

Expresión de esfingomielinasas ácidas de *E. histolytica* y *T. vaginalis* frente al estrés oxidativo.

Expression of acid sphingomyelinases from *E. histolytica* and *T. vaginalis* in response to oxidative stress.

Nadia Brizuela-Escamilla, Michell Alvarado-Ramírez, Ximena Manríquez-Mendoza, Dannae Ponce-Pérez, Daniel Ramírez-Celedón, Sebastián Vallejo-Hernández, Fátima Tornero-Gutiérrez, Sairy Andrade-Guillén, Ángeles Rangel-Serrano, Itzel Páramo-Pérez, José Martínez-Álvarez, Fernando Anaya-Velázquez, Bernardo Franco, Fátima Ramírez-Montiel* y Felipe Padilla-Vaca*.

Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

padillaf@ugto.mx; bf.ramirezmontiel@ugto.mx

Resumen

Entamoeba histolytica y *Trichomonas vaginalis* son patógenos que durante el proceso infeccioso se confrontan a diferentes defensas del hospedero, tales como el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos y la producción de especies reactivas de oxígeno, estos pueden dañar a la membrana plasmática, lo cual ocasiona la pérdida de la viabilidad. *E. histolytica* posee un mecanismo de reparación del daño a la membrana plasmática mediado por esfingomielinasas ácidas, el cual se activa frente a lesiones producidas por los mecanismos de defensa del hospedero como las proteínas formadoras de poros y el estrés oxidativo. En *T. vaginalis* se ha evaluado la expresión de genes y secreción de aSMasas, lo que sugiere que podría presentar un mecanismo de reparación del daño de membrana plasmática en respuesta al ataque del hospedero. El estrés oxidativo, sucede cuando un exceso de oxígeno rompe el equilibrio y al perder el balance oxidación-reducción hay un aumento de ROS que al estar en contacto con la membrana de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, producen la alteración de la fluidez y daño de la membrana plasmática debido a la peroxidación lipídica. El estrés oxidativo induce un incremento de la actividad de aSMasa secretada en *E. histolytica* y *T. vaginalis* y en la expresión de genes.

Palabras clave: Entamoeba; Trichomonas; Esfingomielinasa; Estrés oxidativo.

Protozoarios parásitos

Amibiasis

E. histolytica es el agente etiológico de la amebiasis, una enfermedad cosmopolita mayoritariamente asintomática. Aproximadamente 500 millones de personas en todo el mundo están infectadas, pero sólo el 10 % desarrolla la enfermedad. Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, muchos pacientes con *E. histolytica* presentan un cuadro clínico de amplio espectro que puede presentarse a nivel intestinal (disentería amebiana, rectocolitis aguda, colitis crónica no disintérica, ameboma) y extraintestinal (absceso hepático amebiano) (OMS, 1997; Turkeltaub y col., 2015). El ciclo de *E. histolytica* es relativamente simple, con sólo dos formas celulares, trofozoitos y quistes, cuya transmisión se produce exclusivamente entre humanos. Bajo ciertas condiciones el trofozoito de *E. histolytica* puede penetrar y atravesar el epitelio intestinal y

diseminarse a través del torrente sanguíneo a diversos órganos, principalmente el hígado (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/amebiasis>).

Tricomoniasis

Trichomonas vaginalis es un protozoo parásito flagelado del tracto genital humano y la causa de la enfermedad de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial, con una estimación de 276.4 millones de casos al año en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2012). Las infecciones del tracto genital femenino pueden causar diversos síntomas, como vaginitis y cervicitis (Heine y McGregor, 1993). En los hombres, las infecciones suelen ser asintomáticas, aunque pueden producirse uretritis o prostatitis leves (Guenthner y col., 2005). Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que la infección por *T. vaginalis* se asocia a otras enfermedades con una elevada morbilidad, tanto en hombres como en mujeres, ha incrementado los esfuerzos por diagnosticar y tratar a los pacientes que albergan este parásito.



Figura 1. Amibiasis y tricomoniasis (diseño de los autores)

Hospedero

Sistema del complemento

El sistema del complemento es uno de los principales mecanismos efectores y el primer escudo humoral de la inmunidad innata del huésped contra patógenos. Este sistema consta de más de 30 proteínas solubles. Para patógenos unicelulares, como protozoos, bacterias y hongos, la activación del sistema del complemento puede culminar en la eliminación del invasor principalmente a través de; 1. La formación de un poro que despolariza la membrana plasmática del parásito provocando la lisis celular, mediante la interacción de las proteínas C5b, C6, C7, C8 y la polimerización de C9; 2- opsonización y muerte por fagocitos; 3- incremento de la permeabilidad vascular y reclutamiento de neutrófilos en el sitio de activación (Tegla y col., 2011).

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata, participando como mediador en la respuesta de defensa hacia bacterias, parásitos e infecciones. Son moléculas de entre 12 a 100 aminoácidos. El mecanismo de acción de los PAM involucra la capacidad de provocar daños en la membrana celular. La interacción de los PAM con el microorganismo está dada por las fuerzas electrostáticas entre los residuos de aminoácidos positivos y la carga negativa de la membrana celular del patógeno. Los PAM presentan especificidad dependiendo de la composición de la membrana celular de los patógenos. (Guilhelmelli y col., 2013).

Estrés oxidativo

Se le conoce como estado de estrés oxidativo cuando se genera un incremento en la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a un incremento exagerado de las mismas o debido a la disminución o inhibición de los mecanismos antioxidantes endógenos. Las especies reactivas de oxígeno son moléculas o fragmentos moleculares que suelen tener electrones desapareados por lo que tienen una gran capacidad de reaccionar con otras moléculas, especialmente con otros radicales libres. (Lahera y col., 2020). El estrés oxidativo y su consecuente generación de radicales libres pueden dañar el material genético, proteínas, actividad enzimática y lípidos. Las reacciones en cadena de peroxidación muestran una alta actividad biológica, y puede activar las vías de señalización que inician la muerte celular (Latunde-Dada, 2017). El peróxido de hidrógeno posee un pH ácido y es un mediador importante de la lesión oxidativa de lípidos ya que, altera la fluidez y genera daño en la membrana plasmática debido a la peroxidación de lípidos (Block, 1991).

Confrontación Parásito-Hospedero

Los parásitos *E. histolytica* y *T. vaginalis* son protozoarios patógenos que infectan al ser humano. Durante el proceso infectivo son confrontados por diferentes elementos del sistema inmune del hospedero para evitar su colonización, donde el principal blanco es el daño a la membrana plasmática (MP) del parásito. Entre los componentes del hospedero que dañan la membrana de los parásitos está el sistema del complemento, los péptidos antimicrobianos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La capacidad de los parásitos para establecer una infección exitosa depende de una serie de intrincadas adaptaciones seleccionadas evolutivamente, que incluyen el desarrollo de estrategias para evadir o resistir los mecanismos efectores del sistema inmunitario del hospedero. Nuestro grupo de investigación reportó que *E. histolytica* posee un mecanismo de reparación del daño a la MP mediado por esfingomielinasas ácidas (aSMasas), el cual es activado frente a lesiones producidas por moléculas formadoras de poros y estrés oxidativo. *T. vaginalis*, al igual que *E. histolytica*, secreta aSMasas, lo que sugiere que podría

presentar un mecanismo de reparación del daño a la membrana en respuesta a los componentes de defensa del hospedero (Rios-Barros y col., 2022).

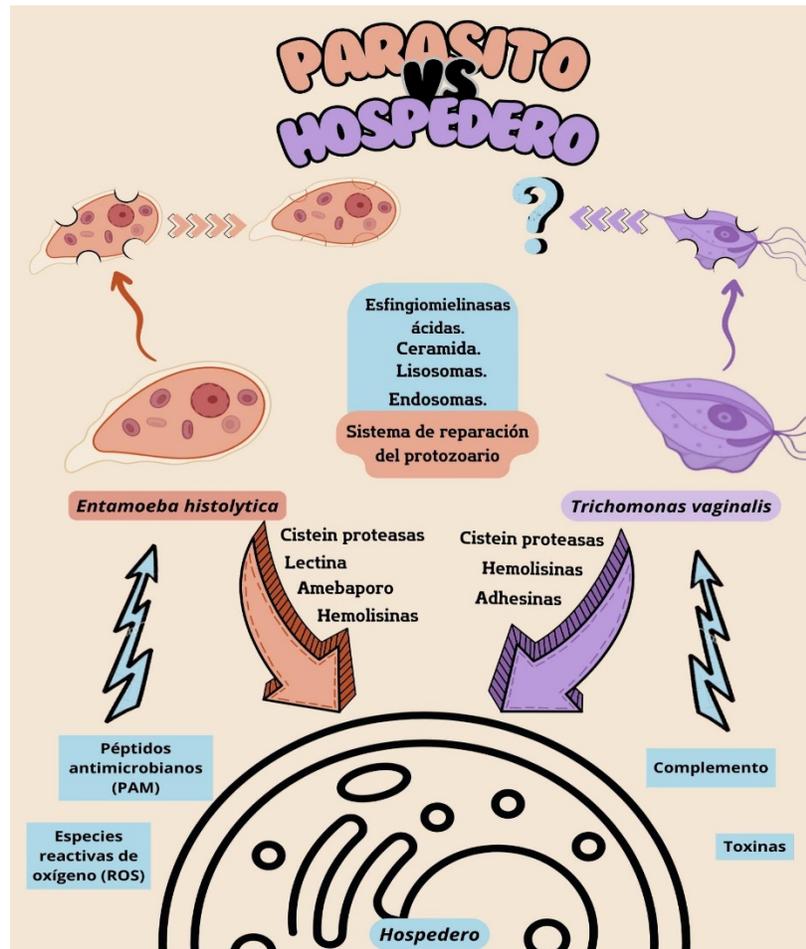


Figura 2. Confrontación parásito-hospedero (diseño de los autores).

Reparación del daño a la membrana plasmática

La membrana plasmática (MP) es una barrera semipermeable que se encarga de aislar selectivamente el contenido de la célula del ambiente externo, regular el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior celular y permitir la comunicación intracelular. La MP presenta microdominios (balsas lipídicas) enriquecidos de lípidos como colesterol, glicolípidos y esfingolípidos, los cuales son sitios de ensamblaje de complejos proteicos y sustratos de enzimas responsables de la generación de segundos mensajeros (Simons e Ikonen., 1997). El primer signo de daño a la MP es una entrada no controlada de Ca^{2+} extracelular que incrementa su concentración intracelular, el cual participa, entre otras cosas, en la activación de diferentes mecanismos para tratar de repararla. El gradiente de Ca^{2+} mantenido a través de la MP (en el orden ~ 2 mM extracelularmente y ~ 100 nM en el citosol) (Cheng, X., y col., 2015) es alterado

durante el daño celular, en donde el incremento del Ca^{2+} intracelular funciona como un segundo mensajero muy eficaz, que activa las proteínas citoplasmáticas involucradas en la reparación y en la exocitosis de vesículas cerca del sitio de la lesión (Parker, M. W., y Feil, S. C., 2005); entre estas vesículas se encuentran los lisosomas convencionales que se comportan como vesículas secretoras reguladas por Ca^{2+} cuando la concentración libre intracelular aumenta por encima de $1 \mu\text{M}$ (Di Paola y Lorusso, A., 2006).

Esfingomielinasas ácidas

Las aSMasas son enzimas metabólicas involucradas en la principal vía de producción de ceramida en la traducción de señales, aunque también se observa su participación en la reparación de daños de distintos tamaños a la membrana plasmática o lesiones que son frecuentes. Las esfingomielinasas ácidas favorecen a la formación de endosomas, estos encuentran la lesión en la membrana plasmática y restauran el daño, devolviendo la integridad en la membrana plasmática (Clarke y Hannun 2006).

En *E. histolytica* se ha reportado la presencia de seis genes que codifican para aSMasas, las cuales se transcriben en el parásito y presentan un péptido señal predicho, detectando su actividad en sobrenadantes, y cuya secreción es estimulada por agentes que dañan la MP de la amiba. El mecanismo de acción reportado para *E. histolytica* es muy similar al reportado en mamíferos. Cuando se presentan un daño en la membrana plasmática la entrada de Ca^{2+} del exterior es descontrolada, lo cual promueve la migración de lisosomas al sitio de la lesión, en este sitio los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática obstruyendo el sitio de la lesión con una estructura parecida a un parche, evitando la lisis celular. Cuando el lisosoma se fusiona con la membrana plasmática, se vierte el contenido del parche al medio extracelular, en donde está presente la enzima lisosomal esfingomielinasa ácida, la cual comienza a hidrolizar la esfingomielina presente en la cara externa de la membrana plasmática, lo que provoca la creación de sitios que son ricos en ceramida, la cual promueve la endocitosis de la lesión y posteriormente la degradación de ésta en el compartimiento endolisosomal, reparando así la lesión de la membrana plasmática (Figura 3) (Ramírez-Montiel y col., 2019).

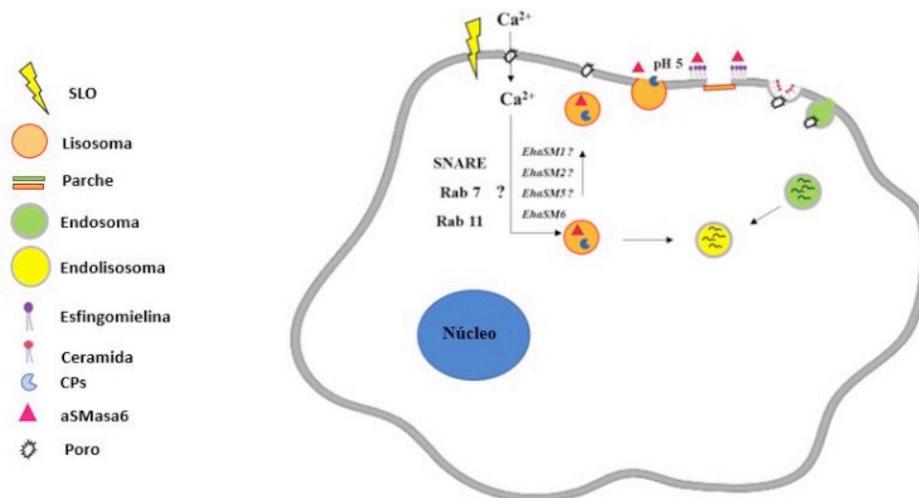


Figura 3. Mecanismo de reparación de la membrana plasmática mediado por aSMasas en el protozoo *E. histolytica*.

En *T. vaginalis*, se ha descrito la expresión de genes que codifican para aSMasas y la secreción de estas con muchas similitudes a *E. histolytica*. *T. vaginalis* se expone a diferentes daños debido al sistema de defensa del hospedero, este sistema incluye factores como el ataque con especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno, por parte de neutrófilos a los trofozoítos de *T. vaginalis*, debido a la competencia con el microbiota natural del sistema genitourinario (Nemati y col., 2018), además del sistema de complemento y péptidos antimicrobianos. Se reportó que *T. vaginalis* secreta actividad de aSMasas y al igual que en *E. histolytica* se detectan en su genoma la presencia de seis genes que codifican para aSMasas, conservando los sitios activos para su actividad (Torres-Castellanos, 2020).

Efecto del peróxido sobre la viabilidad de *E. histolytica* y *T. vaginalis*

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de *E. histolytica* y *T. vaginalis* determinada por la pérdida de la morfología ameboide de los parásitos. Se evaluaron tres cepas de *E. histolytica*, la cepa HM1 que es la de referencia y las cepas sobreexpresantes del gen que codifica para la aSMasa 4 (HM1SM4) y 6 (HM1SM6), respectivamente. En la figura 4 se observa que la cepa HM1 es más sensible en comparación con las cepas sobreexpresantes, sugiriendo que las aSMasas pueden proteger a las amibas del efecto oxidante del H₂O₂ sobre los lípidos de membrana. Se evaluó el efecto del peróxido sobre la cepa GT21 de *T. vaginalis* cultivada en ausencia [GT21(0)] y presencia [GT21(250)] de 250 μM de hierro. En la figura 5 se observa que la GT21 en ambas condiciones de cultivo son igualmente sensibles a las concentraciones evaluadas de H₂O₂.

	Control	H ₂ O ₂ (0.3mM)	H ₂ O ₂ (0.9mM)
HM1			
HM1SM4			
HM1SM6			

Figura 4. Efecto del peróxido (H₂O₂) sobre los trofozoítos de diferentes cepas de *Entamoeba histolytica*.

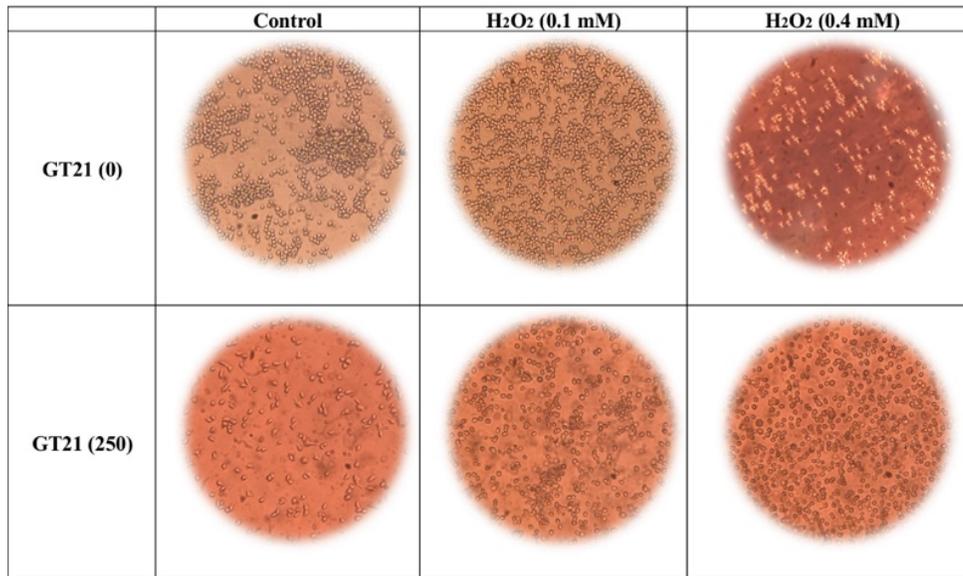


Figura 5. Efecto del peróxido (H₂O₂) sobre los trofozoítos de diferentes cepas de *Trichomonas vaginalis*.

Efecto del peróxido sobre la actividad de aSMasa secretada en tricomonas

Se evaluó la actividad de aSMasa secretada en *T. vaginalis* de la cepa GT21(0) sin y con exposición al H₂O₂ en los sobrenadantes colectados de las condiciones mostradas en la Figura 5. La hidrólisis de la esfingomielina se determinó mediante un método fluorescente indirecto acoplado. La actividad secretada de aSMasa no mostró cambios significativos en tricomonas expuestas a 0.1 mM de H₂O₂, mientras que con 0.4 mM se presentó un incremento de más de 3 veces con respecto al control (Figura 6). Este incremento correlaciona con el efecto observado de 0.4 mM de H₂O₂ sobre la morfología de las tricomonas (Figura 5).

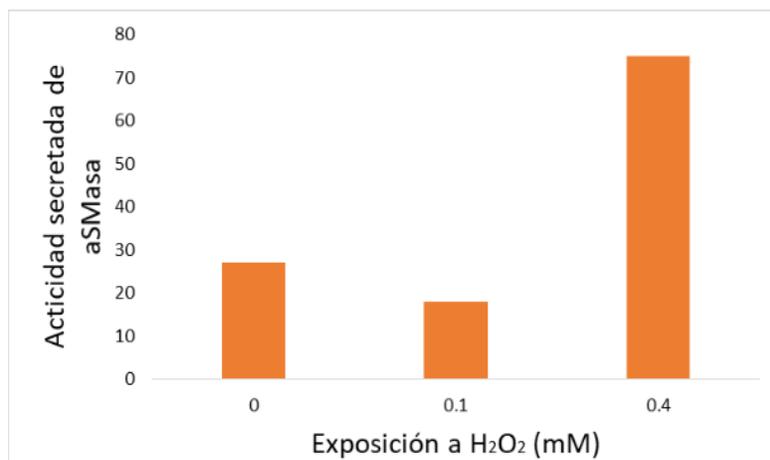


Figura 6. Actividad de aSMasa secretada en *T. vaginalis* GT21(0) expuesta a diferentes concentraciones de H₂O₂.

Efecto del peróxido sobre la expresión de genes de aSMasa en *T. vaginalis*

Se realizó la extracción del RNA total de las cepas GT21(0) y GT21(250) de *T. vaginalis* expuestas a 0.1 mM y 0.4 mM de diferentes concentraciones de peróxido. Se cuantificó la concentración de los diferentes RNAs obtenidos y se verificó su integridad en un gel de agarosa (Figura 7). En todas las muestras se observaron los ribosomales 18s y 28s indicando una buena calidad del RNA obtenido (Figura 7).

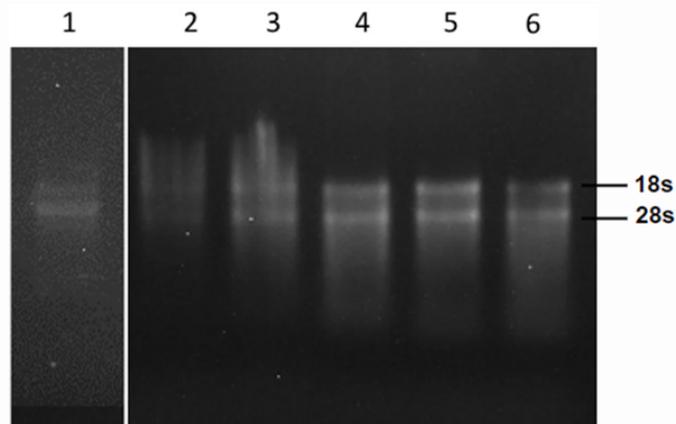


Figura 7. RNA total de *T. vaginalis* expuestas a peróxido. GT21(0) carriles 1, 2 y 3 control, 0.1 mM y 0.4 mM de H₂O₂, respectivamente. GT21(250) carriles 4, 5 y 6, control, 0.1 mM y 0.4 mM de H₂O₂, respectivamente.

Se verificó que el RNA estuviera libre de DNA genómico mediante PCR usando el RNA como templado para amplificar un fragmento del gen de la actina. No se obtuvo amplificación indicando que está libre de DNA genómico (datos no mostrados). Posteriormente se sintetizó el cDNA usando transcriptasa reversa. Para evaluar la calidad del cDNA sintetizado se realizó una PCR para amplificar un fragmento del gen de la actina. En la figura 8 se observa el amplicón de 510 pb correspondiente al gen de la actina, indicando que el cDNA sintetizado es de buena calidad.

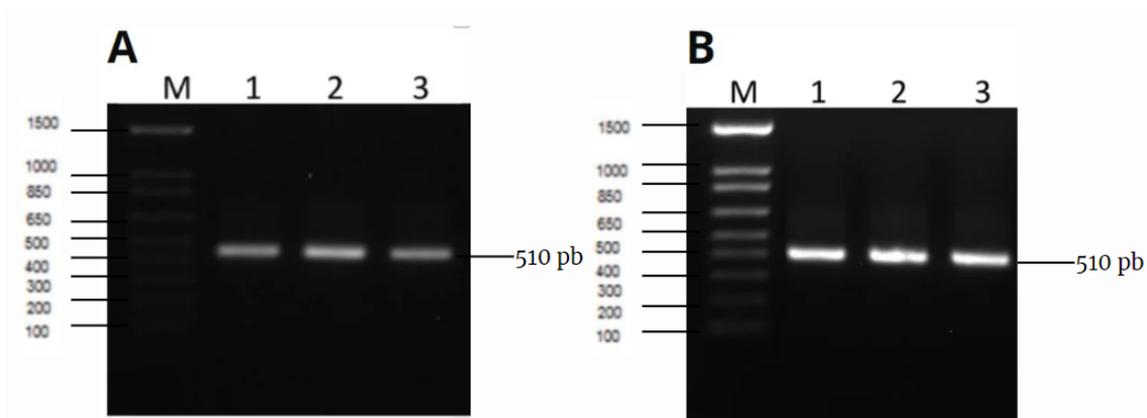


Figura 7. Amplificación de un fragmento del gen de actina usando cDNA como templado. A. GT21(0) carriles 1, 2 y 3 control, 0.1 mM y 0.4 mM de H₂O₂, respectivamente. B. GT21(250) carriles 1, 2 y 3, control, 0.1 mM y 0.4 mM de H₂O₂, respectivamente.

Se cuantificó el nivel de expresión de 5 genes de *T. vaginalis* que codifican para aSMasas en respuesta a la exposición al H₂O₂ mediante la técnica de qRT-PCR. Los resultados se muestran en la tabla 1. Hubo un incremento discreto en la expresión de los genes evaluados, resaltando el gen *TvSM5*, dónde el incremento fue de 5.3 veces.

Tabla 1. Expresión de genes de aSMasas en la cepa GT21(0) de *T. vaginalis* expuesta a peróxido de hidrógeno.

	TvaSM1	TvaSM2	TvaSM3	TvaSM5	TvaSM6
GT-21(0)	1	1	1	1	1
GT-21(0) 0.1 mM H ₂ O ₂	2.7	2.8	3.7	5.3	2.7

La expresión de los genes en la cepa GT21(0) sin peróxido se ajustaron a 1 para comprar con la cepa expuesta a peróxido.

Conclusiones

El peróxido de hidrógeno afecta la morfología y viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Las cepas de *E. histolytica* que sobreexpresan los genes 4 o 6 de las aSMasas presentan menos daño que la cepa control. Por su parte, las tricomonas no presentan diferencias significativas cuando se cultivan en ausencia o presencia de Fe en el medio de cultivo. La cepa GT21(0) incrementó su actividad de aSMasa secretada cuando el efecto del peróxido ya fue evidente, mientras que un incremento en la expresión de los genes que codifican para aSMasas se observó desde concentraciones bajas de peróxido. Se observó una mayor expresión del gen *TvaSM5* en respuesta al daño inducido con H₂O₂.

Agradecimientos

Nos gustaría expresar nuestros más sinceros agradecimientos a todos aquellos que contribuyeron al desarrollo y realización de esta investigación. En primer lugar y ante todo, agradecemos al Dr. Luis Felipe Padilla Vaca por habernos dado la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos de su línea de investigación y de la misma forma a la Dra. Fátima Berenice Ramírez Montiel, por su brindarnos su invaluable orientación y apoyo durante todo el proceso experimental. De igual forma agradecemos a la Dra. Ángeles Rangel Serrano y a la QFB. Itzel Páramo Pérez por darnos el debido apoyo durante el proceso experimental al momento proporcionarnos el material biológico y los reactivos requeridos para la realización los protocolos a seguir. Así también agradecemos a la MC. Sairy Andrade Guillén y a la BE. Fátima Tornero Gutiérrez por

habernos proporcionado en diversas ocasiones parte de su tiempo y ayuda para la realización de ciertos protocolos durante el transcurso del proyecto.

Agradecemos también a la Universidad de Guanajuato por brindarnos la oportunidad de conocer más al respecto sobre el ámbito de la investigación con el programa de “Verano de la Ciencia UG” que hizo posible llevar a cabo este estudio de investigación.

Por último, pero no menos importante expresamos nuestros agradecimientos a nuestros familiares, compañeros y amigos por su constante apoyo a lo largo de este proyecto, ya que sin ellos y todos los anteriormente mencionados, nada de esto podría haberse llevado a cabo.

Los autores agradecen el financiamiento de la Universidad de Guanajuato (072/2024) y del CONAHCYT (CF-2023-G-1274).

Bibliografía

- Block ER. Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 1991;146(3):362-9. [10.1002/jcp.1041460305](https://doi.org/10.1002/jcp.1041460305).
- Clarke CJ, Hannun YA. Neutral sphingomyelinases and nSMase2: Bridging the gaps. *Biochim Biophys Acta—Biomembr.* 2006; 1758(12):1893–901
- Guilhelmelli F, Viela N, Albuquerque P, Derengowski L, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 2013;4:353.
- Lahera V, & de las Heras N, & Cachofeiro V, & Martínez E (2020). Fisiología del endotelio y la pared vascular. Fernández-Tresguerres J.A., & Cachofeiro V, & Cardinali D.P., & Delpón E, & Díaz-Rubio E, & Escriche E, & Juliá V, & Teruel F, & Pardo M(Eds.), *Fisiología humana*, 5e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina-mhmedical-com.ugto.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=2987§ionid=25284036>
- Latunde-Dada GO. Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS*, 2017;1861(8):1893-1900. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019>
- Torres-Castellanos M.F., 2022. Análisis de la expresión de genes que codifican par esfingomielinasas ácidas en respuesta al hierro y al estrés oxidativo en *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Maestría Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología.
- Nemati M, Malla N, Yadav M, Khorrandelazad H, Jafarzadeh A. Humoral and T cell-mediated immune response against trichomoniasis. *Parasite Immunol.* 2018;40(3).
- Ramírez-Montiel, F., Mendoza-Macias, C., Andrade-Guillén, S., Rangel-Serrano, A., Páramo-Pérez, I., Anaya-Velázquez F., Franco B., Padilla-Vaca, F. (2019). Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens*, 15(8), e1008016.
- Organization WH. Strategies for the prevention of blindness in national programmes: a primary health care approach. World Health Organization; 1997.
- Turkeltaub JA, McCarty TR III, Hotez PJ. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015; 31(1):38–44. <https://doi.org/10.1097/MOG>.

- Guenther PC, Secor WE, Dezzutti CS. (2005). *Trichomonas vaginalis* induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect Immun* 73:4155–60.
- Heine P, McGregor JA. (1993). *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clin Obstet Gynecol* 36:137–44.}

- Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R, Rus V, Niculescu F, et al. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res.* 2011; 51(1):45. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8239-5> PMID: 21850539.
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *nature* 1997;387:569–572.
- Cheng X, Zhang X, Yu L, Xu H. Calcium signaling in membrane repair. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier; 2015. p. 24–31.
- Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology* 2005;88:91–142.
- Di Paola M, Lorusso M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2006;1757:1330–1337.
- Laura Valeria Rios-Barros, Anna Luiza Silva-Moreira, Maria Fatima Horta, Nelder Figueiredo Gontijo, Thiago Castro-Gomes. How to get away with murder: The multiple strategies employed by pathogenic protozoa to avoid complement killing. *Molecular Immunology* 149 (2022) 27–38.