

CARACTERIZACIÓN DEL DESENQUISTAMIENTO EN ENTAMOEBA INVADENS

Rosiles Ortega Ana Fernanda (1), Villagómez Castro Julio César (2) Amezola Rivera Jesús Antonio (2)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [af.rosilesortega@ugto.mx]

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

Resumen

Entamoeba invadens es una especie importante dentro del reino Protozoa porque permite un amplio estudio y comparación con los individuos del mismo género que resultan ser patógenos para los seres humanos, como lo es *E. histolytica*. Dentro de estos estudios resaltan los relacionados con su ciclo de vida, específicamente enquistamiento y desenquistamiento. En el presente trabajo se evaluaron dos enzimas presentes durante el enquistamiento amibiano y que pudiesen participar en el desenquistamiento: la quitinasa, encargada de la degradación de la pared gruesa del quiste en dímeros o monómeros de GlcNac y la *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa, que se encarga de la degradación de los dímeros de GlcNac.

Abstract

Entamoeba invadens is an important species within the Protozoa kingdom because it allows a broad study and comparison with individuals of the same genus that turn out to be pathogenic for humans, as is *Entamoeba histolytica*. Within these studies highlight those related to their life cycle, specifically encysting and excystment. In the present work, two enzymes present during the amoebic encystment and that could participate in the excystment were evaluated: chitinase, responsible for the degradation of the thick wall of the cyst in dimers or monomers of GlcNac and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, which is responsible for the degradation of GlcNac dimers.

Palabras Clave

Desenquistamiento, Glucosaminidasa, Quitinasa.

INTRODUCCIÓN

Las amibas del género *Entamoeba* tienen importancia especial para su estudio por incluir especies parásitas y patogénicas para el hombre y algunos animales. Las más conocidas son *Entamoeba invadens* (Rodhain, 1934) [1] y *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) [2].

La amibiasis representa un gran problema de salud pública en México y otros países. Esta enfermedad cuyo causal en el hombre es *E. histolytica* es típica de los países con clima tropical. Sin embargo, la disentería amebiana es bastante común en todo el mundo, principalmente en regiones templadas.

Se han comparado estas dos especies de *Entamoeba* y esto nos ha llevado al estudio de la morfología y ciclo vital de *E. invadens* (Geiman y Ratcliffe, 1972) [3] lo que permite concluir que *E. invadens* y *E. histolytica* son cercanamente semejantes. En opinión de McConnachie (1986) [4], esta semejanza está dada en los procesos de diferenciación y desarrollo metaquístico, por lo que una especie puede ser comparada con la otra.

Es por lo que a pesar de que *E. invadens* (Imagen 1.) es parásito de reptiles, es una especie que permite estudiar el comportamiento de la especie in vitro (sobre todo el proceso de diferenciación) para compararla con el comportamiento de *E. histolytica* que no se ha logrado enquistar en cultivo in vitro.

En este trabajo mostramos los resultados preliminares del desenquistamiento de *E. invadens* en función de su morfología y de dos enzimas probablemente involucradas en el proceso diferenciativo.

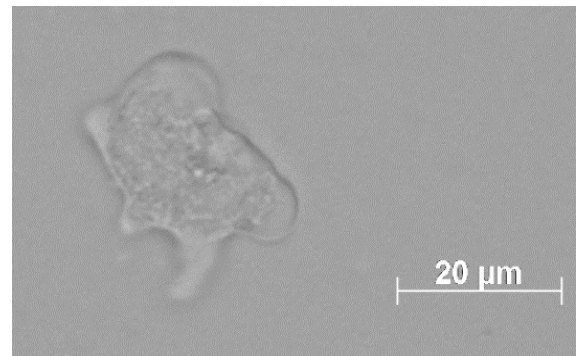


IMAGEN 1: Trofozoito de *E. invadens* (campo claro 40x).

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Medio de cultivo TYI-S-33 para mantenimiento:

Peptona biotriptasa 30.0 g, Extracto de levadura 3.0 g, Dextrosa 10.0 g, Cloruro de sodio 2.0 g, Fosfato de potasio monobásico 0.6 g, Fosfato de potasio dibásico 1.0 g, L-cisteína 1.0 g, Citrato férrico amoniacal 0.023 g, Agua desionizada 820 mL, Suero bovino (SB) suplementado con SED 180 mL. [5]

Medio LG: Misma composición del medio TYI-S-33, exceptuando el uso de dextrosa o glucosa. [6]

Medio LG-47:

Por cada 100 ml de medio se mezclan 47 mL de medio LG, 5 mL de SB y 48 mL de agua desionizada estéril. [7]

Medio Desenquistamiento:

TYI-S-33, NaHCO₃ 40 mM, Bilis bovina 1mg/mL [8]

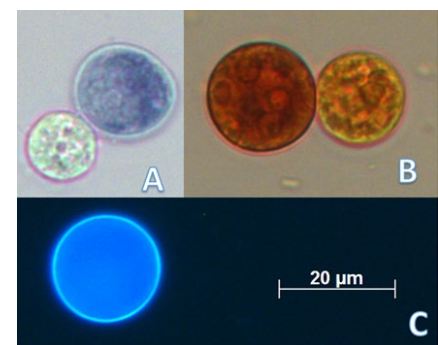


IMAGEN 2. Tinciones diferenciales amebianas. A., Viabilidad, quiste viable (blanco) y quiste no viable (azul); B, Madurez quística, quiste tetranucleado (café izquierda); C, Pared celular; quiste maduro con halo refringente de quitina.

Morfología microscópica:

Viabilidad celular: Se tiñeron las células con azul de Tripano 0.2 % (p/v) en PBS. Las células teñidas son células muertas (Imagen 2A).

Determinación de madurez nuclear y morfología: Las células se tiñeron con colorante D'Antonie para evidenciar el número de núcleos y su morfología (Imagen 2 B).

Tinción de la pared celular: Se realizó con blanco de Calcoflúor al 0.01% y observación con microscopio de fluorescencia para revelar la pared de quitina (Imagen 2C).

Proceso de Enquistamiento y Desenquistamiento:

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 500,000 trofozoítos/mL en cajas Costar de 40 ml de volumen. Se incubaron a 28 °C.

En alícuotas 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 0.05 % (v/v) a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavadas 1x con PBS 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 Calcoflúor 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'Antonie.

Los ensayos de desenquistamiento se realizaron con los quistes resistentes al detergente, obtenidos después de 24 horas de incubación en medio LG-47, los cuales fueron lavados y resuspendidos en medio TYI-S-33 completo adicionado de NaHCO₃, 40 mM y bilis bovina (1 mg/mL) de acuerdo con lo descrito por Mitra et al., 2010 [8] (imagen 3).

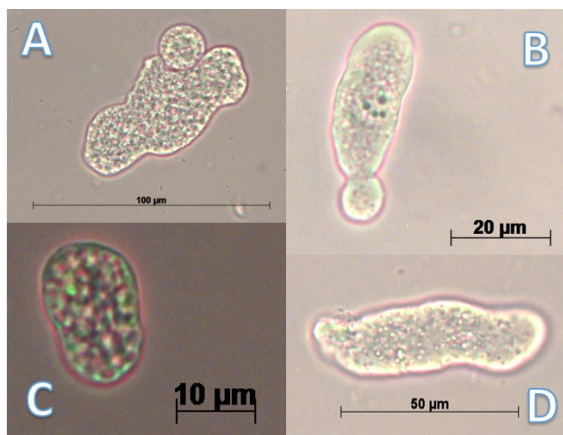


IMAGEN 3. Morfología de trofozoítos de *E. invadens*.

Trofozoito enorme campo claro 40x.

B) Trofozoito antes de enquistamiento campo claro 40x.

C) Trofozoito después de desenquistamiento campo claro 40x

D) Trofozoito enorme campo claro 40x.

Determinación de la actividad enzimática

Ensayo de actividad de N-acetil-β-D-glucosaminidasa

El ensayo se realizó en mezclas conteniendo 40 y 100 μL de la muestra enzimática, 4-MUGlc 5 μM como sustrato, amortiguador de citrato-fosfato 50 mM, pH 5.5 y Tritón X-100 al 0.5 % (p/v). La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y la reacción se detuvo por la adición de 2.7 mL de solución de paro (Na₂CO₃ 0.5 M en NaOH 0.1 N, pH 10.4). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min en la oscuridad para permitir el desarrollo de la fluorescencia debida a la 4-metilumbeliferona (4-MU) liberada por la hidrólisis enzimática. La fluorescencia se determinó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer utilizando longitudes de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración estándar de 4-metilumbeliferona (4-MU) de acuerdo con el método descrito por Bravo-Torres y col., (2005). [9]

Ensayo de actividad de Quitinasa.

El ensayo se realizó en mezclas conteniendo 40 y 100 μL de la muestra enzimática, 4-MU-N-N-N-triacetilquitotriósido 5 μM, amortiguador de citratos 50 mM, pH 5.5 y Tritón X-100 al 0.5 % (p/v). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min y la reacción se detuvo por la adición de 2 mL de solución de paro (Na₂CO₃ 0.5 M en NaOH 0.1 N, pH 10.4). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min en la oscuridad para permitir el desarrollo de la fluorescencia debida a la 4-Metilumbeliferona (4-MU) liberada por la hidrólisis enzimática. La fluorescencia se determinó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer utilizando longitudes de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración estándar de 4-Metilumbeliferona (4-MU) de acuerdo con el método descrito por Villagómez-Castro y col. (1992). [10]

Determinación de proteína

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Lowry y col. (1951) [11] para la determinación de proteína en presencia de lípidos. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración. Los volúmenes se ajustaron para realizar la determinación en método micro utilizando una placa de 96 pozos. La lectura se realizó en un lector de Microplacas con Monocromador UV-Vis EPOCH en una longitud de onda de 750 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de determinación de proteínas y lectura de actividad en el fluorómetro se utilizaron para determinar la Actividad Específica de cada enzima.

Los valores mayores se encontraron en los sobrenadantes (Gráfica 1), lo que indica que ambas enzimas están presentes durante el desenquistamiento y ambas son secretadas en función del tiempo de diferenciación (Gráfico 2).

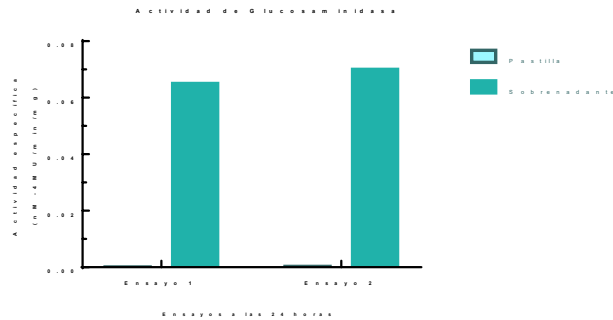


GRÁFICO 1. Actividad enzimática determinada a las 24 h de desenquistamiento.

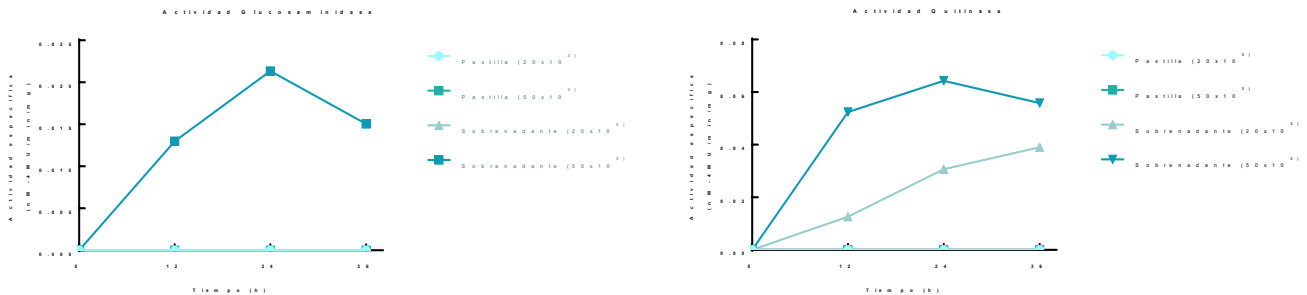


GRÁFICO 2: Cinética del desenquistamiento amibiano en función de las actividades de Glucosaminidasa y Quitinasa. Se realizaron ensayos con 2 cantidades de muestra correspondientes a dos diferentes concentraciones de proteína y número de células en función del tiempo de desenquistamiento y la fracción celular: pastilla y sobrenadante.

Si bien, los trofozoítos inoculados en medio de enquistamiento muestran una morfología normal (Imagen 3 C) y los quistes recuperados durante el proceso diferenciativo, con eficiencia del 50 %, manifiestan viabilidades superiores al 95 % (Imagen 2A) y madurez medida por la formación de células tetranucleadas (Imagen 2B) y la integridad de la pared celular (Imagen 2C); durante el desenquistamiento amibiano se generan células enormes provenientes de la agregación de los trofozoítos metaquísticos recién liberados de los quistes (Imágenes 3A y 3D), los cuales a las 36 h de iniciada la diferenciación recuperan su morfología y tamaños normales (Imagen 3B). Este proceso diferenciativo requiere la participación de hidrolasas ácidas secretadas como las determinadas en este trabajo. Como se observa en los Gráficos 1 y 2, la actividad enzimática presente en el sobrenadante (actividad enzimática secretada) alcanza un máximo y luego desciende ligeramente durante la diferenciación amibiana. Un proceso semejante fue descrito para estas enzimas durante el enquistamiento amibiano [10]. Sin embargo, no fue posible observar actividad en las pastillas celulares, significando que toda la actividad enzimática es secretada. Se requiere un estudio exhaustivo para caracterizar el proceso de desenquistamiento amibiano que podría utilizarse para la búsqueda de fármacos que inhiban el proceso y eviten la infección en el hospedero.

CONCLUSIONES

Durante el desenquistamiento amibiano se secretan dos enzimas: Quitinasa y *N*-acetil-Glucosaminidasa que dadas las evidencias presentadas se sugiere participan en la diferenciación celular.

Durante el desenquistamiento amibiano se producen trofozoítos metaquísticos agregantes que pudiesen tener una mayor concentración de glicoproteínas en su membrana que podrían ser posteriormente hidrolizadas o recicladas por las amibas para recuperar su morfología normal.

PERSPECTIVAS

Se requiere un análisis integral de este proceso diferenciativo para determinar las enzimas y glicoproteínas involucradas en él.

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros, Dr. Julio César Villagómez Castro, C. a Dr. Lérida Liss Flores Villavicencio y pasante de Q.F.B. Jesús A. Amezola Rivera por enseñarme y ayudarme durante toda la etapa de verano. A mi Papá Gustavo, mi hermano Gael y mi familia que hicieron un gran esfuerzo para que yo estuviera aquí, a J. Pablo Gutiérrez Vicencio por la paciencia, tiempo y apoyo mutuo para lograr una estancia constructiva y de mucho aprendizaje para ambos.

A la Universidad de Guanajuato y la DCNE por mantener esta labor de apoyo y desarrollo para los jóvenes.

REFERENCIAS

- [1] Rodhain, J (1934). *Entamoeba invadens* parasite de serpents. C.- R. Soc. Biol. Paris. 117: 1195-1200.
- [2] Pimenta PF, Diamond LS, Mirelman D (2002). *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: differences in their cell surfaces and in the bacteria-containing vacuoles. *J Eukaryot Microbiol.* 49(3):209-19.
- [3] Geiman, Q. M. y H. Ratcliffe (1936). Morphology and life-cycle of an amoeba producing amoebiasis in reptiles. *J Parasitol.* 20: 208.
- [4] McConnachie, E. W (1955). Studies on *Entamoeba invadens*. Rodhain, 1934 in vitro an its relationship to some other species of *Entamoeba*. *J. Parasitol.* 59:41
- [5] Diamond, S., D. R. Harlow y C. C. Cunnick (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Roy. Soc. Trop. - Med Hyg* 72: 431.
- [6] Vazquezdelara-Cisneros, L. G. & Arroyo-Begovich, A. (1984). Induction of Encystation of *Entamoeba invadens* by Removal of Glucose from the Culture Medium. *J. Parasitol.* 70, 629-633
- [7] Turner, N.A., Eichinger, D. (2007). *Entamoeba invadens*: The requirement for galactose ligands during encystment. *Exp Parasitol*, 115, pp.467-474.
- [8] Biswa Nath Mitraa, Gabriele Pradelb, Ute Freverta, and Daniel Eichingera. (2010). Compounds of the upper gastrointestinal tract induce rapid and efficient excystation of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol.* 40(6): 751–760. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.11.012. NIH-PA
- [9] Bravo Torres José Carlos, (agosto, 1994). Estudio Epidemiológico de *Entamoeba histolytica* en la ciudad de Guanajuato. Págs. 5,7,68-69.
- [10] Julio C. Villagómez-Castro, Carlos Calvo-Méndez, Everardo López-Romero. (1992). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 52-53-62 53. Elsevier Science Publishers B.V. 0166-6851
- [11]. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A. Randall RJ (1951). Protein measurement with the with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1), 265-75.