

# ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA UNA PROTEÍNA DE *Entamoeba histolytica* SIMILAR A LA TOXINA DIFTÉRICA

Villanueva Romo Azucena(1), Rodríguez Mayra (2), Ávila Eva E (2)

1 Colegio de Nivel Medio Superior, Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, azucenavillanueva465@yahoo.com

2 Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, mayraroso@ugto.mx

2 Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, edilia@ugto.mx

## Resumen

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario causante de la amibiasis, ésta es la 6° causa entre las enfermedades transmisibles en México. En estudios anteriores, hemos demostrado que *E. histolytica* posee una proteína ("EhToxin-like") de la familia de la toxina diftérica. En este trabajo, deseamos saber si la proteína EhToxin-like se encuentra presente en la infección natural por *E. histolytica* y por lo tanto si existen anticuerpos contra ella. Se analizaron, mediante ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), 16 muestras de calostro de donadoras sanas (Hospital General de Guanajuato) y 10 muestras de pacientes con amibiasis (Hospital Infantil de México Federico Gómez). Como antígeno se empleó un extracto total de *E. histolytica* y para los ensayos posteriores se eligieron las muestras de calostro y de suero con mayor reactividad. Para determinar la presencia de anticuerpos contra la proteína EhToxin-I, ésta se purificó y se realizó la inmunodetección empleando las muestras de calostro y sueros elegidas. Se observó que todas las muestras de calostro que tienen reactividad con *E. histolytica*, poseen anticuerpos contra EhToxin-I. Los resultados de este estudio sugieren que durante la infección natural por *E. histolytica*, la proteína EhToxin-I se expresa y los pacientes generan anticuerpos contra esta proteína.

## Abstract

*Entamoeba histolytica* is the protozoan parasite that causes amebiasis, this is the 6th leading cause among communicable diseases in Mexico. In previous studies, we have shown that *E. histolytica* possesses a protein ("EhToxin-like") from the diphtheria toxin family. In this paper, we want to know if EhToxin-like protein is expressed in the natural infection with *E. histolytica* and therefore if patients generate antibodies against the protein. We analyzed, by solid phase immunosorbent assay (ELISA), 16 colostrum samples from healthy female donors (General Hospital of Guanajuato) and 10 samples from patients with amebiasis (Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez). We used a total extract of *E. histolytica* as antigen and the samples with greater reactivity were chosen for further testing the reactivity to EhToxin-like. EhToxin-I recombinant protein was purified and immunodetection was performed using the selected samples of colostrum and sera. We observed that all samples of colostrum having reactivity to *E. histolytica*, have antibodies to EhToxin-I. The results of this study suggest that during natural *E. histolytica* infection, the EhToxin-I protein is expressed and patients generate antibodies against this protein.

## Palabras Clave

Inmunoglobulinas humanas; Parásitos; Amiba; Ensayos inmunoquímicos.

## INTRODUCCIÓN

### Amibiasis y su agente causal *E. histolytica*

*Entamoeba histolytica* es el parásito protozoario causante de la amibiasis, ésta es la 6° causa entre las enfermedades transmisibles en México (Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2011. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver\\_ejecutiva\\_2011.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf)). La amibiasis como otras enfermedades diarreicas es causa y efecto de la desnutrición infantil [1].

En experimentos previos hemos demostrado que *Entamoeba histolytica* posee una proteína ("EhToxin-like") que pertenece a la familia de la toxina diftérica, esta última tiene un papel importante en la patogenicidad durante la difteria. La proteína de *E. histolytica* "EhToxin-like" ha sido expresada en *Escherichia coli* y purificada parcialmente [2].

### Función de los anticuerpos

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina capaz de identificar y neutralizar sustancias extrañas. Son las principales glicoproteínas responsables de la respuesta inmune humoral y su correcto funcionamiento es esencial para la defensa frente a microbios. Su carencia hace que el individuo muera por infecciones si no se instaura un tratamiento adecuado y a tiempo (Inmunología en línea, coordinador José Peña Martínez, <http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/inmunologia>).

En el organismo, los anticuerpos pueden encontrarse de dos formas: De forma soluble en los líquidos biológicos, donde actúan neutralizando y colaborando en la destrucción de antígenos; y unidos a la membrana de linfocitos B donde actúan como receptores de antígenos (Inmunología en línea, coordinador José Peña Martínez).

Un antígeno es una sustancia foránea o extraña, habitualmente una proteína o polisacárido que, cuando se une a un anticuerpo complementario activa la respuesta inmune.

Por lo anterior, deseamos saber si la proteína recombinante de la amiba parecida a la toxina diftérica se encuentra presente en la infección natural por *Entamoeba histolytica* y por lo tanto si existen anticuerpos contra ella.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de extracto total de amiba

Se cosecharon 2 tubos del cultivo de *Entamoeba histolytica* cepa HM1 después de 72 horas de crecimiento a 36.8°C en medio TYI-S-33. Los trofozoítos se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  amibas/mL en un amortiguador de fosfatos con salina (PBS) conteniendo yodoacetamina 20 mM como inhibidor de proteasas. Las amibas se lisaron en un homogeneizador de vidrio, después se centrifugó el extracto a 2,000 g a 4°C por 15 minutos y se determinó proteína en el sobrenadante por el método de Lowry.

### Ensayo inmunoenzimático en fase sólida

En la placa para ELISA se añadieron 50 µL de extracto total de amiba a 20 µg de proteína por mL en PBS, se incubó durante una noche a 4°C. Posteriormente, se retiró el antígeno no unido a los pozos y se agregaron 150 µL de solución de gelatina preparada en PBS; se incubó una hora a temperatura ambiente. En seguida se retiró la gelatina no unida a los pozos; para eliminar el exceso de antígeno y gelatina se lavó tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween (PBS-Tween). Se añadió el primer anticuerpo (calostro o suero humano) a diferentes diluciones, se incubó una hora a temperatura ambiente y se lavó tres veces PBS-Tween. Se añadió el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (1:1,000), se incubó por una hora a temperatura ambiente, se lavó tres veces y se añadió ABTS (sustrato de la enzima peroxidasa) incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbencia a 450 nm en un lector de ELISA (labsystems multiskan).

### Purificación de EhToxin-I y la mutante E354Q

La cepa de *E. coli* que expresa la proteína EhToxin-I (pET30-EHI\_155600) y la cepa mutante E354Q y se crecieron en medio LB con 50 µg/mL de kanamicina y 2% de glucosa por siete horas a 37°C en agitación. Se tomó una alícuota del precultivo anterior y se creció la bacteria en las mismas condiciones induciendo la producción de la proteína con IPTG 1 mM. La pastilla bacteriana se lisó en Tris-HCl 10 mM pH 7.0, NaCl 300 mM con un cóctel inhibidor de proteasas (Roche), se

agregó lisozima a 100 µg/ml se incubó durante 30 min a 37°C y se rompió con un sonicador. La fracción soluble se colocó sobre una columna de Niquel-agarosa para purificar la proteína que tiene etiqueta de 6 histidinas. La columna se lavó sucesivamente con una solución Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, con la misma solución conteniendo imidazol 40 y 250 mM. Las muestras obtenidas con 250 mM se dializaron realizando cuatro cambios de buffer, se liofilizó la muestra y se resuspendió en TBS-A (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM) con coctel inhibidor de proteasas.

### Inmunodetección de la proteína EH-toxin-I y E354Q con sueros y calostros humanos

Se corrieron las proteínas purificadas EhToxin-I y EhToxin-I\_E354Q en gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5%. Se retiró la solución de bloqueo y se agregó el primer anticuerpo. Después de una hora de incubación, se retiró el exceso de anticuerpo lavando con PBS-Tween, se agregó el segundo anticuerpo y se incubó una hora. Se eliminó el exceso de anticuerpo lavando con PBS-Tween y se realizó la inmunodetección usando el reactivo "Chemiluminescent HRP substrate" (Millipore) en el documentador de imágenes ChemiDoc (BioRad).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar el título de anticuerpos contra *Entamoeba histolytica* se realizaron ensayos de ELISA en calostros de personas que posiblemente hayan padecido amibiasis y sueros de pacientes diagnosticados con esta infección. En la Figura 1 se muestra la presencia de anticuerpos, notoriamente en el calostro número 82 y la nula presencia de éstos en el calostro número uno.

La Figura 2 permite observar la presencia del anticuerpos contra *E. histolytica* en los calostros número 70 y 55. La Figura 3 es una ELISA en la cual las diluciones del suero empleadas fueron de 1:400 hasta 1:12,800. Se observa claramente la presencia de anticuerpos en el suero número nueve y el efecto de las concentraciones utilizadas. Se puede percibir también que los anticuerpos en los sueros no se encuentran a una concentración tan elevada como se esperaba.

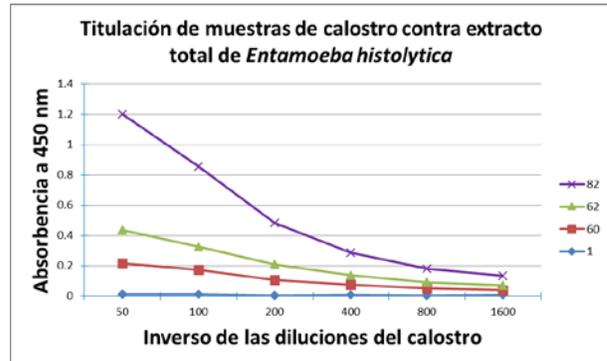


Figura 1. ELISA 01 probada con cuatro calostros humanos.

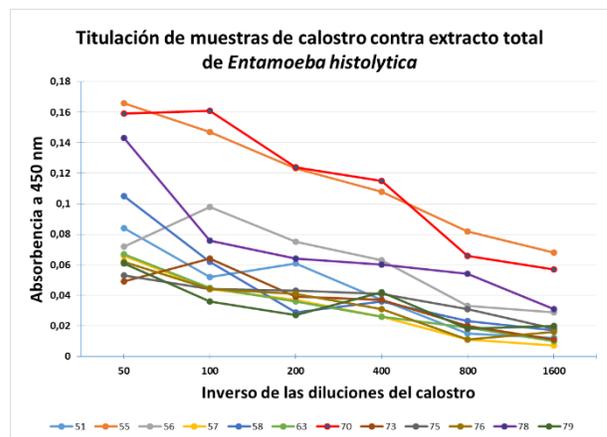


Figura 2. ELISA 02 probada con 12 calostros humanos.

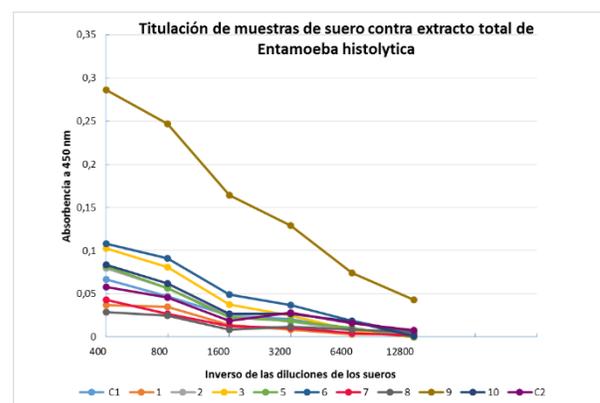


Figura 3. ELISA probada con sueros de pacientes diagnosticados con amibiasis.

Después de haber hecho la transferencia de las proteínas EhToxin-I y la mutante EhToxin-I\_E354Q (Fig. 4 y 5), los calostros y sueros que reconocieron el antígeno de *E. histolytica* a mayor dilución fueron utilizados para hacer la inmunodetección en el papel de nitrocelulosa que contiene la proteína EhToxin-I\_E354Q (Fig. 6 y 7).

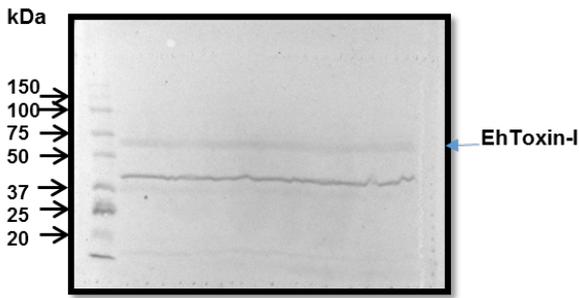


Figura 4. Transferencia en papel de nitrocelulosa de la proteína EhToxin-I.

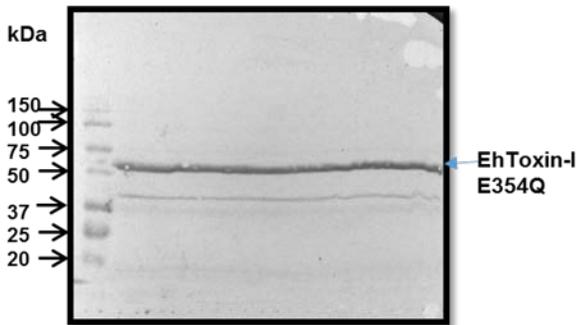


Figura 5. Transferencia en papel de nitrocelulosa de la proteína EhToxin-I\_E354Q.

En la Figura 6 se observa que los calostros 81, 62, 70 y 55 que poseen anticuerpos contra amiba, son capaces de reconocer la proteína EhToxin-I\_E354Q. El calostro número 1, en el cual no se detectaron anticuerpos contra EhToxin-I\_E354Q, tampoco mostró reactividad contra esta proteína recombinante.

En la Figura 7 se muestra la reacción débil del suero usado como control negativo (C1) y de los sueros 3, 4 y 6 los cuales tenían anticuerpos detectables contra *E. histolytica*. Inesperadamente el suero número 9, que tenía un título de anticuerpos contra amiba >1:12,800 (Fig 3) no reconoció la proteína de amiba EhToxin-I\_E354Q.

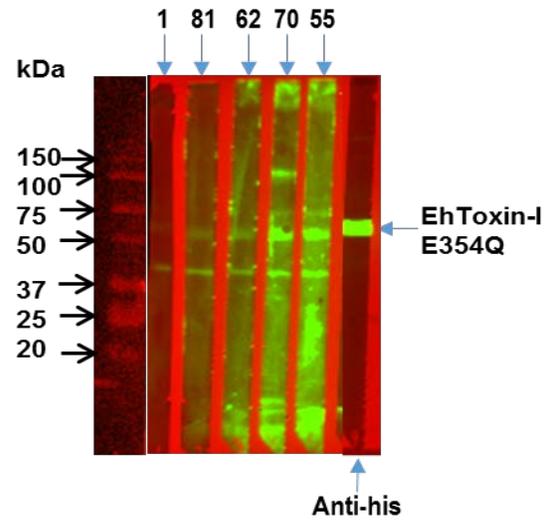


Figura 6. Inmunodetección realizada con calostros humanos. Calostro humano 1, anticuerpos contra *E. histolytica* no detectables. Calostros 81, 62, 70 y 55 poseen anticuerpos contra amiba. Como control positivo detección de EhToxin-I\_E354Q con anticuerpo contra la etiqueta de histidinas.

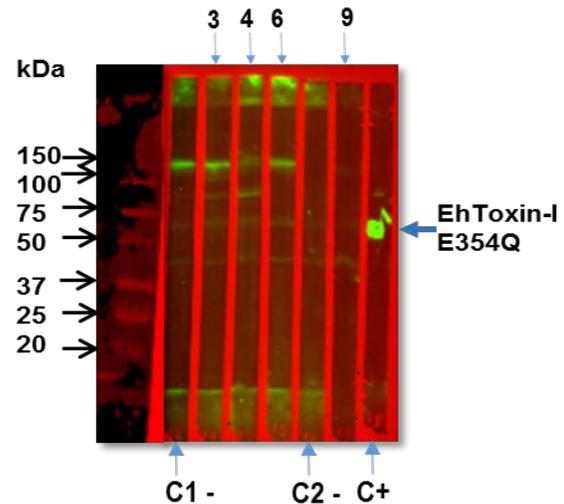


Figura 7. Inmunodetección realizada con sueros de pacientes con amibiasis. Sueros de pacientes con amibiasis, números 3, 4, 6 y 9. Controles negativos (C1- y C2-), sueros de donadores sanos. Control positivo (C+), se empleó el suero de un conejo inmunizado con un péptido de la región amino terminal de EhToxin-I (Tesis Maestría Alma Jaqueline Márquez).

## CONCLUSIONES

La mayoría de las muestras de calostro, de mujeres mexicanas, poseen anticuerpos contra *Entamoeba histolytica*.

Las muestras de calostro ensayadas que poseen anticuerpos contra amiba reconocen la proteína EhToxin-I\_E354Q de *E. histolytica*.

No todos los sueros de pacientes con amibiasis que se ensayaron poseen anticuerpos contra la proteína EhToxin-I\_E354Q de *E. histolytica*.

## REFERENCIAS

1. Verkerke H, Petri W, Marie C. The dynamic interdependence of amebiasis, innate immunity, and undernutrition. *Seminars in Immunopathology*. 2012;34(6):771-85. doi: 10.1007/s00281-012-0349-1. PubMed PMID: WOS:000310988000004.
2. Avila EE, Rodriguez OI, Marquez JA, Berghuis AM. An *Entamoeba histolytica* ADP-ribosyl transferase from the diphtheria toxin family modifies the bacterial elongation factor Tu. *Mol Biochem Parasitol*. 2016;207(2):68-74. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.05.012. PubMed PMID: 27234208.

## REFERENCIAS TOMADAS DE INTERNET

Información Epidemiológica de Morbilidad Anuario 2011. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver\\_ejecutiva\\_2011.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf)

Inmunología en línea, coordinador José Peña Martínez, <http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/inmunologia>