

Caracterización de la internalización de ferritina y el efecto amebicida de apo-lactoferrina en *Entamoeba histolytica*

F. López-Soto^a, A. González-Robles^b, N. León-Sicairos^c, M. Shibayama^b, M. de la Garza^{a*}

^a Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México.

^b Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN, México.

^c Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

*Dra. Mireya de la Garza. Av. IPN No. 2508 Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F. 07360, México.
Tel. 5747-3800 ext. 3987. mireya@cell.cinvestav.mx

INTRODUCCIÓN:

La amibiasis es una infección cosmopolita en la que el ser humano es el único huésped. Esta enfermedad es originada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* [1]. Todos los organismos, inclusive *E. histolytica*, necesitan de hierro (Fe) para realizar sus funciones metabólicas esenciales, es por esta razón que la amiba ha desarrollado varias estrategias para captar Fe de distintas proteínas con Fe: Hemoglobina [2], Transferrina [3] y Lactoferrina [4]. En un reporte previo se describió que la amiba puede usar Ferritina [5] como fuente de Fe en cultivos in vitro, pero a la fecha no se ha descrito la vía de internalización de ferritina en la amiba. La amibiasis causa, a nivel mundial, 100,000 muertes por año, siendo este padecimiento la tercera causa de muerte por parásitos en todo el mundo y el absceso hepático una de las complicaciones más severas. El metronidazol es el fármaco más utilizado para combatir la amibiasis hepática, por desgracia esta droga es muy agresiva ya que es tóxica y puede ser mutagénica. Recientemente se ha descrito la presencia de amibas resistentes al metronidazol [6]. Debido a estos problemas se necesitan nuevas estrategias para combatir la amibiasis, y apo-lactoferrina puede ser un buen candidato para este fin ya que recientemente se ha reportado que esta proteína tiene efecto microbicida [7, 8, 9]. Nuestras líneas de investigación son la evaluación de otras fuentes de Fe para la amiba, tales como ferritina, proteína abundante en hígado, su internalización por el parásito así como el efecto amebicida que presenta apo-lactoferrina sobre este parásito.

OBJETIVO:

Evaluar, mediante microscopías electrónica y confocal, la internalización de ferritina en *E. histolytica* y el efecto amebicida de apo-lactoferrina.

METODOLOGÍA:

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS se crecieron a 37 °C por 48 hrs. en medio de cultivo BI-S-33 [10], el cual está suplementado con 16% de suero bovino descomplementado y vitaminas. Las amibas se separaron del tubo y se cosecharon por centrifugación a 500g por 5 min, lavando con PBS. La fuente de Fe de este medio es el citrato férrico amónico (CFA). El medio sin fierro no contiene CFA, además de ser tratado con la resina Chelex-100 (BioRad), con la finalidad de eliminar las trazas de Fe de los reactivos.

Para evaluar si *E. histolytica* puede internalizar ferritina se planteó la siguiente estrategia: Amibas crecidas en BI-S-33 se colocaron en un medio sin Fe por espacio de 4 h. y posteriormente se cosecharon. Después se

incubaron con ferritina-FITC a diferentes tiempos, se lavaron, se fijaron con paraformaldehído y se bloquearon los sitios inespecíficos con glicina. Posteriormente las amibas se lavaron con PBS y se procesaron para evaluar su fluorescencia en un microscopio confocal Leica TCS-SP2. Otra estrategia fue la siguiente: Los parásitos crecidos en BI-S-33 se colocaron en un medio sin Fe por espacio de 4 hrs. y fueron cosechados. Después se incubaron con ferritina catiónica a diferentes tiempos, se lavaron con cacodilato de sodio, se fijaron con glutaraldehído y se bloquearon con NH_4Cl . Posteriormente las amibas fueron post-fijadas con tetraóxido de osmio, se deshidrataron con etanol y se embebieron en resina epoxi. Los trofozoítos fueron evaluados por microscopía electrónica de transmisión en un microscopio Zeiss 910.

Para determinar la participación de clatrina en la internalización de ferritina por la amiba se utilizó la siguiente estrategia: Las amibas ayunadas de Fe fueron incubadas con Ferritina-FITC por varios minutos, después fueron lavadas y fijadas, se permeabilizaron con triton X-100 y se incubaron con anticuerpos contra clatrina. Este anticuerpo fue visualizado con un anticuerpo secundario acoplado a TRITC. Las muestras se observaron por microscopía confocal. Para confirmar la participación de clatrina en la endocitosis de ferritina por la amiba, los trofozoítos ayunados de Fe se incubaron con ferritina catiónica por varios minutos. Inmediatamente los parásitos se fijaron con paraformaldehído –glutaraldehído, después, se deshidrataron con etanol concentrado y fueron embebidos en una resina de epóxido. A continuación fueron bloqueados los sitios inespecíficos con NH_4Cl . Las muestras se incubaron con un anticuerpo contra clatrina y posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal. Los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo y después con citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico de transmisión.

Para estudiar si la apo-lactoferrina tiene efecto microbicida sobre la amiba se planteó la siguiente estrategia: Los trofozoítos crecidos en BI-S-33 fueron cosechados e incubados con diferentes concentraciones de apo-lactoferrina por 1 h. a 37 °C en medio sin Fe. Transcurrido cada tiempo las amibas fueron incubadas con Ioduro de propidio y las muestras fueron procesadas para microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión.

RESULTADOS:

***E. histolytica* internaliza ferritina**

Trofozoítos de *E. histolytica* rápidamente unen ferritina-FITC a la superficie amibiana antes del primer minuto de incubación con la proteína marcada. A tiempos posteriores, ferritina-FITC se localizó en vesículas bien definidas desde los 5 minutos. Este mismo resultado se confirmó mediante microscopía electrónica. Las amibas se incubaron con ferritina catiónica y a los 5 minutos de incubación, ferritina catiónica se encontró en vesículas en el citosol de *E. histolytica*.

***E. histolytica* endocita ferritina mediante vesículas cubiertas con clatrina.**

Una vez confirmado que la amiba internaliza ferritina, se procedió a investigar la participación de proteínas vesiculares (como clatrina y caveolina) en la internalización de ferritina. En este parásito se encontraron co-localizando, a los 2 minutos de incubación, ferritina-FITC junto con clatrina mediante microscopía confocal. Este

mismo resultado se comprobó mediante microscopía electrónica. A los 2 minutos de incubación, se encontró co-localizando a ferritina catiónica con clatrina.

Apo-lactoferrina presenta un efecto amebicida sobre *E. histolytica*.

Apo-lactoferrina (a 31.25 μ M de concentración) provoca un 60% de mortalidad sobre *Entamoeba histolytica* en la primeras 3 horas de incubación. Además, mediante microscopía electrónica se observan los poros formados por apo-lactoferrina en la superficie amibiana, lo cual ocasiona la lisis de los trofozoítos de *E. histolytica*.

CONCLUSIONES:

Entamoeba histolytica internaliza ferritina mediante un proceso de endocitosis mediado por vesículas cubiertas con clatrina. Este proceso de endocitosis comienza con la unión de ferritina a la superficie amibiana y posteriormente internalizándose en vesículas en el interior de la amiba.

Apo-lactoferrina presenta un efecto amebicida sobre *E. histolytica* y dicho efecto es dependiente de la concentración de apo-lactoferrina.

BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Espinosa-Cantellano M., Martinez-Palomo A., Clinical Microbiology Reviews, 13 (2000) 318-331.
- [2] Serrano-Luna J, Negrete E., Reyes M., de la Garza M., Experimental Parasitology, 89 (1998) 71-77.
- [3] Reyes-López M., [Serrano J.](#), [Negrete E.](#), [León N.](#), [Guerrero A.](#), [de la Garza M.](#), Experimental Parasitology 99 (2001) 3:132-40.
- [4] León-Sicairos N., Reyes M., Canizales A., Bermúdez R., Serrano J., Arroyo R., and de la Garza M., Microbiology 151 (2005) 3859-3871.
- [5] López-Soto F. Tesis de maestría (2005) Cinvestav-IPN
- [6] Wassmann C., Hellberg A., Tannich A., and Bruchhaus I., Journal of Biological Chemistry, 274 (1999) 26051–26056.
- [7] Shi Y., Kong W., Nakayama K., Journal of Biological Chemistry, 275 (2000) 30002-30008.
- [8] Farnaud S., Evans R. W., Molecular immunology, 40 (2003) 395-405
- [9] Viejo-Diaz M., Andres M. T., Fierro J. F., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48 (2004) 1242-1248.
- [10] Diamond L. S., Harlow D. R., Cunnick C. C., [Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene](#), 72 (1978) 431-432.