

# EFECTO DEL LIPOPÉPTIDO-FOSFOGLICANO DE *ENTAMOEB*A *HISTOLYTICA* SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS

Rosas Jiménez, José Guadalupe (1) Reyes Cortés, Ruth (2), Avila Muro, Eva Edilia (3)

1 [Lic. En Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [jgrj95@gmail.com]

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

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [edilia@ugto.mx]

## Resumen

En estudios recientes se ha descrito que *Entamoeba histolytica* desencadena la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) *in vitro*, sin embargo, la actividad microbicida producida por este mecanismo es reducida. El lipopéptidofosfoglicano (EhLPPG), es el principal componente de superficie de *E. histolytica*, y es uno de los factores inmunogénicos determinantes en la inducción de trampas por los neutrófilos. En este trabajo empleamos a la bacteria *E. coli* W3110 como modelo de estudio para evaluar si el EhLPPG está involucrado en la capacidad antimicrobiana disminuida que presentan las NETs hacia *E. histolytica*. Se analizaron las curvas de crecimiento de *E. coli* midiendo la densidad óptica a 620 nm en exposición a NETs inducidas con PMA y con EhLPPG. Los resultados mostraron que la bacteria *E. coli* W3110 es sensible a la acción mediada por las trampas inducidas con PMA por lo que este modelo podría ser de utilidad para determinar el papel del EhLPPG en la acción microbicida.

## Abstract

Recent studies have shown the capability of *Entamoeba histolytica* to induce Neutrophil Extracellular Traps (NETs) *in vitro*. However, the NET microbicidal effect is reduced. Lipopetidophosfoglican (EhLPPG) is the main surface component of *E. histolytica* and it is an immunogenic factor to induce NET formation. In this work, we used *E. coli* W3110 as a study model to evaluate if EhLPPG is involved in the diminished antimicrobial effect mediated by NETs. We analyzed the growth curves of *E. coli* through 620 nm optical density in exposition to NETs induced either by PMA or EhLPPG. Results show that *E. coli* is sensitive to the NET antimicrobial effect, induced by PMA. Thus, this bacterial model may be useful for test the effect of EhLPPG in the NET microbicidal action.

## PALABRAS CLAVE

Trampas Extracelulares de Neutrófilos; *Entamoeba histolytica*; Lipopéptidofosfoglicano; Respuesta Inmune; *Escherichia coli* W3110.

## INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos (también llamadas células polimorfonucleares, PMN, en conjunto con los eosinófilos y basófilos) son los primeros elementos celulares en aparecer durante una respuesta inmune inmediata. Su importancia se ve reflejada al constituir la mayor población de leucocitos circulantes. Es reconocida su participación en la defensa contra patógenos como bacterias, hongos y parásitos [1].

Actualmente se han estudiado y caracterizado tres mecanismos principales de la participación de los neutrófilos en la respuesta inmune: fagocitosis, degranulación y formación de trampas extracelulares (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs). Las trampas extracelulares de neutrófilos fueron descubiertas en 2004, cuando Zychlinski y colaboradores observaron la capacidad antimicrobiana extracelular de estas estructuras [2,3].

Las NETs están formadas por redes de cromatina (DNA e histonas) decoradas con proteínas contenidas en los gránulos del neutrófilo. El proceso de formación de trampas, conocido como NETosis, involucra cambios en la célula que culminan con su muerte, liberando el contenido nuclear y granular [3]. Desde su descubrimiento, la participación de las NETs en la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiada, a través de su interacción con diversos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* [4], *Pseudomonas aeruginosa* [5], *Vibrio cholerae* [6] y *Staphylococcus aureus* [7], por mencionar algunos.

A partir de su estudio, se han mostrado los mecanismos por los que las NETs participan en la defensa contra patógenos. La trampa por sí misma es capaz de atrapar e inmovilizar al agente infeccioso, mediante la interacción electrostática con la cromatina (cargada negativamente). Esto previene la diseminación y promueve la eliminación del patógeno. Así mismo, las proteínas unidas a las fibras de cromatina son capaces de neutralizar factores de virulencia, así como ocasionar la inhibición o muerte del patógeno mediante péptidos antimicrobianos, lisozima, proteasas, entre otras moléculas [3].

La NETosis es un proceso inducible por múltiples factores. El ácido hipocloroso (HClO) y el 13-acetato de forbol-12-miristato (PMA) [8] son sustancias ampliamente utilizadas para inducir la formación de trampas *in vitro*. También se observa un efecto inductor empleando agentes biológicos como bacterias, hongos y parásitos; así como con patrones moleculares asociados a patógenos, interacciones antígeno-anticuerpo y por interacción con los receptores tipo tol (TLR) [3].

*Entamoeba histolytica* es el agente causal de la disentería amibiana, cuya complicación más grave es el absceso hepático. Se conoce que durante la infección por este parásito ocurre una respuesta inflamatoria intensa con una amplia participación de neutrófilos. Dado el tamaño de la amiba, la fagocitosis no es un recurso empleado por el neutrófilo para el control de la infección, sino que la de granulación y la NETosis juegan un papel más importante [2].

En un estudio reciente realizado por Ávila, E. E. *et al*, fue demostrada la formación de NETs por trofozoítos de *Entamoeba histolytica in vitro* [2]. Más aún, este grupo de trabajo descubrió que las trampas pueden ser inducidas por un componente de la membrana de la amiba, el lipopéptidofosfoglicano (LPPG), reconociéndolo como uno de los principales factores que induce esta ruta de la respuesta inmune. Esta molécula es un proteofosfoglicano anclado a GPI, conocido por su alta inmunogenicidad y reconocido por el suero de pacientes con absceso hepático causado por amebiasis [2].

No obstante, aun cuando fue observada la interacción de los trofozoítos con la trampa, ésta no tuvo un efecto sobre la viabilidad de la amiba [2]. Debe haber entonces factores de evasión que le permiten al parásito sobrevivir a la acción de las trampas. Dichos mecanismos no han sido esclarecidos y los autores del estudio han propuesto la participación de DNAasas extracelulares y del LPPG como inhibidores de la acción antimicrobiana de las trampas.

El objetivo del presente trabajo es determinar si el LPPG de *Entamoeba histolytica* es capaz de inhibir la actividad antimicrobiana de las NETs, empleando como modelo de estudio el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* W3110.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Bacterias y condiciones de cultivo.

Se utilizó *Escherichia coli* W3110, crecida en placas de medio LB sólido para su mantenimiento. Para su uso en los ensayos, la bacteria fue crecida en medio LB líquido hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de  $0.5$  ( $2 \times 10^8$  UFC/mL).

### Aislamiento de Neutrófilos

Las células polimorfonucleares (PMN) se aislaron a partir de sangre periférica heparinizada empleando un gradiente de densidad de Histopaque (Sigma) y mediante centrifugación, se obtuvo la fracción correspondiente a los PMN. Posteriormente se lavó con 3 ml de PBS estéril y se resuspendió en medio RPMI con HEPES 25 mM y HSA al 2%, para ser contadas en una cámara de Neubauer. Las células PMN finalmente se resuspendieron a una razón de  $2 \times 10^6$  /mL en medio nuevo [2].

### Determinación de la actividad antimicrobiana de las NETs

En una placa de 96 pozos fueron depositados  $2 \times 10^5$  neutrófilos por cada una de las condiciones ensayadas. La inducción de trampas fue realizada empleando acetato de forbol miristato (PMA) a una concentración final de 488 nM, o bien, empleando lipopéptidofosfoglicano de *Entamoeba histolytica* (EhLPPG) a una concentración final de 10 ng/mL, incubando la placa a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Como controles se incluyeron neutrófilos estimulados en las mismas condiciones sin el inóculo bacteriano.

El inóculo bacteriano fue preparado mediante dilución del cultivo a 0.5 de densidad óptica (600 nm) ajustado a una MOI de 1:1 en un volumen de 50 µL, para llegar a un volumen final de 200 µL por pozo. La placa fue centrifugada a 800 xg durante 15 minutos. La incubación se realizó a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y agitación a 80 rpm. El

crecimiento de la bacteria fue monitoreado mediante la determinación de la densidad óptica a 620 nm cada hora durante 7 horas, con una medición adicional a las 18 horas.

### Visualización de NETs por microscopía de fluorescencia confocal

Para visualizar la formación de trampas se utilizó una placa de 24 pozos, en la cual se colocaron cubreobjetos tratados y estériles y se realizó la inducción de las trampas bajo las mismas condiciones que en el ensayo de determinación de actividad antimicrobiana. Después de la inducción fue adicionado el inóculo bacteriano a la MOI indicada y se incubó por 2 horas en las mismas condiciones. La muestra en el cubreobjetos fue fijada con paraformaldehído al 4% y teñida con el colorante Hoescht 53342 a 15 µg/mL para la detección del ADN de las trampas de neutrófilos. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio de fluorescencia confocal del Departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato.



**IMAGEN 1:** Curva de crecimiento de *E. coli* W3110. Se realizó un subcultivo de 100 µl de un cultivo de toda la noche en 3 ml de medio LB.

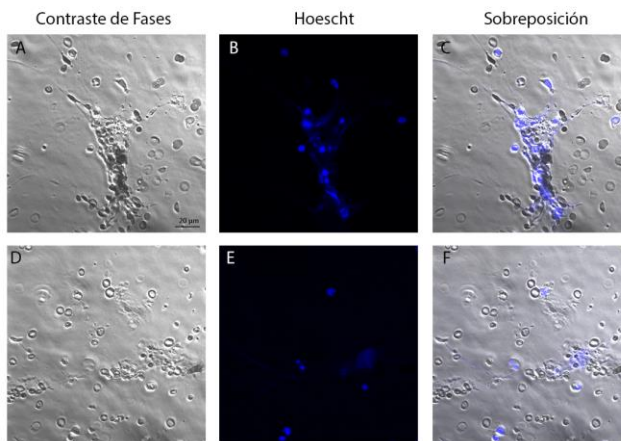
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Curva de crecimiento de *E. coli*

Partiendo de un inóculo de 0.1 del cultivo bacteriano de toda la noche, el crecimiento de *E. coli* en tubo con medio LB presento una fase de latencia de 20 minutos y la fase media-exponencia ( $OD_{600}$  0.5) en un tiempo promedio de 60 minutos, como se muestra en la imagen 1, presentado una cuenta viable de  $2 \times 10^8$  UFC/ml.

### Visualización de la formación de Trampas

Para corroborar la inducción de las trampas en las condiciones utilizadas en los experimentos, se hicieron observaciones al microscopio confocal. En la imagen 2 se observa la formación de trampas con PMA y con bacterias. Se observa la presencia de filamentos en color azul (indicativo de material nuclear teñido con Hoescht) característicos de las trampas extracelulares de neutrófilos.



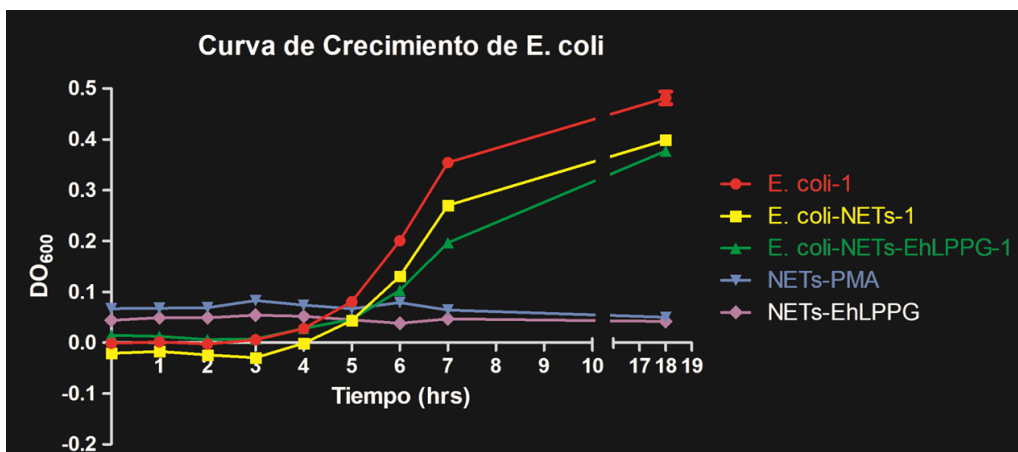
**IMAGEN 2: Visualización de formación de trampas extracelulares de neutrófilos por microscopia confocal.** A-C: trampas inducidas con PMA 488 nM D-F: trampas inducidas con bacterias MOI 1. Tinción con colorante Hoescht (azul) de las fibras de material nuclear indicativas de la presencia de NETs

### Curvas de crecimiento de *E. coli* en presencia de trampas inducidas con PMA y EhLPPG

En la imagen 3 se observan que la curva de crecimiento de *E. coli* presenta una fase de latencia entre 3 y 4 horas. Durante esta etapa no hay diferencias en el crecimiento bacteriano en las diferentes condiciones estudiadas. Sin embargo, en la fase exponencial se observa que las bacterias expuestas a neutrófilos inducidos con PMA y EhLPPG presentan valores de densidad óptica menores ( $OD_{600nm}$  0.39 y 0.37 respectivamente) en comparación con la curva de crecimiento de la bacteria sin exponer a los neutrófilos ( $OD_{600nm}$  0.49).

En las condiciones control donde solo se tienen los neutrófilos inducidos sin interacción con la bacteria observándose una  $OD_{600nm}$  constante durante todo el ensayo.

Los resultados nos indican que la bacteria *E. coli* W3110 es sensible a la acción bactericida mediada por la formación de Nets por lo que puede utilizarse como modelo de estudio para analizar el papel del EhLPPG en la acción bactericida.



**IMAGEN 3: Curva de crecimiento de *E. coli* en presencia de trampas extracelulares de neutrófilos.** *E. coli*-1 ( $2 \times 10^5$  UFC) en RPMI 1640. *E. coli*-NETs-1: Neutrófilos estimulados con PMA 488 nM y bacterias a una MOI de 1. *E. coli*-NETs-EhLPPG-1: Neutrófilos estimulados con EhLPPG a 10 ng/ $\mu$ l a una MOI de 1. NETs-PMA: Neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) estimulados con PMA 488 nM. NETs-EhLPPG: Neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) estimulados con EhLPPG a 10 ng/ $\mu$ l

## CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizó a la bacteria *E. coli* W3110 como modelo de estudio para analizar el papel del lipopéptido-fosfoglicano de *Entamoeba histolytica* sobre la actividad antimicrobiana de las trampas extracelulares de neutrófilos. Los resultados mostraron que el crecimiento de *E. coli* W3110 se ve disminuido al inducir la formación de trampas extracelulares mediante PMA y EhLPPG, por lo que sugerimos que con este modelo bacteriano es posible estudiar el papel del EhLPPG de *E. histolytica* en la actividad microbicida.

## REFERENCIAS

- [1] Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J. T., Levi, M. M., Press, O. W., Burns, L. J., Caligiuri, M. A. (2016). *William's Hematology*. New York: McGraw Hill Education.
- [2] Ávila, E. E., Salaiza, N., Pulido, J., Rodríguez, M. C., Díaz-Godínez, C., Lacleste, J. P., Becker, I. & Carrero, J. C. (2016). *Entamoeba histolytica* trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS ONE*, 11(7). doi: 10.1371/journal.pone.0158979.
- [3] Vorobjeva, N. V. & Pinegin, B. V. (2014). Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease. *Biochemistry (Moscow)* 79(12), 1286-1296. doi: 10.1134/S0006297914120025.
- [4] Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., González-Pozos, S., Muñoz-Hernández, S., Rojas-Espinosa, O., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S. & Estrada-García, I. (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 89(1), 29-37. doi: 10.1016/j.tube.2008.09.009.
- [5] Young, R. L., Malcolm, K. C., Kret, J. E., Caceres, S. M., Poch, K. R., Nichols, D. P., Taylor-Cousar, J. L., Saavedra, M. T., Randell, S. H., Vasil, M. L., Burns, J. L., Moskowitz, S. M. & Nick, J. A. (2011). Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Mediated Killing of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of Acquired Resistance within the CF Airway, Independent of CFTR. *PLoS ONE*, 6(9) e23637. doi: 10.1371/journal.pone.0023637.
- [6] Seper, A., Hosseinzadeh, A., Gorkiewicz, G., Lichteneger, S., Roier, S., Leitner, D. R., Röhm, M., Grutsch, A., Reidl, J., Urban, C. F. & Schild, S. (2013). *Vibrio cholerae* Evades Neutrophil Extracellular Traps by the Activity of Two Extracellular Nucleases. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003614. doi: 10.1371/journal.ppat.1003614.
- [7] Schilcher, K., Andreoni, F., Uchiyama, S., Ogawa, T., Schuepbach, R. A. & Zinkernagel, A. S. (2014). Increased Neutrophil Extracellular Trap-Mediated *Staphylococcus aureus* Clearance Through Inhibition of Nuclease Activity by Clindamycin and Immunoglobulin. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(1), 473-482. doi: 10.1093/infdis/jiu091.
- [8] White, P. C., Chicca, I. J., Ling, M. R., Wright, H. J., Cooper, P. R., Milward, M. R. & Chapple, I. L. C. (2017). Characterization, Quantification, and Visualization of Neutrophil Extracellular Traps. En Seymour, G. J., Cullinan, M. P. & Heng, N. C. K. (2 Ed), *Oral Biology. Molecular Techniques and Applications* (pp. 481-497). New York: Humana Press.