

EFFECTO DEL PROCESAMIENTO DEL INTRÓN EN EL TRANSCRITO DEL GEN *EHRAB8* SOBRE LA VIRULENCIA DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

López-Reyes, Cinthia (1), Padilla-Vaca, Luis Felipe (2), Franco-Bárceñas, Bernardo (3)

1 Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | c.lopezreyes28@gmail.com

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

3 Departamento de Biología, División de Ciencia Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato | bfranco@ugto.mx

Resumen

La amebiasis es una infección intestinal o extraintestinal provocada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. En el grupo de trabajo se encontró por primera vez que el transcrito del gen *EhRab8* se expresa diferencialmente entre cepas de diferente virulencia y retiene el intrón sólo en las cepas de baja virulencia. Las cepas G3 y Rahman transfectadas con el gen *EhRab8* sin intrón presentaron la producción del transcrito procesado. La cepa G3-Rab8 presentó menor expresión del transcrito procesado que la cepa Rahman-Rab8. La cepa Rahman sobreexpresante mostró un incremento en la virulencia determinada por efecto citopático, actividad hemolítica, actividad citotóxica y fagocitosis de bacterias. Los resultados sugieren fuertemente que la proteína *Rab8* participa como un determinante de virulencia de *E. histolytica*.

Abstract

Amebiasis is an intestinal or extraintestinal infection caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. In the workgroup it was found for the first time that the *Ehrab8* gene transcript expresses differentially between strains of different virulence and it holds back the intron only in low virulence strains. The G3 and Rahman strains transfected with the *EhRab8* without intron showed the production of the processed transcript. The G3-Rab8 showed less expression of the processed transcript than the Rahman-Rab8 strain. The overexpressing Rahman strain showed an increase of the virulence determined by cytopathic effect, hemolytic activity, cytotoxic activity and bacteria phagocytosis. The results strongly suggest that the *Rab8* protein participates as a virulence determinant of *E. histolytica*.

Palabras Clave

Amebiasis; RabGTPasa; Determinantes de virulencia; intrones

Con formato

Tabla con formato

INTRODUCCIÓN

Amibiasis

La amibiasis es una infección intestinal o extra intestinal provocada por el protozoo parásito *Entamoeba histolytica*, causante de aproximadamente 50 millones de casos de infección y 100 mil muertes al año, afectando principalmente a países en vías de desarrollo. La amibiasis representa la tercera causa de muerte por infecciones parasitarias, después de la malaria, la enfermedad de Chagas y la tercera causa de morbilidad, después de la malaria y la tricomoniasis [1].

Virulencia

Se ha sugerido que la virulencia de *E. histolytica* es un proceso multifactorial, en el que están involucrados factores tanto de la amiba como del hospedero. Entre los factores del hospedero que pudieran influir, se encuentra la microbiota del intestino [2,3] la mucina intestinal [4] y la respuesta inmune. Entre los factores del parásito se encuentran algunas moléculas como el amebaporo, las cisteín proteasas y lectinas de superficie ([5]. Además, se han aislado distintas cepas con distintos grados de virulencia como las cepas HM1 de alta virulencia, G3 y UG10 de baja virulencia, que han sido caracterizadas y comparadas de acuerdo a su capacidad de lisis, fagocitosis y digestión de eritrocitos, así como la formación de abscesos hepáticos [6,7]

Determinantes de virulencia

Los determinantes de la virulencia son moléculas que están indirectamente involucradas en el proceso patogénico. Pueden regular la expresión de factores de virulencia, proteger al parásito durante el proceso infectivo, le proporcionan tolerancia al ambiente extracelular o le confieren alta plasticidad metabólica favoreciendo su adaptación y supervivencia ante factores del hospedero [8]. Entre las moléculas que se ha sugerido que participan están aquellas que le permiten contender ante especies reactivas de oxígeno, como la superóxido dismutasa dependiente de hierro y la peroxirredoxina [9], las esfingomielinasas [3,10] y la *Rab8* [11].

Retención de intrones

Los intrones son secuencias presentes en algunos genes de los organismos eucariotas, y para los que inicialmente no se conocía alguna función biológica [12].

El RNAm y su regulación mediante la retención de intrones, se ha propuesto como un mecanismo de regulación de la expresión génica en células eucarióticas. En nuestro grupo de trabajo se ha reportado por primera vez la retención de un intrón en el transcrito proveniente del gen *EhRab8* en la cepa UG10 de *E. histolytica* no virulenta, en contraste a lo que ocurre en el transcrito que se obtiene en la cepa HM1 de alta virulencia [13].

Justificación

La comparación del transcriptoma de dos cepas de amibas con el mismo fondo genético, reveló que la expresión de un grupo de genes podría estar relacionada con la modulación de la virulencia amibiana. En el grupo de trabajo se encontró por primera vez que el transcrito del gen *EhRab8* se expresa diferencialmente entre cepas de diferente virulencia y retiene el intrón sólo en las cepas de baja virulencia. Por lo tanto, es importante determinar si la retención del intrón está relacionado directa o indirectamente con la virulencia de *E. histolytica*, lo cual sería fundamental para el entendimiento de las bases moleculares del proceso patogénico de este parásito.

En el presente proyecto se evaluaron los niveles del transcrito procesado en las cepas Rahman y G3 de *E. histolytica* de baja virulencia, las cuales fueron transfectadas con el gen *EhRab8* sin intrón. Se evaluará el efecto citopático, citotóxico, citolítico y fagocítico sobre células blanco de las cepas transfectantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Entamoeba histolytica*

Se utilizaron las cepas Rahman-HA y G3-HA como control, pues no procesan el intrón y no expresan el gen *EhRab8*; así como las cepas transfectantes Rahman-Rab8 y G3-Rab8.

Tabla con formato

Extracción de RNA

Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* en fase exponencial y se utilizó el kit Aurum™ Total RNA (BioRad) de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante. Al paquete celular de 4×10^6 trofozoítos, se le adicionaron 350 μ L de solución de lisis y 350 μ L de etanol al 70%. Se colocó el lisado de amibas a una columna conteniendo una matriz de unión a RNA. Se incubó con DNasa I durante 30 min a temperatura ambiente. El RNA se dejó precipitando 18 h a 4°C. El RNA obtenido se cuantificó a 260 nm y se determinó su calidad e integridad en un gel de agarosa al 1 %. Se almacenó a -70 °C.

Síntesis de cDNA

La síntesis se realizó a partir de 3 μ g de RNA total en 1 μ l de oligo RT primer 50 μ M, 1 μ l de dNTP 10 mM y 7 μ l de agua DEPC. Se incubó a 65°C por 3 minutos y se adicionaron 4 μ l de amortiguador RT 5x, 2 μ l de ditiotreitól (DTT) 0.1 M, 1 μ l de inhibidor de RNasa, 1 μ l de transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Se incubó a 42°C por 50 minutos y después a 70°C por 15 minutos. Se enfrió en hielo, se diluyó con 80 μ l de agua MQ estéril y se dividió en alícuotas de 20 μ l para su almacenamiento a -20°C.

Efecto citopático

Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* en fase exponencial y se colocaron 1×10^5 , 2×10^5 y 3×10^5 amibas en diferentes pozos que contendían una monocapa confluyente de células MDCK. Se incubó la placa a 37°C de 120-180 minutos, según se requirió, y la reacción se detuvo poniendo la placa en hielo. Se lavó la placa con PBS-A para retirar las amibas; se fijaron las células remanentes con formaldehído al 4% y se tiñeron con azul de metileno al 0.1%. Con HCl 0.1M se extrajo el colorante incorporado a las células epiteliales y se leyó a 655 nm.

PCR

El cDNA fue utilizado como templado para la amplificación por PCR durante 40 ciclos, utilizando oligonucleótidos que amplifican un fragmento que comprende al intrón de 54 pb que posee el gen *EhRab8*. Los productos de la reacción se separaron en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Actividad hemolítica

Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* lavándolos con PIPES-Tris y se ajustaron a 1.5×10^6 amibas/ml. Por otro lado, se lavaron los eritrocitos humanos con PIPES-Tris y se ajustaron a una concentración de 1×10^9 eritrocitos/ml. A cada tubo eppendorf se adicionaron 125 μ l de PIPES-Tris, 125 μ l de amibas y 250 μ l de eritrocitos. Se incubaron por 90 minutos, para luego centrifugar a 13000 rpm, tomar 200 μ l del sobrenadante y leer a 570 nm.

Efecto citotóxico

Se usaron células MDCK en suspensión, se lavaron con medio TYI-33 y se ajustaron a 4×10^6 células/ml. Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* y se ajustaron a 8×10^5 amibas/ml. A cada tubo eppendorf se adicionaron 200 μ l de células MDCK y 80 μ l de amibas. Se incubaron durante 75 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 40 μ l del fluorocromo vital Hoechst 33258. Se incubó a temperatura ambiente y se observaron en el microscopio de fluorescencia UV para determinar el porcentaje de células MDCK muertas.

Fagocitosis de bacterias

A cada tubo con trofozoítos en fase exponencial, se le añadieron 500 μ l de *E. coli* que expresa una proteína roja fluorescente. Se incubaron a 37°C por 15, 30 y 60 minutos. Se lavaron con PBS-A atemperado y se cosecharon. La pastilla resultante se resuspendió con PBS-A frío y se le adicionó p-formaldehído al 2% para fijar las células. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y por medio de citometría se determinó el porcentaje de amibas que fagocitaron bacterias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de demostrar la expresión del *EhRab8* sin intrón en las cepas transfectantes (G3 y Rahman), se les extrajo el RNA y a partir de este se sintetizó cDNA y se realizó una PCR (Figura 1). Se observó que las transfectantes producían el transcrito procesado (427 pb).

Tabla con formato

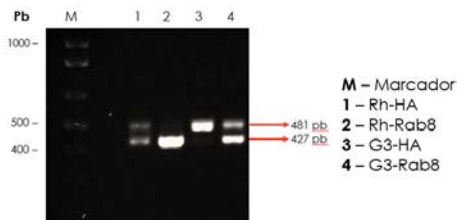


FIGURA 1: Producción del transcrito procesado del gen *Ehrab8*. Productos de amplificación separados en un gel de agarosa al 1%. Bandas de 481 y 427 corresponde al transcrito sin procesar y procesado, respectivamente.

Ya demostrada la expresión del gen, se evaluó la virulencia de las cepas transfectantes en comparación con las cepas control (de baja virulencia). En cuanto a la destrucción de monocapas de células epiteliales o efecto citopático, se observa que la cepa Rahman sobreexpresante (Figura 2A) tiene un mayor porcentaje de destrucción en comparación a la cepa que no lo procesa. En la Figura 2B no se observan diferencias significativas para la cepa G3, debido a la baja producción del transcrito procesado.

Para el ensayo de la evaluación de la capacidad de las amibas para lisar glóbulos rojos humanos, se cuantificó la hemoglobina liberada. Se obtuvieron resultados similares a lo anteriores: la cepa Rahman-Rab8 tuvo una mayor actividad hemolítica respecto a su control (Figura 3), mientras que la G3 no mostró diferencias.

En la determinación la capacidad citotóxica de las amibas sobre células epiteliales en suspensión, no se osbervaron diferencias significativas.

Finalmente, se determinó la capacidad ambiana para fagocitar bacterias. Los gráficos obtenido del análisis de la fagocitosis por citometría de flujo se muestras en la figura 4. En la Tabla 1 se presentan los valores del % de fagocitosis de diferentes cepas a tres tiempos de fagocitosis. la cepa Rahman-Rab8 fagocita más que su cepa control, y la cepa G3-HA tiene valores bajos con respecto a su control.

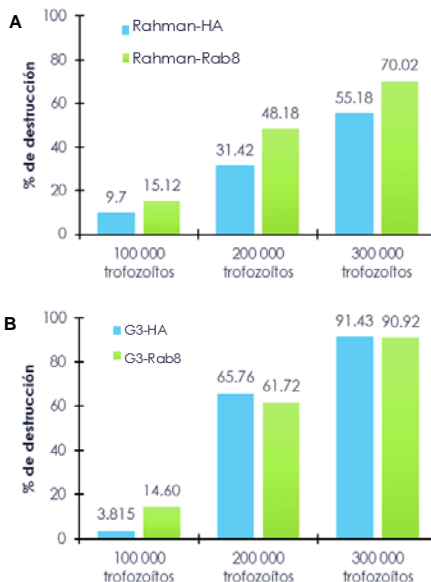


FIGURA 2. Efecto citopático de las cepas Rh-Rab8 (2A) y G3-Rab8 (2B) sobre monocapas de células MDCK.

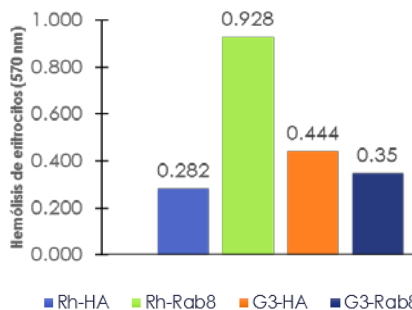


FIGURA 3. Actividad hemolítica de las cepas Rh-Rab8 y G3-Rab8 sobre monocapas de células MDCK.

Tabla con formato

Tabla 1: Porcentajes de fagocitosis de bacterias en diferentes tiempos.

TIEMPO DE FAGOCITOSIS (minutos)	PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS			
	Rh-HA	Rh-Rab8	G3-HA	G3-Rab8
15	1.58	7.56	4.73	8.91
30	7.26	14.90	28.97	18.94
60	40.69	48.25	50.99	42.18

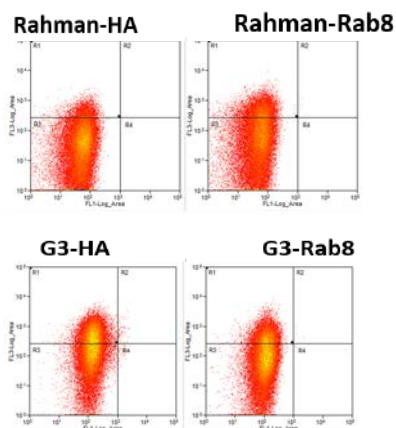


FIGURA 4. Análisis de fagocitosis por citometría de flujo. Distribución de las amebas con bacterias fluorescentes fagocitadas después de 30 min de incubación.

CONCLUSIONES

Se comprobó la expresión del gen *EhRab8* sin intrón en las cepas transfectantes Rahman y G3, aunque en esta última se expresó menos que en Rahman. Al generar un transcrito maduro de este gen, cepas de baja virulencia aumentan su virulencia significativamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Felipe Padilla, por todo el apoyo que me ha brindado desde el inicio de la carrera hasta este momento y por haberme aceptado en grupo de trabajo. A las auxiliares del laboratorio Ángeles e Itzel que me apoyaron con la siembra de amebas y al Dr. Bernardo Franco por su paciencia y consejos. Todos ellos hicieron posible este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). Estadísticas Sanitarias Mundiales.
- [2] Mirelman, D. (1987). Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol Rev* 51, 272-284.
- [3] Mendoza-Macias, C. L., Barrios-Ceballos, M. P., Anaya-Velázquez, F., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., Padilla-Vaca, F. (2010). Entamoeba histolytica: molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. *Exp Parasitol* 125(3), 279-285.
- [4] Vinall L.E., Hill, A.S., Pigny, P., Pratt, W.S., Toribara, N., Gum, J.R., Kim, Y.S., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D.M. (1998). Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum. Genet.* 102: 357-366.
- [5] Mirelman, D. (1988). Ameba-Bacterial Relationship in Amebiasis. Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica. Edited by Ravdin J. I. John Wiley and Sonns New York.
- [6] Mirelman, D., Anbar, M., Nuchamowitz, Y., Bracha, R. (2006). Epigenetic silencing of gene expression in Entamoeba histolytica. *Arch Med Res* 37(2), 226-233.
- [7] Lozano-Mendoza, J. (2009). Caracterización de una cepa de E. histolytica resistente al derivado de la neomicina G-418. Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología.
- [8] Anaya-Velázquez F., Padilla-Vaca F. (2011). Virulence of Entamoeba histolytica: a challenge for human health research. *Future Microbiol* 6, 255-258.
- [9] Bansal, D., Malla, N., Mahajan, R. C. (2006). Drug resistance in amoebiasis. *Indian J Med Res* 123, 115-118.
- [10] Ramírez-Montiel, F.B. (2015). Caracterización de la actividad de esnfigomielinasa ácida secretada por Entamoeba histolytica. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología.
- [11] Velázquez-Ramírez, D.A. (2015). Efecto de la retención del intrón en el transcrito del gen *EhRab8B* sobre la virulencia de Entamoeba histolytica. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología.
- [12] Wong GK-S, Passey DA, Huang Y-z, Yang Z, et al. (2000). Is "Junk" DNA mostly intron DNA? *Genome Res* 10: 1672-8

Tabla con formato