

# PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA EL PARÁSITO *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Mercado Sánchez Itzel Montserrat (1), Reyes Cortes Ruth (2)

1 [Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [itzmercado@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [reyes.ruth@ugto.mx]

## Resumen:

Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de infección como respuesta del sistema inmune innato ante microorganismos patógenos. Uno de los mecanismos recientemente descritos por los neutrófilos para la eliminación de los microorganismos patógenos es la formación de trampas extracelulares. Las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) están constituidas por redes de DNA y proteínas microbicidas que permiten el aislamiento y eliminación del patógeno. El lipopéptidofosfoglicano (EhLPPG) es uno de los componentes extracelulares de *Entamoeba histolytica* y activadores de los neutrófilos a través de sus receptores tipo Toll. En este trabajo se aisló, cuantificó y determinó el perfil electroforético del EhLPPG de *E. histolytica* y se observó la formación de NETs inducidas con amibas tratadas y sin tratar con el anticuerpo Anti-EhLPPG. Los resultados observados sugieren que el lipopéptidofosfoglicano es un importante componente que influye en el tamaño y número de trampas inducidas.

## Abstract

Neutrophils are the first line of defence of the innate immune system face pathogens. Recently, a new neutrophils antimicrobial mechanism for elimination of pathogens has been described: neutrophil extracellular traps. Neutrophil extracellular traps (NET's) are structures composed of chromatin and microbicide proteins that bind, isolate and kill the pathogen. Lipopeptidophosphoglycan (EhPPG) is an extracellular component from *Entamoeba histolytica*, it activates many cell types including neutrophils through Toll like receptors. In this work we isolate and analyse by electrophoretic profile, the EhLPPG from *Entamoeba histolytica* Furthermore, we observed NETs formation by *E. histolytica* treated with and without Anti-EhLPPG antibody. The results indicate that the lipopeptidophosphoglycan is important for the number and size of NETs formation

## Palabras Clave

*Entamoeba histolytica*, Lipopéptidofosfoglicano, Trampas extracelulares de neutrófilos, Neutrófilos.

## INTRODUCCIÓN.

### “Respuesta inmune innata: Los neutrófilos”

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato y son las primeras células en migrar de la sangre hacia los sitios de infección. Los neutrófilos exhiben varios receptores tipo Toll en su superficie para la detección de los componentes de microorganismos patógenos [1]. Uno de los activadores de los receptores tipo Toll es el lipopéptidofosfoglicano de *Entamoeba histolytica*, el cual posee la capacidad de activar a los neutrófilos [2]. Después de la activación, se conocen tres estrategias utilizadas por los neutrófilos para eliminar a los microorganismos invasores: 1. La fagocitosis: el patógeno se internaliza y se elimina al exponerlo a un estallido oxidativo y a compuestos antimicrobianos que son descargados en las vacuolas fagocíticas por gránulos citoplasmáticos. 2. La degranulación: implica la liberación de sustancias antimicrobianas en el sitio de la infección y 3. Las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs): mecanismo descrito recientemente constituido por redes de cromatina que contienen proteínas y péptidos antimicrobianos que atrapan diversos patógenos, inhiben su crecimiento e impiden la propagación de infecciones [3,4].

### “Amibiasis producida por *Entamoeba histolytica*”

La amebiasis es una parasitosis causada por *Entamoeba histolytica*, y es una de las principales causas de la disentería parasitaria en los países en desarrollo. Se estima a la amebiasis en segundo lugar después de la malaria como la causa principal de mortalidad relacionada con protozoarios en todo el mundo [5]. La infección puede causar una amplia gama de manifestaciones que van desde el estado de portador asintomático, la disentería, hasta el absceso hepático [6].

### “*Entamoeba histolytica*”

*E. histolytica* presenta dos formas de desarrollo: el trofozoíto y el quiste, que constituyen, respectivamente la forma invasiva e infectante. El trofozoíto, es pleomorfo, ya que su aspecto y

movilidad son muy fluidos debido a los cambios de pH y su potencial reductor. El tamaño del trofozoíto oscila entre los 10 y 60  $\mu\text{m}$ . Este parásito es sensible al jugo gástrico y su hábitat comprende la luz y pared del colon [7].

Uno de los principales componentes extracelulares de *E. histolytica* es el lipopéptidofosfoglicano (EhLPPG) [8], El EhLPPG es una molécula de tipo polisacárido que contiene 75-85% de carbohidratos, 8% de proteínas, 2.5% de lípidos y 1% de fosfatos [9]. Este componente, es una molécula altamente inmunogénica, ya que se han detectado anticuerpos específicos contra el EhLPPG en pacientes con diagnóstico de absceso hepático amebiano [4].

Estudios previos han reportado la inducción de trampas extracelulares de neutrófilos con los parásitos *Trichomonas vaginalis* y *E. histolytica*. En estos estudios se observó que existe una diferencia entre la interacción de las NETs con ambos parásitos, puesto que la viabilidad de *E. histolytica* no se ve afectada significativamente [10]. Lo que sugiere que las moléculas secretadas o presentes en la superficie del parásito como el EhLPPG son capaces de modificar la función de las células del sistema inmune. Por lo anterior, en este trabajo se aisló y cuantificó el EhLPPG y se analizó la formación de NETs en presencia y ausencia de anticuerpos Anti EhLPPG.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Parásito

Para los estudios se utilizó la cepa HM1: IMSS de *E. histolytica*, la cual se cultivó en el medio de cultivo TYI-S-33 [12].

### Aislamiento de EhLPPG de *E. histolytica*

El EhLPPG se obtuvo a partir de un cultivo de *E. histolytica* de 6 botellas (150 mL cada una). Las amibas se cosecharon, se lavaron con PBS y se resuspendieron en agua estéril. Posteriormente, las células se lisaron por 3 ciclos de congelación y descongelación. Después, el homogenado se centrifugó a 1,600 rpm durante 10 minutos, se

recuperó el sobrenadante y subsecuentemente se ultracentrifugó a 40,000 rpm durante 2 horas. La pastilla se extrajo con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (10:10:3) y el material insoluble se recuperó mediante centrifugación a 2,000 rpm durante 20 minutos. Enseguida, se realizaron tres extracciones con fenol al 90% a 68°C durante 30 minutos y se recuperó la fase acuosa por centrifugación a 10,000 rpm entre cada extracción. Finalmente, la fase acuosa que contiene el EhLPPG se dializó con agua destilada. Terminada la diálisis el EhLPPG se concentró por liofilización y se almacenó a -20°C [11].

### Caracterización del EhLPPG

#### Determinación de glúcidos

La determinación de glúcidos se realizó por el método de Dubois [13]. A una solución con 10 y 25  $\mu\text{L}$  de EhLPPG y a una curva patrón de glucosa (0, 5, 10, 20, 50, 100, 150  $\mu\text{g}$ ) se le añadió 60  $\mu\text{L}$  de fenol al 80% y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a 450 nm.

#### Perfil electroforético del EhLPPG

Se observó el perfil electroforético de 60  $\mu\text{g}$  de EhLPPG en un gel de poliacrilamida al 12%. La visualización se realizó mediante la tinción de plata siguiendo el protocolo de la bibliografía [2].

#### Western Blot

Se preparó el gel de poliacrilamida al 12% con una concentración de 60  $\mu\text{g}$  de EhLPPG y se realizó el corrimiento a 100 Volts. Después, se realizó la transferencia del EhLPPG a una membrana de nitrocelulosa en una unidad de transferencia semi-húmeda (TE70 Semi-dry transfer unit) durante 1:30 h. Para la inmuno-detección, la membrana se bloqueó toda la noche con leche 5%, como primer anticuerpo se utilizó el suero inmune de ratón a una dilución 1:500 (en Leche al 5% con Tween 20 al 10%). Se utilizó un segundo anticuerpo (Ab anti IgG de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano) a una dilución 1:1500. Para revelar se utilizó el kit Inmobilon western Chemiluminescent HRP

Substrate. La imagen se observó en el fotodocumentador (Biorad).

### Inducción de NETs

#### Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

Los neutrófilos se aislaron de donadores voluntarios sanos. Primeramente se realizó un gradiente de dos fases, con 3 mL histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), y 3 mL de histopaque 1119 (Sigma-Aldrich). Sobre el gradiente se colocaron 6 mL de sangre periférica con 10 U/mL de heparina. El gradiente se centrifugó a 2,200 rpm durante 30 minutos y se retiró la capa de granulocitos, la cual se resuspendió en PBS estéril. Después los granulocitos de lavaron por centrifugación a 1,200 rpm por 5 minutos. La pastilla se resuspendió en medio RPMI con 2% de HSA (albúmina sérica humana) a una razón de  $2 \times 10^6$  neutrófilos/mL.

#### Inducción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) con *E. histolytica*

En una placa de cultivo de 24 pozos se colocaron cubreobjetos previamente tratados con HCl, se sembraron los neutrófilos (200,000 en 100  $\mu\text{L}$ ) y se incubaron durante 1 h a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$ . Para la inducción de trampas se agregaron las amibas (20,000 aproximadamente 60  $\mu\text{L}$ ) en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  de acuerdo a la tabla 1 y se incubó durante una hora en atmósfera de  $\text{CO}_2$ . Después de la incubación las muestras se fijaron con un volumen igual de paraformaldehído al 8%.

Tabla 1: Condiciones utilizadas para la inducción de NETs

Tabla de condiciones utilizadas.		
	Condiciones	
Controles	1	Neutrófilos ( $2 \times 10^5$ )
	2	Amibas ( $2 \times 10^4$ )
Tratamientos	3	Neutrófilos + amibas tratadas con Anti-EhLPPG (1:500)
	4	Neutrófilos + amibas NO tratadas

### Inhibición de la formación de NETs con amibas tratadas con el Ab EhLPPG

La inhibición se realizó induciendo los neutrófilos con amibas incubadas previamente con el suero inmune de ratón (anti EhLPPG) a una dilución 1:500 durante 15 minutos a 4°C. Después, se realizaron dos lavados con medio RPMI con 2% de albumina para eliminar el exceso de anticuerpo.

### Visualización de trampas de neutrófilos

Para visualizar las NETs se utilizó el colorante Hoechst 33342 (azul) que se une al DNA a una concentración de 15 µg/mL. La visualización de las amibas fue mediante la inmuno-detección del EhLPPG. Se utilizó el suero inmune de ratón (Anti EhLPPG) a una dilución de 1:500 y un segundo anticuerpo anti IgG de ratón acoplado al fluorocromo FITC (Isocianato de fluoresceína verde) a una dilución 1:2000.

### Montaje de muestras

En un portaobjetos seco previamente tratado con HCL se colocó una gota de Prolong gold (Life Technology) (10µL) y cada cubreobjetos de la placa de 24 pozos se colocó cuidadosamente hacia abajo sobre la gota de Prolong gold, las muestras se dejaron secar durante 24 h y se observaron en el microscopio confocal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y determinación de EhLPPG

El EhLPPG se purificó partir de un cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* como se describe en materiales y métodos y mediante el método de

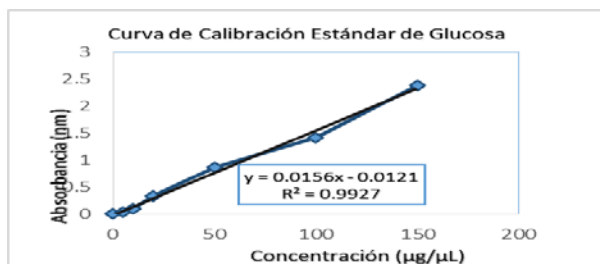


IMAGEN 1: Curva de calibración estándar de glucosa.

determinación de glúcidos y la curva estándar de glucosa (Imagen 1) se obtuvo un título de 1,5 µg/µL de EhLPPG.

Una vez cuantificado el EhLPPG, se observó su patrón electroforético en un gel de poliacrilamida al 12% visualizado con la tinción de plata (Imagen 2.A) En la imagen se observa un barrido y un par de bandas correspondientes a un peso molecular entre 97 y 200 KDa, lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía [9].

Al analizar la inmuno-detección del EhLPPG con el suero inmune de ratón (obtenido previamente) y el Anti IgG de ratón acoplado a la peroxidasa de rábano, se observó un barrido que abarca desde 70 a 200 kDa (Imagen 2B), lo que sugiere que nuestro suero inmune reconoce un compuesto cuyo peso molecular concuerda con el EhLPPG y no reconoce otros componentes de menor peso molecular.

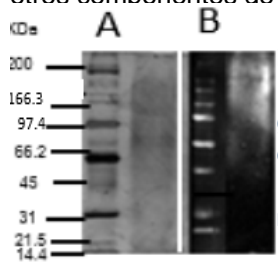


IMAGEN 2: Perfil electroforético del EhLPPG. A) Sesenta µg de EhLPPG en gel de poliacrilamida al 12% visualizado con la tinción de plata. B) Inmunodetección del EhLPPG en la membrana de nitrocelulosa.

### Inducción de NETs por *E. histolytica*

En este trabajo comparamos la formación de trampas extracelulares de neutrófilos inducidas con amibas tratadas y no tratadas con el anticuerpo anti-EhLPPG. En la imagen 3 se muestra los neutrófilos, los cuales no forman NETs al no estar en contacto con el agente inductor (amibas). En la imagen 4 observamos 4 microfotografías de microscopía confocal que nos muestran la formación de NETs al inducir a los neutrófilos con *E. histolytica*. Las trampas extracelulares de neutrófilos observadas en esta preparación son largas y abundantes también se observa un acumulo de neutrófilos rodeando a *E. histolytica*. La

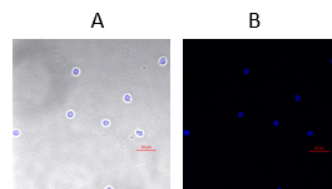
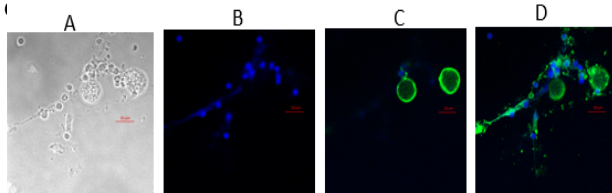
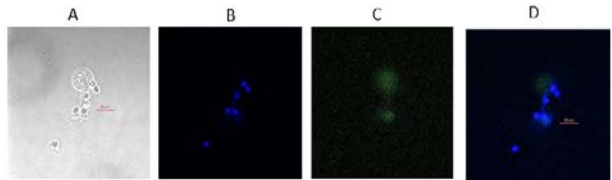


IMAGEN 3: Neutrófilos. A) imagen de contraste de fases de neutrófilos. B) Neutrófilos teñidos con Hoechst 33342 (azul)

imagen 5 muestra que las NETs inducidas con amibas tratadas con el anti-EhLPPG son pequeñas, escasas y presentan menos neutrófilos rodeando a las amibas. Estos resultados sugieren que existe una diferencia en la formación NETs inducidas con amibas tratadas y no tratadas con el anticuerpo Anti-EhLPPG la cual está influenciada por la



**IMAGEN 4:** Formación NETs inducidas por *E. histolytica*. A) NETs vista en contraste de fases. B) NETs formada por los neutrófilos teñido con Hoechst 33258. C) Amibas visualizadas con un Anti EhLPPG (verde) D) Largas y predominantes NETs rodeando 2 amibas.



**IMAGEN 5:** Inhibición de la inducción de NETs. A) Contraste de fases de NETs, las células grandes son amibas y las células pequeñas son neutrófilos. B) Neutrófilos y NETs teñidos con Hoechst 33342. C) Amiba tratada con el Anti EhLPPG (verde). D) NETs de tamaño pequeño y escasas en la muestra.

## CONCLUSIONES

El EhLPPG es un compuesto constituido en su mayoría por carbohidratos y en menos proporción por proteína y otros componentes por lo que en el perfil electroforético y la inmuno-detección se observa un barrido entre 90 y 200 kDa.

Con los resultados observados se sugiere el Anti-EhLPPG está bloqueando parcialmente la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, ya que en presencia del anticuerpo son escasas y de menor longitud.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por la oportunidad de realizar esta grata experiencia. Agradezco a la Doctora Ruth Reyes Cortés por la

paciencia y atención prestada a lo largo del desarrollo de este trabajo.

## REFERENCIAS

- [1] Kindt Thomas J., Goldsby Richard A., Osbrne Barbara A. (2007). *Inmunología de Kuby* (6ta Ed). México: McGRAW-HILL.
- [2] Vivanco-CidH. Apulche C., Wong I., Rocha M., Rios N., Estrada I., Villasis M., López C. y Isibasi A. (2007). Lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite Immunology*, 29: 467-474.
- [3] Poonum S. Korpe, Blake R. Stott, Florida Nazib, Mamun Kabir. (2012). Evaluation of a Rapid Point-of-Care Fecal Antigen Detection Test for *Entamoeba histolytica*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Volumen (86), pp. 980-981
- [4] Isibasi A, Blanco F, Arreguin. (1990). Immunochemical differences in the surface polysaccharides obtained from *Entamoeba histolytica* strain HM1: IMSS and its virulent (C-A) and non-virulent (L-6) clones. *Arch Invest Med*. Volumen (21), pp.175-181.
- [5] World Health Organization. (1997). Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec* 7, pp. 97- 100.
- [6] Stanley SL. (1997). Progress towards development of a vaccine for amebiasis. *Clin Microbiol Rev*; 10, pp. 637-649.
- [7] Li, E, Stenson, W.F., Kunz-Jenhins, C., Swanson, E., Duncan, E., Stanley, L. (1994). *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect.Immun.* 62: 5112-5119.
- [8] C. Maldonado Bernal, CJ Kirschning, Y. Rosenstein, LM Rocha, N. Ríos-Sarabia, C. López-Macias y A. Isibasi. (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunology*. Volumen (27), pp. 127-137.
- [9] Campos-Rodriguez R, Barranco-Tovar C, Isibasi-Araujo A & Kumate-Rodriguez. (1986). Anti-amebic plasma cells in peripheral blood of patients with amebic liver abscess. *Arch Invest Med*. Volumen (17), pp. 303-306.
- [10] Pulido, J. (2014). Interacción del parásito *Entamoeba histolytica* con trampas extracelulares de neutrófilos (NET). (Tesis de posgrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
- [11] Diamond, L.S., Harlow, D.R. & Cunnick, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72, 431-432 (1978)
- [12] Hannelore Lotter. (2009). *Plos Pathogens*.
- [13] Dubois, M. (1956). In Weir DM (Ed). *Analytical Chemistry*. Oxford, Dlackwell Science Ltd. 350.