

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE CEPAS DE DIFERENTE VIRULENCIA DE *Entamoeba histolytica*

González Rodríguez Silvia Mariela (1), Rangel-Serrano Ángeles (2), Páramo-Pérez Itzel (2),
Ramírez-Montiel Fátima Berenice (2), Anaya-Velázquez Fernando (2), Padilla-Vaca Felipe* (2)

1 [Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico:
[gsilvia0021@gmail.com]

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

Resumen

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito, agente causal de la amibiasis en los seres humanos y es una de las principales causas de muerte por infecciones parasitarias a nivel mundial. En este estudio fueron analizadas cepas de diferente virulencia y fondo genético de *E. histolytica* mediante la técnica de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD); donde se encontró que los productos de amplificación de los RAPD para las cepas de *E. histolytica* con diferente virulencia, mostraron huellas génicas que permiten discriminar entre cepas de la misma especie, aun estrechamente relacionadas, donde la diferencia más marcada es entre las cepas con diferente fondo genético. Estas variaciones en el genotipo se podrían ver reflejadas en los fenotipos del parásito y así explicar sus implicaciones en virulencia, diagnóstico molecular y epidemiología.

Abstract

Entamoeba histolytica is a protozoan parasite, causative agent of amoebiasis in humans and is one of the leading causes of death among parasitic infections worldwide. In this study, strains of different virulence and genetic background of *E. histolytica* were analyzed by the technique of random amplified polymorphic DNA (RAPD); where it was found that the amplification products of the RAPD for strains of *E. histolytica* with different virulence, showed genetic fingerprints that allow to discriminate between strains of the same species, even closely related, where the most marked difference is between the strains with different genetic background. These variations in the genotype could be reflected in the parasite phenotypes and explain their implications in virulence, molecular diagnostic and epidemiology.

Palabras Clave

Amibiasis; Huella génica; *Entamoeba Histolytica*; Epidemiología molecular; RAPD

INTRODUCCIÓN

Amibiasis

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis humana. Entre las manifestaciones clínicas de esta patología incluyen diarrea, disentería y absceso hepático. Aproximadamente 50 millones de personas se ven afectadas por este parásito causando cerca de 55 000 muertes anualmente [1] [2]. La incidencia de esta infección se encuentra estrechamente relacionada al hacinamiento y pobreza, las cuales contribuyen a las condiciones sanitarias inadecuadas, favoreciendo la transmisión directa fecal-oral de amibas de una persona a otra.

Polimorfismo de cepas de *Entamoeba histolytica*

Se han descrito varias especies de *Entamoeba*, de las cuales destaca *Entamoeba dispar* por ser considerada una especie no patógena, morfológicamente indistinguible de *E. histolytica* y filogenéticamente muy cercana. Asimismo, se han descrito cepas y aislados de *E. histolytica* que presentan diferente virulencia, lo que implica que poseen diferencias genéticas. La variación genética inter e intra especies de *Entamoeba* tiene implicaciones importantes en la patogenicidad del parásito [3]. Por lo tanto, el estudio de los polimorfismos de *E. histolytica* es importante para determinar la variabilidad del genoma del parásito y sus implicaciones en virulencia, diagnóstico y epidemiología.

RAPD

Los métodos genotípicos se utilizan para la identificación y la caracterización de los microorganismos, y representan una alternativa para poder conocer la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Los métodos que se han usado para dicho fin son: DNA genómico digerido con enzimas de restricción (REAC) y separando los fragmentos generados por electroforesis convencional o por electroforesis en gel por campo pulsado, polimorfismo de la longitud de fragmentos de DNA digeridos con enzimas de restricción (RFLP) y la PCR arbitrariamente iniciada (AP-PCR) a la que también se le conoce como la amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD) [4].

El RAPD es una técnica para detectar rápidamente polimorfismos genómicos [5], que utiliza un único oligonucleótido corto de secuencia arbitraria en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se lleva a cabo en condiciones de baja rigurosidad para generar una matriz reproducible de productos específicos de la cepa que subsecuentemente son analizados mediante electroforesis en gel. El análisis RAPD se ha utilizado en numerosas aplicaciones, incluido el mapeo de genes, la detección de diversidad de cepas, el análisis de poblaciones, la epidemiología molecular y la demostración de relaciones filogenéticas y taxonómicas [6]. El análisis de RAPD se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada porque permite la detección rápida de polimorfismos en diferentes loci diferentes utilizando solo cantidades de nanogramos de DNA genómico. Además, el análisis de RAPD puede llevarse a cabo en organismos para los cuales hay poca o ninguna información con respecto a las secuencias genómicas u organización, lo que hace posible analizar polimorfismos para prácticamente cualquier organismo del que se pueda aislar DNA genómico relativamente puro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Entamoeba histolytica*

Se utilizaron cepas de *E. histolytica* de diferente virulencia y fondo genético. Se analizaron las siguientes cepas parentales de referencia: HM1-a, HM1-b, G3, UG10 y Rahman, además de varias cepas transfectantes para el silenciamiento o sobre-expresión de genes. Se cultivaron en medio TYI-S-33 con suero bovino descomplementado a 37°C por 48 horas.

Extracción y purificación de DNA genómico

Se cosecharon las amibas de las cepas de *E. histolytica* y se obtuvo el DNA genómico empleando el kit Wizard® DNA Genomic Purification kit (PROMEGA). Brevemente: Se obtuvo un lisado nuclear al cual se le agregó una solución de RNasa y se incubó a 37°C. Posteriormente se precipitaron las proteínas y se recuperó el sobrenadante conteniendo el DNA, el cual fue precipitado con isopropanol. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar por 15 minutos, y se rehidrató con agua a 4°C por dos horas. Su pureza, integridad y concentración se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm.

RAPD

Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl usando el reactivo Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix, 10 ng – 25 ng de templado de DNA de las cepas de *E. histolytica* y 25 pmol de los distintos oligonucleótidos. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (T100™ Thermal Cycler BIO-RAD) mediante 45 ciclos de amplificación y una temperatura de alineamiento de 36°C. Los productos de PCR se separaron mediante cromatografía en geles de agarosa al 2% y se utilizó bromuro de etidio para teñir el DNA. El DNA se visualizó con luz UV y se fotodocumentó para su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la extracción y purificación del DNA de doce cepas de *Entamoeba histolytica* y una de *Trichomonas vaginalis*. Se cuantificó y se separó en un gel de agarosa al 0.8% para valorar su integridad (Figura 1).

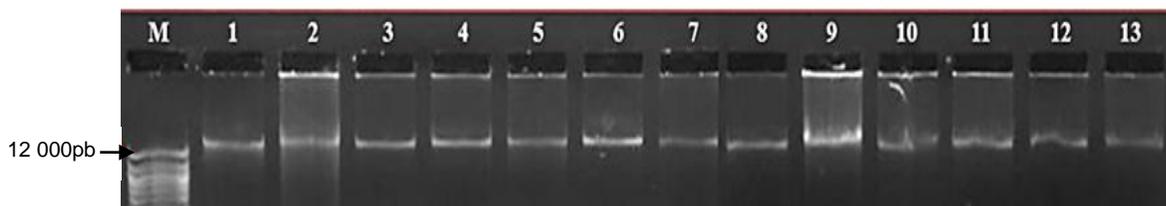


FIGURA 1. DNA de cepas de *E. histolytica*. Electroforesis de 200-500 ng de DNA total de cepas parentales y transfectantes de *E. histolytica* (1-12) y de una cepa de *T. vaginalis* (13) en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

El DNA obtenido de una cepa se utilizó como templado para las reacciones de RAPD con diferentes oligonucleótidos, donde se seleccionaron los dos que mostraron mejores perfiles de amplificación (datos no mostrados). Se evaluaron diferentes tipos de polimerasas, cantidades de DNA y de oligonucleótidos para estandarizar las condiciones de amplificación. Se realizaron los RAPD de cinco cepas parentales de *E. histolytica* de diferente virulencia con los oligonucleótidos seleccionados (P53-1 y Qg1-U) empleando dos diferentes cantidades de templado (10 ng y 25 ng) (Figura 2).

Con el oligonucleótido P53-1 se obtuvieron perfiles similares con 10 ng de DNA (Figura 2A), mientras que con el oligonucleótido Qg1-U se observaron perfiles de amplificación diferenciales entre todas las cepas (Figura 2B).

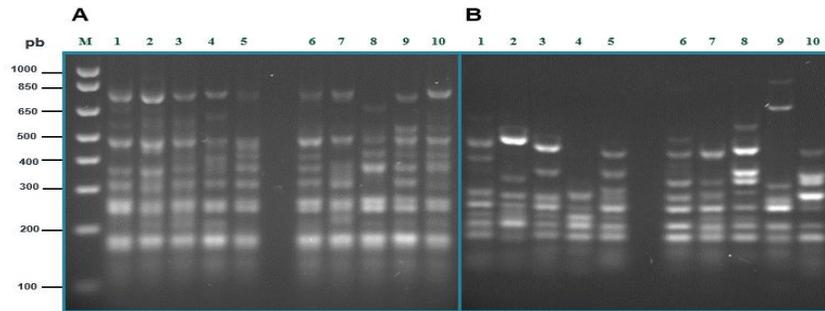


Figura 2. RAPD de cepas de referencia de diferente virulencia de *Entamoeba histolytica*. Perfil de amplificación usando los oligonucleótidos P53-1 (A) y Qg1-U (B), y 10 ng (carriles 1-5) o 25 ng (carriles 6-10) de ADN de las cepas HM1-a (1,6), HM1-b (2,7), G3 (3,8), UG10 (4,9) y Rh (5,10). M, marcador de tamaño molecular (pb). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Se obtuvieron los perfiles de amplificación mediante RAPD de las cepas parentales y transfectantes usando el oligonucleótido P53-1 con diferentes cantidades de DNA (10 ng y 25 ng). En la Figura 3 se observan los perfiles de amplificación obtenidos, en donde se observa que también para las cepas transfectantes los perfiles son similares con 10 ng de DNA, pero se distinguen bandas de amplificación específicas por arriba de los 300 pb (Figura 3A). Con 25 ng de DNA se observan perfiles diferenciales entre las cepas y dicha diferencia es más marcada cuando se compara con el perfil de *T. vaginalis* (Figura 3B).

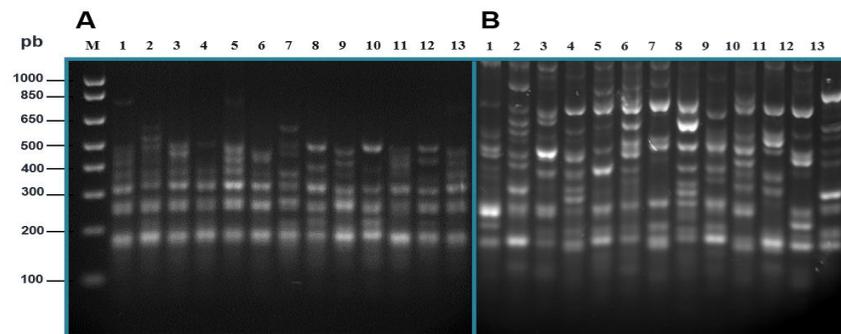


Figura 3. RAPD de cepas parentales de diferente virulencia y transfectantes de *Entamoeba histolytica*. Perfil de amplificación usando el oligonucleótido P53-1 para las cepas de *E. histolytica* con diferentes cantidades de DNA, de 10 ng (A) y 25 ng (B). HM1a (carriles 1), HM1b (carriles 2), MH1b MYC (3), G3 (4), G3HA (5), G3R17 (6), UG10 (7), MHA (8), MR17K (9), Rh (10), RhHA (11), RhR17 (12), y de *T. vaginalis* usada como control (13). M, marcador de tamaño molecular (pb). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio

Finalmente, se obtuvieron los perfiles de amplificación mediante RAPD de todas las cepas estudiadas usando el oligonucleótido Qg1-U. En la Figura 4 se muestran los perfiles de amplificación obtenidos para las cepas parentales y transfectantes de *E. histolytica*. Con 10 ng de DNA se distinguen bandas de amplificación específicas por arriba de los 300 pb (Figura 4A), similar a lo que se mostró con el oligonucleótido P53. Los perfiles obtenidos con 25 ng de DNA muestran diferencias marcadas entre la mayoría de las cepas comparadas, siendo esta más marcada para *T. vaginalis* (Figura 4B).

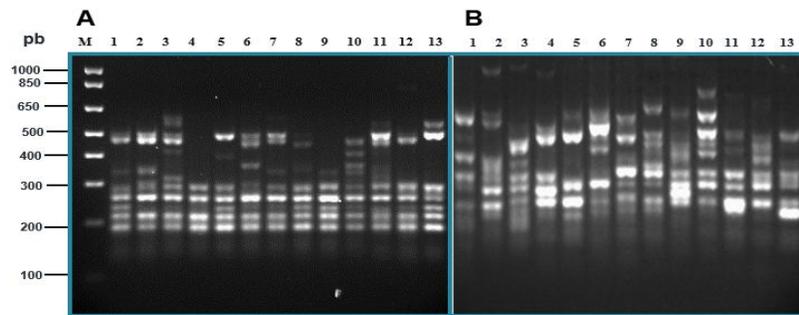


Figura 4. RAPD de cepas parentales de diferente virulencia y transfectantes de *Entamoeba histolytica*. Perfil de amplificación usando el oligonucleótido Qg1-U para las cepas de *E. histolytica* con diferentes cantidades de DNA, de 10ng (A) y 25ng (B). HM1a (carriles 1), HM1b (carriles 2), MH1b MYC (3), G3 (4), G3HA (5), G3R17 (6), UG10 (7), MHA (8), MR17K (9), Rh (10), RhHA (11), RhR17 (12), y de *T. vaginalis* usada como control (13). M, marcador de tamaño molecular (pb). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

CONCLUSIONES

Los productos de amplificación de los RAPD para las cepas de *Entamoeba histolytica* con diferente virulencia, mostraron huellas génicas que permiten discriminar entre cepas de la misma especie aun estrechamente relacionadas, siendo más evidente la diferencia entre cepas con diferente fondo genético. Estas variaciones en el genotipo podrían verse reflejadas en los fenotipos y así explicar los diferentes grados de virulencia de este parásito.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Dr. Luis Felipe Padilla Vaca por aceptarme como parte de este proyecto, por su tiempo y apoyo. A la Dra. Ángeles Rangel Serrano, la QFB Itzel Páramo Pérez, al Dr. Bernardo Franco Bárcenas y también de manera especial a M en C. Fátima Ramírez Montiel por apoyarme en el desarrollo experimental durante mi estancia. A mis compañeros del Laboratorio de Patobiología Molecular de Protozoarios Parásitos por ayudarme siempre que lo necesite. Y finalmente a la Universidad de Guanajuato por promover e impulsar el desarrollo de la ciencia en nosotros los estudiantes.

REFERENCIAS

- [1] World Health Organization. 1997. Amoebiasis. W. H. O. Weekly Epidemiol. Rec. 72:97-100.
- [2] Turkeltaub JA, McCarty (2015). TR 3rd, Hotez PJ. Curr Opin Gastroenterol. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. Jan;31(1):38-44. doi: 10.1097/MOG.0000000000000135.)
- [3] Weedall, G. D., Clark, C. G., Koldkjaer, P., Kay, S., Bruchhaus, I., Tannich, E., Hall, N. (2012). Genomic diversity of the human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. Genome Biology, 13(5), R38. doi:10.1186/gb-2012-13-5-r38
- [4] García Avendaño M.E. (2002) Trabajo de tesis de licenciatura. Implementación de un sistema basado en los RAPD para el análisis de la variabilidad genética de diferentes cepas de *Trichomonas vaginalis* del estado de Guanajuato. Departamento de Biología. DCNE. Universidad de Guanajuato.
- [5] Williams JG1, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). Nucleic Acids Res. Nov 25;18(22):6531-5. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
- [6] Welsh, J. et al. (1995), PCR 2: A Practical Approach, McPherson, M. J., Hames, B. D., Taylor, G.R. eds., chapter 11.