

EVIDENCIA ULTRAESTRUCTURAL DEL NUCLÉOLO DE *Entamoeba histolytica*

Citlali Vázquez-Echeverría^a, Guadalupe Zavala^b, Bibiana Chávez^c,
Olga M. Echeverría-Martínez^a, Gerardo H. Vázquez-Nin^a, María
de Lourdes Segura-Valdez^a y Luis F. Jiménez-García^a.

^aDepto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. ^bDirección actual: Unidad de Microscopía, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Morelos. ^cDepto. de Patología Experimental, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, México D.F.
E-mail: lfjg@hp.fciencias.unam.mx.

RESUMEN

Aunque la estructura celular de *Entamoeba histolytica* se conoce con detalle, no se ha descrito la presencia de material nucleolar con el microscopio electrónico. En este trabajo utilizamos técnicas citoquímicas para microscopía de luz y electrónica para evidenciar la presencia del nucléolo en trofozoitos de esta amiba. Con la técnica de azul de toluidina para RNA y la técnica de impregnación argéntica para organizador nucleolar, se observa contraste de material intranuclear periférico. Con el microscopio electrónico, un material similar de naturaleza fibro-granular se contrasta también con las técnicas para ribonucleoproteínas y para organizador nucleolar. Una zona similar es negativa cuando se aplican técnicas para DNA. Estos resultados muestran evidencia ultraestructural de la presencia de un nucléolo periférico y anular en el núcleo de *E. histolytica*. Se sugiere que este organelo intranuclear es un carácter general de los eucariontes.

Palabras Clave: Amiba, *Entamoeba histolytica*, núcleo, nucléolo, protistas.

ABSTRACT

Although cell structure of *Entamoeba histolytica* is well known, the presence of nucleolar material has not been described with the electron microscope. Here we use light and electron microscopy cytochemical techniques to search for evidence¹ of nucleolar material in this amoeba trophozoite. Toluidine blue for RNA and silver staining for nucleolar organizer stain peripheral intranuclear material². With the electron microscope, a³ similar material is fibro-granular and is contrasted with techniques for ribonucleoproteins and nucleolar organizer, but it is negative for DNA. These results show ultrastructural evidence for the presence of a peripheral and ring-shaped nucleolus⁴ in the nucleus of *E. histolytica*. It is suggested that this intranuclear organelle is a general feature in eukaryotes.

Key words: Amoeba, *Entamoeba histolytica*, nucleus, nucleolus, protists.

INTRODUCCIÓN

E*ntamoeba histolytica* es un protista unicelular parásito que afecta al ser humano, lo que representa un problema de salud en varios países. Además, biológicamente reviste una importancia especial pues pertenece a un linaje ancestral entre los eucariontes. Por lo anterior, varios estudios se han dedicado al conocimiento de varios aspectos de

la biología celular de *E. histolytica*¹. Sin embargo, aunque se conoce con detalle la ultraestructura de la célula amibiana²⁻⁵, no se ha descrito la presencia de material nucleolar en *E. histolytica* con técnicas citoquímicas y microscopía electrónica.

El nucléolo es un dominio nuclear en donde ocurre la síntesis y maduración del pre-rRNA y del ensamblado de las subunidades del ribosoma⁶. Recientemente se han atribuido otras funciones a este organelo nuclear. El nucléolo contiene una gran cantidad

de proteínas, varios tipos de RNA (como el rRNA y los UsnoRNAs) y los genes ribosomales o rDNA. Estos componentes moleculares se organizan en dominios de tres elementos ultraestructurales conocidos como centros fibrilares, el componente fibrilar denso y el componente granular. Por ejemplo, los genes ribosomales se presentan en el componente fibroso⁷, de manera similar a como se presentan algunas proteínas como la fibrilarina.

En este trabajo, mostramos evidencia ultraestructural de la presencia de material intranucleolar periférico, fibro-granular y denso a los electrones, que se contrasta con técnicas para ribonucleoproteínas y organizador nucleolar, lo que corresponde a la presencia de nucléolo en el trofozoito de esta amiba.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos de *Entamoeba histolytica*. Los trofozoitos de la clona A de *Entamoeba histolytica*, que se deriva de la cepa HM1_IMSS, se cultivaron en medio de Diamond TYI-S-33 y se cosecharon durante la fase de crecimiento logarítmico.

Microscopía óptica. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina. Se llevaron a cabo cuatro técnicas: 1) el procedimiento con azul de toluidina ácido-alcohólico para RNA nucleolar⁸; 2) la tinción de plata para organizador nucleolar⁹⁻¹⁰; 3) la técnica de Feulgen para DNA y 4) la técnica de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), también para DNA. Las muestras se observaron con un microscopio de 1) campo claro equipado con un objetivo de 100X planapocromático con apertura numérica de 1.4 ó 2) epifluorescencia, equipado con filtro para DAPI (Eclipse E800, Nikon) y objetivo de 60X plan apocromático con apertura numérica de 1.3. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MT1) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3DFPG.

Microscopía electrónica de transmisión. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se incluyeron en resina hidrofílica (Lowicryl K4M). Se llevaron a cabo tres técnicas de contraste: 1) el procedimiento estándar a base de acetato de uranilo y citrato de plomo¹¹; 2) el procedimiento de contraste regresivo preferencial para ribonucleoproteína¹²; y 3) el procedimiento específico para impregnación argéntica para organizador nucleolar¹⁰. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1010, Jeol) operando a 80 kV. Las imágenes se registraron con una cámara digital (CCD-300-RC, MT 1) acoplada al microscopio con el programa Scion Image.

RESULTADOS

Microscopía óptica. La técnica de azul de toluidina preparado en condiciones ácidas para RNA reveló tinción

en una región intranuclear periférica, en forma de anillo (Figura 1a). Asimismo, la técnica de plata amoniacal específica para organizador nucleolar impregnó una región similar en el interior del núcleo (Figura 1b). Por el contrario, la técnica de Feulgen y DAPI para DNA muestra regiones periféricas intranucleares que no se tiñen (Figura 1 b-c).

Microscopía electrónica. El contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo muestra un material denso a los electrones en el interior nuclear, hacia la periferia (Figura 2a). En mayores aumentos, se observa que este material contiene regiones fibrosas y granulares (Figura 2b). Además, es positivo cuando se aplica la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (Figura 2c) o la técnica de plata amoniacal para organizador nucleolar (Figura 2d), de manera similar a como ocurre con microscopía de luz.

DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos evidencias citoquímicas con el microscopio de luz y con el microscopio electrónico, de la presencia de nucléolo en *Entamoeba histolytica*. Las evidencias con el microscopio de luz son: 1) hay un material intranuclear,

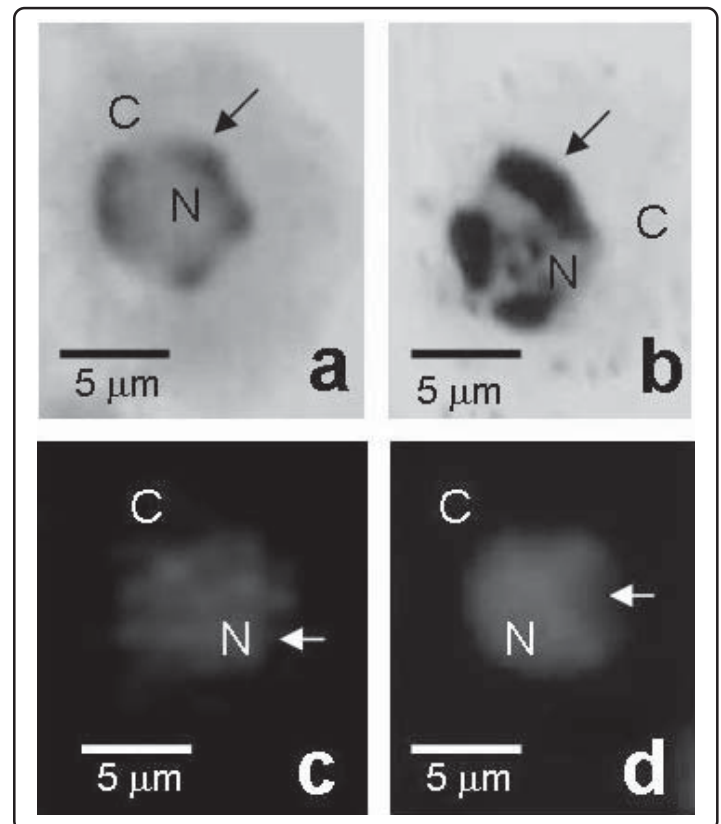


Figura 1. Microscopía óptica de campo claro y de epifluorescencia de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* teñidos con azul de toluidina ácido para RNA (a), con plata amoniacal para organizador nucleolar (b), con reacción de Feulgen (c) y DAPI (d) para DNA. En a) y b), la tinción ocurre en una región periférica dentro del núcleo (N), en forma de anillo (flechas). En c) y d) algunas regiones periféricas (flechas) son negativas a tinción para DNA. C, citoplasma.

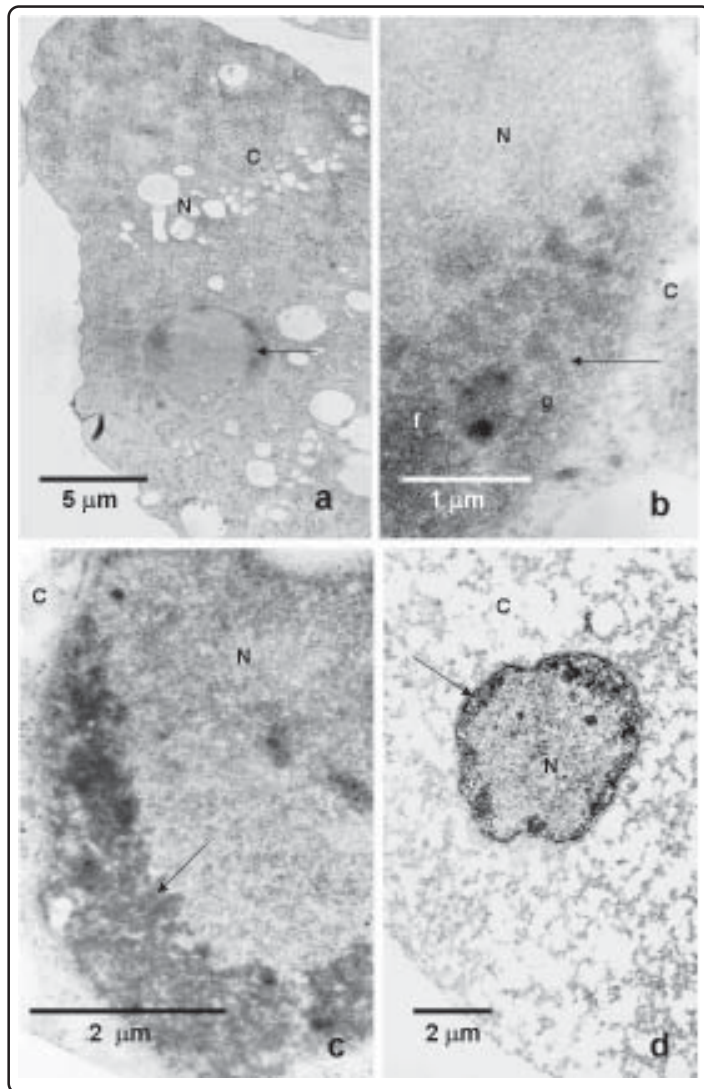


Figura 2. Microscopía electrónica de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (a-b), con la técnica para ribonucleoproteínas (c) o con la técnica de plata amoniacal para organizador nucleolar (d). El material intranuclear periférico (flechas en a y b) contiene regiones fibrilares (f) y granulares (g). Este material es positivo para ribonucleoproteínas (c, flecha) y se contrasta intensamente con plata amoniacal (d, flecha). C, citoplasma.

periférico que se tiñe con la técnica de Smetana con azul de toluidina ácido para RNA⁸ y 2) se contrasta fuertemente con la técnica de impregnación argéntica para organizador nucleolar descrita por Goodpasture y Bloom⁹⁻¹⁰. Las técnicas de Feulgen y de DAPI para DNA revelan una tinción homogénea en el núcleo, con zonas periféricas no muy bien definidas pero negativas a la tinción (Figura 1, c-d).

Aunque los resultados de microscopía de luz revelan material periférico negativo a la presencia de DNA con técnicas específicas, la resolución con este tipo de microscopio no permite definir detalles claramente, por lo que se llevaron a cabo observaciones con el microscopio electrónico.

Con el microscopio electrónico, el material periférico en forma de anillo en el interior del núcleo, presenta las siguientes características: 1) tiene elementos fibrogranulares que por su estructura corresponden al componente fibrilar denso y al componente granular; 2) se contrasta con la técnica regresiva a base de EDTA de Bernhard¹² para ribonucleoproteínas; 3) se contrasta con la técnica de impregnación argéntica específica para organizador nucleolar⁹⁻¹⁰. Este material no presenta cantidades detectables de DNA. De manera similar a como ocurre con microscopía de luz, las técnicas ultraestructurales para DNA a base de PTA, amina de osmio e inmunolocalización para DNA produjeron resultados negativos en esta zona periférica (no mostrados).

Aunque varios estudios ultraestructurales han mostrado la presencia de material intranuclear periférico en amibas²⁻⁵, éste no se había identificado como material nucleolar, salvo para el caso de *Entamoeba invadens*, en la cual se presenta un material similar fibrogranular¹³. De igual manera, los presentes resultados apoyan observaciones inmunológicas que indican la presencia de fibrilarina y RNA polimerasa I en regiones similares del núcleo de *E. histolytica* con el microscopio de fluorescencia¹⁴ y también observaciones ultraestructurales y autorradiográficas previas^{2,3,5}.

La observación del nucléolo en *E. histolytica* y datos recientes que muestran la presencia de este organelo intranuclear en *Giardia duodenalis*¹⁵, un organismo tempranamente divergente, así como en *Trypanosoma cruzi*¹⁶, sugieren que este organelo es un dominio intranuclear característico en donde se han compartamentalizado los genes ribosomales -y en general la biogénesis de los ribosomas- desde etapas muy tempranas de la evolución de los eucariontes.

CONCLUSIÓN

La ultraestructura de la célula de *Entamoeba histolytica* en su fase de trofozoito muestra la presencia de nucléolo. Este material se presenta como una región intranuclear periférica con forma de anillo, de morfología fibrogranular, de naturaleza ribonucleoproteica y que carece o presenta poco DNA, pero es positivo a RNA y tinción de plata para organizador nucleolar.

AGRADECIMIENTOS

A la DGAPA-UNAM a través de los proyectos PAPIIT IN206307, PAPIME PE205607.

REFERENCIAS

1. Martínez-Palomo, A. Amebiasis (Médica Panamericana, México D.F., 1987).

2. El-Hashimi, W. & Pittman, F. Ultrastructure of *Entamoeba Histolytica* trophozoites obtained from the colon and from *in vitro* cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 215-226 (1970).
3. Miller, J.H., Swartzwelder, J.C. & Deas, J.E. A electron microscopic study of *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* **47**, 577-587 (1961).
4. Albach, R.A. Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **36**, 197-205 (1989).
5. Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. & Downing, S. *Entamoeba histolytica*: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp. Parasitol.* **42**, 248-259 (1977).
6. Raska, I., Shaw, P.J. & Cmarko, D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 325-334 (2006).
7. Jiménez-García, L.F. et al. Electron microscopy localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by non-isotopic *in situ* hybridization. *Exp. Cell Res.* **207**, 220-225 (1993).
8. Smetana, K. in *Methods in Cancer Research* (ed. Busch, H.) 361-443 (Academic Press, New York, vol. II, 1967).
9. Goodpasture, C. & Bloom, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**, 37- 50 (1975).
10. Spector, D.L., Goldman, B.O. & Leinwand, L.A. *Cells: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, vol. II, 1997).
11. Vázquez Nin, G.H. & Echeverría, O.M. *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas* (Fondo de Cultura Económica, México D.F., 2000).
12. Bernhard, W. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* **27**, 250- 265 (1969).
13. Jiménez-García, L.F. et al. Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi, and protoctists. *BioSystems* **22**, 103-116 (1989).
14. Jhingan, G.D., Panigrahi, S.K., Bhattacharya, A. & Bhattacharya, S. The nucleolus in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* is located at the nuclear periphery. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 72-80 (2009).
15. Jiménez-García, L.F. et al. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1297-1304 (2008).
16. López-Velázquez, G. et al. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.* **11**, 293-299 (2005).