-9.
29. Donlin L.T., Andresen C., Just S., Rudensky E., Pappas C.T., Kruger M., Jacobs E.Y., Unger A., Zieseniss A., Dobenecker M.W., Voelkel T., Chait B.T., Gregorio C.C., Rottbauer W., Tharakhovskiy A. & Linke W.A. (2012). Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes and development*, 26: 114-119.
30. Elnekave K. Siman-Tov R. & Ankri S. (2003). Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite immunology*, 25 (11-12): 597-608.

31. Espinosa-Cantellano M. & Martínez-Palomo A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clinical microbiology reviews*, 13 (2): 318-331.
32. Faust D.M. & Guillen N. (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes and infection*, 14: 1428-1441.
33. Flisser A. & Perez-Tamayo R. (2006). Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos. Pp 321-335.
34. Foda B.M. & Singh U. (2015). Dimethylated H3K27 is a repressive epigenetic histone mark in the protist *Entamoeba histolytica* and is significantly enriched in genes silenced via the RNAi pathway. *Journal of biological chemistry*, 290 (34): 21114-21130.
35. García M. I., Muñoz A. B., Aguirre I. A. Polo R. I., García M. An. & Refoyo R. P. (2008). Manual de laboratorio de Parasitología. 4. Amebas parásitas y/o comensales. *Reduca*, 1(1): 28-37.
36. Gherardini P. F. & Helmer-Citterich M. (2008). Structure-based function prediction: approaches and applications. *Briefings in functional genomics and proteomics*, 7 (4): 291-302.
37. Ghosh S., Padalia J. & Moonah S. (2019). Tissue destruction caused by *Entamoeba histolytica* parasite: Cell death, inflammation, invasion and the gut microbiome. *Parasitology*, 6: 51-57.
38. Gómez J.C., Cortes J.A., Cuervo S.I. & Lopez M.C. (2007). Amebiasis intestinal. *Infectio*, 11 (1): 36-45.
39. Guillén. (2023). Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence*, 14 (1): 2158656
40. Gunawan M., Venkatesan N., Loh J.T., Wong J.F., Berger H., Neo W.H., Li L.Y., La Win M.K., Yau Y.H., Guo T., See P.C., Yamazaki S., Chin K. C., Gingras A.R., Shochat S.G., Ng L.G., Sze S.K., Ginhoux F. & Su IH. (2015). The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. *Nature Immunology*, 16:505–516.

41. Gutiérrez-Gutiérrez F. & Palomo-Ligas L. (2023) Change in the incidence of intestinal diseases caused by parasitic protozoa in the Mexican population during the period (2015-2019) and its association with environmental and socioeconomic risk factors. *Parasitology research*, 122:903-914
42. Han N., Jeschke U., Kuhn C., Hester A., Czogalla B., Mahner S., Rottmann M., Mayr D., Schmoeckel E., Trillsch F. (2020). H3K4me3 is a potential mediator of antiproliferative effects of calcitriol (1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$) in ovarian cancer biology. *International journal of molecular sciences*, 21: 2151.
43. Heaslip A. Nishi M., Stein B. & Hu K. (2011). The motility of a human parasite, *Toxoplasma gondii*, is regulated by a novel lysine methyltransferase. *PLOS pathogens*, 7 (9): e1002201
44. Herman E., Siegesmund M.A., Bottery M.J., van Aerle R., Shather M.M., Caler E., Dacks J.B. & van der Giezen M. (2017), Membrane trafficking modulation during *Entamoeba* encystation. *Scientific reports*, 7: 1284
45. Hernández-Acatitla E.A. (2017). Análisis de la dimetilación de lisinas en proteínas de *Entamoeba histolytica* en condiciones basales y en la fagocitosis. Tesis de Maestría. CINVESTAV
46. Hornbeck P.V., Zhang B., Murray B., Kornhauser J.M., Latham V., Skrzypek E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*, 43:D512–D520.
47. Huang, J. & Berger S.L. (2008). The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Current opinion in genetics and development*, 18: 152-158
48. Huston C.D. (2004). Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends in parasitology*, 20 (1): 23-26
49. Huston C.D., Boettner D.R., Miller-Sims V. & Petri W.A. (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and immunity*, 71 (2): 964-972.

50. ITIS (nd). Integrated Taxonomic Information System. *Entamoeba histolytica*. Taxonomic serial: 43907. Consultado en enero 2019 en http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=43907
51. Jiang L., Mu J., Zhang Q., Ni T., Sirinivasan P., Rayavara K., Yang W., Turner L., Lavstsen T., Theander T. G., Peng W., Wei G., Jing Q., Wakabayashi Y., Bansal A., Luo Y., Ribeiro J. M.C., Scherf A., Aravind L., Zhu J., Zhao K. & Miller L. H. (2013). PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Nature* (499 (7457): 223-227.
52. Kantor M., Abrantes A., Estevez A., Schiller A., Torrent J., Gascon J., Hernandez R & Ochner C. (2018). *Entamoeba histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis and vaccine development. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, V.2018: 4601420
53. Khoury,G.A., Baliban,R.C. and Floudas,C.A. (2011) Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, 1, 90.
54. Kim J., Park S., Kwon S. H., Lee E. J. & Lee J. S. (2021). Set-1 mediated H3K4 methylation is required for *Candida albicans* virulence by regulating intracellular level of reactive oxygen species. *Virulence*, 12 (1): 2468-2648.
55. Lanouette S., Mongeon V., Figeys D. & Couture J.F. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular systems biology*, 10 (724) : 1-26
56. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. & Thornton J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26 (2): 286-291.
57. Leinhart K. & Brown M. (2011) SET/MYND lysine methyltransferases regulate gene transcription and protein activity. *Genes*, 2: 210-218
58. Levecke B., Dreesen L., Dorny P., Verweji J., Vercammen F., Casaert S. Vercruyssen J. & Geldhof P. (2010). Molecular identification of *Entamoeba* spp. In captive nonhuman primates. *Journal of clinical microbiology*, 48 (8): 2988-2990

59. Liu Y., Liu N., Yin Y., Chen Y., Jiang J & Ma Z. (2015). Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism and multiple stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environmental microbiology*, 17 (11): 4615-4630.
60. Lozano-Amado D. Herrera-Solorio A.M., Valdes J., Alemán-Lazarini L., Almaraz-Barrera M.J., Luna-Rivera A., Vargas M. & Hernández-Rivas R. (2016). Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasites & vectors*, 9:19.
61. Luo M. (2018). Chemical and biochemical perspectives of protein lysine methylation. *Chemical reviews*, 118 (14): 6656-6705.
62. MacFarlane R. C., Shah P. H. & Singh U. (2005). Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *International Journal of Parasitology*, 35 (5): 533-542.
63. Makioka A. Kumagai M. Hiranuka K. Kobayashi S. & Tekeuchi T. (2011). *Entamoeba invadens*: Identification of ADF/cofilin and their expression analysis in relation to encystation and excystation. *Experimental parasitology*, 127: 195-201
64. Mann M. & Jensen O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21: 255-261.
65. Mirelman D., Michael A. & Bracha R. (2008). Epigenetic transcriptional gene silencing in *Entamoeba histolytica*. *Life*, 60 (9): 598-604.
66. Moncada D., Keller K. & Chadee K. (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alters its protective function. *Infection and immunity*, 71 (2): 838-844.
67. Moore K. E. & Gozani O. (2014). An unexpected journey: Lysine methylation across the proteome. *Biochimica Et Biophysica. Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 1839: 1395-1403
68. Munguía-Robledo S. (2018). Expresión de las metiltransferasas de lisina EhHKMT2 y EhHKMT4 de *Entamoeba histolytica* durante la eritrofagocitosis. Tesis de maestría. CINVESTAV.

69. Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Immunol*. 2016 May 12;7:175.
70. Nakada-Tsukui K. & Nozaki T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, 7: 175
71. NIAID (2018). NIAID Emerging Infectious Diseases/Pathogens. Consultado en marzo de 2023 en: <https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens>
72. Okada M. & Nozaki T. (2006). New insights onto molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Archives of medical research*, 37: 244-252.
73. Okada M., Huston C. D., Mann B. J., Petri W. A., Kita K. & Nozaki T. (2005). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell*, 4 (4): 827-831.
74. Organización Mundial de la Salud (1996). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias – Segunda edición. Organización Mundial de la Salud, Ginebra [versión electrónica]. Consultado en enero de 2019. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.1.1.html>
75. Orozco E., Guarneros G., Martínez-Palomo A. & Sánchez T. (1983). *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as virulence factor. *Journal of experimental Medicine*, 158: 1511-1521.
76. Paik W.K. & Kim S. (1971). Protein methylation. *Science*, 174 (4005) : 114-119
77. Park Y., Powell R.T., Tripathi D.N., Dere R., Ho T.H., Blasius T.L., Chiang Y., Davis I.J., Fahey C.C., Hacker K.E., Verhey K.J., Bedford M.T., Jonasch E., Rathmell W.K. & Walker C.L. (2016). Dual chromatin and cytoskeletal remodeling by SET2. *Cell*, 166 (4) : 950-962.
78. Pérez- Toledo K., Rojas-Meza A. P., Mancio-Silva L., Hernández-Cuevas N.A., Delgadillo D. M., Vargas M., Martínez-Calvillo S., Schert A. & Hernández-Rivas R.

- (2009). *Plasmodium falciparum* heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of *var* genes. *Nucleic acids research*, 37 (8): 2596-2065.
79. Pineda E. & Perdomo D. (2017). *Entamoeba histolytica* under oxidative stress: What countermeasure mechanisms are in place?. *Cells* 6(4): 44.
80. Pivovarova Y., Liu J., Lesigang J., Koldyka O. Rauschmeier R., Hu K. & Dong G. (2018). Structure of a novel dimeric SET domain methyltransferase that regulates cell motility. *Journal of molecular biology*, 430 (21): 4209-4229.
81. Qian C. & Zhou M. M. (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cellular an molecular life sciences*, 63 (23): 2755-2763
82. Ralston K. (2015). Taking a bite: Amoebic trophocytosis in *Entamoeba histolytica* and beyond. *Current opinion in microbiology*, 28: 26-35.
83. Ralston K. S. & Petri Jr W. A. (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in parasitology*, 27 (6): 254-263.
84. Ramazi S. & Zahiri J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021.
85. Recillas F. & Escamilla M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje bioquímico UNAM*, 28: 171-201.
86. Ren K., Mou Y. N., Tong S. M., Ying S. H. & Feng M. G. (2021). DIM5/KMT1 controls fungal insect pathogenicity and genome stability by methylation of histone H3K4, H3K9 and H3K36. *Virulence*, 12 (1): 1306-1322
87. Rice J.C. & Allis D. (2001). Code of silence. *Nature*, 414 (6861): 258-261.
88. Salusso A., Zlocowski N., Mayol G. F., Zamponi N. & Rópolo A. S. (2017). Histone methyltransferase 1 regulates the encystation process in the parasite *Giardia lamblia*. *The FEBS journal*, 284: 2396-2409.
89. Samie A., ElBakri A & AbuOdeh R. (2012). Amoebiasis in the tropics: Epidemiology and pathogenesis. *Current topics in tropical medicine*. Dr. Alfonso Rodriguez-Morales (Ed), InTec.

90. Santos F., Nequiz M., Hernández-Cuevas N. A., Hernández K., Pineda E., Encalada R., Guillén N., Luis-García E., Saralegui A., Saavedra E., Pérez-Tamayo R. & Olivos-García A. (2015). Maintenance of intracellular hypoxia and adequate heat shock response are essential requirements for pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, 17(7): 1037-1051.
91. Saraswathy N. & Ramalingam P. (2011). Phosphoproteomics en N. Saraswathy & P. Ramalingam (Eds). *Concepts and techniques in genomics and proteomics* (pp. 203-211) Woodhead Publishing.
92. Sautel C.F., Cannella D., Bastien, O., Kieffer, S., Alderbert D., Garin J., Tardieux I., Belrhali H. & Hamkimi M. (2007). SET-8 mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in Apicomplexan genomes. *Molecular and cellular biology*, 27 (16): 5711-5724.
93. Schubert H. L., Blumenthal R. M. & Cheng X. (2006). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in biochemical Sciences*, 26 (6): 329-335.
94. Shamsuzzaman S.M & Hashiguchi Y. (2002). Thoracic amebiasis. *Clinics in chest medicine*, 23 (2): 479-492.
95. Shirley D. T., Farr L., Watanabe K. & Moonah S. (2018). A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. *Open forum infectious diseases*, 5(7): ofy161
96. Sierra-Lopez F., Baylon-Pacheco L., Espiritu-Gordillo P., Lagunes-Guillén A., Chávez-Munguía B. & Rosales-Encina J. L. (2018). Influence of micropatterned grill line son *Entamoeba histolytica* trophozoites morphology and migration. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8 (2018)
97. Sim S. Yong T. S., Park S. J., Im K. I., Kong Y., Ryu J.S., Min D. Y., & Shin M.H. (2005). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK ½ is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *Journal of immunology*, 174 (7): 4279-4288
98. Singh M., Sharma S., Bhattacharya A. & Tatu U. (2015). Heat shock protein 90 regulates encystation in *Entamoeba*. *Frontiers in microbiology*, 6: 125.

99. Sivagurunathan S., Heaslip A., Liu J. & Hu K. (2013). Identification of functional modules of AKMT, a novel lysine methyltransferase regulating the motility of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 189: 43-53
100. Sjöblom B., Salmazo A. & Djinovic-Carugo K. (2008). Alpha actinin structure and regulation. *Cellular and molecular life sciences*, 65 (17) : 6288-6701
101. Somlata, Bhattacharya, A. (2015). Phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. In: Nozaki, T., Bhattacharya, A. (eds) Amebiasis. Springer, Tokyo.
102. Stanley S.L. & Reed S. (2001). Microbes and microbial toxins. Paradigms for microbial mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 280: G1049-G1054.
103. Stanley SL. (2003). Amoebiasis. *The lancet*, 361: 1025-1034
104. Su I., Dobenecker M.W., Dickinson E., Oser M., Basavaraj A., Marqueron R., Viale A., Reinberg D., Wülfing C. & Tarakhovsky A. (2005). Polycomb group protein Ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell*, 121: 425-436.
105. Sun J. J., Li H. L., Ma H., Shi Y., Yin L. R. & Guo S. J. (2019). SMYD2 promotes cervical cancer growth by stimulating cell proliferation. *Cell and bioscience*, 9: 75.
106. Tanyuksel M. & Petri W. A. (2003) Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical microbiology reviews*, 16 (4): 713-729.
107. Tillack M., Biller L., Irmer H., Freitas M., Gomes M. a Tannich E. & Bruchhaus I. (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *Biomed central genomics* 8:170
108. Torres-Guerrero H., Peattie D.A. & Meza I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 45:121-130.
109. Torres-Guerrero H., Peattie D.A. & Meza I. (1991). Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 45:121-130.

110. Tovy A., Hertz R., Siman-Tov R., Syan S., Faust D., Guillen N. & Ankri S. (2011). Glucose starvation boost *Entamoeba histolytica* virulence. *PLOS Neglected tropical diseases*, 5 (8): e1247.
111. Tracy C., Warren J. S., Szulik M., Wang L., Garcia J., Makaju A., Russell K., Miller M. & Franklin S. (2018). The SMYD family of methyltransferases: Role in cardiac and skeletal Muscle Physiology and Pathology. *Current opinion in physiology*, 1: 140-152.
112. Upcroft, J.A., Campbell, R.W., Benakli, K., Upcroft P. & Vanelle P. (1999). Efficacy of new 5-nitroimidazoles against Metronidazol-susceptible and –resistant *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (1): 73-76.
113. Vázquez, J., Franco E., Reyes G. & Meza I. (1995). Characterization of adhesión plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell motility and the cytoskeleton*, 37: 37-45
114. Vermillion K. L., Lidberg K. A. & Gamill L. S. (2014). Cytoplasmic protein methylation is essential for neural crest migration. *The journal of cell biology*, 204 (1): 95-109
115. Voigt H. & Guillen N. (1999) New insights into the role of cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cellular microbiology*, 1 (3): 195-203.
116. Völker P. & Angrand P.O. (2006). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochemie*, 89: 1-20.
117. Volz J.C., Bártfai R., Petter M., Langer C., Josling G.A., Tsuboi T., Schwach F., Baum J., Rayner J.C., Stunnenberg H.G., Duffy M.F. & Cowman A.F. (2012). PfSET10, a *Plasmodium falciparum* methyltransferase, maintains the active *var* gene in a poised state during parasite división. *Cell host and microbe*, 11: 7-18.
118. Walsh JA. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. *Reviews of infectious diseases*, 8: 228-238

119. Wang L., Wang Q. T., Liu Y.P., Dong Q. Q., Hu H. J., Miao Z., Li S., Liu Y., Zhou H., Zhang T.C., Ma W. J. & Luo X. G. (2017). ATM signaling pathway is implicated in the SMYD3-mediated proliferation and migration of gastric cells. *Journal of gastric cancer*, 17 (4): 295-305
120. Weber C., Guigon G., Bouchier C., Frangeul L., Moreira S., Sismeiro O., Gouyette C., Mirelman D., Coppe J. Y. & Guillen N. (2006). Stress by heat shock induces massive downregulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic cell*, 5 (5) : 871-875.
121. Weihing R.R. & Korn E.D. (1970). e-N-Dimethyllysine in amoeba actin. *Nature*, 227 (1263) : 1263-1264
122. World Health Organization (1997). Amoebiasis. *Weekly Epidemiological Record*, 72 : 97-100
123. Wu Z., Connolle J. & Biggar K. K. (2017). Beyond histones – the expanding roles of protein lysine methylation. *The febs journal*, 284: 2732-2744.
124. Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A & Gómez A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis. State of the art. *Infection, genetics and evolution*, 9: 1023-1032
125. Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A., Gomez A., Ramiro M., Cerritos R., González E., Hernandez E. & Partida O., (2011). Novelthies on Amoebiasis: A neglected tropical disease. *Journal of global infectious disease*. 3 (2): 166 - 174.
126. Yu Y. & Chadee K. (1997). *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasites. enterocyte contact. *Gastroenterology*, 112 (5): 1536-1547
127. Zhang X., Wen H. & Shi X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 44 (1): 14-27