

La información genética de un organismo devastador



Miguel A. Vargas Mejía



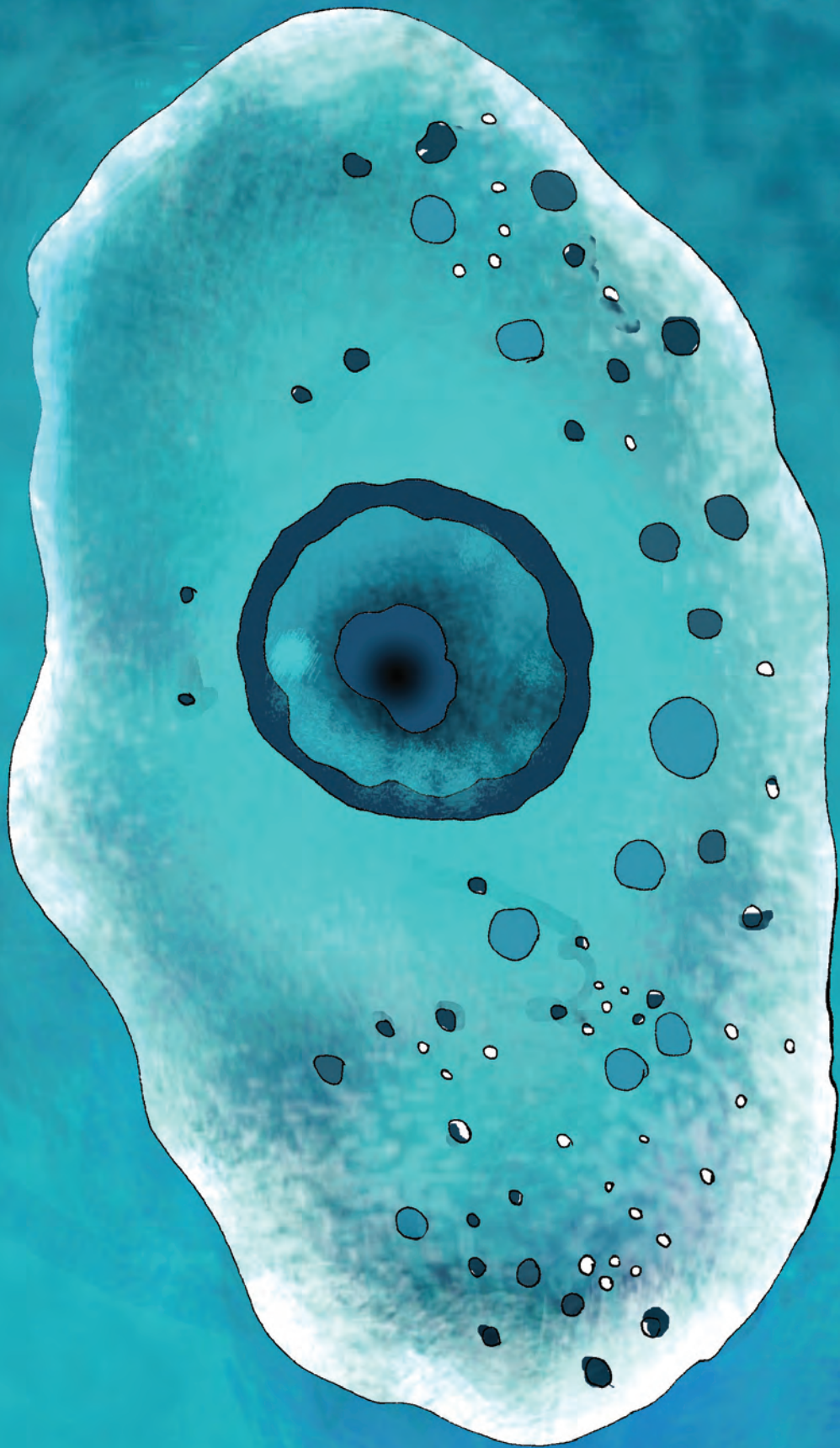
El adelanto de la biología molecular ha permitido observar el genoma de *Entamoeba histolytica* –el total de la información genética contenida en su ADN–. Estos estudios representan sólo la punta del iceberg, por lo que será necesario continuar con las investigaciones para encontrar la mejor forma de controlar a este parásito y las enfermedades que produce.

El genoma de *Entamoeba histolytica*

En los últimos años se ha logrado un gran avance en la biología molecular de *Entamoeba histolytica*. Esto ha permitido obtener datos sobre el genoma de este parásito (el total de su información genética, contenida en su ADN), así como sobre la naturaleza de los genes que lo constituyen.

Esta revisión se concentrará en algunos de esos genes y de los procesos moleculares de *Entamoeba histolytica* que podrían estar relacionados o ser directamente responsables de la agresividad o virulencia de estas amibas, ya que este parásito tiene la capacidad de matar múltiples tipos celulares, como neutrófilos (Guerrant y colaboradores, 1981), linfocitos (Salata y colaboradores, 1987), células epiteliales (Kobiler y Mirelman, 1981) y células cancerosas (Berninghausen y Leippe, 1997) en un tiempo muy corto; es decir, entre 5 y 15 minutos. Las células atacadas por este parásito muestran drásticos cambios morfológicos asociados con la apoptosis o muerte celular, acompañados con pérdida de la integridad de la membrana plasmática así como la fragmentación del ADN de la células destruidas por este parásito. Esta amplia capacidad destructiva de *E. histolytica* sobre diferentes tipos celulares permiten considerar a este parásito como un organismo devastador.

Sabemos ahora que el ADN genómico de *Entamoeba histolytica* está constituido por 24 millones de bases (Mb) púricas y pirimídicas, de las cuales alrededor del 75% corresponden a adenina (A) y timina (T). Los análisis *in silico* de la información



que se puede obtener de bases de datos en Internet revelaron que de los 9 938 genes identificados, solamente 49% codifica para proteínas, y de éstos tan sólo el 12% presenta las secuencias llamadas *intrones* (Figura 1), que se eliminan al sintetizarse una proteína, y que algunos genes (6%) presentan múltiples intrones.

Esta característica del genoma de las amibas resulta muy interesante, ya que se cree que los genes con múltiples intrones tendrían la posibilidad de generar diferentes moléculas de ARN mensajero (ARNm) a partir del mismo gen, dando como resultado que se sintetizaran variantes o *isoformas* de una misma proteína, cada una de las cuales podría tener diferentes propiedades, bioquímicas o funcionales.

La organización del ADN en el núcleo depende de su asociación con proteínas llamadas *histonas*, para formar la cromatina. Aunque este agregado molecular se puede distinguir en el núcleo amibiano (Figura 2), el número de cromosomas, así como el contenido del ADN en ellos, o *ploidía*, han sido difíciles de determinar. Los datos al respecto son todavía sujeto de controversia.

En 1991 un análisis de microscopía electrónica de mayor resolución reveló que la cromatina de este parásito presenta una organización semejante a la de un collar de perlas, lo que sugirió que las estructuras llamadas *nucleosomas* (las perlas), que se observan en organismos superiores, también organizan a la cromatina amibiana (Figura 3). Adicionalmente, se ha encontrado que aunque el extremo amino terminal de las histonas diverge respecto a la secuencia encontrada en organismos superiores, ésta conserva varios residuos del aminoácido llamado lisina, que son el blanco potencial para su acetilación por las enzimas histona-acetiltransferasas, lo cual promueve de manera positiva la actividad de expresión del ARNm; es decir, la actividad transcripcional de los genes en las células (Figura 4).

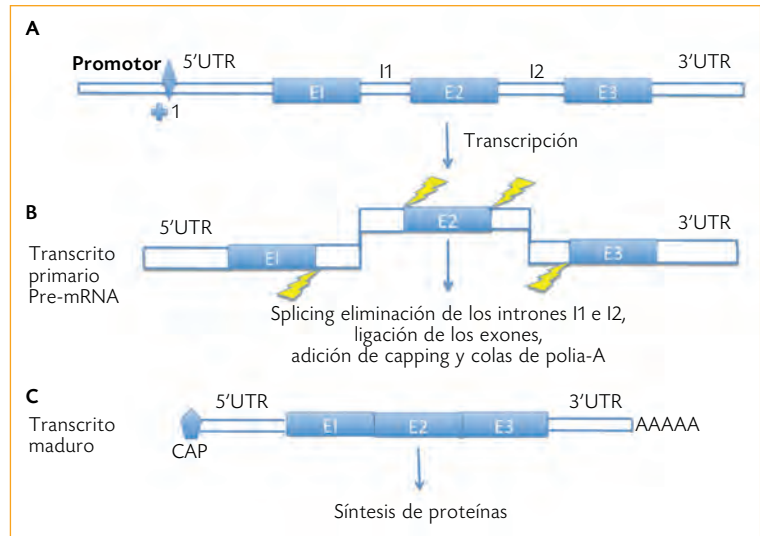


Figura 1. Procesamiento del ARN mensajero. **A)** Organización estructural básica de un gen. Promotor, sitio +1 del inicio de la transcripción, región 5'UTR no traducida, exón 1 (E1); exón 2 (E2) y exón 3 (E3); intrón 1 (I1) e intrón 2 (I2), región 3'UTR no traducida. **B)** Transcripción del pre-ARNm y eliminación de los intrones I1 e I2. **C)** Organización estructural de un ARNm maduro: un CAP; una región 5'UTR no traducida; los exones E1-E2-E3; una región 3'UTR no traducida y una cadena de poli-A. Este ARNm está listo para que la maquinaria de traducción de los mRNA (los ribosomas) promuevan la síntesis de una proteína. En este ejemplo, la secuencia peptídica de esta proteína hipotética estaría constituida por la traducción de los nucleótidos del ARNm que codifican para los exones del E1 al E3. Sin embargo, el mecanismo molecular denominado "splicing" permite generar variantes de proteínas, ya que es posible obtener las combinaciones E1-E3 (sin el exón E2) e E1-E2 (sin el exón E3), lo que permitiría ampliar el repertorio funcional de esta proteína.

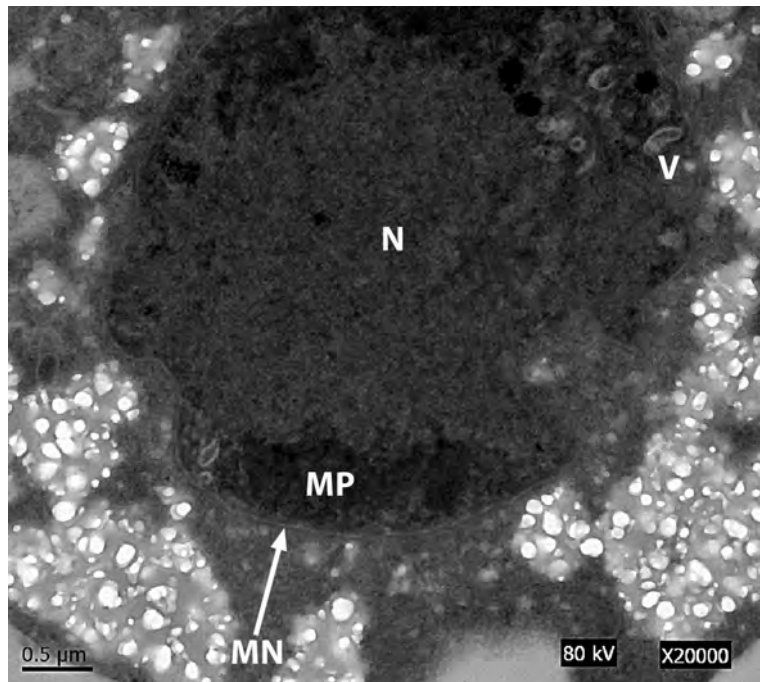


Figura 2. Microscopía electrónica del núcleo (N) de *E. histolytica*. Se puede observar la membrana nuclear (MN), el agregado perinuclear de la cromatina (MP) y algunas vesículas intranucleares (V).

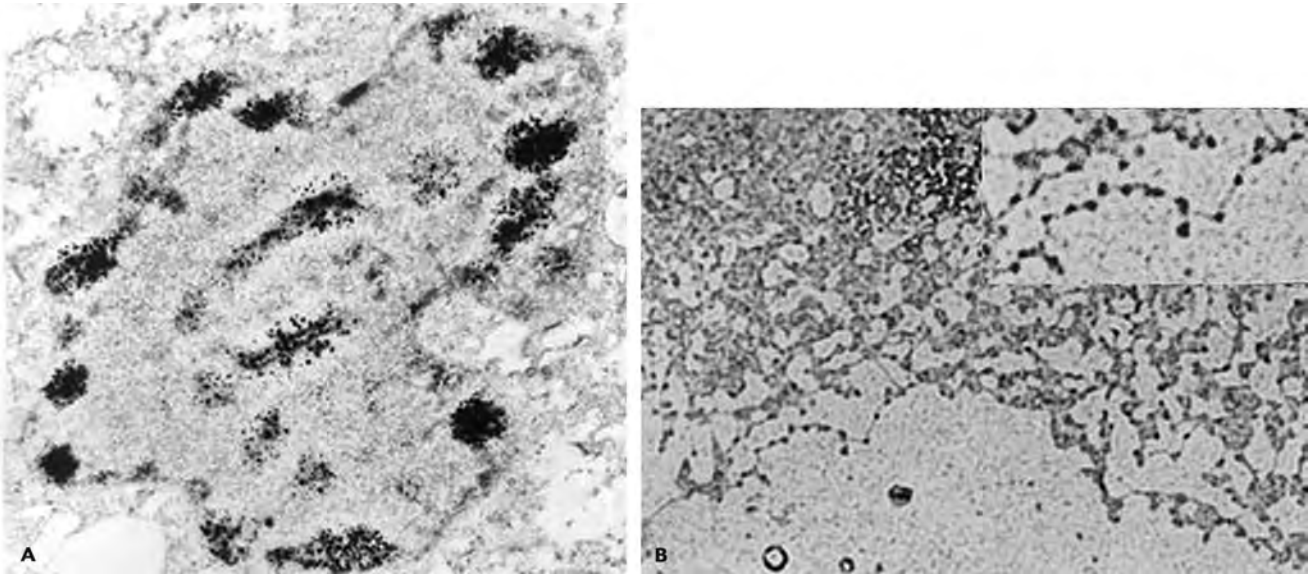


Figura 3. Cromatina obtenida de los núcleos muestra su organización en nucleosomas.

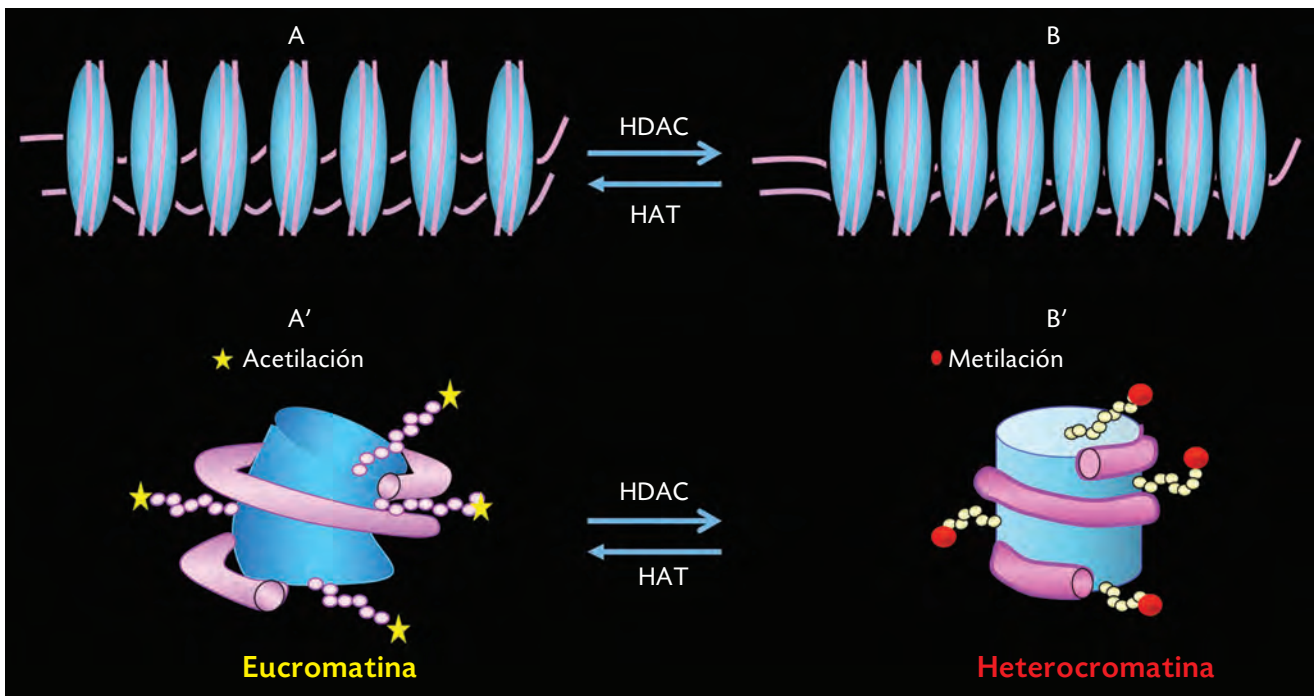


Figura 4. Regulación de la expresión transcripcional. Representación de cromatina activa constituida por ADN e histonas (A y B), así como múltiples unidades fundamentales denominadas nucleosomas (A' y B'). La eucromatina (A) es la forma en que el ADN está transcripcionalmente activo, ya que las histonas en los nucleosomas presentan una modificación postraduccional llamada acetilación (A'), realizada por la enzima acetiltransferasa de histona (HAT). Este evento molecular es revertido por la enzima desacetilasa de histona (HDAC), que elimina la marca de acetilación de la histona y permite que las histonas sean metiladas (B') por la enzima metiltransferasa de histonas (HMT). De esta manera se obtiene una forma de organización de la cromatina denominada heterocromatina (B), la cual no es transcripcionalmente activa; es decir, no hay síntesis de ARN mensajero ni tampoco de proteínas.

En el genoma de *Entamoeba histolytica* se han encontrado datos que sugieren que en sus cromosomas han ocurrido eventos celulares como la recombinación meiótica y la posible existencia de un mecanismo de reproducción sexual

Además de estas características, se conoce muy poco sobre la organización estructural de la cromatina de *Entamoeba histolytica*, debido en parte a que el genoma de estas amibas no se condensa en cromosomas visibles como tales durante la metafase de la mitosis, como sucede en la mayoría de las células que tienen un núcleo. Únicamente se han podido observar estructuras que asemejan cromosomas utilizando técnicas especiales de microscopía de luz y electrónica. Con la técnica llamada electroforesis de campos pulsados rotatorios se identificaron, en núcleos aislados de amibas, entre 31 y 35 bandas cuyo tamaño podría contener fragmentos del ADN entre 0.5 a 2.2 millones de bases.

● Secuenciación del genoma de *E. histolytica*

La secuenciación y el análisis del genoma de *Entamoeba histolytica* no solamente ha permitido obtener una vasta e importante información sobre el número de genes y el tipo de proteínas que son codificados por los mismos. También han puesto en evidencia la posible existencia de mecanismos moleculares que hacen de *E. histolytica* un organismo biológicamente muy interesante, no solamente por ser un problema para la salud, sino porque ha permitido estudiar procesos y

funciones *sui generis* que podrían favorecer que se seleccionaran parásitos con mayor virulencia.

En el genoma de *Entamoeba histolytica* se han encontrado datos que sugieren que en sus cromosomas han ocurrido eventos celulares como la recombinación meiótica y la posible existencia de un mecanismo de reproducción sexual. La existencia de una recombinación meiótica abriría la posibilidad para que hubiese transferencia de información genética entre distintas cepas de *E. histolytica* que resultase en amibas con mayor capacidad de invadir tejidos, sobrevivir y reproducirse, y por lo tanto en parásitos más agresivos. Los análisis también sugieren la posibilidad de que la transferencia de información genética confiera a las amibas resistencia a fármacos, lo cual también permitiría a las amibas sobrevivir en el hospedero y tener mayor posibilidad para invadir los tejidos y para transmitirse a otros individuos. Algo interesante en el genoma de las amibas es que se ha observado la llamada ganancia de información genética, obtenida por la transferencia de genes provenientes de bacterias que habitan en la flora intestinal del hospedero y que fueron fagocitadas por las amibas.

Otros hallazgos interesantes: los análisis del genoma de *Entamoeba histolytica* mostraron que en este microorganismo hay diferentes genes que codifican para proteínas pertenecientes a la familia A1G1, cuya función está relacionada con la resistencia a fármacos en bacterias. Lo más interesante es que la expresión de este grupo de proteínas está considerablemente disminuida en amibas que no son virulentas, como *Entamoeba dispar*, lo que sugiere que estas moléculas podrían participar en la virulencia de *Entamoeba histolytica*. Para estudiar esto a fondo daremos una idea de las nuevas metodologías de biología molecular mediante las cuales sería posible inhibir la expresión de los genes de proteínas como las mencionadas A1G1.

El empleo de un ARN antisentido o de un ARN de doble cadena impedirían la expresión de estos genes, al competir con la transcripción del ARNm no alterado, del cual se traduce la información para sintetizar a las proteínas. Otra metodología, llamada “interferencia por ARN” (ARNi) proporciona una estrategia fácil y rápida para degradar ARN mensajeros mediante la introducción a la célula de un ARN pequeño de doble cade-

na (siARN), homólogo al ARN mensajero celular de interés, el cual es reconocido y degradado específicamente, ya que contiene la secuencia complementaria al siARN (Figura 5). Con la degradación del ARN mensajero no habría la expresión o síntesis de la proteína correspondiente. La maquinaria del ARNi requiere de la participación coordinada de tres proteínas clave que incluyen a DICER, AGO y RdRP. El análisis del genoma de *Entamoeba histolytica* reveló la presencia de tres genes homólogos para AGO, un gen para RdRp y, aunque carece de un gen que codifique para una DICER típica (dos dominios de la enzima ARNasa y un dominio Paz), se ha encontrado un gen que contiene un dominio de la ARNasa III que permite pensar que el silenciamiento de genes a través de un mecanismo similar al del ARNi podría funcionar en *E. histolytica*.

En el genoma de *E. histolytica* también se han encontrado genes que se repiten varias veces y que codifican para ciertas proteínas. Se han identificado tres grupos principales: los genes que codifican para las pro-

teínas ribosomales, los que específicamente codifican para proteínas tipo BspA (BspA-like), y los que lo hacen para las proteínas Ariel. Las proteínas BspA-like comprenden una extensa familia de antígenos de superficie tanto en bacterias como en parásitos. En bacterias patógenas como *Treponema pallidum* y *Tannerella forsythensis*, las proteínas Bsp-A participan en la agregación celular, en la unión a proteínas de la matriz extracelular y en la adhesión a células blanco, todas ellas funciones que serían muy importantes para un parásito invasor como las amibas, que requieren un contacto íntimo para causar daño a otras células.

Otro aspecto interesante de las moléculas Bsp-A es que pueden estimular la producción de citosinas proinflamatorias a través de la estimulación de receptores llamados Toll-like, que participan en la respuesta inmunitaria innata encargada de detener el avance de patógenos en el organismo. Estas citosinas a la vez ayudarían a generar un microambiente inflamatorio que, se ha propuesto, favorece la destrucción de células por parte de las amibas. La abundancia de genes que codifican para estas moléculas que se han encontrado en *Entamoeba histolytica* podría estar vinculada con procesos adaptativos para sobrevivir, colonizar e invadir las mucosas del tracto digestivo del huésped.

El otro grupo de genes muy repetidos en *E. histolytica* son los que codifican para proteínas pertenecientes a la familia Ariel, la cual está compuesta por proteínas ricas en aminoácidos de serina. Se ha observado que estas proteínas se caracterizan por presentar hacia su extremo amino terminal una secuencia líder que promueve su asociación con la membrana celular, mientras que su extremo carboxilo terminal se caracteriza por tener secuencias repetidas de serina organizadas en grupos de 4 y 8 aminoácidos. Estas proteínas se localizan principalmente en la superficie amibiana y son altamente inmunogénicas, por lo que podrían ser muy útiles para inducir la producción de anticuerpos contra el parásito, aunque aún no se han estudiado.

En contraste con lo anterior, existen genes que han sido ampliamente estudiados por su importancia, así como por su participación en diferentes procesos celulares relacionados con la patogenia de este parásito. Uno de estos genes codifica para la lectina Gal/GalNac; otros codifican para las proteínas llamadas ameboporos

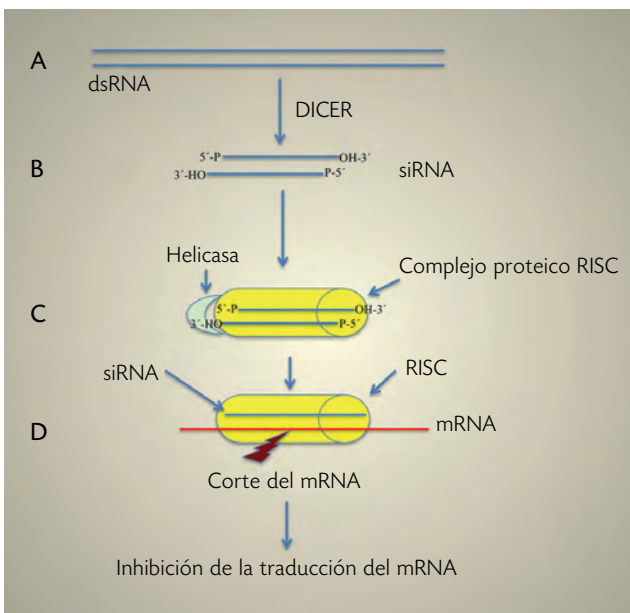


Figura 5. Mecanismos básicos de la inhibición de la expresión de un gen a través de un ARN pequeño de interferencia (siARN). **A)** Formación de una doble cadena de ARN (dsARN). **B)** Corte del dsARN por la enzima endonucleasa DICER para formar un siARN pequeño. **C)** Formación del complejo proteico (RISC), helicasa, y el siARN pequeño para generar un siARN de cadena sencilla. **D)** Degradación de un ARNm específico a través del ensamblaje del complejo del RISC y el apareamiento específico del siARN con su ARNm blanco, impidiendo de esta manera que se traduzca y se sintetice una proteína específica.



y para algunas de las proteinasas de cisteína (descritas en el artículo de Mineko Shibayama y Víctor Tsutsumi, en este mismo número de *Ciencia*).

El análisis de este tipo de genes en el genoma de *Entamoeba histolytica* permitió identificar redundancia de los genes que codifican para este tipo de moléculas. Se han identificado 30 homólogos para la subunidad intermedia de la lectina GalGalNAc, y un homólogo para la cadena pesada. Se encontraron diez nuevas proteinasas de cisteína que pudieran estar asociadas a la membrana plasmática, y tres nuevos genes que codifican para ameboporos, de los cuales uno de ellos también presenta cierto grado de homología con la hemolisina III, lo cual sugiere que la actividad lítica promovida por los ameboporos podría también estar ligada con la actividad hemolítica. Las proteinasas de cisteína también son codificadas por un grupo numeroso de sus respectivos genes.

Como se describe en otros artículos de este número, la fase infectiva de *Entamoeba histolytica* es la forma quística del parásito, y en el genoma se han identificado dos genes relacionados con las secuencias codificantes para dos proteínas con actividad de sintasas de quitina, EhCH-1 y EhCHS-2, que se requieren para la síntesis de la glicoproteína quitina, componente principal de la cubierta resistente del quiste. El análisis filogenético para las proteínas codificadas por estos dos genes mostró que la proteína codificada por el gen EhCH-1 es única, mientras que la enzima EhCHS-2 es similar a sintasas de quitina pertenecientes a un grupo llamado *clados*, presente en insectos y nemátodos.

Por otra parte, los estudios funcionales que se han hecho mediante la expresión de las enzimas EhCHS-2 y EhCHS-1 en levaduras mostraron que EhCHS-1 se expresa y es funcional en levaduras de cerveza, mientras que para la enzima EhCHS-2 no se detectó actividad significativa de síntesis de quitina. Sin embargo, sí se logró observar la expresión de EhCHS-1 y EhCHS-2 a nivel de ARN mensajero en la amiba parásita de reptiles llamada *Entamoeba invadens*, después de ocho horas de inducción del enquistamiento. La evaluación de la expresión de EhCHS-1 y EhCHS-2 podría ser muy importante para entender los mecanismos moleculares implicados en la expresión genética de estas enzimas, ya que seguramente permitiría encontrar blancos moleculares para impedir la formación de quistes y diseñar una o varias herramientas farmacológicas para impedir la diseminación del parásito al medio externo, la infección o reinfección de hospederos.

Por otro lado, el conocimiento de las rutas metabólicas establecidas en *Entamoeba invadens* han dejado claro que las enzimas sintasa de glutamina y la aminotransferasa de glucosamina-6-fosfato son clave en la biosíntesis de quitina en este parásito, por lo que su estudio en *Entamoeba histolytica* también es importante para poder bloquear la formación de quistes.

Regulación de la expresión genética en *E. histolytica*

Otros de los hallazgos recientes obtenidos de los análisis del genoma de *Entamoeba histolytica* son la identificación de las moléculas, así como los mecanismos implicados en las modificaciones epigenéticas (metilación del ADN o modificación de las histonas), las cuales inciden directamente en la conformación de la cromatina y en la regulación de la expresión de los genes. Dichos mecanismos moleculares ya se conocían en *Plasmodium falciparum*, y son importantes para la variabilidad antigénica que se presenta en este parásito. Las modificaciones epigenéticas reportadas en *E. histolytica* están relacionadas con la metilación del ADN y de la histona H3. La detección de la metilación del ADN permitió proponer que existe un mecanismo de regulación negativo de la expresión de genes, asociado a las secuencias CpG (que se agrupan como

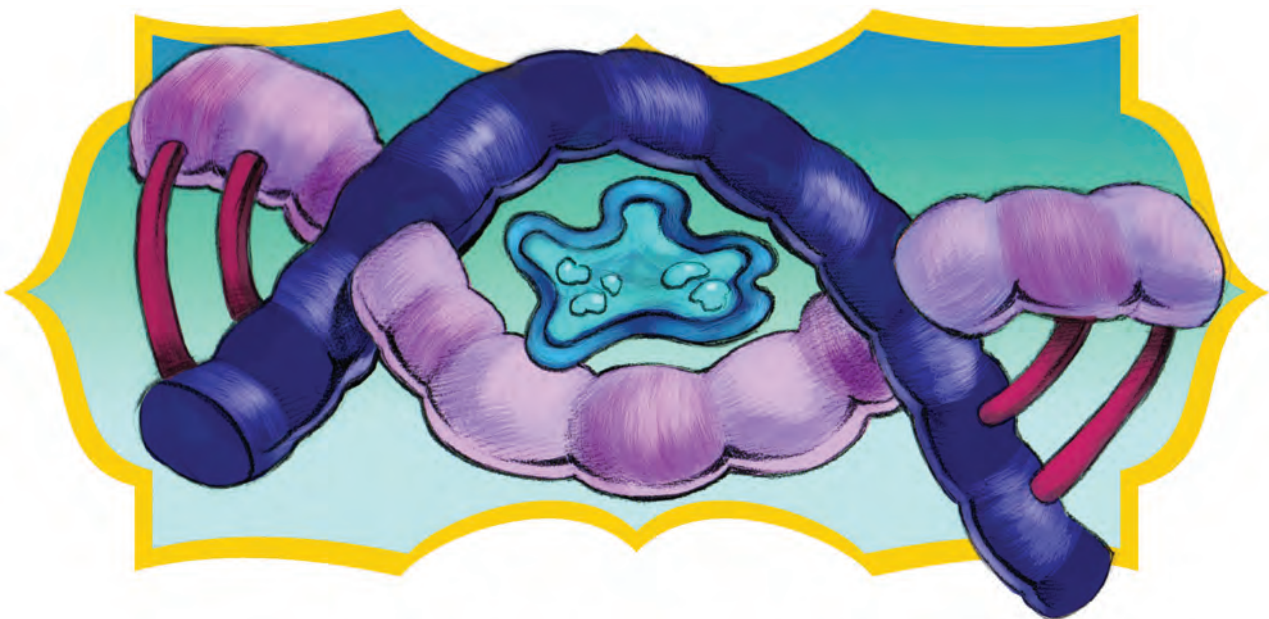
islas) de las regiones promotoras, mediante la participación de enzimas como la citosina-5-metiltransferasa (Dnmt2). Por otro lado, la modificación epigenética debida a la metilación de la histona H3 se ha correlacionado con la actividad positiva de transcripción de ciertos genes. Estos mecanismos epigenéticos de la regulación podrían ser importantes para activar o prevenir la expresión de genes involucrados en virulencia o implicados en la expresión de moléculas relacionadas con la formación del quiste.

● Elementos móviles del genoma

Otro descubrimiento reciente en el estudio del genoma de *E. histolytica* ha sido la presencia de elementos denominados *transposones* y *retrotransposones* en el ADN amibiano. Los primeros son elementos con capacidad de moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, generando una transposición de las secuencias del ADN que puede provocar mutaciones y cambios en la cantidad de ADN en el genoma, o alterar la expresión de los genes en las células en donde se lleva a cabo este proceso. Los retrotransposones son copias del ADN sintetizadas por la enzima transcriptasa inversa a partir de ARN. La inserción de retrotransposones también trae como consecuencia cambios en la cantidad del ADN, así como

cambios y mutaciones en los genes. Estos estudios permitieron determinar la existencia de estos elementos móviles en *Entamoeba histolytica* y establecer que estos elementos se insertan preferencialmente en los mismos sitios en el genoma.

En cuanto a los retrotransposones, también se ha reportado que existen alrededor de 740 de estos elementos en el genoma, por lo que constituyen el 11% del genoma de este parásito. Estos elementos son de dos tipos: SiNEs y LINEs. Se encontró que en 88 copias de los LINEs existen dos marcos de lectura abiertos: uno de ellos codifica para una proteína de función desconocida y otro para una transcriptasa inversa, para una nucleasa y para una proteína de unión al ADN. Por otro lado, se ha reportado la existencia de un fragmento invertido repetido denominado EhERE. En éste se encontró un marco de lectura abierto de 2.7 kilobases, el cual codifica para una proteína similar a una ATPasa relacionada con funciones de segregación del ADN y su reparación. Aunque hasta la fecha no se tiene información sobre la función de este tipo de moléculas, se piensa que estos elementos del ADN amibiano podrían estar participando en la generación de variantes patógenas de *E. histolytica*, que son obtenidas tanto de aislados clínicos como de cultivos de amibas hechos en presencia de bacterias patógenas, en los cuales se produce un aumento en la virulencia del parásito.



Como puede apreciarse en esta revisión, los estudios de la biología molecular de *Entamoeba histolytica* solamente representan la punta del iceberg, y es necesario continuar las investigaciones para encontrar la mejor forma de controlar a este parásito y las enfermedades que produce.

Miguel A. Vargas Mejía es biólogo por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y obtuvo el doctorado en patología experimental en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Hizo una estancia posdoctoral en el Instituto Pasteur de París, Francia. Actualmente es investigador titular del Departamento de Biomedicina Molecular del Cinvestav. Su trabajo se ha centrado en el estudio de las moléculas reguladoras de las pequeñas GTPasas Rho en *Entamoeba histolytica*, así como en la identificación y evaluación de fármacos contra estas proteínas.

mavargas@cinvestav.mx

Lecturas recomendadas

- Ankri, S., R. Bracha, F. Padilla-Vaca y D. Mirelman (1999), "Applying Antisense Technology to the Study of *Entamoeba Histolytica* Pathogenesis: Response", *Trends in Microbiology*, 7, 473-474.
- Baxt, L. A. y U. Singh (2008), "New Insights into *Entamoeba Histolytica* Pathogenesis", *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21, 489-494.
- Berninghausen, O. y M. Leippe (1997), "Necrosis Versus Apoptosis as the Mechanism of Target Cell Death Induced by *Entamoeba Histolytica*", *Infection and Immunity*, 65, 3615-3621.
- Clayton, C. (2010), "Repetitive Elements in Parasitic Protozoa", *Biomed Central Biology*, 8, 64-67.
- Eichinger, L. y A. A. Noegel (2005), "Comparative Genomics of *Dictyostelium Discoideum* and *Entamoeba Histolytica*", *Current Opinion in Microbiology*, 8, 606-611.
- Guerrant, R. L., J. Brush, J. I. Ravdin, J. A. Sullivan y G. L. Mandell (1981), "Interaction Between *Entamoeba Histolytica* and Human Polymorphonuclear Neutrophils", *Journal of Infectious Diseases*, 143, 83-93.
- Kobiler, D. y D. Mirelman (1981), "Adhesion of *Entamoeba Histolytica* Trophozoites to Monolayers of Human Cells", *Journal of Infectious Diseases*, 144, 539-546.
- Loftus, B., I. Anderson, R. Davies, U. C. Alsmark y colaboradores (2005), "The Genome of the Protist Parasite *Entamoeba Histolytica*", *Nature*, 433, 865-868.
- Salata, R. A., J. G. Cox y J. I. Ravdin (1987), "The Interaction of Human T-lymphocytes and *Entamoeba Histolytica*: Killing of Virulent Amoebae by Lectin-dependent Lymphocytes", *Parasite Immunology*, 9, 249-261.
- Tovy, A. y S. Ankri (2010), "Epigenetics in the Unicellular Parasite *Entamoeba Histolytica*", *Future Microbiology*, 5, 1875-1884.
- Weedall, G. D. y N. Hall (2011), "Evolutionary Genomics of *Entamoeba*", *Research in Microbiology*, 162, 637-645.
- Zhang, H., J. M. Pompey y U. Singh (2011), "RNA Interference in *Entamoeba Histolytica*: Implications for Parasite Biology and Gene Silencing", *Future Microbiology*, 6, 103-117.



comunicaciones libres