

Aspectos novedosos sobre la biología de la *Entamoeba histolytica*

HECTOR MARQUEZ-MONTER*

Para obtener información sobre el mecanismo de la mitosis de Entamoeba histolytica se llevó a cabo un estudio del protozoario en cultivos axénicos en vasos de Coplin y portaobjetos, lo que permitió su fijación y tinción in situ con colorante de Giemsa y anticuerpos fluorescentes para actina, miosina y tubulina. Se emplearon también para estudios de ultraestructura previa fijación en glutaraldehído e inclusión en eponaraldita, con microscopios electrónicos Philips y Zeiss. Los extendidos amibianos teñidos por Giemsa mostraron formas de duplicación por gemación y también por fisión, con producción de amibas multinucleadas, así como amibas con macronúcleos probablemente poliploides y micronúcleos, con reducción de ADN. Se interpretan estos estudios como prueba de reducción cromosómica por meiosis directa y recombinación genética, lo que puede explicar las formas de comensalismo en portadores y parasitismo en la amibiasis invasora.

CLAVES:

SUMMARY

To determine the mechanism of mitosis in E. histolytica, a study was carried out with axenic cultures of trophozoites in Coplin jars with glass slides to stain them in situ with Giemsa and fluorescent antibodies for actin, tubulin and myosin. Sedimented amoeba of cultures were used also for ultrastructural studies after glutaraldehyde fixation, and inclusion in spon-araldite. Giemsa stained trophozoites showed duplication by budding or fission with production of polycaryons, mononuclei, micronuclei and aparent polyploidy and DNA reduction. Tubuline was present in nuclei and cytoplasm, actin and myosin had a peripheral distribution with low contents of the latter in large amoeba, resulting in polynucleated cells. The findings are suggestive of endomeiosis with chromosomal recombination which would render virulent and non virulent strains producing either invasive or asymptomatic amoebiasis.

KEY WORDS:

Desde el descubrimiento inicial por Loesch en 1875¹ de la amibiasis invasora en el hombre, se han efectuado numerosos estudios de trofozoitos y quistes de *Entamoeba histolytica* utilizando material fecal fresco, cortes de tejidos humanos, o de otros animales, principal-

mente primates, o lesiones en animales experimentales, así como cultivos monoxénicos, axénicos y axénicos sincronizados, con microscopios de luz y electrónico. Sin embargo, poco se sabe con exactitud sobre el mecanismo de reproducción de este parásito.²⁻¹⁴

La mitosis en protozoarios presenta un patrón diferente a la de eucariotes superiores: ocurre por endomitosis, fisión nuclear o gemación, sin participación importante de microtúbulos y de cinetocoros, ausencia de

Trabajo presentado en sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, el 8 de agosto de 1990.

* Académico titular. Investigador titular. Instituto Mexicano del Seguro Social.

centriolos y persistencia de la membrana nuclear.^{15,16} Durante la segregación del material cromosómico se observa en algunos protozoarios su orientación mediada por el centro organizador de microtúbulos, (también llamado centro organizador del huso acromático), dentro o fuera de la membrana nuclear.^{15,16} La *Entamoeba histolytica* es un protozoario primitivo en la evolución, pues carece de mitocondrias, cloroplastos, centriolo, aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso⁹ lo que le confiere una ubicación primitiva en la frontera entre procariotes y eucariotes y hace difícil el estudio de su mitosis. Algunos autores llaman a los protozoarios mesocariotes.¹⁵

En esta comunicación se presentan los resultados de un estudio multidisciplinario para obtener información sobre el mecanismo de la mitosis de la *E. histolytica* en cultivos con medio axénico.

Material y métodos

Se utilizaron 32 cultivos axénicos de la cepa IMSS-1 México en medio de Diamond.¹⁷ Se emplearon vasos de Coplin estériles con tapón de rosca con portaobjetos insertados en sus ranuras según método descrito previamente.¹⁸

Los portaobjetos con amibas adheridas se cosecharon a las 72 h, cuando ocurren los niveles más altos de duplicación¹⁹ se fijaron *in situ* con alcohol metílico al 30 por ciento y se tiñeron con Giemsa y el fluorocromo de anaranjado de acridina a un pH de 7. Algunos de los portaobjetos con amibas fueron tratados por aplastamiento con cubreobjetos para aplanar a los parásitos y hacer más visible su contenido nuclear.

Para determinar la participación del citoesqueleto en la mitosis ambiana se fijaron 12 portaobjetos con acetona fría y posteriormente se incubaron con un búfer de fosfato a pH7 con anticuerpos fluorescentes para actina, miosina y tubulina (Biosciences). Los vasos de Coplin con cultivos axénicos sin portaobjetos se refrigeraron a 4° durante una hora, para permitir que se desprendieran las amibas adheridas a su superficie interna, y el medio con amibas se centrifugó; el sedimento se fijó *in situ* con glutaraldehído para su inclusión en metacrilato y epon-araldita, para obtener cortes semifinos y finos en ultramicrotomo. Los cortes semifinos en metacrilato se tiñeron con acridina anaranjada debido a que este plástico permite la penetración del fluorocromo. Las secciones ultrafinas se tiñeron con tetróxido de osmio y acetato de uranio para su observación con microscopios electrónicos Philips 300 y Zeiss 9.

Se determinó la frecuencia de amibas multinucleadas contando mil trofozoitos con tres o más núcleos en 1000 amibas multinucleadas para determinar si su reproducción era por fisión binaria en el caso de obtener un número par.

Resultados

Observaciones con microscopio de luz. Se observaron amibas de diferentes tamaños y considerable variación en la forma de los núcleos: redondos, ovoides, fusiformes y frecuentemente con duplicación por gemación nuclear simple o doble. El tamaño nuclear varió de 3 a 12 μ . Se observaron amibas multinucleadas con dos, tres y hasta 36 núcleos en 5 por ciento de los trofozoitos, algunas con cuerpos cromatoides (figs. 1-4). La tabulación de amibas multinucleadas mostró frecuencias noes y pares (Cuadro 1).

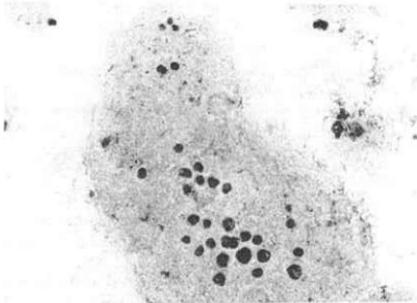


Figura 1. Policarión de *E. histolytica* en frotis de cultivo de trofozoitos en medio axénico. Los núcleos son de forma y tamaño irregular. Tinción de Giemsa x 400

Con frecuencia se observaron vesículas intranucleares pequeñas de 0,3 a 1,3 μ y en número de 3 a 34 las cuales mostraron una pared basófila y un espacio vacío central. Con la tinción de acridina anaranjada se observó color verde en la porción central correspondiente al cariosoma seguida de nucleoplasma anaranjado.

Citoesqueleto. Se identificó actina en la parte periférica del ectoplasma en forma de filamentos cortos. La miosina se observó como filamentos más largos, paralelos y dispuestos en forma perpendicular a la membrana nuclear y en ocasiones como puentes citoplásmicos en amibas grandes. La tubulina mostró distribución regularmente difusa en el citoplasma y núcleos de los trofozoitos (figs. 5-7).

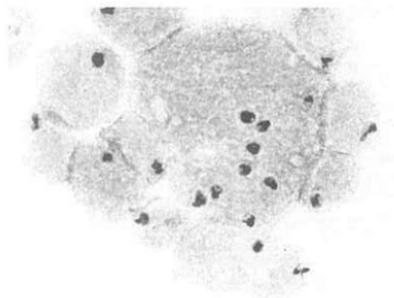


Figura 2. Trofozoitos de *E. histolytica* con núcleos que muestran duplicación por gemación. Giemsa x 400

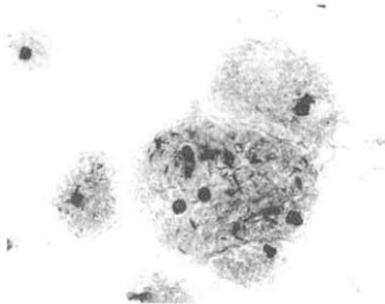


Figura 4. Trofozoitos de *E. histolytica* con gemación nuclear. Un trofozoito nuclear contiene cuerpos cromatóides. Giemsa x 400

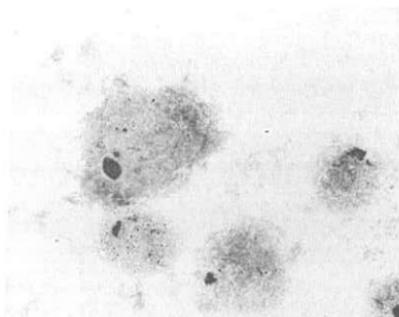


Figura 3. Trofozoitos con macro y micronúcleos, algunos con duplicación nuclear por gemación. Giemsa x 400

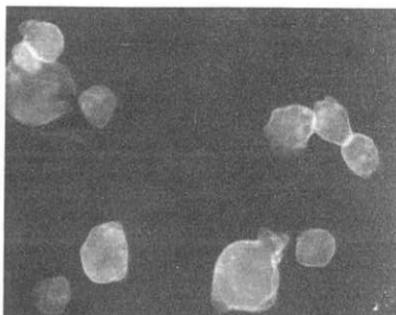


Figura 5. Trofozoitos teñidos con antitubulina, marcada por fluoresceína. La tubulina tiene una distribución homogénea en el citoplasma y el núcleo x 400

Cuadro 1. FRECUENCIA DE DOS O MÁS NÚCLEOS EN 1000 TROFOZOITOS DE *E. HISTOLYTICA* DE CULTIVOS AXÉNICOS TEÑIDOS *IN SITU* CON GIEMSA

| Números de núcleos | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--------------------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| Trofozoitos | 585 | 167 | 139 | 42 | 36 | 14 | 6 | 5 | 4 | 0 | 1 | 1 |
| Por ciento | 58.5 | 16.7 | 13.9 | 4.2 | 3.6 | 1.4 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0 | 0.1 | 0.1 |

Ultraestructura. El microscopio electrónico mostró membrana citoplásmica ondulante, seguida de amplio citoplasma con vacuolas de tamaño irregular, semejante a otras descripciones registradas en la literatura. La membrana nuclear tortuosa, formada por dos capas osmiofílicas dotadas de pequeños poros, seguida de

nucleoplasma con grumos irregulares de material osmiofílico adosado a la membrana interna y en la parte central se identifican estructuras de mayor densidad, algunas sugestivas de microtúbulos y otras con disposición semejante a cromosomas de eucariotes; ocasionalmente se observaron microtúbulos paralelos polariza-



Figura 6. Trofozoítos teñidos con suero antiactina por fluoresceína. Se identifican filamentos de actina en la periferia del citoplasma por 400

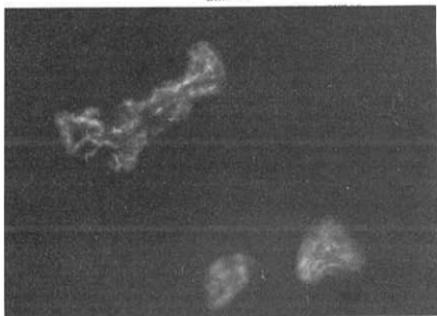


Figura 7. Filamentos de miosina, algunos en forma de puente en mitosis, teñidos por suero antimiosina marcado por fluoresceína por 400

dos hacia evaginaciones de la membrana nuclear. Se encontraron también pequeñas vesículas de pared osmófila con estructuras butiliformes de tamaño y número variable (figs. 8-9).

Los cortes de amibas multinucleadas presentaron membranas nucleares tortuosas, sin restos de membranas citoplásmicas sugestivas de fusión de los trofozoítos que explicara la formación de policariones (fig. 10).

Comentario

La dispersión, fijación y tinción *in situ* de los trofozoítos en los portaobjetos permitió su observación claramente con el microscopio de luz. Llamó la atención la presencia de amibas multinucleadas en aproximada-

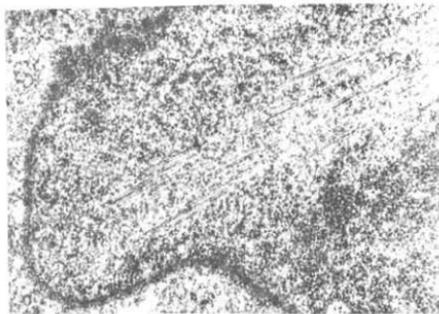


Figura 8. Microelectrografía que muestra microtúbulos paralelos en una evaginación nuclear x 16.000

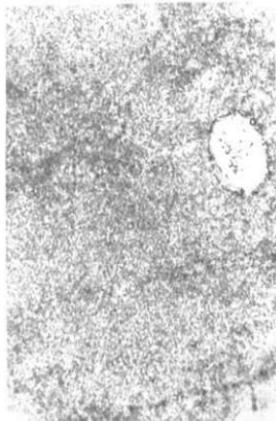


Figura 9. Microelectrografía con trofozoítos en cuyo núcleo se observa una vesícula con estructuras botuliformes electrodensas centrales, semejantes a cromosomas (c) x 16.000

mente cinco por ciento, con 2 y hasta 36 núcleos. Este hecho se ha interpretado como duplicación nuclear independiente de la citocinesis por insuficiente producción de miosina o su dilución citoplásmica en amibas grandes. Este fenómeno ha sido reproducido experimentalmente por Knoch y Loomis en el protozoario de vida libre *Dictiostelium discoideum* al utilizar mensajeros de ARN en contrasentido para bloquear la síntesis de la cadena B de miosina con la consiguiente forma-

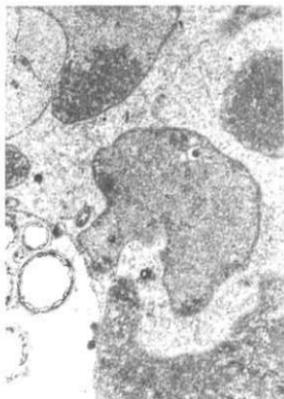


Figura 10. Trofozito con varios núcleos irregulares con membrana nuclear electrodensa y citoplasma granular x 6.000

ción de policariones.¹⁶ La frecuente gemación de las membranas nucleares se interpretó como forma de duplicación y ocasionalmente formas de fisión. La asincronía de la duplicación nuclear y la citocinesis podría explicar también la producción de policariones.

La actina y miosina dispuestas en el citoplasma amibiano se consideran como relacionadas a la motilidad amibiana así como a la citocinesis. La escasez de filamentos de miosina en amibas grandes se interpretó como a una menor síntesis o a su dilución citoplásmica, posiblemente relacionada a la formación de policariones. La identificación de tubulina en forma difusa en núcleos y citoplasma indica su presencia en forma despolimerizada, sin formación de microtúbulos, como se ha descrito por Gicquard en la endomitosis de la *E. histolytica* cepa Laredo y ocasionalmente en el presente estudio, con poca participación en la mitosis.¹⁰

La ultraestructura verificó la presencia de amibas multinucleadas, sin observarse restos de membrana nuclear en el citoplasma que indicara un mecanismo de fusión celular, para explicar su origen. La variación del tamaño nuclear puede explicarse por diferente contenido de ADN en trofozoítos señalado ya por López Revilla y Gómez.²⁰

Las vesículas intranucleares con cuerpos botuliformes descritas previamente por González Angulo y Treviño-García Manzo¹¹ con ADN y Zaman,¹² podrían corresponder a microcromosomas, aunque estos au-

tores no los consideran como tales. Los cuerpos botuliformes en el interior de las vesículas pueden ser representativas de estructuras de material cromosómico descritas recientemente por Hueber y col.²¹

La gemación nuclear y la formación de amibas multinucleadas como forma de duplicación, así como la presencia de macronúcleos y micronúcleos indican también una posible meiosis reductiva directa no descrita previamente en la *E. histolytica*. Este evento reductivo implica un potencial importante de recombinación genética de este protozoo, lo que explicaría ampliamente su segregación en amibas virulentas y avirulentas, así como su correlación con las formas clínicas de amibiasis en pacientes portadores de amibas avirulentas o comensales y pacientes con amibiasis invasora por amibas virulentas en su forma genuina de parásitos.¹⁹ La recombinación genética amibiana explicaría también los diferentes patrones de isoenzimas descritos por Sargeant en cepas de amibas obtenidas de varias regiones geográficas.²²

Agradecimientos

El autor agradece al doctor Ruy Pérez Tamayo las facilidades proporcionadas en su laboratorio para la realización de gran parte de este trabajo. Y a la señorita Pilar Arriaga Cruz por la transcripción del manuscrito.

Referencias

- Loesch AF. Massive development of amebas in the large intestine. Traducción del texto original en alemán: Arch. f. Path. u. Physiol. u. f. Klin. Med., von Rudolf Vichow. Vol. 65: 196, 1875, en: Am. J. Trop. Med. & Hyg., 1975, 24: 383.
- Dobell C y Jepps MW. A study of diverse races of *Entamoeba histolytica* distinguishable from one another by the dimensions of the cysts. Parasitol, 1918, 10: 320.
- Hakansson E. Observations on chromatoid bodies in the cysts of *Entamoeba histolytica*. Naval Med. Bull. 1936, 34: 1.
- Uribe C. Nuclear division in the trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Proc. Nat. Acad. Sci., 1926, 30: 12.
- Sapero JJ, Hakansson EG y Loutti CM. The occurrence of two significantly distinct races of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. 1942, 22: 191.
- Craig CF y Faust EC. Clinical parasitology. Lea & Febiger, 1937.
- Johnson CM. Observations on natural infections of *Entamoeba histolytica* in Ateles and Rhesus monkeys. Am. J. Trop. Med. 1941, 21: 49.
- Anaya Velázquez F y col. Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic cultures strains of *E. histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1985, 34: 723.
- Martínez Palomo A. Biología de la *Entamoeba histolytica*. En amibiasis, ed. Martínez Palomo, A, Editorial Médica Panamericana, México, 1989, p. 17.
- Gicquard CR. Etude d'ultrastructure du noyau et de la mitosis de *Entamoeba histolytica*. Biologie Cell. 1979; 35: 305.
- González-Angulo A, Ruiz de Chávez I, Treviño García-Manzo N.

- Estudio con el microscopio electrónico de los cuerpos redondos intranucleares de *E. histolytica* después del tratamiento con desoxirribonucleasa y ribonucleasa. Arch. Invest. Méd. (México) 1973, 4 (Supl. 1): 25.
12. Zaman V. The intranuclear bodies of *Entamoeba*. Int. J. Parasitol., 1973, 3: 251.
 13. Chevez A y col. Esférulas yuxtanelares en *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. 3 (Supl. 2): 257, 1972.
 14. Orozco E y col. *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. Exp. Parasitol. 1988, 67: 85.
 15. Kubai DF. The evolution of mitosis spindle. Int. Rev. Cytol., 1989, 43: 167, 285.
 16. Knochel DAY Loomis WF. Antisense RNA inactivation of myosin heavy B chain gene expression in *Dicostediscoideum*. Science, 1987, 236: 1081.
 17. Reikov I. The protozoa nucleus. Morphology and evolution. Translated from the Russian, Ed. Acad. Press. 1978.
 18. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 72, 431.
 19. Márquez-Monter H, Becker I y Carrillo-Farga J. A new monotorizator method. An axenic cultural of *Entamoeba histolytica*. Patología (En prensa).
 20. López-Revilla R, Gómez R. *E. histolytica*. *E. invadens*. *E. Moshkovskii*: Fluctuations of the DNA contents of axenic trophozoites. Exp. Parasitol., 1978, 44: 243.
 21. Huber M y col. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes carried on palindromic circular DNA molecules. Mol. and Biochem. Parasitol., 1989, 32: 285.
 22. Sargeant PC et al. A comparative study of «*E. histolytica-like*» and another identical amoebae using isoenzymes electrophoresis y Trans. Roc. Trop. Med. Hyg., 1980, 74: 469.

