

LIBERACIÓN DEL LIPOPEPTIDOFOSFOGLICANO DE LA SUPERFICIE DE *Entamoeba histolytica* Y SU INTERACCIÓN CON EL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO LL-37

Ponce Sánchez Martha Guadalupe Jazmín (1), Rodríguez Solís Mayra C. (2), Ávila Eva Edilia (3)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: mgj.poncesanchez@ugto.mx

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: mayraroso@ugto.mx

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

Resumen

Entamoeba histolytica es un parásito que causa infecciones diarreicas en el ser humano y cuenta con varios factores de virulencia, los cuales le permiten sobrevivir durante la infección. En este estudio se analizó la molécula llamada lipopeptidofosfoglicano (EhLPPG) la cual contribuye a su virulencia. Se realizaron ensayos tipo ELISA para determinar si el EhLPPG es liberado por la ameba sobre la superficie de la placa de cultivo, debido a que se reportó que en el sitio donde la ameba se adhiere deja moléculas de su superficie que se denominaron microexudado. Para determinar la presencia de EhLPPG, se usó un anticuerpo primario anti-EhLPPG y como uno secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Además, se determinó la posible interacción de EhLPPG con trampas extracelulares formadas por neutrófilos (NETs) humanos. Para ello, se colocaron en interacción amebas recién cosechadas y neutrófilos obtenidos de donadores voluntarios sanos y se observó por microscopia confocal la co-localización del EhLPPG y el péptido antimicrobiano LL-37. Finalmente, se concluyó que la ameba libera el EhLPPG en la superficie donde se encuentra adherida y se demostró que la molécula EhLPPG interactúa con las trampas extracelulares de neutrófilos, probablemente a través del LL-37 y quizá otros péptidos antimicrobianos.

Abstract

Entamoeba histolytica is a parasite that causes diarrheal infections in humans and has several virulence factors, which support the parasite survival during infection. In this study, the molecule called lipopeptidofosfoglicano (EhLPPG) was analyzed, which contributes to its virulence. ELISA assays were performed to determine if the EhLPPG is released on the culture surface. A previous publication reported the presence of ameba molecules on the surface of the culture plate, which were denominated microexudate. To determine the presence of EhLPPG, we used a primary antibody anti-EhLPPG and an anti-mouse IgG conjugated to peroxidase as secondary antibody. Additionally, the possible interaction of EhLPPG with human neutrophil extracellular traps was determined. For this purpose, we interacted recently harvested ameba with human neutrophils obtained from volunteer healthy donors, and the co-localization of EhLPPG with the LL-37 antimicrobial peptide was observed by confocal microscopy. The final conclusions were that *E. histolytica* releases EhLPPG on the culture surface and that EhLPPG interacts with neutrophil extracellular traps, likely through LL-37 and may be other antimicrobial peptides.

Palabras Clave

Microexudado; Lipolisacárido; Lipoglicanos, Neutrófilos; NETs

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es un parásito que causa infecciones diarreicas en los seres humanos, sobre todo en niños. Este parásito posee varias moléculas que contribuyen a su virulencia, entre ellas se encuentra una molécula del glicocalix en la superficie celular denominada lipopeptidofosfoglicano (EhLPPG). Esta molécula es buen inductor de la respuesta inmune innata y adaptativa [1].

En la composición del EhLPPG se encuentran oligosacáridos, glicolípidos y una pequeña proporción de proteína, creando una capa impermeable que le ayuda al trofozoíto a evadir el sistema del complemento [2]. Se ha reportado que la amiba al moverse deja algunos de sus componentes adheridos a la superficie de cultivo. Estos componentes se conocen en conjunto como microexudado [3]. Debido a que EhLPPG es un componente de la superficie amibiana, nos preguntamos si el EhLPPG se encuentra en el microexudado.

El EhLPPG pertenece a la familia del lipopolisacárido (LPS) que se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El LPS es capaz de causar fiebre y shock en animales modelo, se sabe que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias por monocitos, macrófagos y células epiteliales [3].

Se ha propuesto que el efecto del LPS puede ser bloqueado por el péptido antimicrobiano humano de 37 aminoácidos denominado LL-37 [4]. En los pacientes con septicemia el LL-37 podría proteger a los pacientes del shock evitando la unión de LPS a las células fagocíticas [5]. Debido a que el LPPG de *E. histolytica* pertenece a la familia del LPS bacteriano, en este trabajo nos preguntamos si el LL-37 es capaz de unirse al EhLPPG y probablemente neutralizar su efecto.

Por otro lado, se ha reportado que el EhLPPG es capaz de inducir trampas extracelulares formadas por neutrófilos (NETs) en las cuales también se ha encontrado la presencia de LL-37 [6], por esa razón en este estudio se realizó un ensayo con NETs inducidas por amibas para buscar la posible co-localización entre el LL-37 y el EhLPPG.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron:

Determinar si el LPPG de *E. histolytica* se libera en la superficie del cultivo donde los trofozoítos se encuentran adheridos.

Determinar si el LPPG de *E. histolytica* se une al péptido antimicrobiano LL-37.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de microexudado de *E. histolytica*.

Se colocaron distintas concentraciones de amibas en medio TYI con suero en una placa de 96 pozos estéril (Immunolon 2H, Thermo Scientific) y se incubó durante 24 horas a 37°C en atmósfera microaerofílica. Una vez terminado el tiempo de incubación se enfrió la placa durante 10 minutos para retirar las amibas de los pozos y se lavó con PBS hasta que no hubiera células adheridas a la placa.

Detección de EhLPPG en microexudado por ensayo ELISA.

Se usó una solución de BSA a 1 mg/mL para bloquear la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, terminado el tiempo de incubación se retiró la solución bloqueadora y se colocó el primer anticuerpo contra EhLPPG diluido 1:500 en BSA. Después de la incubación se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:2000 en BSA. Para revelar la actividad de la enzima se usó ABTS y se determinó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).

Se aislaron los neutrófilos de sangre periférica usando un gradiente de 2 fases empleando histopaque 1077 y 1119. Los neutrófilos se resuspendieron a razón de 1 millón de células por mL de RPMI con 2% de HSA.

En una placa de 24 de pozos se incubaron 200,000 neutrófilos (200 μ L) usando cubreobjetos previamente tratados con poli-L-Lisina, se adicionó RPMI con 2% de HSA y se incubó durante 1 hora a 37° C en atmosfera microaerofílica. Después se añadieron 20,000 amibas en un volumen de 50 μ L de RPMI con 2% de HSA, la placa se incubó 1 hora a 37° C en atmosfera microaerofílica.

Después de la inducción de las NETs, éstas se fijaron usando paraformaldehído al 4% incubando 15 minutos a temperatura ambiente, una vez terminada la fijación los grupos aldehído libres se bloquearon durante 1 hora con una solución de glicina 100 mM. Por último, se dejó incubando toda la noche a 4° C en una solución que contenía 10% de plasma descomplementado, 0.1% de gelatina en PBS-0.05% Tween 20.

En cada pozo se colocaron 300 μ L de anticuerpo primario anti-LL37 y anti-EhLPPG diluidos 1:250 en PBS-0.05% Tween 20. Después de la incubación y los lavados, se colocaron los anticuerpos secundarios anti- IgG de conejo conjugado de Alexa Fluor 594 (InvitroGen – A21207) y anti-IgG de ratón conjugado a Fluoresceína, ambos diluidos 1:1500 en PBS- Tween 20 0.05%.

Se usó Hoechst 33342 para teñir y Prolong gold (InvitroGen- P36930) para el montaje en el portaobjetos para ver por microscopia confocal (Carl Zeiss, LSM700).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró que *E. histolytica* libera el LPPG en la superficie donde se encuentra adherida, demostrando que ésta es una de las moléculas que forman parte del microexudado (**Imagen 1**). La cantidad de EhLPPG detectada en la superficie de las placas fue mayor a mayor cantidad de amibas cultivadas durante 24 h. Probablemente el EhLPPG también se encuentre en el sobrenadante del cultivo, pero en muy baja cantidad (datos no mostrados).

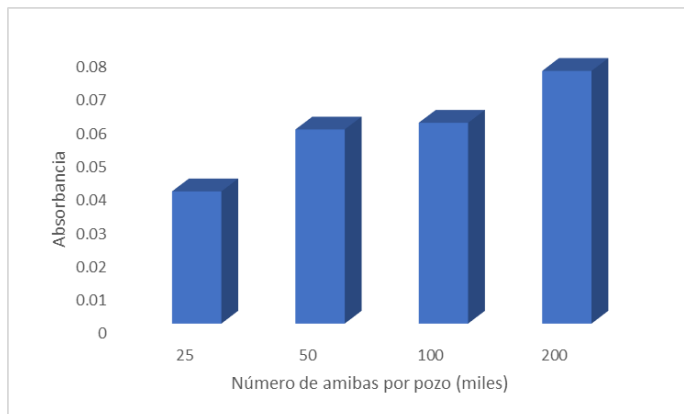


Imagen 1. Detección de EhLPPG en el microexudado de *E. histolytica*. En el eje horizontal se observa el número de amibas por pozo utilizadas para el ensayo y en el eje vertical las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro a 450 nm.

Después de identificar el EhLPPG en el microexudado se prosiguió a determinar si esta molécula se une al LL-37. Se indujeron NETs para buscar la co-localización del EhLPPG con el LL-37, ya que existe el antecedente de que el LL-37 forma parte de estas estructuras [6] y el EhLPPG podría unirse a ellas. Se usó un control sin inductor de NETs (**Imagen 2**), y un control sin el primer anticuerpo (**Imagen 3**) para descartar alguna inespecificidad.

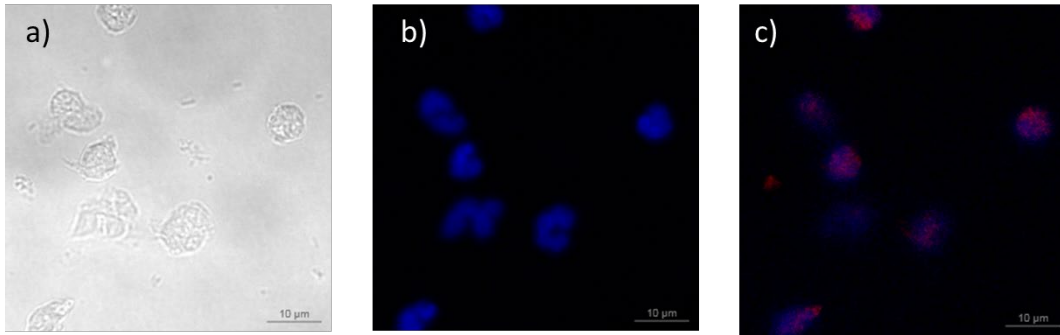


Imagen 2. Tinción del LL-37 en neutrófilos humanos. a) Contraste de fases. b) Neutrófilos con núcleos celulares íntegros, sin liberación de ADN para la formación de NETs, c) LL-37 ubicado en los neutrófilos.

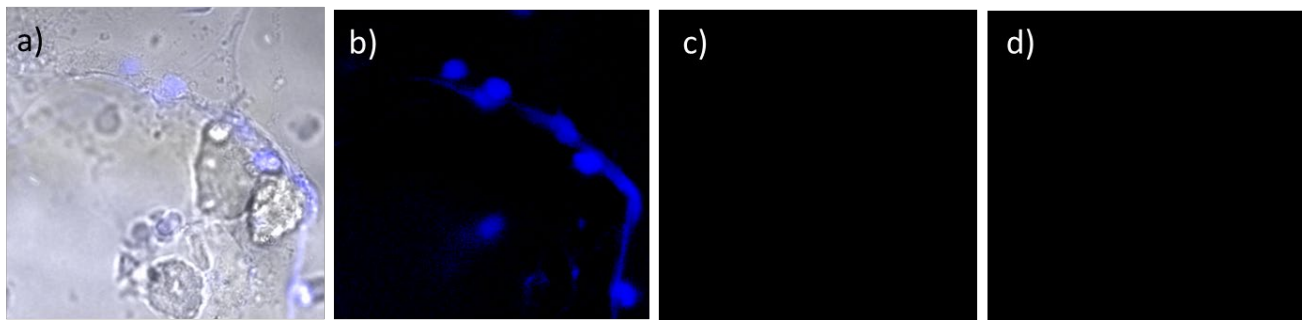


Imagen 3. Control sin anticuerpos primarios. a) Contraste de fases. b) ADN en NETs teñido con Hoechst 33342 (azul). c) Control negativo de LL-37 teñido usando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 594 (rojo). d) Control negativo de EhLPPG teñido usando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína (verde).

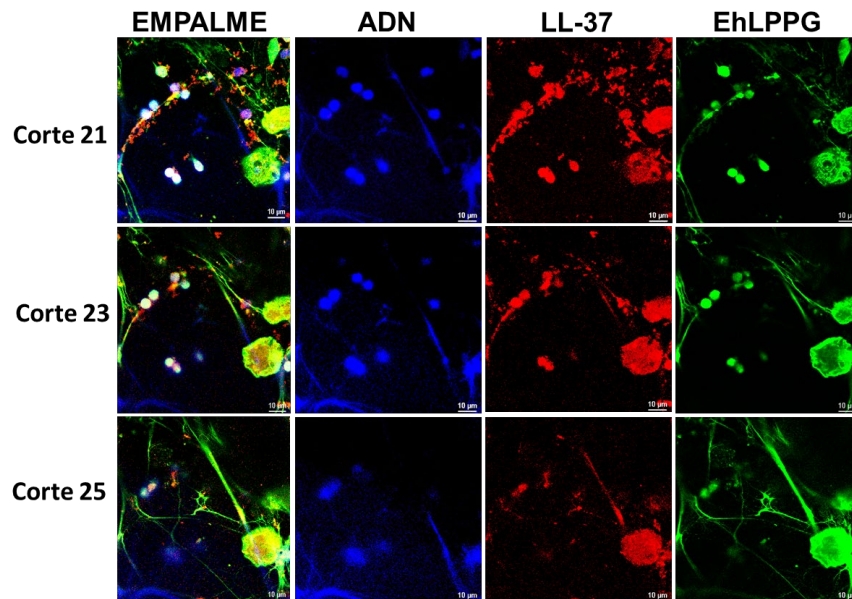


Imagen 4. Localización del LL-37 y el EhLPPG sobre las trampas extracelulares de neutrófilos. ADN en NETs teñido con Hoechst 33342 (azul). LL-37 teñido usando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 594 (rojo). EhLPPG teñido usando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína (verde). Cortes ópticos de 1 μ m.

Por microscopía confocal se observó que en varias regiones de las NETs el EhLPPG (verde) y el LL-37 (rojo) se encontraban en el mismo sitio, ya que al superponerse los colores se observó que coincidían dando por resultado tonos amarillo o naranja (**Imagen 4**).

Sin embargo, no se puede concluir que el EhLPPG se una al LL-37 debido a que son varias las moléculas que forman parte de las NETs y que podrían interactuar con el EhLPPG [4]. Por lo tanto, el EhLPPG se pudo unir al LL-37 y a alguna otra molécula que forme parte de las NETs. Sería interesante realizar el mismo ensayo en búsqueda de interacción del EhLPPG con otros péptidos antimicrobianos.

CONCLUSIONES

El EhLPPG es liberado por *E. histolytica* como parte del microexudado.

El EhLPPG se une a las trampas extracelulares de neutrófilos humanos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional y a la Universidad de Guanajuato por brindarnos la oportunidad de participar en estos proyectos.

REFERENCIAS

1. **Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, Ramírez-Saldívar I, Arriaga-Pizano L et al.** (2010) The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. *BioMed Research International*;2010.
2. **Nakada-Tsukui K, Nozaki T.** (2016) Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*;7:175.
3. **Silva P, Martínez-Palomo A, Gonzalez-Robles A.** (1975) Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. *The Journal of cell biology*;64(3):538-550.
4. **Rico-Mata R, De Leon-Rodríguez LM, Avila EE.** (2013) Effect of antimicrobial peptides derived from human cathelicidin LL-37 on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Experimental parasitology*;133(3):300-306.
5. **Bociek K, Ferluga S, Mardirossian M, Benincasa M, Tossi A et al.** (2015) Lipopolysaccharide Phosphorylation by the WaaY Kinase Affects the Susceptibility of *Escherichia coli* to the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *J Biol Chem*;290(32):19933-19941.
6. **Ávila EE, Salaiza N, Pulido J, Rodríguez MC, Díaz-Godínez C et al.** (2016) *Entamoeba histolytica* trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human neutrophil extracellular traps. *PLoS one*;11(7):e0158979.