

Artículo



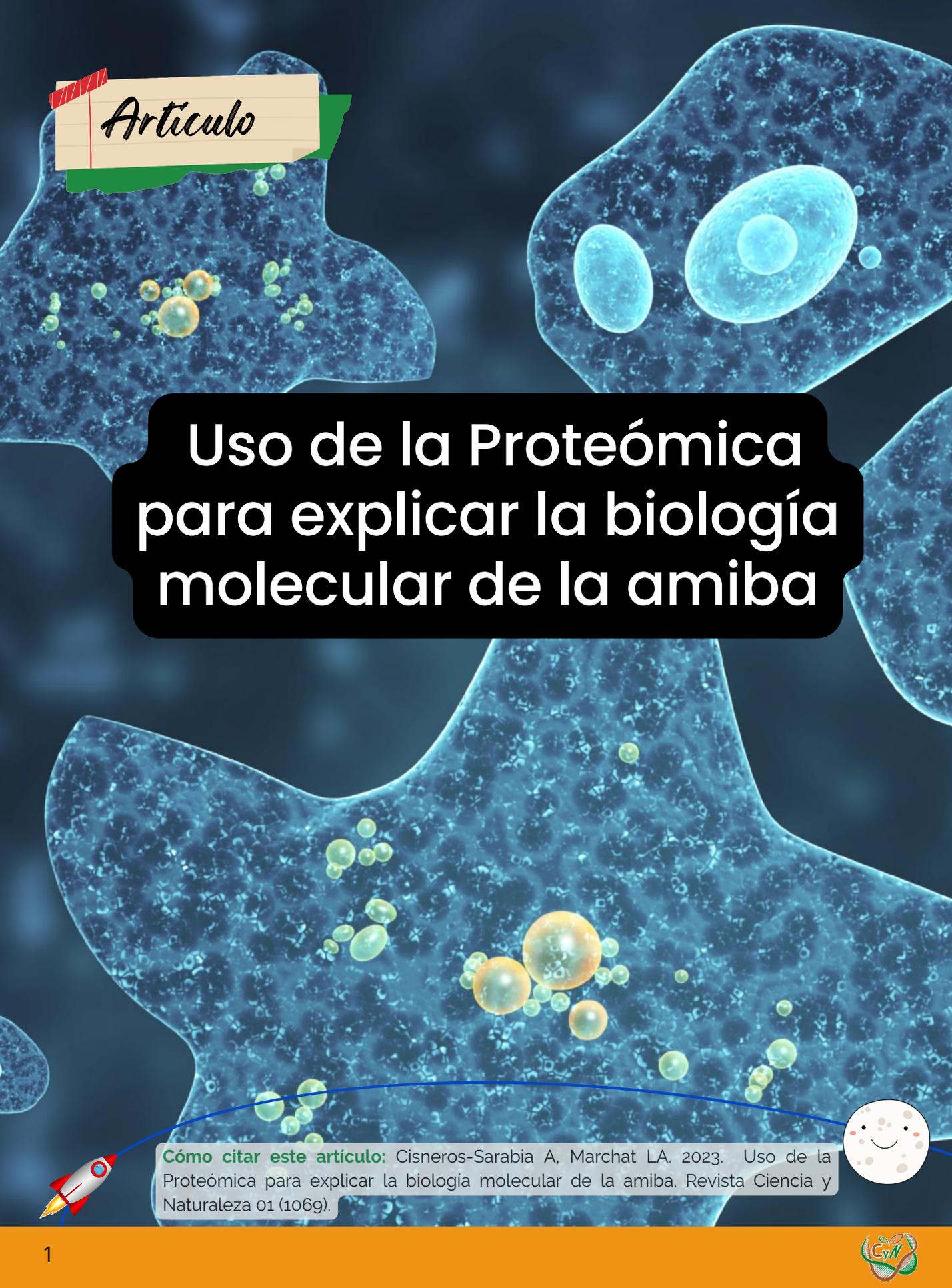
Revista

Ciencia
y Naturaleza

Uso de la Proteómica para explicar la biología molecular de la amiba

Alondra Cisneros Sarabia
Laurence A. Marchat

1069



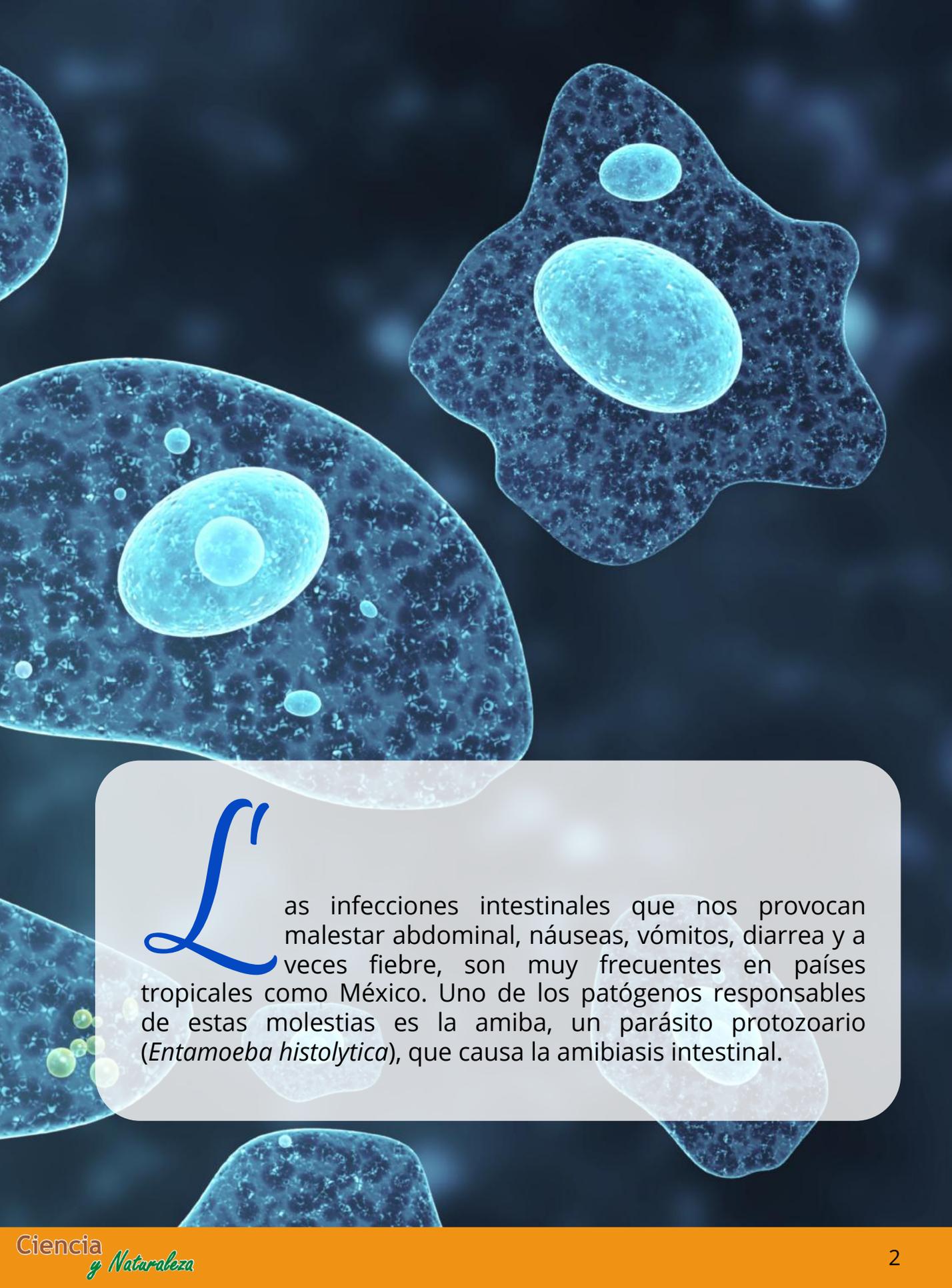
Artículo

Uso de la Proteómica para explicar la biología molecular de la amiba



Cómo citar este artículo: Cisneros-Sarabia A, Marchat LA. 2023. Uso de la Proteómica para explicar la biología molecular de la amiba. Revista Ciencia y Naturaleza 01 (1069).



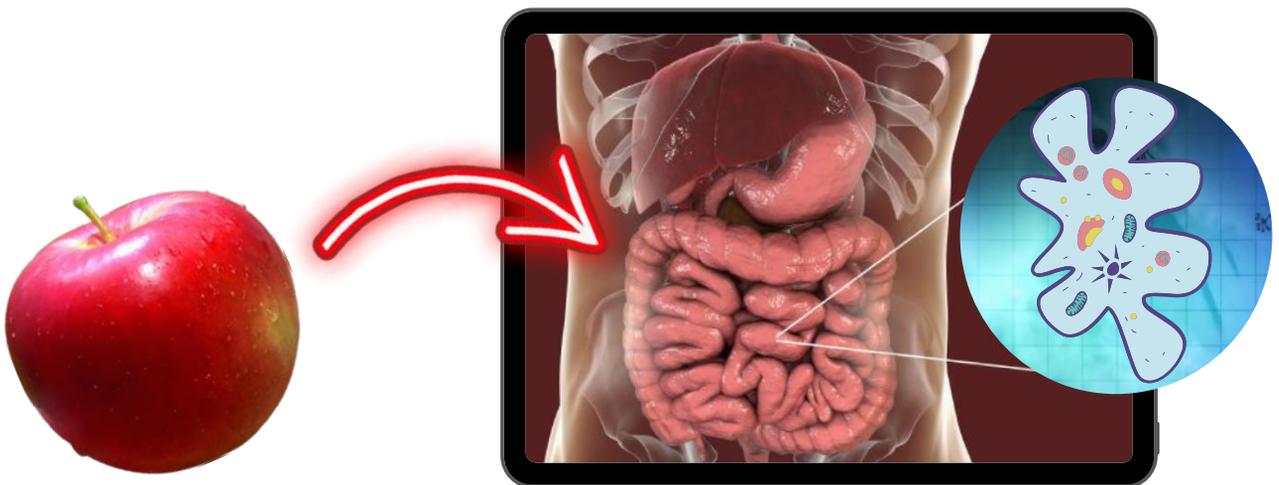


Las infecciones intestinales que nos provocan malestar abdominal, náuseas, vómitos, diarrea y a veces fiebre, son muy frecuentes en países tropicales como México. Uno de los patógenos responsables de estas molestias es la amiba, un parásito protozoario (*Entamoeba histolytica*), que causa la amibiasis intestinal.

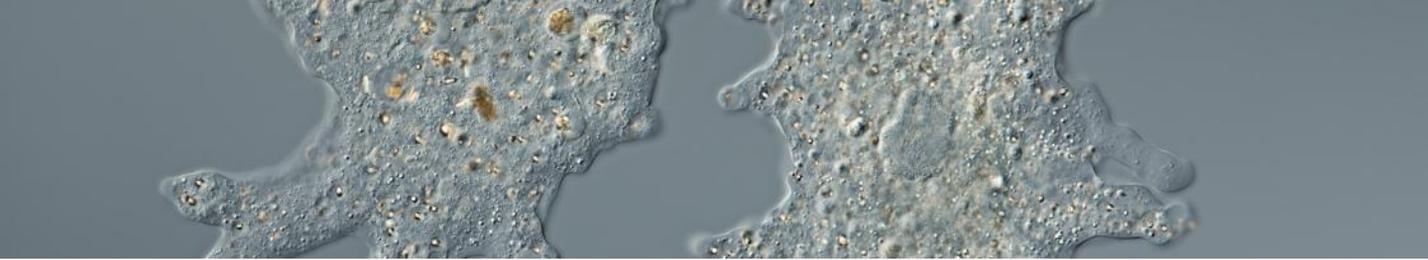


Conociendo a la Amiba

La amiba pasa una parte de su vida en el medio exterior, expuesta a diferentes condiciones de temperatura y humedad. Para protegerse frente a estas condiciones adversas, adquiere una forma de quiste, una estructura redonda (5 a 20 μm de diámetro) cubierta por una pared resistente formada por quitina en donde el patógeno se multiplica hasta formar cuatro parásitos. Cuando las condiciones sanitarias y de higiene son deficientes, los quistes de amiba suelen encontrarse en el agua, así como en las frutas y verduras. La pared de los quistes es muy resistente a las concentraciones de cloro en el agua potable, por lo que es difícil eliminarlos y prevenir la infección. Al alimentarnos con el agua y los vegetales contaminados con quistes, le damos al parásito la posibilidad de ingresar a nuestro cuerpo.



El quiste recorre nuestro sistema digestivo con el resto de los alimentos, pasando por el estómago y el duodeno hasta llegar al intestino delgado, donde finalmente se rompe para liberar los cuatro parásitos que rápidamente se dividen para generar ocho formas nuevas llamadas trofozoítos.



Cada trofozoíto de *E. histolytica* mide entre 20 y 50 μm de diámetro y presenta una forma redonda irregular con la presencia de extensiones móviles llamadas pseudópodos, que le permiten moverse y desplazarse sobre las células intestinales. La membrana del trofozoíto también forma invaginaciones para envolver a las bacterias, glóbulos rojos y fragmentos celulares cercanos, en un proceso que se conoce como fagocitosis. Los materiales son posteriormente digeridos adentro de vesículas especializadas para de esta manera producir los nutrientes y la energía que necesita el parásito para vivir. En el trofozoíto también está el núcleo (¡y a veces tiene varios!), una pequeña estructura que contiene el material genético del parásito, es decir un catálogo de más de 24 millones de letras que corresponden a la asociación ordenada de los nucleótidos A, T, C y G para formar alrededor de 9,938 genes; ahí está el principal centro de control que regula la vida del parásito.

La vida de un trofozoíto

Una vez que está acomodado dentro de nuestro cuerpo, considerado ahora como el huésped del parásito, se ofrecen varios destinos al trofozoíto para cumplir con su ciclo de vida (**Figura 1**).

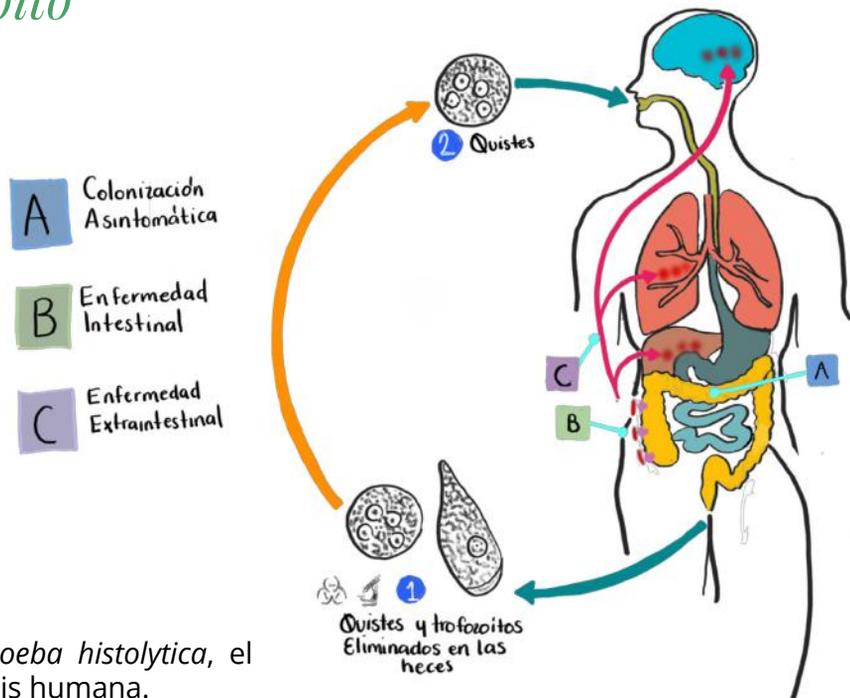


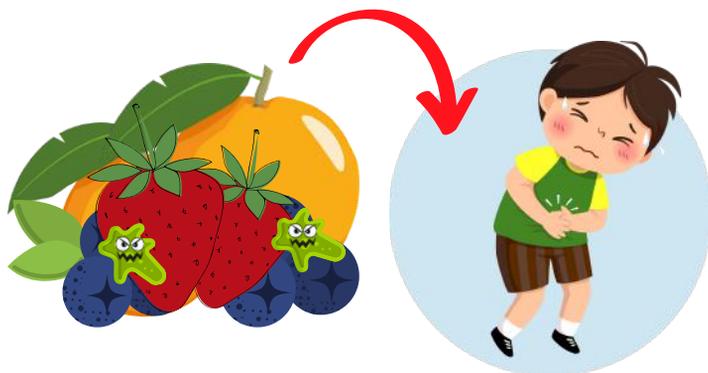
Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*, el parásito responsable de la amibiasis humana.



En la mayoría de los casos, los trofozoítos viven y se reproducen en nuestro intestino, sin causarnos mayores molestias, por lo que ni sabemos que están ahí (colonización asintomática). Esta condición se llama “portador asintomático”; aún sin estar enfermo, el huésped alberga el parásito y permite su multiplicación.

Bajo ciertas condiciones, los trofozoítos pueden volver a formar quistes que son eliminados con las heces, contribuyendo de esta manera a su diseminación en la población si la persona infectada no dispone de condiciones sanitarias adecuadas. Los quistes pueden volver al medio ambiente, donde están al alcance de cualquier persona que entre en contacto con ellos a través de agua o vegetales contaminados, completando así el llamado ciclo de vida de la amiba. Asimismo, si la persona no se lava las manos después de ir al baño, puede transmitir quistes a las personas que viven en su entorno.

En ciertos casos, los trofozoítos causan la destrucción de la pared intestinal, alterando su función y causando las molestias típicas de una enfermedad intestinal, es decir malestar abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, y fiebre (enfermedad intestinal).



La colitis amebiana es una de las principales causas de diarrea en el mundo; particularmente está entre las primeras 15 causas de diarrea en los niños pequeños (menos de dos años). Sin un tratamiento adecuado, los síntomas pueden incrementar y causar complicaciones intestinales severas acompañadas de la presencia de bacterias que pueden conducir a la muerte del paciente.



A veces, debido a condiciones que dependen del parásito (por ejemplo, su grado de virulencia) y del paciente (su estado inmunológico), los trofozoítos logran destruir las células del epitelio intestinal y atraviesan los tejidos hasta alcanzar los vasos sanguíneos que utilizan como carreteras para viajar a diferentes partes de nuestro cuerpo. Así podemos encontrar trofozoítos de *E. histolytica* a nivel de los pulmones y del cerebro, pero es en el hígado donde terminan más frecuentemente su viaje (enfermedad extraintestinal). Ahí, los parásitos quedan atrapados por los componentes del sistema inmune y se forma el llamado absceso hepático amebiano, la complicación más importante de la amibiasis ya que puede llevar a la muerte del paciente.

Realmente ¿podemos controlar a la amibiasis?



Por su facilidad de diseminación y contagio, y la gravedad de las enfermedades que puede causar, *E. histolytica* es considerada como un patógeno prioritario en salud pública y en el desarrollo de biodefensa. Afortunadamente, existen medicamentos para tratar la amibiasis; el más frecuentemente utilizado es el metronidazol, que es muy efectivo para eliminar los trofozoítos, pero no tiene ningún efecto contra los quistes. Sin embargo, fue descubierto en los años sesenta y su uso continuo y a veces inadecuado durante más de seis décadas, puede ocasionar que los parásitos se acostumbren a él y evolucionen para adaptarse a su presencia en el paciente, promoviendo de esta manera la aparición de parásitos resistentes al metronidazol. Por otro lado, el metronidazol produce algunos efectos secundarios en el paciente que pueden limitar su uso, como son náuseas, taquicardia, vómito, o diarrea; por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha impulsado la búsqueda de nuevos tratamientos contra la amibiasis.

La proteómica para entender y vencer a la amiba

Es bien sabido que conocer al enemigo es de suma importancia para poder dominarlo. Esta idea se aplica perfectamente al caso de la amibiasis humana y su control. En ese sentido, las técnicas “ómicas” que permiten estudiar diferentes moléculas biológicas a gran escala representan herramientas poderosas para la generación de nuevos conocimientos acerca de la amiba. Particularmente, la proteómica basada en la identificación masiva y global de las proteínas de *E. histolytica* ha sido muy útil para entender como el trofozoíto modula la expresión de sus genes para producir las proteínas que necesita en condiciones específicas.

Para identificar el conjunto de proteínas presentes en el trofozoíto, es decir el proteoma, o bien el grupo de proteínas de *E. histolytica* asociadas a un evento particular, por ejemplo las proteínas que interactúan con una proteína de interés (en este caso, se habla del interactoma), se requiere generalmente cinco etapas experimentales (**Figura 2**).

- 1) Extraer las proteínas del trofozoíto.
- 2) Separar las diferentes proteínas de la muestra, por su masa y carga eléctrica (electroforesis en dos dimensiones) o con base en sus características de solubilidad, polaridad, carga, etc. (métodos cromatográficos).



3) Cortar cada proteína en fragmentos más pequeños llamados péptidos usando como tijeras una proteína conocida como tripsina.

4) Determinar la masa de los fragmentos peptídicos por espectrometría de masas para conocer la secuencia de aminoácidos que corresponde a cada uno.

5) Mediante métodos computacionales, buscar en bancos de datos la proteína que contiene estos péptidos, para de esta manera dar un nombre y una función a la proteína analizada. Cabe mencionar que también es posible trabajar con una muestra compleja de proteínas; se omite la etapa 2 para analizar las proteínas sin tenerlas de manera individual, en este caso, se habla de un análisis proteómico global o total.

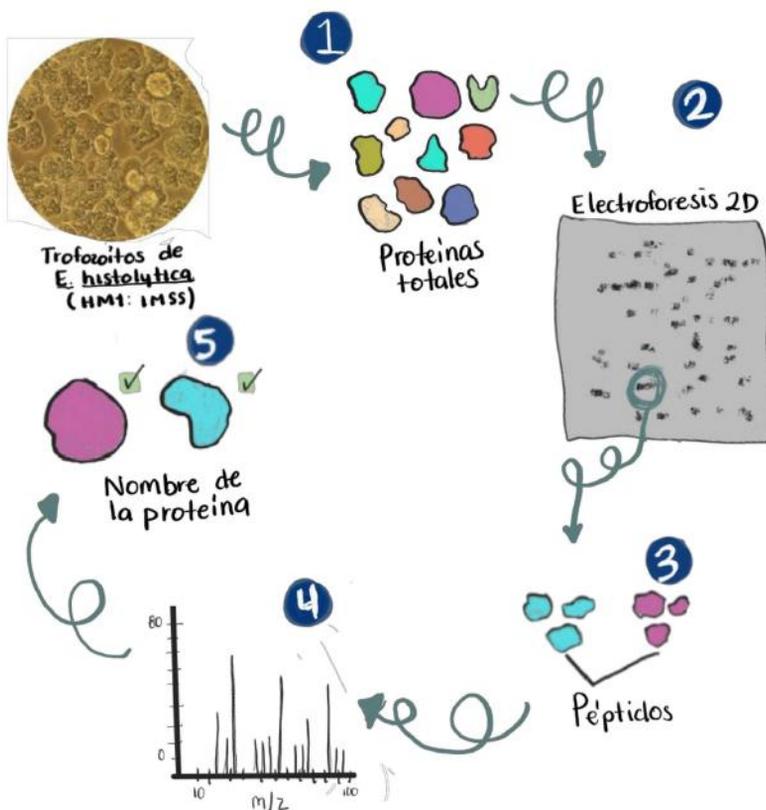


Figura 2. Principales etapas de la proteómica. 1) Extraer las proteínas del trofozoito; 2) Separar las diferentes proteínas de la muestra; 3) Cortar cada proteína en fragmentos más pequeños llamados péptidos; 4) Determinar la masa de los fragmentos peptídicos; 5) Identificar cada proteína.



La proteómica ha sido utilizada para estudiar diferentes aspectos de la vida de *E. histolytica*. Por ejemplo, identificar proteínas asociadas a la virulencia, la interacción con el huésped, o la fagocitosis, entre otros.

Particularmente, algunos grupos de investigación utilizaron esta estrategia para estudiar la regulación de la expresión génica, enfocándose en las proteínas que participan en la maduración y degradación del ARN mensajero (ARNm), la molécula que permite llevar el mensaje genético del núcleo al citoplasma donde sirve de molde para producir las proteínas correspondientes.

Después de su síntesis en el núcleo, el ARN sufre tres principales modificaciones que incluyen la protección de los extremos 5' y 3' de la molécula con estructuras conocidas como capuchón (CAP en inglés) y cola de poliadeninas (poliA), respectivamente, así como la eliminación de secuencias no codificantes llamadas intrones por el proceso de corte/empalme (*splicing* en inglés).

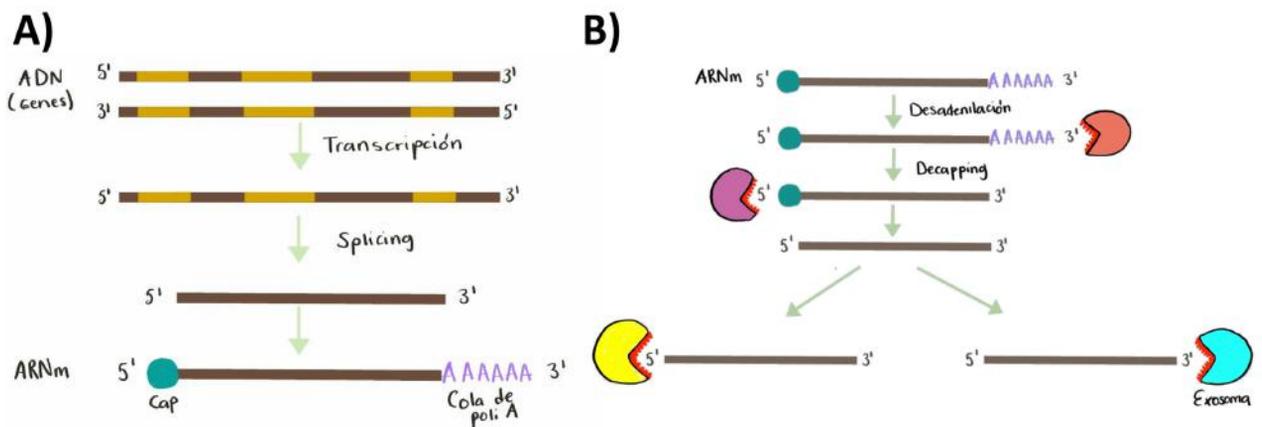


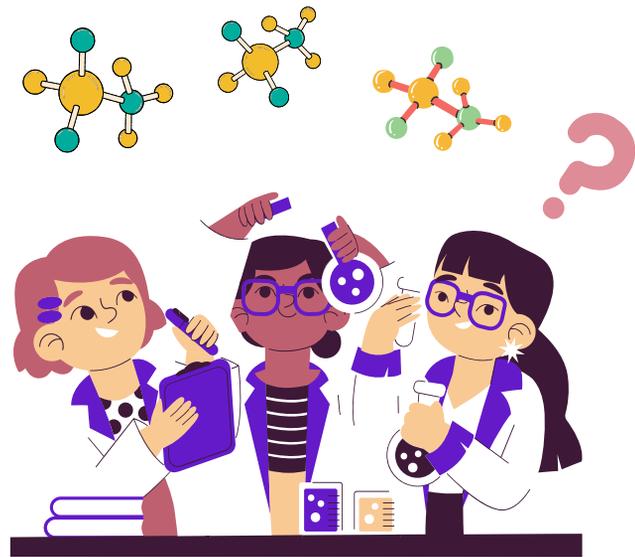
Figura 3. Metabolismo del ARNm. A) Síntesis y modificación del ARNm en el núcleo. B) Degradación del ARNm en el citoplasma.



El ARNm maduro es después translocado al citoplasma donde interactúa con ribosomas para formar las proteínas en la reacción de traducción. Finalmente, la degradación del ARNm en el citoplasma inicia por la eliminación de la cola de poliA en el extremo 3', seguido por la eliminación del CAP en el extremo 5', y finalmente la digestión del cuerpo de la molécula a partir de un extremo o el otro (**Figura 3**). Todos estos eventos son altamente regulados, implican la participación de varios complejos de proteínas que pueden ser caracterizados gracias a la proteómica.

Investigaciones actuales

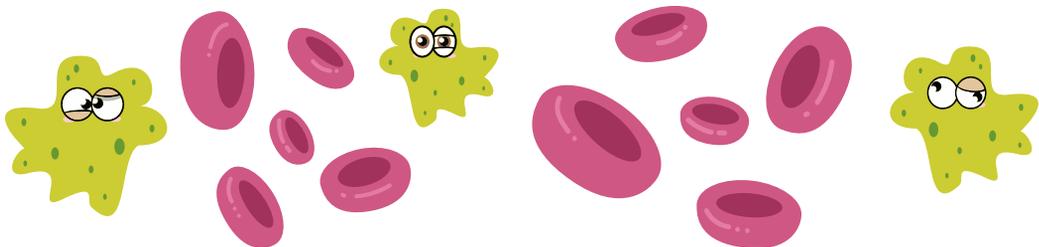
El grupo del Dr. Jesús Valdés, investigador del CINVESTAV en la Ciudad de México, quiso conocer la identidad de las proteínas que interactúan con la proteína U1-A snRNP que participa en la reacción de corte/empalme en *E. histolytica*.



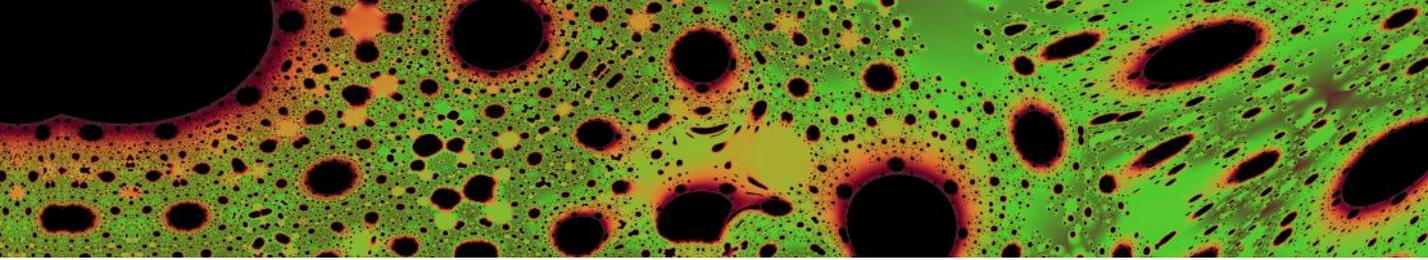
Se realizó la captura de dichas proteínas en los trofozoítos y su identificación mediante un análisis proteómico global. Los resultados mostraron que la proteína U1-A snRNP interactúa con otros 32 factores de *splicing*, y 24 helicasas de ARN que permiten desenrollar las estructuras tridimensionales formadas por la molécula de ARNm durante las distintas etapas de la reacción de corte/empalme. Además, el interactoma de la proteína U1-A snRNP contiene proteínas relacionadas con la síntesis del ARNm, la producción y modificación de proteínas, y el transporte de moléculas a través de vesículas en la célula, lo que dejó también claro la gran complejidad de la maquinaria de corte/empalme en *E. histolytica*.



En nuestro grupo de investigación, estamos estudiando la formación de la cola de PoliA del extremo 3' del ARNm también conocida como reacción de poliadenilación. Demostramos que la ausencia de la proteína EhCFlm25, uno de los factores que participan en la poliadenilación del ARNm, disminuye la virulencia del parásito y provoca su muerte. Para entender mejor la relevancia de esta proteína, la proteína EhCFlm25 en estos eventos, realizamos un análisis proteómico global en trofozoítos que no producen EhCFlm25. Los resultados evidenciaron cambios en la abundancia de 75 proteínas en ausencia de EhCFlm25. De manera interesante, estas proteínas están relacionadas con el metabolismo energético, particularmente la glicolisis que permite la producción de las moléculas de ATP esenciales para la realización de todos los procesos bioquímicos y celulares del parásito.

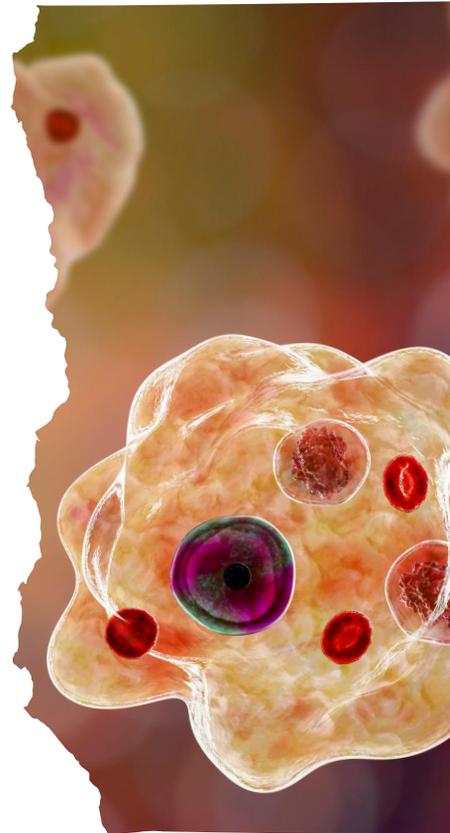


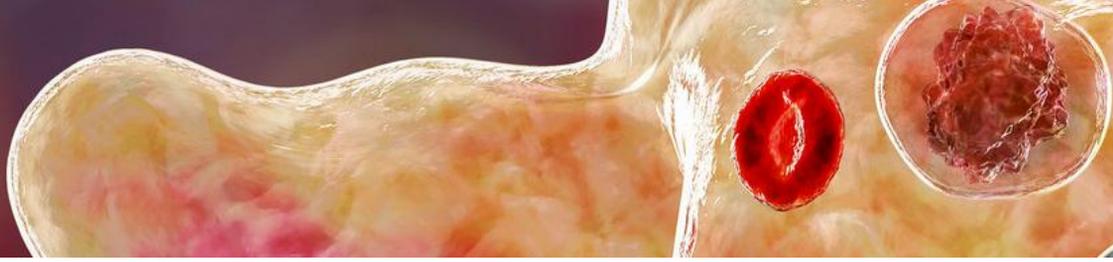
Así, la reducción de ciertas proteínas y el aumento de otras sugieren que la ameba reorienta las últimas reacciones de la glicolisis para garantizar la producción de una molécula energética de ATP, con la finalidad de restaurar parcialmente la pérdida de energía causada por la reducción en la abundancia de las demás proteínas. También se observaron cambios en la abundancia de proteínas relacionadas con la dinámica del citoesqueleto, un arreglo proteico de soporte interno que le permite al trofozoíto ingerir bacterias y células, moverse sobre las células intestinales e invadirlas. Los datos obtenidos de la proteómica permitieron entender como la ausencia de EhCFlm25 causa la muerte del parásito por falta de energía y disminuye su virulencia por una disfunción del citoesqueleto.



Por otro lado, reportamos las proteínas que participan en la degradación del ARNm en el citoplasma, incluyendo las enzimas responsables de la eliminación de los elementos protectores que se ubican en los dos extremos de la molécula, el CAP y la cola de poliA. La proteína EhCAF1 es responsable de la eliminación de la cola de poliA, pero necesita de otros factores para llevar a cabo su función. Sorprendentemente, los resultados del análisis proteómico global mostraron que EhCAF1 interactúa con proteínas del metabolismo energético y del citoesqueleto. También interactúa con la proteína EhL-PSP que degrada el cuerpo de la molécula de ARN y la proteína EhRRP41 que participa en la degradación del ARN a partir del extremo 3' después de la eliminación de la cola de poliA por EhCAF1. En conjunto, estos resultados indican que la proteína EhCAF1 es relevante en los eventos tempranos y tardíos de la degradación del extremo 3' del ARNm.

Estos estudios evidencian de manera muy clara el impacto de las "ómicas", en este caso de la proteómica, en el conocimiento de un patógeno como *Entamoeba histolytica*. La proteómica permitió demostrar la relevancia funcional de las proteínas de estudio (U1-A snRNP, EhCFIm25, y EhCAF1), contribuyendo a la identificación de nuevos blancos moleculares que pueden ser útiles para el control de la amibiasis. Estos hallazgos nos permitieron diseñar moléculas llamadas aptámeros que reconocen con gran afinidad y especificidad a la proteína EhCFIm25 para bloquear su función, así como la de las proteínas que interactúan con ella, para producir la muerte rápida de los trofozoítos. Estos resultados representan la primera etapa en el largo camino que podría llevar a la utilización de los aptámeros para tratar los pacientes con amibiasis.





Por otro lado, la proteómica reveló la existencia de interacciones entre eventos de la regulación de la expresión génica y procesos biológicos que parecen muy alejados, lo que agrega aún más complejidad a la biología molecular de este parásito. 🍀

Agradecimientos

Al CONAHCyT (proyecto 285467, becas 19577 y 1007635) y al Instituto Politécnico Nacional (COFAA, EDI, BEFI) por el apoyo a la realización de este trabajo.

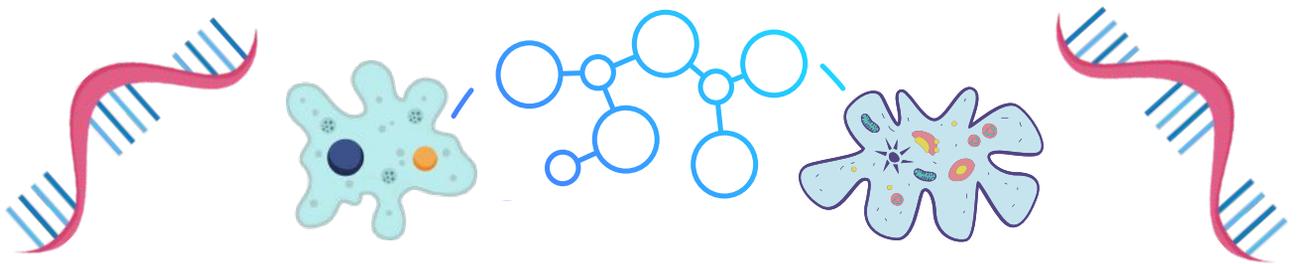
Para Consulta

-  López-Rosas I, Orozco E, Marchat LA, *et al.* 2012. mRNA decay proteins are targeted to poly(A)⁺ RNA and dsRNA-containing cytoplasmic foci that resemble P-bodies in *Entamoeba histolytica*. PloS one 7(9): e45966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045966>
-  López-Rosas I, Marchat LA, Olvera BG, *et al.* 2014. Proteomic analysis identifies endoribonuclease EhL-PSP and EhRRP41 exosome protein as novel interactors of EhCAF1 deadenylase. Journal of proteomics 111: 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.019>
-  Salgado-Martínez AI, Avila-Bonilla RG, Ramírez-Moreno E, *et al.* 2021. Unraveling the relevance of the polyadenylation factor EhCFIm25 in *Entamoeba histolytica* through proteomic analysis. FEBS open bio 11(10): 2819–2835. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13287>
-  Valdés J, Nozaki T, Sato E, *et al.* 2014. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica* in vivo assembled pre-mRNA splicing complexes. Journal of proteomics 111: 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.027>



Crédito de imágenes en orden de aparición: Geralt (pixabay), creativehavenbydine (DGRanPX), frentusha (Getty Images, GI), eommina (pixabay), R, Science Photo Library, PublicDomainPictures, micro_photo (GI), Troyan Alexandra, Narathip, Vector Tradition, iconsy, Nanotrillion, KanHem, HeungSoon (pixabay), Clker-Free-Vector-Images, Macrovector, MRPOR, Olhar de Alice, Rafael Classen (Pexels), Veii Rehanne Martinez, Good mood illustration, molekuul.be, Chokniti Khongchum (Pexels), Kateryna Kon/Science Photo Library, Twemoji, Sketchify, Natali Barbani, Tarupala Studio, taras95, Jenzon Lopez, Whiteway (GI Signature), Science Photo Library, Thinking How, bsd studio. Figuras proporcionadas por los autores.

Diseño de publicación: David Paz y DH Alice



Alondra Cisneros Sarabia

Maestra en Ciencias en Biomedicina Molecular, estudiante de Doctorado en Ciencias en Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Sus áreas de interés incluyen la biología molecular de parásitos, y el diseño y caracterización computacional de proteínas. Su tema de tesis está enfocado al diseño de aptámeros capaces de reconocer a *Entamoeba histolytica*, el parásito responsable de la amibiasis humana.

contacto: acisneross1903@alumno.ipn.mx



Laurence A. Marchat

Investigadora Titular en el Instituto Politécnico Nacional, adscrita a los programas de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular y Doctorado en Ciencias en Biotecnología. Estudia la biología molecular de *Entamoeba histolytica* desde hace más de 20 años. También se dedica a la búsqueda de nuevos métodos de control de la obesidad, y en colaboración con otros investigadores, al estudio de aspectos moleculares del cáncer.

contacto: lmarchat@ipn.mx