

EFFECTO DEL ESTRÉS NUTRICIONAL Y DE LA INTERACCIÓN CON BACTERIAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Alcántar Aranda María de Guadalupe (1), Padilla Vaca Luis Felipe (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [alcantarmdg@gmail.com]

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

Resumen

La amibiasis es una infección intestinal o extraintestinal causada por *Entamoeba histolytica*, se encuentra dentro de las principales causas de muerte generadas por infecciones parasitarias en el mundo. El proceso patogénico se vincula con moléculas que participan directa e indirectamente denominadas factores y determinantes de virulencia, respectivamente. Miembros de las familias AIG y Rab son moléculas que se ha sugerido participan como determinantes de virulencia. En el presente trabajo se comparó la expresión de los genes *ehaig1* y *ehrab8* en cepas de diferente virulencia cultivadas en presencia de bacterias y con déficit nutricional. La expresión del gen *ehaig1* disminuyó significativamente en cepas cultivadas con bacterias y fue afectada por el déficit nutricional. La expresión del gen *ehrab8* en cepas virulentas disminuyó con bacterias y aumentó con el déficit nutricional. Esta es la primera evidencia donde se muestra que la expresión de los genes *ehaig1* y *ehrab8* se expresan diferencialmente bajo diferentes condiciones de cultivo, lo cual permitirá iniciar estudios sobre su regulación en el proceso adaptativo a diferentes condiciones de cultivo.

Abstract

Amibiasis is an intestinal or extraintestinal infection caused by *Entamoeba histolytica*. This infection is among the leading causes of death by parasitic infections in the world. The pathogenic process is linked to molecules that participate directly and indirectly in virulence called factors and virulence determinants, respectively. Members of the AIG and Rab families are molecules that have been suggested to participate as determinants of virulence. In the present work the expression of the *ehaig1* and *ehrab8* genes were compared in *E. histolytica* strains of different virulence cultivated in the presence of bacteria and with nutritional deficit. The expression of the *ehaig1* gene decreased significantly in strains cultured with bacteria and was affected by nutritional deficits. Expression of the *ehrab8* gene in virulent strains decreased with bacteria and increased with nutritional deficits. This is the first evidence that the expression of the *ehaig1* and *ehrab8* genes are differentially expressed under different culture conditions, which will allow start studies on their regulation in the adaptive process to different culture conditions.

Palabras Clave

Entamoeba histolytica; Determinante de virulencia; Interacción Amiba-bacteria; Rabs; AIGs

INTRODUCCIÓN

AMIBIASIS

La amibiasis es una infección intestinal o extraintestinal provocada por *Entamoeba histolytica*. Es considerada un problema de salud pública, siendo causante de aproximadamente 48 millones de casos y de 70-100 mil muertes al año, presentándose con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo. [1]. Dentro del ciclo de vida de *E. histolytica*, se presenta en dos formas celulares: el quiste que es la forma infectiva y el trofozoíto que es la forma invasiva. El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza con el consumo de quistes maduros a través de agua y alimentos contaminados, los cuales viajan por el sistema digestivo hasta llegar a la porción terminal del íleon, donde se desinquistan y se liberan los trofozoítos, los cuales migran al colon, donde pueden permanecer como comensales o invadir la mucosa intestinal. Los trofozoítos presentes en el colon bajo ciertas condiciones forman un quiste tetranucleado, completando así su ciclo de vida [2]. Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, en las infecciones intestinales se puede presentar disentería, colitis fulminante, apendicitis amibiana y el ameboma del colon como las manifestaciones más severas. De la amibiasis extraintestinal la complicación más común es el absceso hepático amibiano [3]. El diagnóstico tradicional es la demostración de presencia de quistes o trofozoítos de *E. histolytica* en muestras de heces por medio de microscopía convencional [4].

Virulencia de *E. histolytica*.

En la virulencia de *E. histolytica* se encuentran involucrados los factores y determinantes de virulencia. Las proteínas que pueden producir daño a las células de hospedero son denominadas factores de virulencia. Dentro de esta clasificación se encuentran las lectinas específicas que interactúan con las moléculas de la superficie de células blanco para lograr la adhesión a la célula, el amebaporo el cual genera poros y causa lisis

celular y las cisteín proteasas relacionadas con la degradación de la matriz extracelular [5].

Las moléculas indirectamente involucradas en el proceso patogénico son denominadas determinantes de virulencia, las cuales tienen relación en la regulación de expresión de factores de virulencia, proteger al parásito durante el proceso infectivo o conferir alta plasticidad metabólica favoreciendo su adaptación y supervivencia ante factores del hospedero [6]. Entre las moléculas candidatas como determinantes de virulencia se encuentran las esfingomielinasas, AIGs y Rabs. Las proteínas AIG1 son pequeñas GTPasas, identificadas originalmente en plantas, donde se les relaciona con resistencia a infecciones bacterianas y en la respuesta al estrés. En *E. histolytica* las proteínas AIG1 son codificadas por una familia de genes [7] y se expresan diferencialmente en cepas de diferente virulencia [8]. Las Rab GTPasas constituyen el más amplio grupo de las GTPasas pequeñas dentro de *E. histolytica* y han sido caracterizadas por la función de regular rutas de tráfico vesicular [9]. El procesamiento de preRNAm, debe llevarse a cabo para convertirse en un RNA maduro y ser transportado al citoplasma de la célula para su traducción a proteína [10]. Dentro de las Rab GTPasas existen genes *ehrab*, que procesan diferencialmente sus intrones, la cual puede estar relacionada con la virulencia de *E. histolytica* [11].

- Efecto de las condiciones de cultivo sobre la virulencia de *E. histolytica*.

Se ha sugerido que la microbiota en el intestino podría contribuir a la expresión patogénica de otros microorganismos, en particular sobre la virulencia de *E. histolytica* [12]. Se ha demostrado que la interacción de bacterias específicas con trofozoítos de *E. histolytica* modula la virulencia de este parásito [13]. El déficit nutricional también podría relacionarse con la expresión de genes involucrados en la virulencia de *E. histolytica*.

En el presente trabajo se pretende evaluar la expresión de genes descritos como determinantes de virulencia en diferentes cepas de *E. histolytica* y el efecto del cultivo con bacterias y en estrés nutricional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento de *E. histolytica* en cultivo monoxénico con *E. coli* y con bajo déficit nutricional. Se cultivaron trofozoitos de *E. histolytica* en medio TYI-S-33 en condiciones axénicas y en presencia de *E. coli* en cultivo monoxénico. Los trofozoitos de la cepa virulenta HM1 y la no virulenta UG10 se sometieron a estrés nutricional al cultivarlas en 80% de suero.

Extracción y purificación de ARN y síntesis de cDNA. Se obtuvo RNA total de amibas cultivadas bajo las siguientes condiciones de cultivo: axénica, monoxénica, 100% de suero y 80% de suero. El RNA se obtuvo utilizando el reactivo Trizol (Sigma) y el RNA obtenido se trató con DNasa. La síntesis de cDNA se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa y oligo (dT) usando el sistema Superscript II (Invitrogen).

PCR. El cDNA sintetizado se utilizó como templado para la amplificación del gen EhRab8, EhAIG y GAPDH (control) empleando el kit GoTaq Green Master Mix (Promega) y pares de oligonucleótidos específicos para cada gen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los trofozoitos cultivados bajo las condiciones previamente mencionadas se realizó la extracción y purificación del RNA total, el cual se muestra en la Figura 1, donde se observa la integridad de los ribosomales. Para comprobar la ausencia de DNA genómico se realizó una PCR para amplificar un fragmento del gen ehgapdh que es de expresión constitutiva, utilizando como templado el RNA obtenido y como control positivo el cDNA de la cepa HM1, donde solo se generó amplificación en el carril positivo como se muestra en la Figura 2, por lo que el RNA es de buena calidad y libre de

contaminación de DNA genómico para la síntesis del cDNA.

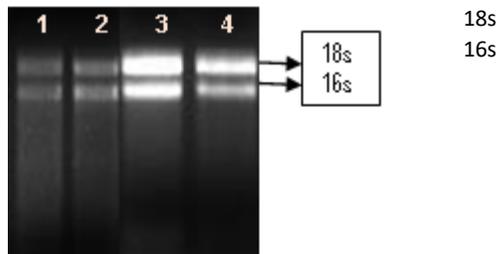


Figura 1. RNA total de *E. histolytica* cultivada bajo diferentes condiciones. Se separó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. 1, Axénica (HM1); 2, Monoxénica (HM1); 3, 100% suero (UG10); 4, 80% suero (UG10).

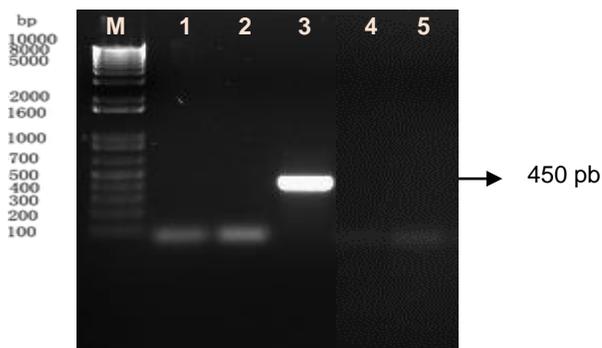


Figura 2. RNA libre de gADN. Amplificación del gen *Ehgapdh* de expresión constitutiva en *E. histolytica*. 1-Axénica(HM1), 2-Monoxénica(HM1), 3-cDNA HM1, 4-100% suero(UG10), 5-80% suero(UG10), M-Marcador de tamaño en pares de bases.

A partir del RNA purificado se realizó la síntesis del cDNA, el cual se usó como templado para la amplificación por PCR de un fragmento del gen *ehgapdh* de expresión constitutiva. También se incluyeron otros cDNAs sintetizados previamente en el laboratorio de amibas polixénicas y reaxenizadas. En la Figura 3 se presenta la amplificación del fragmento del gen *ehgapdh* para

todas las muestras y con niveles de expresión similares.

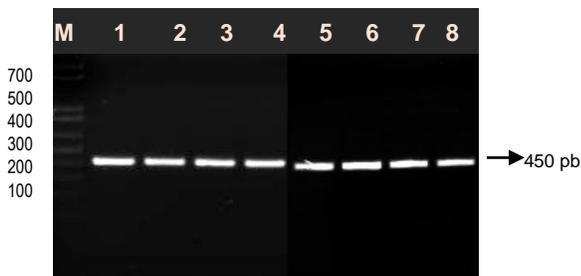


Figura 3. Amplificación de gen *Ehgapdh* utilizado como templado los cDNA obtenidos (1-4). 1-Axénica(HM1), 2-Monoxénica(HM1), 3- 100% suero(UG10), 4-80% suero(UG10), 5-Polixénica, 6-Reaxénisada, 7- 60% suero, 8-60%peptona, M-Marcador de tamaño en pares de bases.

Se evaluó la expresión del gen *ehaig* relacionado con la virulencia de *E. histolytica* en las cepas de alta virulencia HM1 en las condiciones axénica, monoxénica, polixénica, 60% suero y 60% peptona; y en las de baja virulencia UG10 en condiciones de 100% de suero y 80% suero.

En la Figura 4, se presenta el resultado más relevante en donde la expresión del gen *ehaig* disminuye drásticamente en la cepa monoxénica y polixénica con respecto a la cepa axénica de la cual se derivaron. El déficit de suero no afecta su expresión, mientras que el déficit de peptona aumenta su expresión en la cepa polixénica. Los resultados obtenidos durante la interacción con bacterias contrastan con lo reportado en plantas, donde aumenta su expresión frente al daño con bacterias. Es de interés evaluar la expresión del gen *ehaig* en diferentes condiciones de interacción con varios tipos de bacterias.

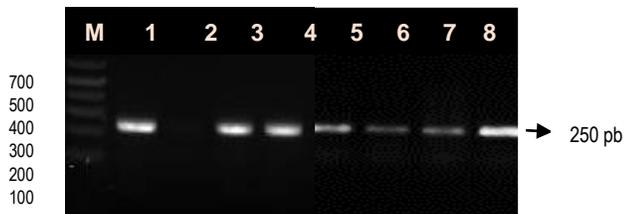


Figura 4. Amplificación de gen *Ehaig*. Se corrió en un gel de agarosa al 1.5%. 1-Axénica (HM1), 2-Monoxénica(HM1), 3- 100% suero(UG10), 4-80% suero(UG10), 5-Polixénica, 6-Reaxénisada, 7- 60%suero, 8- 60%peptona, M-Marcador de tamaño en pares de bases.

Se evaluó la expresión y procesamiento del transcrito del gen *ehrab* en varias cepas y condiciones de cultivo de *E. histolytica*. En la Figura 5, se observa que la expresión disminuye en cultivos monoxénicos y polixénicos y aumenta en cultivos polixénicos sometidos a un déficit nutricional de suero o peptona.

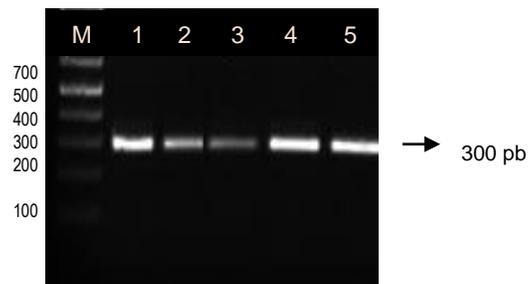


Figura 5. Amplificación del gen *Ehrab8*. Se corrió en un gel de agarosa al 1.5%. 1-Axénica(HM1), 2-Polixénica, 3-Reaxénisada, 4- 60% suero, 5-60% peptona, M-Marcador de tamaño en pares de bases

CONCLUSIONES

Trofozoítos de *E. histolytica* cultivados con bacterias presentan una disminución significativa de la expresión del gen *ehaig1*. El estrés nutricional con suero o peptona aumenta la expresión de los genes *ehaig1* y *ehrab8* en la cepa virulenta, pero no en la virulenta. La expresión del gen *ehaig1* se ve relacionado con el tiempo de infección al disminuir su expresión en mayor tiempo se encuentre la interacción con bacterias.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas del Laboratorio de laboratorio de Patobiología molecular de protozoarios parásitos, por compartir espacio de trabajo y por las enseñanzas proporcionadas durante mi estancia en el verano; a la Dra. Ángeles Rangel Serrano y QFB Itzel Páramo Pérez por todo el apoyo técnico y en especial Dr. Luis Felipe Padilla Vaca por aceptarme dentro del proyecto y el conocimiento proporcionado.

REFERENCIAS

[1] World Health Organization. 1998. The World Health Report 1998. Life in the 21st century: a vision for all. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

[2] Ravdin, J. I. (1996). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytotoxicity. *Rev Infect Dis* 8(2),

[3] Martínez-Palomo, A., y Ruiz-Palacios, G., "Amoebiasis, tropical and geographical medicine", eds. Warren, K.S., Mahmoud A.A.F, McGraw Hill, New York, 327-344. 1990.

[4] Martínez-Palomo y Espinosa-Cantellano M. (1998). Intestinal amoebae, Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections (9 ed.), Vol., Parasitology, (pp. 157-177).

[5] Huston, C. D. (2004). Parasite and host contributions to the pathogenesis of amoebic colitis. (pp. 20, 23-26) *Trends Parasitol.*

[6] Anaya-Velázquez F., Padilla-Vaca F. (2011). Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. (pp. 6, 255-258). *Future Microbiol.*

[7] GIMAPS/ GTPases of immunity associated Protein. 2010.

[8] Lozano J. (2017). Análisis comparativo de dos cepas de *Entamoeba histolytica* genéticamente relacionadas que presentan diferente virulencia. Tesis de Doctorado en proceso.

[9] Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K. (2006). Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. (pp. 179-183) *Parasitol research.*

[10] Will C. L., Lührmann R. (2011). Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*

[11] Phillips, B.P., Wolfe, P.A. y Bartgis, I.L., "Studies on the amoeba-bacteria relationship in amoebiasis". Some concepts on the etiology of the disease *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7:392-399. 1958.

[12] Mendoza M. C. (2009). *Entamoeba histolytica*: Effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with *Escherichia coli* 055. *Exp. Parasitol.*, Elsevier, 121: 167-174,

[13] Padilla-Vaca, F., Ankiri, S., Brecha, R., Koole, L.A. y Mirelman, D., (1999). Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with *Escherichia coli* 055 is related to a decrease in expression of the light (35-Kilodalton) subunit of the Gal/GalNac lectin. *Infect Immun.* Vol.67. No.5: 2096-2102.