

CARACTERIZACIÓN DEL ENQUISTAMIENTO EN LA CEPA IP-1 DE *ENTAMOEBIA INVADENS*

Amezola Rivera Jesús Antonio (1), Villagómez Castro Julio César (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [ja.amezolarivera@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [Castroj@ugto.mx]

Resumen

Actualmente se cuenta con información acerca del proceso de cultivo y enquistamiento de trofozoítos en los medios TYI-S-33 y LG, sin embargo no se ha comparado la eficiencia entre uno y otro cuando se induce la diferenciación celular en medio LG-47. En el presente trabajo se comparó el efecto de preinocular trofozoítos de Entamoeba invadens IP-1 en ambos medios de cultivo (TYI-S-33 y LG) y su efecto en el proceso de enquistamiento inducido en medio LG-47, observándose que no existen diferencias significativas entre utilizar como medio de preinóculo a uno u otro medio de cultivo para la diferenciación celular de Entamoeba invadens IP-1 en medio LG-47.

Abstract

Information is currently available on the cultivation and encystment of trophozoites in TYI-S-33 and LG culture media, however, the efficiency between one and another has not been compared when cell differentiation is induced in LG-47 medium. In the present work, the effect of preinoculate trophozoites of Entamoeba invadens IP-1 was compared in both culture media (TYI-S-33 and LG) and was analyzed its effect over the induced encystment process in LG-47 medium, it was observed that there are no significant differences between both medium used as a preinoculum medium for the cell differentiation of Entamoeba invadens IP-1 in LG-47 medium.

Palabras Clave:

Diferenciación amibiana; TYI-S-33; LG; LG-47.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba invadens es un parásito de reptiles ampliamente utilizado para los estudios de diferenciación amibiana, ya que, en el parásito de humanos, *Entamoeba histolytica*, aún no se ha logrado reproducir in vitro el enquistamiento [1]. Para inducir la diferenciación amibiana, se han utilizado medios basados en la disminución de glucosa [2] y la disminución de glucosa y de la presión osmótica [3]. Un aspecto relevante es el cultivo previo de los trofozoítos en medio LG [4] para favorecer el enquistamiento en lugar del precultivo en medio TYI-S-33 [5]. En este trabajo se comparó el efecto del precultivo de la cepa IP-1 de *E. invadens* en medio LG y TYI-S-33 cuando el enquistamiento amibiano se indujo en medio LG-47.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se utilizó la cepa IP-1 de *Entamoeba invadens*.

Preparación de medios de cultivo (TYI-S-33, LG y LG 47)

Medio TYI-S-33

Fue preparado de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Diamond *et al.*, 1978 [6] y adicionado de suero bovino descomplementado (SB, 16% v/v) y 100 μ L de una mezcla de antibióticos (Penicilina G/Gentamicina).

Medio LG y Medio LG-47

El medio LG fue preparado utilizando las mismas condiciones que para el medio TYI-S-33, sin la adición de glucosa como lo describieron Vazquez de Lara-Cisneros *et al.*, 1984 [2]. El medio LG-47 se preparó por dilución al 47% del medio LG, es decir; por cada 100 mL de medio: 47 mL de medio LG, 5 mL de suero bovino y 48 mL de agua estéril de acuerdo a lo descrito por Turner *et al.*, 2007 [3].

Preservación de la cepa amibiana y Curva de crecimiento amibiano

Tubos con tapón de rosca de 13x100 mm, conteniendo cada uno de ellos 6.1 mL de medio TYI-S-33 completo, se inocularon con 10,000-20,000 trofozoítos y se incubaron a 28 °C en posición inclinada. El crecimiento celular fue observado cada 24 horas utilizando el microscopio invertido hasta que se obtuvo la confluencia celular evaluada por la formación de una monocapa amibiana en la pared del tubo. Estos tubos se utilizaron para resembrar los trofozoítos para su mantenimiento y replicación para los experimentos.

La curva de crecimiento se realizó por duplicado inoculando 20,000 células/mL en ambos medios de cultivo: TYI-S-33 y LG, adicionados con 16% de SB. Cada 24 horas se contaron los trofozoítos recuperados en 2 tubos de cada medio de cultivo. Para ello se colocaron los tubos en un baño de agua-hielo durante 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 280 x g durante 5 minutos a 4 °C y se decantó el medio sobrenadante. La pastilla celular se lavó por centrifugación con medio TYI-S-33 sin SB y se resuspendió en 1 mL del mismo medio. Los trofozoítos recuperados se contaron en una cámara de Neubauer.

Enquistamiento y Des enquistamiento

El proceso de enquistamiento fue realizado por duplicado. Se resuspendieron los trofozoítos cultivados en medio completo TYI-S-33 y LG, se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en medio LG-47, adicionado con antibióticos, a una densidad de 3.5×10^5 trofozoítos/mL en viales de 2 mL de capacidad. Se incubaron los viales a 28 °C y se recuperaron cada 24 horas 3 viales de cada condición de cultivo. Se contó el número de células recuperadas utilizando el protocolo descrito anteriormente.

En alícuotas de los viales se determinó la cantidad de células totales y el número de quistes recuperados. La viabilidad celular se determinó utilizando el colorante azul tripano al 0.2 % (p/v) utilizando el criterio de exclusión del colorante por las células vivas, mientras que las células muertas no lo hacen. El % de enquistamiento se calculó con base al número de quistes obtenidos en

función del total de células recuperadas. La eficiencia del enquistamiento se evaluó considerando el total de quistes recuperados con respecto al total de células inoculadas. La resistencia al detergente, criterio de formación de quistes, se evaluó en alícuotas de las células recuperadas de los ensayos de enquistamiento, las cuales se lavaron con PBS y se expusieron durante 10 minutos a la acción del detergente Tritón X-100 al 0.2 % (v/v) a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavadas 3x con agua y resuspendidas en un volumen conocido de PBS para contar el número de células remanentes. Se utilizó como criterio de maduración de los quistes, la tinción de la pared celular con el colorante fluorescente Calcofluor W2R (0.2 % p/v), observando la integridad de ésta y contando el número de núcleos presentes en las células recuperadas teñidas con colorante D'Antoni.

Los ensayos de desenquistamiento se realizaron con los quistes resistentes al detergente, obtenidos después de 24, 48, 72 y 96 horas de incubación en medio LG-47, los cuales fueron lavados y resuspendidos en medio TYI-S-33 completo adicionado de NaHCO_3 , 40 mM y bilis bovina (1%) de acuerdo a lo descrito por Mitra *et al.*, 2010 [7].

Todos los experimentos fueron realizados al menos dos veces con duplicados en cada ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio de la cinética de crecimiento se inocularon 2×10^4 células/mL tanto en medio LG como en TYI-S-33. Cada 24 h, a lo largo de 7 días se contó el número de trofozoítos recuperados (Figura 1., Imagen 1.). En ambos medios de cultivo la fase exponencial de crecimiento inicia a las 48 horas. Los valores de tiempo de duplicación en fase exponencial de crecimiento fueron de 24.4 y 32.3 h, mientras que el número de generaciones recuperadas al final del ensayo fueron de: 6.7 y 6.2 respectivamente para las células cultivadas en TYI-S-33 y LG. Este comportamiento manifiesta una diferencia en ambos parámetros debida a la presencia/ausencia de glucosa.

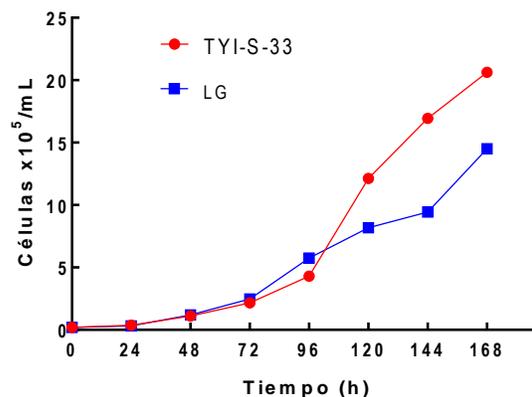


FIGURA 1: Curva de crecimiento de *E. invadens* IP-1 en medio LG y TYI-S-33. Se inocularon 2×10^4 células/mL en cada medio de cultivo, se incubaron a 28 °C durante los tiempos indicados y al término de éstos se contaron los trofozoítos obtenidos.

A lo largo del desarrollo de los experimentos, la viabilidad amibiana determinada por el método de exclusión de azul tripano fue superior al 95 %.

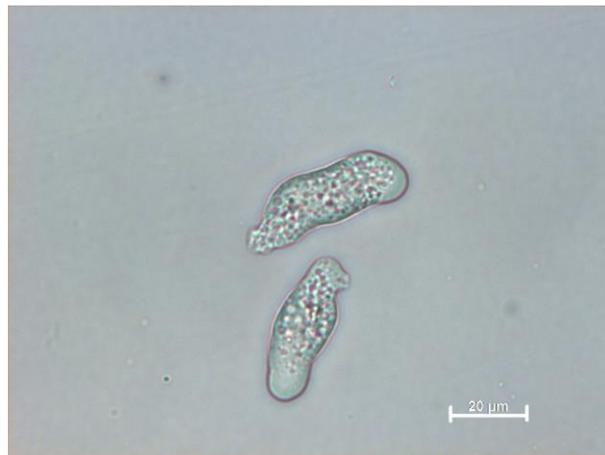


IMAGEN 1: Microfotografía de trofozoítos de *E. invadens* IP-1 en microscopía de campo claro. Muestra tomada de un cultivo de 72 horas luego de haber sido inoculados.

Con base a la curva de crecimiento amibiano, se eligió el tiempo de 72 h como tiempo del preinóculo para realizar los experimentos de enquistamiento, tanto con trofozoítos provenientes del medio TYI-S-33 como del LG (Figura 2).

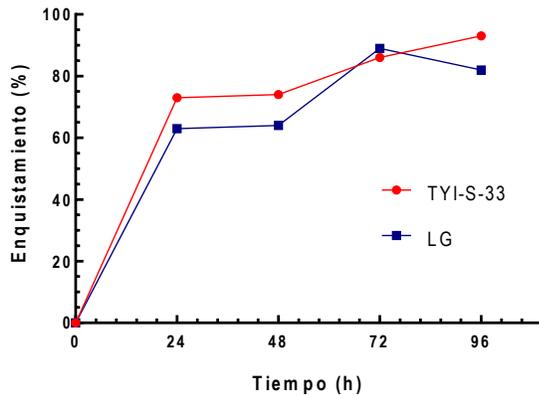


FIGURA 2: Enquistamiento de *E. invadens* IP-1 en medio LG-47 preinoculada en medio TYI-S-33 y LG. Se inocularon en LG-47 350,000 trofozoítos preincubados en medio LG y TYI-S-33 durante 72 h. Cada 24 h se contaron los trofozoítos y quistes recuperados a partir de su inoculación en medio LG-47 y se determinó el % de enquistamiento.

Para la evaluación de la diferenciación ambiental se contaron los quistes y trofozoítos recuperados cada 24 h a lo largo de 4 días de su inóculo en medio LG-47. Si bien se observa, durante las primeras 48 h una ligera disminución del porcentaje de enquistamiento en las células precultivadas en medio LG con respecto a las precultivadas en medio TYI-S-33, a las 72 horas el porcentaje de enquistamiento (89 y 86 %, respectivamente) es muy similar. Sin embargo, a las 96 horas hay un decremento en el porcentaje de quistes en las células provenientes de medio LG. Este comportamiento se refleja en la eficiencia de enquistamiento (Figura 3A) y en la resistencia al detergente (Figura 3B). El decremento en el número de quistes recuperados a las 96 h corresponde probablemente a un proceso de desenquistamiento de quistes maduros, como fue descrito por García-Zapien, *et al.*, 1995 [8]) en donde se pone en evidencia que los quistes originados en medio LG tienen la capacidad de desenquistar en el mismo medio.

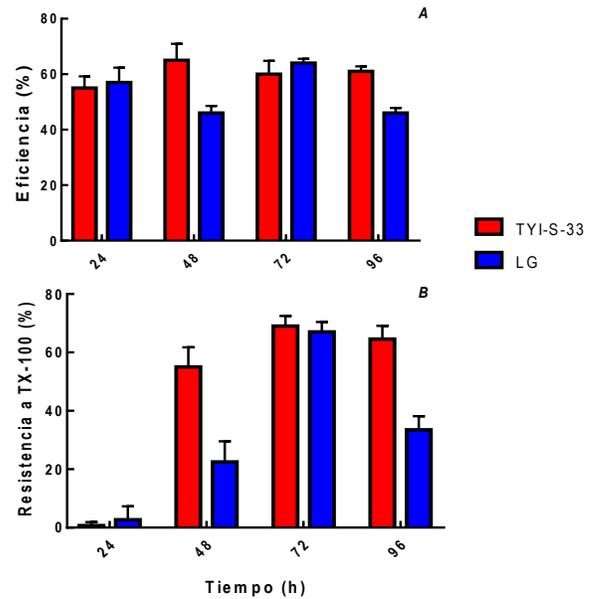


FIGURA 3. Eficiencia de enquistamiento y Resistencia de los quistes al detergente en *E. invadens* IP-1 preinoculadas en medio TYI-S-33 y LG. El número de quistes recuperados se contó a los tiempos indicados y el % de enquistamiento se calculó con base al número de células inoculadas inicialmente (Panel A) y a los resistentes al tratamiento con Tritón X-100 (0.2%) (Panel B).

Al evaluar el proceso de enquistamiento con base a la integridad de la pared celular utilizando tinción con Calcofluor W2R, no se encontraron diferencias en los quistes recuperados en medio LG-47, ya sea que fuesen preinoculados en medio LG o TYI-S-33 (Imagen 2). Si bien, en ambos casos, se recuperan células que no formaron completamente su pared celular y se lisan durante el protocolo, mostrando un aspecto similar al descrito por Arroyo Begovich, *et al.*, 1980 [9] de células en forma de saco (datos no mostrados).

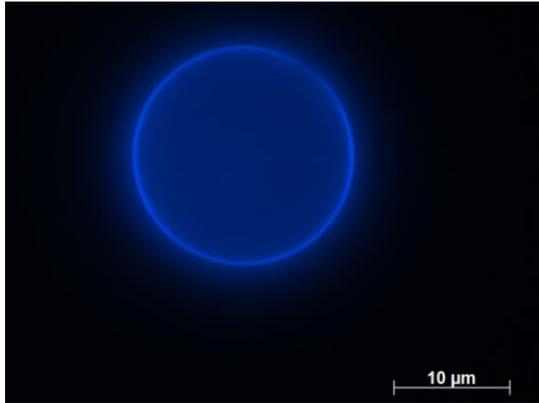


IMAGEN 2: Aspecto microscópico de un quiste de *E. invadens* IP-1 teñido con Calcofluor W2R. Se destaca la fluorescencia del contorno celular debida a la adsorción del colorante sobre la pared celular.

Para complementar la caracterización de los quistes recuperados, se determinó su índice de madurez evaluado por el número de núcleos presentes en ellos a lo largo del proceso de enquistamiento (Figura 4). El porcentaje de quistes maduros se incrementó a las 72 h y no cambió significativamente a las 96 h; considerando como quiste maduro aquel que presenta 4 núcleos (Figura 4A.). Esta madurez se refleja en el cambio de las 48 a las 72 h, donde se observó la desaparición de quistes con 2 y 3 núcleos y la aparición de los de 4 núcleos preferentemente, si bien, se observaron algunos quistes aberrantes con más de 4 núcleos (Figura 4B.). Este comportamiento es similar al descrito previamente por García-Zapien *et al.*, 1995 [8]. Un ejemplo de quiste maduro se observa en la Imagen 3, donde el quiste se tiñó con colorante D'Antonie para evidenciar los núcleos.

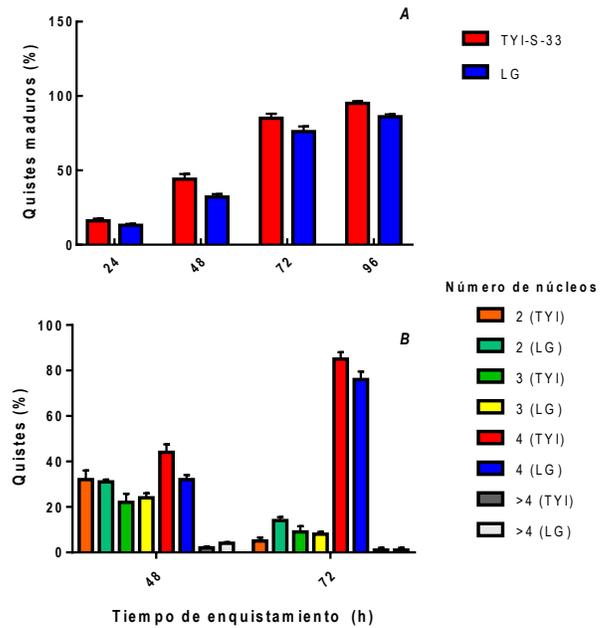


FIGURA 4. Maduración de quistes de *E. invadens* IP-1 en medio LG-47 y preinoculados en medio TYI-S-33 y LG. Se determinó el porcentaje de quistes maduros (tetranucleados) a lo largo del proceso de enquistamiento (Panel A) y su conversión de inmaduro (con < 4 núcleos) a maduro (tetranucleado) a las 48 y 72 h de iniciado el protocolo de enquistamiento (Panel B).

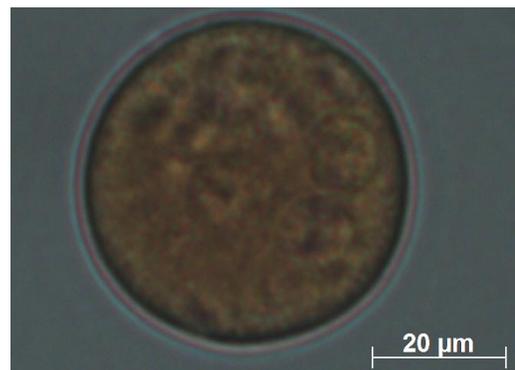


IMAGEN 3: Quiste maduro (tetranucleado) de *E. invadens* IP-1. Microscopia de campo claro y tinción con colorante D'Antonie de un quiste recuperado a las 72 h de iniciado el protocolo.

El desenquistamiento amibiano ocurrió en ambas condiciones, sin embargo, en los provenientes del preinóculo en medio LG mostraron poca movilidad

con respecto a los preinoculados en medio TYI-S-33, a diferencia de lo descrito por Mitra *et al.*, 2010 [7].

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que ambos medios de cultivo, LG y TYI-S-33, pueden ser utilizados como medio de preinóculo para la diferenciación de *E. invadens* IP-1 en medio LG-47.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de veranos UG en la investigación científica y al Dr. Julio César Villagómez Castro por darme la oportunidad de incursionar en el apasionante mundo de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] López-Romero, E., Villagómez-Castro, J.C. (1993). Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitology Today*, 6(6), pp.225-227.
- [2] Vázquezdelara-Cisneros, L.G., Arroyo-Begovich, A. (1984). Induction of Encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture médium. *J. Parasit*, 70(5), pp.629-633.
- [3] Turner, N.A., Eichinger, D. (2007). *Entamoeba invadens*: The requirement for galactose ligands during encystment. *Exp Parasitol*, 115, pp.467-474.
- [4] Sanchez, L., Vincenzo, E., Eichinger, D. (1994). Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol*. 67, pp.125-135.
- [5] Villagómez-Castro, J.C., López-Romero, E. (1996). Identification and partial characterization of three chitinase forms in *Entamoeba invadens* with emphasis on their inhibition by allosamidin. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70, pp.41-48.
- [6] Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 72(4), pp.431-432.
- [7] Mitra, B.N., Pradel, G., Frevert, U., Eichinger, D. (2010). Compounds of the upper gastrointestinal tract induce rapid and efficient encystation of *Entamoeba invadens*. *Int J Parasitol*. 40(6), pp.751-760.

[8] García-Zapien, A.G., Hernández-Gutiérrez, R., Mora-Galindo, J. (1995). Simultaneous growth and mass encystation of *Entamoeba invadens* under axenic conditions. *Arch Med Res*. 26(3), pp.257-262.

[9] Arroyo-Begovich, A., Ramírez-Rojas, O. (1980). Origen de las paredes en forma de saco observadas en cultivos de *Entamoeba invadens* en proceso de enquistamiento. *Arch Invest Méd*. 11(Supl.1), pp.17-23.