

# CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES DE VIRULENCIA DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Ramírez Calderón Yesica (1), Padilla-Vaca Luis Felipe (2)

<sup>1</sup>Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato. qfbyesicaramirezcalderon@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. padillaf@ugto.mx

## Resumen

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito intestinal y el agente causante de la amibiasis en los seres humanos, una de las principales causas de muerte entre las infecciones parasitarias en el mundo. En este trabajo se compara la expresión del gen *Ehaig1* en la cepa virulenta HM-1, avirulenta UG10 y sobre-expresante UG-AIG, así como la virulencia de estas cepas. Los trofozoítos de la cepa sobreexpresante aumentaron la expresión del gen *Ehaig1* con respecto a la cepa parental UG10. La virulencia *in vitro* de las cepas correlaciona con los niveles de expresión del gen en estudio. La función de las proteínas AIG en *E. histolytica* podría ser como determinante de virulencia, regulando la expresión de factores de virulencia, protegiendo al parásito durante el proceso infeccioso o confiriéndole una alta plasticidad metabólica favoreciendo su adaptación y sobrevivencia.

## Abstract

*Entamoeba histolytica* is a protozoan intestinal parasite and the causative agent of amebiasis in humans, one of the leading causes of death among parasitic infections in the world. In this paper *Ehaig1* gene expression was compared in the virulent strain HM-1, avirulent UG10 and UG-AIG over-expressing, and the virulence also was evaluated. Trophozoites of UG-AIG strain increased their expression of *Ehaig1* gene relating to the parental strain UG10. *In vitro* virulence of *E. histolytica* strains correlates with the expression levels of this gene. The role of AIG proteins in *E. histolytica* could be as a determinant of virulence, regulating the expression of virulence factors, protecting the parasite during the infective process or giving it a high metabolic plasticity promoting their adaptation and survival.

### Palabras Clave

*Entamoeba histolytica*; parásito; virulencia

## INTRODUCCIÓN

### Amebiasis

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito intestinal, el agente causante de la amebiasis en los seres humanos, una de las principales causas de muerte entre las infecciones parasitarias en el mundo. Se estima que el 10% de la población humana está infectada, causando la enfermedad en 50 millones y hasta 100.000 muertes cada año [1,2].

Con el fin de identificar los genes cuya expresión se correlaciona con el fenotipo patógeno o virulento de varias cepas de *E. histolytica*, diferentes enfoques se han realizado, ya sea comparando los transcriptomas o proteomas de cepas virulentas y no virulentas. En la mayoría de los casos, la comparación se realiza entre la cepa virulenta HM-1:IMSS y la cepa no virulenta Rahman, cuyo fondo genético es diferente [3], lo que representa una desventaja en la búsqueda de genes de virulencia.

### Virulencia

La virulencia de las amibas es determinada por factores propios del parásito y factores del hospedero. La cepa UG10 no virulenta fue derivada de la cepa HM-1:IMSS virulenta, la cual ha sido caracterizada parcialmente en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Al comparar el transcriptoma de los trofozoítos de la cepa UG10 avirulenta con su parental virulenta, no se observaron diferencias en la expresión de genes de virulencia clásicos, lo que sugiere la presencia de nuevos factores y/o determinantes de virulencia. Varios de los genes expresados diferencialmente pertenecen a la familia de las pequeñas GTPasas, que codifican para proteínas Rab y AIG. El nivel de expresión del gen *Ehaig1* se correlaciona con la virulencia de varias cepas de amibas. Los perfiles de expresión específicos de amibas virulentas y no virulentas con el mismo fondo genético pueden proporcionar nuevos conocimientos para entender el mecanismo de modulación de la virulencia de *E. histolytica* [3].

La familia de proteínas **AIG1** son proteínas G con un dominio de tipo Ras [4,5]. En vertebrados y plantas, se ha sugerido que las proteínas AIG1 desempeñan un papel importante durante las respuestas de defensa contra bacterias, y respuestas a estrés abiótico en *Arabidopsis* [6].

Las proteínas AIG en amibas podrían estar indirectamente involucradas en el proceso patógeno. Pueden regular la expresión de factores de virulencia, proteger al parásito durante el proceso infeccioso o conferir alta plasticidad metabólica favoreciendo su adaptación y sobrevivencia [4,5].

En el presente trabajo se comparó el nivel de expresión del gen *Ehaig1* en las cepas HM-1, UG10 y en la transfectante UG-AIG que sobre-expresa el gen *Ehaig1*. Así mismo, se evaluó la virulencia de la cepa sobre-expresante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas de *Entamoeba histolytica*.** Se utilizaron tres cepas de *E. histolytica*: HM-1 (virulenta), UG10 (avirulenta) y UG-AIG (transfectante). Para el cultivo de los trofozoítos se utilizó el medio TYI-S-33.

**Extracción y purificación de RNA.** Se cosecharon los trofozoítos de las cepas de *E. histolytica* y se obtuvo el RNA empleando el kit Aurum™ Total RNA (BioRad). El lisado celular se transfirió a una columna de unión de RNA, se lavó varias veces y se incubó con DNasa. El ARN fue eluido de la columna y se precipitó con acetato de sodio y etanol absoluto por 8 horas a -20°C. Posteriormente se lavó el precipitado, se solubilizó y se cuantificó.

**Síntesis de cDNA.** Para la síntesis de la cadena de cDNA, se usaron 3 µg de RNA total, el cual se transcribe en forma reversa empleando un oligo (dT) como iniciador y la enzima transcriptasa reversa incubando por 50 min a 42°C.

**PCR.** El cDNA sintetizado se utilizó como templado para la amplificación por PCR, empleando oligonucleótidos específicos para el gen *GAPDH* (control) y *AIG*.

**Efecto citopático.** Para medir la capacidad de las amibas para destruir la monocapa de células epiteliales, se colocaron 50, 100, 200 y 300 mil

amibas por pozo conteniendo una monocapa confluyente de células MDCK. La placa se incubó a 37°C durante 60 min y se paró la reacción enfriando la placa durante 10 min a 4°C. Se lavó 2 veces con PBS-A, se fijó con p-formaldehído, se tiñó con azul de metileno y se determinó el porcentaje de destrucción midiendo la absorbancia a 650 nm.

**Actividad hemolítica.** Para evaluar la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, se incubaron amibas con eritrocitos en una proporción 1:1000 en amortiguador PIPES-Tris. Se incubaron por 90 minutos y se calculó la actividad hemolítica midiendo la absorbancia del sobrenadante a 570 nm.

**Fagocitosis y digestión de bacterias.** Se adicionaron 500 µL de un cultivo de *Escherichia coli* que expresa la proteína roja fluorescente. Se incubó 1 hora a 37°C y se lavó con medio TYI-33. Para la fagocitosis se cosecharon las amibas y se fijaron con p-formaldehído. Para el ensayo de digestión se agregaron 6 mL de medio TYI-S-33 y se incubó durante 3 horas. Se cosecharon las amibas y se fijaron. Cada muestra fue observada en el microscopio de fluorescencia Carl Zeiss LSM700.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de la extracción y purificación de RNA para las cepas HM-1, UG10 y UG-AIG, el ARN de cada cepa se cuantificó y se separó en un gel de agarosa al 1% para valorar su integridad. En la figura 1 se observa el RNA obtenido de las tres cepas, observándose las dos subunidades del RNA ribosomal, indicando que es de buena calidad. El RNA obtenido se usó como templado en una reacción de PCR para corroborar la ausencia de contaminación de gDNA (Figura 2).

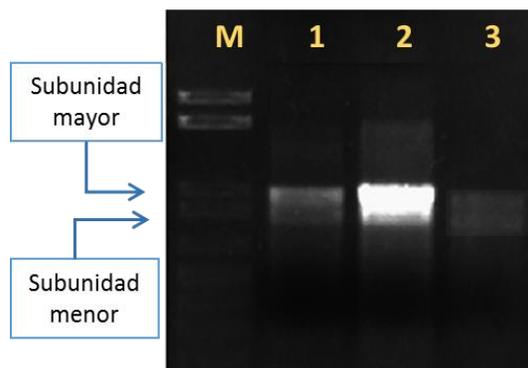


Figura 1. Integridad para RNA de tres cepas de *E. histolytica*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. RNA de la cepa HM-1 (Carril 1), UG10 (Carril 2), UG-AIG (Carril 3). M marcador de tamaño molecular (pb).

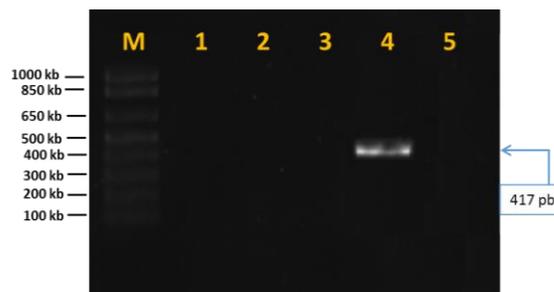


Figura 2. RNA sin contaminación con gDNA. Amplificación por PCR de un fragmento de 417 pb del gen *GAPDH* usando como templado RNA de las cepas HM-1, UG10, UG-AIG (Carril 1, 2 y 3), cDNA (Carril 4, control positivo) y H<sub>2</sub>O (Carril 5, control negativo). M marcador de tamaño molecular (pb).

Se evaluó el nivel de expresión del gen *Ehaig1* en los trofozoitos de las cepas HM-1, UG10 y UG-AIG utilizando como templado cDNA de cada cepa. Como ya fue previamente reportado, los niveles de expresión de la cepa no virulenta (UG10) son menores con respecto a la cepa parental virulenta (HM-1). La cepa sobre-expresante recuperó los niveles de expresión (Figura 3).

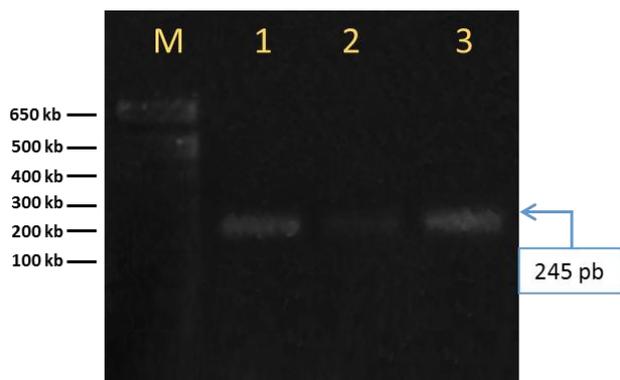


Figura 3. Evaluación de la expresión del gen *Ehaig1*. Amplificación por PCR de un fragmento de 245 pb del gen *Ehaig1* empleando como templado cDNA de las cepas HM-1 (1), UG10 (2) y UG-AIG (3). M marcador de tamaño molecular (pb).

Para determinar si la expresión del gen *Ehaig1* está relacionada con la virulencia de las amibas, se evaluó la capacidad de las amibas para destruir monocapas de células MDCK. La cepa parental virulenta HM-1 destruyó totalmente la monocapa, mientras que la cepa avirulenta UG10 perdió su capacidad para destruir monocapas celulares. La cepa transfectante que sobreexpresa el gen *Ehaig1* mostró una recuperación parcial de su capacidad para destruir monocapas celulares (Figura 4). En la figura 5 se muestran imágenes de la destrucción de la monocapa por las diferentes cepas amibianas.

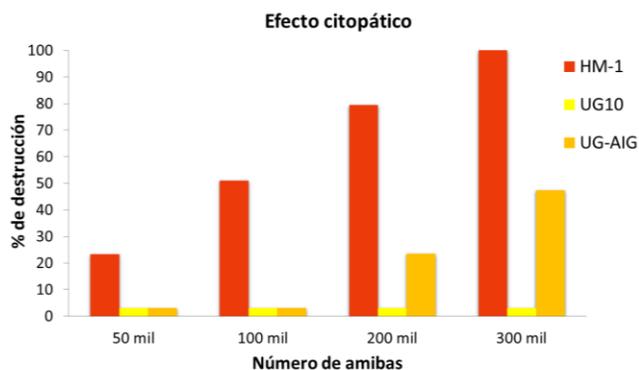


Figura 4. Destrucción de monocapas MDCK por trofozoitos de diferentes cepas de *E. histolytica*. Se usaron amibas de las cepas HM-1, UG10, UG-AIG en distintas cantidades para medir la destrucción de la monocapa.

	HM-1	UG10	UG-AIG
100 mil amibas	50%	0%	0%
200 mil amibas	79%	0%	23%
300 mil amibas	100%	0%	47%

Figura 5. Destrucción de monocapas MDCK por trofozoitos de *E. histolytica*. Se adicionaron 100 mil, 200 mil y 300 mil trofozoitos de cada cepa (HM-1, UG10 y UG-AIG) y se evaluó la destrucción a los 60 min.

Se determinó la capacidad de las amibas para lisar eritrocitos humanos. Se observó que la cepa sobreexpresante recupera su capacidad de lisar glóbulos rojos a niveles similares a la cepa virulenta HM-1 (Figura 6).

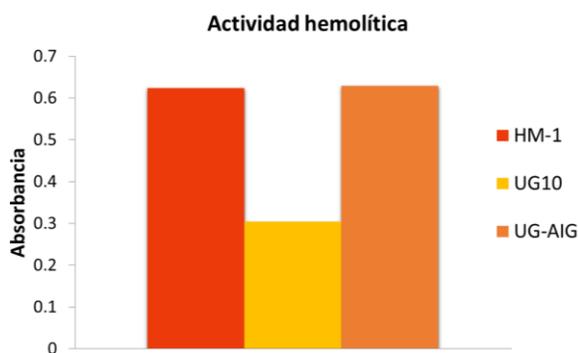
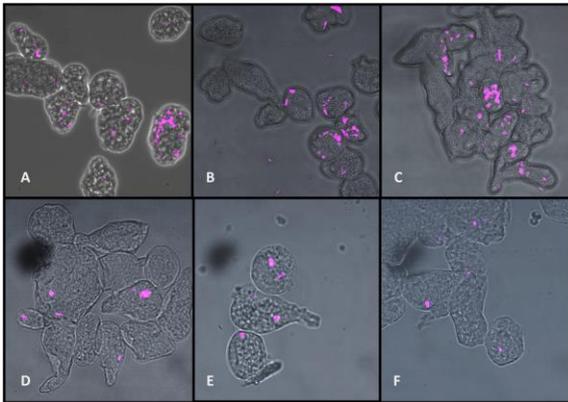


Figura 6. Actividad hemolítica de trofozoitos de las cepas HM-1, UG10 y UG-AIG.

Se evaluó la fagocitosis y digestión de bacterias fluorescentes. Aunque el experimento mostró claramente este proceso, no fue posible distinguir diferencias entre las tres cepas evaluadas (Figura 7).



**Figura 7. Fagocitosis y digestión de bacterias fluorescentes por trofozoitos de *E. histolytica*. Fagocitosis y digestión de la cepa HM-1 (A y D), UG10 (B y E) y UG-AIG (C y F).**

2. M. Ali, Ibne Karim, Graham Clark C, Petri Jr William A. (2008). *Infect Genet Evol*, 8 (5), 698-707.
3. Lozano Mendoza J. (2015). Trabajo de tesis de maestría: Análisis comparativo de dos cepas de *Entamoeba histolytica* genéticamente relacionadas que presentan diferente virulencia.
4. Anaya-Velázquez, Padilla-Vaca, (2011). Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. *Future Microbiol* 6, 255-258.
5. Padilla-Vaca F., Anaya-Velázquez F. (2010). Insights into *Entamoeba histolytica* virulence modulation. *Infect. Disord. Drug Targets*. 10(4):242-250.
6. Stenmark H, Olkkonen VM. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Bio*, 2 (5) ,1-7.

## CONCLUSIONES

El nivel de transcrito del gen *Ehaig1* fue mayor en la cepa UG-AIG que en la cepa parental UG10. La sobreexpresión del gen *Ehaig1* aumentó la virulencia de los trofozoitos de *E. histolytica*, determinada por su capacidad para destruir monocapas celulares y lisar glóbulos rojos, sugiriendo su participación en la virulencia.

La fagocitosis y digestión de bacterias no se afecta significativamente en la cepa amibiana que sobreexpresa el gen *Ehaig1*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Felipe Padilla por aceptarme en su grupo de trabajo. A la Dra. Ángeles Rangel Serrano, la QFB Itzel Páramo Pérez y M en C. Fátima Ramírez Montiel por apoyarme en el desarrollo experimental. A mis compañeros del Laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos. Gracias a Mane y a mis papás por creer en mí.

## REFERENCIAS

1. (1997). Amoebiasis. *Weekly Epidemiological Record*, 72 (14), 97-100.