

## Proteínas antigénicas de *Acanthamoeba castellanii* implicadas en la adhesión

Antigenic proteins of *Acanthamoeba castellanii* involved in adhesion

José Alberto Juárez Rodríguez<sup>1</sup>, Gloria Barbosa Sabanero<sup>2</sup>, José de Jesús Serrano Luna<sup>3</sup>,  
Lérida Liss Flores Villavicencio<sup>1</sup>, Mineko Shibayama Salas<sup>4</sup>, Myrna Sabanero López<sup>\*</sup>

Juárez Rodríguez, J. A.; Barbosa Sabanero, G.; Serrano Luna, J. J.; Flores Villavicencio, L. L.; Shibayama Salas, M.; Sabanero López, M.,  
Proteínas antigénicas de *Acanthamoeba castellanii* implicadas en la adhesión. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 58, 21-25, 2013.

### RESUMEN

*Acanthamoeba castellanii* es un patógeno oportunista causante de infecciones como queratitis amebiana, encefalitis granulomatosa amebiana crónica e infecciones en la piel. En la actualidad, la acantamoebiosis es un problema en cuyo tratamiento se utilizan fármacos poco selectivos y tóxicos. La capacidad de adherencia de *A. castellanii* a tejidos de las células del hospedero es esencial para el desarrollo de la infección. En este trabajo se analizan las proteínas antigénicas y su papel en la adhesión del parásito a las células. Los resultados muestran mayoritariamente ocho proteínas antigénicas de Mr ≤ 180, 174, 124, 113, 84, 49, 43 y 40kDa, localizadas en la superficie del trofozoíto. Además, los resultados de la interacción parásito-huésped aplicando los anticuerpos policlonales indican una disminución de la adhesión (90%) de los trofozoítos a la célula huésped. Para conocer el mecanismo de infección, es necesario elucidar

**Palabras clave:** *Acanthamoeba castellanii*, proteínas antigénicas, adhesión.

**Keywords:** *Acanthamoeba castellanii*, antigenic proteins, adhesion.

Recibido: 30 de Enero de 2013, aceptado: 7 de Mayo de 2013

<sup>1</sup> Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, campus Guanajuato.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, campus León.

<sup>3</sup> Departamento de Biología Celular, CINVESTAV unidad Zacatenco.

<sup>4</sup> Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV unidad Zacatenco.

\* Autor para correspondencia: myrna.sabanero@gmail.com

la participación de cada una de las moléculas antigénicas en el proceso de adhesión.

### ABSTRACT

*Acanthamoeba castellanii* is an opportunistic pathogen agent causing infections such as keratitis, encephalitis and skin infections. Actually, the acantamoebiosis is a health problem, with unselective and toxic drugs. The adhesion ability of *A. castellanii* by tissues of the host cell is essential to the development of infection. This study analyzes the antigenic proteins and their role in adherence of the parasite to the host cells. The results show eight antigenic proteins of Mr ≤ 180, 174, 124, 113, 84, 49, 43 and 40 kDa, localized in the trophozoite surface. Furthermore the parasite-host interaction assays using polyclonal antibodies, indicating a decrease in adhesion (90%) of the trophozoite to the host cell. However, it is necessary to elucidate the involvement of each of the antigenic molecules in the adhesion process, to understand the mechanism of infection.

### INTRODUCCIÓN

*Acanthamoeba castellanii* es un patógeno oportunista de humanos. En los individuos inmunocompetentes provoca graves infecciones que comprometen órganos como el ojo, el cerebro e infecciones en la piel (Siddiqui y Khan, 2012). La tasa de mortalidad es de 95% en la encefalitis granulomatosa. Los lentes de contacto son considerados el principal factor de riesgo para adquirir la infección (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

La adhesión del patógeno a las células hospederas es un paso crítico en la patogénesis de la infección. El proceso de adhesión depende fundamentalmente de la complementariedad de las moléculas de superficie del parásito con el huésped. La mayoría de los patógenos (protozoarios, hongos, bacterias y virus) expresan factores de superficie que median la unión a los tejidos hospederos y a proteínas de la matriz extracelular (Kerr, 1999). En *A. castellanii* se han caracterizado proteínas relacionadas con la adhesión y virulencia, como la proteína de unión a manosa de 130 kDa expresada en la superficie y la identificación de proteínas citopáticas amebianas con actividad proteolítica (Garate *et al.*, 2005; Hadas y Mazur, 1993). Aún se desconocen los mecanismos implicados en la patogenicidad de la acantamoebiosis, la cual constituye un problema de salud en el que se aplican fármacos poco selectivos y tóxicos.

En el presente trabajo se identifican en *A. castellanii* a las proteínas con mayor capacidad antigénica. Se postula que estas proteínas están involucradas en la fisiopatología del parásito y pueden ser blancos terapéuticos que pueden inhibir la adherencia. En ese sentido, serán útiles en el desarrollo de fármacos específicos y alternativamente pueden ser útiles en la detección temprana de la infección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo y cultivo celular

Los trofozoítos *A. castellanii* fueron aislados de un paciente humano con queratitis por el doctor Simon Kilvington (*Public Health Laboratory, Bath, England*); la cepa que se trabaja en este estudio fue donada por la doctora Mineko Shibayama del Departamento de Patogénesis e Infectómica del CINVESTAV. Los trofozoítos fueron cultivados en medio de Chang (Chang, 1971) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se incubaron a 30 °C por 32 h.

Los cultivos de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1) se efectuaron en medio D-MEM con 10% de SFB. Se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta obtener una monocapa con un 70-80% de confluencia.

### Anticuerpos policlonales

Se preparó el antígeno adicionando a los trofozoítos SDS al 2% y adyuvante completo para la pri-

mera inmunización, las siguientes inmunizaciones se efectuaron utilizando adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Antes de las inmunizaciones se colectó el suero preinmune y posteriormente, el antígeno se administró a conejos Nueva Zelanda vía intramuscular, siguiendo los métodos clásicos para la generación de anticuerpos (Coons *et al.*, 1955), los cuales fueron titulados por ensayo de ELISA (Dynatech 5000) a 450nm (Leher *et al.*, 1998).

### Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se efectuó después del fijado de los trofozoítos (Noriega *et al.*, 2011), se expusieron a los anticuerpos policlonales (dilución 1:200) y después del segundo anticuerpo cabra anti-conejo-FITC (dilución 1:2000), las preparaciones se montaron en Vectashield Mounting Medium with DAPI y se observaron a 450-490nm en un microscopio de epifluorescencia (Leica DMLS).

### Western blot

La identificación de proteínas antigénicas de *A. castellanii* por los anticuerpos policlonales se determinó por Western blot (Towbin *et al.*, 1979). Las proteínas de los trofozoítos se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Después, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se expusieron a los anticuerpos anti *Acanthamoeba* (1:2000), y a un anticuerpo secundario unido a peroxidasa (1:2000) durante 1h. Las bandas reactivas se revelaron colorimétricamente utilizando diaminobenzidina.

### Ensayos de inhibición de la adhesión huésped-parásito

Se cultivaron células de fibroblastos (ATCC L929) a una confluencia del 80%. Por otro lado, se incubaron 2x10<sup>5</sup> trofozoítos con 50µl de anticuerpos policlonales durante una hora. Después, se adicionaron a la monocapa de fibroblastos y se incubaron durante 15, 30 y 60 min a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. Los trofozoítos no unidos se contaron en una cámara de Neubauer y el porcentaje de trofozoítos no adheridos se calculó con la ecuación: (trofozoítos no adheridos)/(trofozoítos totales) X 100. El porcentaje de trofozoítos adheridos se calculó restando 100 - (el porcentaje de trofozoítos no adheridos).

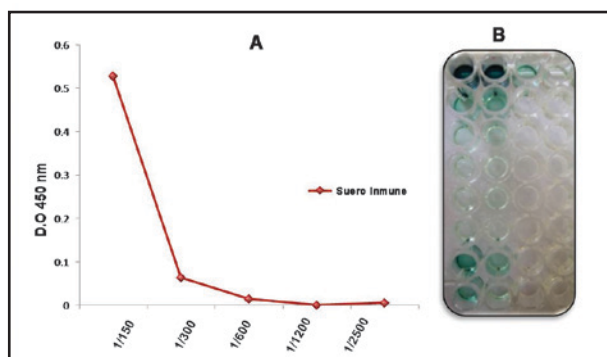
### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron aplicando una t- student y los valores representan el promedio ± SD, n=3. \*p<0.05.

## RESULTADOS

### Distribución e identificación de los antígenos de *A. castellanii*

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos policlonales anti- *A. castellanii* mediante ensayo de ELISA (Figura 1). Los resultados muestran que los anticuerpos presentan títulos de 1:1250 a 1:2500.



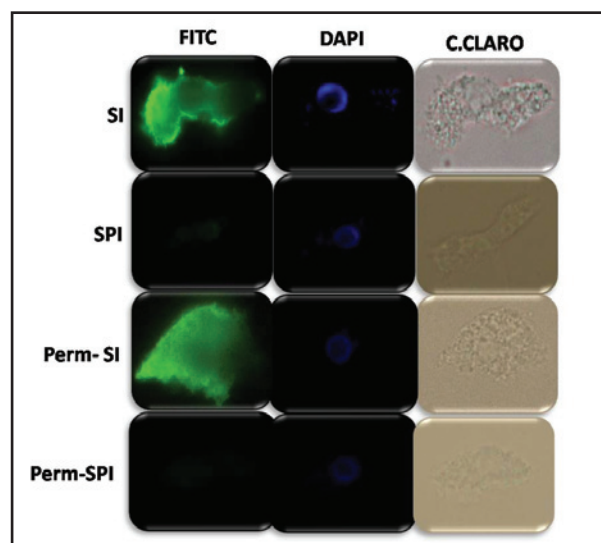
**Figura 1.** Titulación de los anticuerpos policlonales anti- *A. castellanii*. **A.** Cuantificación de los antígenos por ensayo ELISA. **B.** Placa tipo ELISA donde se observa colorimétricamente la reactividad antígeno-anticuerpo de las diferentes diluciones.

Se determinó la distribución de los antígenos de *A. castellanii* por inmunofluorescencia (Figura 2). Los resultados muestran la fluorescencia en la región cortical de la membrana, e indican que las proteínas antigénicas se localizan en la superficie de los trofozoítos sin permeabilizar (SI) y permeabilizados (Perm-SI). Ensayos similares que utilizan suero preinmune, tanto en preparaciones sin permeabilizar (SPI) como en permeabilizadas (Perm-SPI), no presentan fluorescencia.

Los resultados del análisis electroforético (Figura 3A) muestran los diferentes perfiles de proteínas en los trofozoítos (carril HT) y en la fracción mixta de membranas (carril FMM). Los ensayos tipo Western blot (Figura 3C) indican que los anticuerpos reconocen en el HT proteínas con movilidad relativa ( $M_r$ ) de: 210, 180, 174, 124, 113, 84, 78, 70, 49, 43, 40, 28 kDa como proteínas de mayor antigenicidad. Un patrón similar muestran las FMM con proteínas adicionales de  $M_r$  de: 180, 174, 124, 113, 84, 49, 43 y 40 kDa. Los ensayos con el suero preinmune (Figura 3D) no detectan ninguna proteína.

### Inhibición de la adhesión del parásito a células epiteliales por los anticuerpos anti- *A. castellanii*

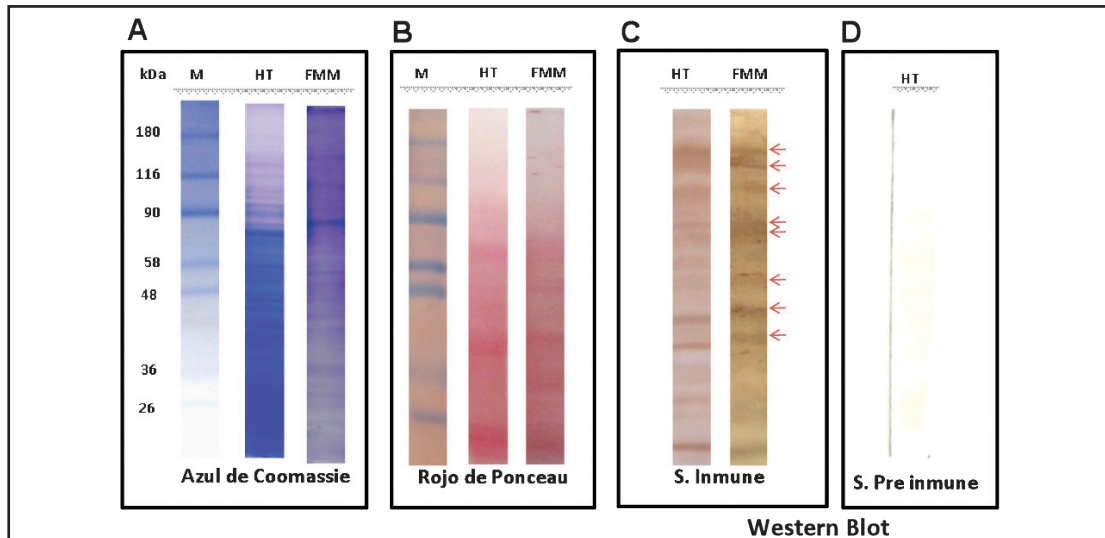
Para determinar el efecto de los anticuerpos policlonales sobre la inhibición de la adhesión de los trofozoítos de *A. castellanii* a los fibroblastos, se utilizaron ensayos de interacción *A. castellanii* – fibroblastos (Figura 4). Los resultados indican que los trofozoítos tratados con los anticuerpos (SI) inhiben en un 90% la adhesión a los fibroblastos. Ensayos similares con suero preinmune (SPI) y sólo trofozoítos (TROF) fueron utilizados como control.



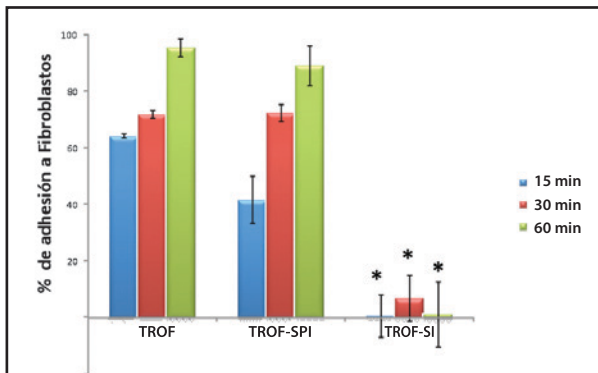
**Figura 2.** Localización de los antígenos anti- *Acanthamoeba castellanii*. Trofozoítos expuestos a sondas fluorescentes para determinar la distribución de los antígenos reconocidos por los anticuerpos anti- *A. castellanii*, en preparaciones sin permeabilizar (SI) y permeabilizadas (Perm-SI). Como control se utilizó suero pre inmune (SPI) y Perm-SPI. El núcleo de los trofozoítos se tiñó con DAPI y se muestran los trofozoítos en campo claro.

## DISCUSIÓN

*A. castellanii* es una ameba de vida libre que produce infecciones como queratitis amebiana, encefalitis granulomatosa amebiana e infecciones en la piel. Con el aumento de personas inmunocomprometidas y enfermedades crónicas es razonable predecir el aumento de infecciones causadas por este microorganismo (Visvesvara *et al.*, 2007). En la actualidad, no se cuenta con un método de diagnóstico efectivo para identificar estas infecciones y es necesario investigar y comprender los mecanismos moleculares básicos de las interacciones huésped-parásito.



**Figura 3.** Identificación de los antígenos mayoritarios de *A. castellanii*. **A.** M) Marcadores de peso molecular, HT) Perfiles proteicos de homogenado total y FMM) Fracción mixta de membranas de trofozoítos de *A. castellanii* teñido con azul de Coomassie. **B.** M) Marcadores de peso molecular, HT) Perfiles proteicos de homogenado total y FMM) Fracción mixta de membranas de trofozoítos de *A. castellanii* electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. **C.** HT) Antígenos mayoritarios de homogenado total y FMM) Fracción mixta de membranas, reveladas con diaminobenzidina. **D.** HT) Perfil proteico de homogenado total incubado con suero preinmune (control).



**Figura 4.** Efecto de los anticuerpos anti- *A. castellanii* sobre la adherencia de los trofozoítos. Los trofozoítos fueron tratados con suero preinmune (TROF-SPI) y suero inmune anti- *A. castellanii* (TROF-SI), después se realizó la interacción con los fibroblastos (15, 30 y 60min). Los valores representan el promedio  $\pm$  SD, n=3. \*p<0.05.

Con el propósito de contar con una herramienta para estudiar la patogénesis de la infección por *A. castellanii*, se generaron anticuerpos policlonales anti- *A. castellanii* y se identificaron los antígenos que podrían estar implicados en el desarrollo de la infección. Los resultados muestran que los anticuerpos reconocen proteínas en la superficie de los trofozoítos de *A. castellanii*, esto

sugiere que dichas proteínas pueden estar involucradas en la adhesión del parásito al huésped (Hauck, 2002 Kerr; 1999).

En una fracción mixta de membranas (FMM), los anticuerpos anti- *A. castellanii* revelan proteínas con movilidad relativa ( $M_r$ )  $\geq 180$ , 174, 124, 113, 84, 49, 43 y 40kDa, lo que indica que estas proteínas antigénicas son de superficie celular. Existen reportes de la caracterización de una proteína de unión a manosa (MBP) (130kDa), reportada como una posible adhesina (Garate *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha propuesto otra proteína de adhesión distinta a la MBP (Kennett *et al.*, 1999). Además, se han descrito dos proteínas de unión a laminina (40 y 55kDa), las cuales fueron identificadas por su afinidad a las proteínas que conforman la matriz extracelular del huésped (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). No obstante, desconocemos si las proteínas antigénicas mayoritarias son receptoras de unión a manosa o laminina, pero es posible que existan otras moléculas de la superficie celular de *A. castellanii* que participan en la patogénesis de la infección, por lo que no se descarta que las proteínas antigénicas identificadas en este proyecto sean parte del repertorio de proteínas ya descritas y nuevas proteínas que también podrían participar en la fisiopatología.



Finalmente, exploramos la fisiología de los anticuerpos anti- *A. castellanii* para conocer si estas proteínas antigénicas están implicadas en la patogénesis de la infección. Para ello se desarrollaron ensayos de inhibición de la adhesión de los trofozoítos previamente expuestos a los anticuerpos en interacción con los fibroblastos. Los resultados indican 90% de inhibición de la adhesión. Ensayos reportados en la ameba de vida libre *Balamuthia mandrillaris* donde se exponen con sueros de individuos sanos, sólo se obtuvo un 50% de inhibición de la adhesión (Matin *et al.*, 2007), incluso cuando se prueba un anticuerpo monoclonal de la proteína de unión

a manosa de *Acanthamoeba* sólo inhibe 52% (Garate *et al.*, 2005). Se sugiere que las proteínas antigénicas *A. castellanii* identificadas en este trabajo están implicadas en la adherencia del hospedero durante el inicio de la infección.

## CONCLUSIONES

Se identificaron las proteínas más antigénicas que están relacionadas con la adhesión y consecuentemente, con la infección en el ser humano. Los anticuerpos obtenidos serán una valiosa herramienta para el estudio de la acantamoebiosis.

## LITERATURA CITADA

- CHANG, S., Small, free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis, and resistance. *Current Topics on Comparative Pathobiology*, 1: 201-254, 1971.
- COONS, A., LEDUC, E., CONNOLLY, J., Studies on antibody production: a method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *The Journal of Experimental Medicine*, 102: 49-60, 1955.
- GARATE, M., CUBILLOS, I., MARCHANT, J., PANJWANI, N., Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. *Journal: Infection and Immunity*, 73: 5775-5781, 2005.
- HADAS, E., MAZUR, T., Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Tropical Medicine And Parasitology*, 44: 197-200, 1993.
- HAUCK, C., Cell adhesion receptors—signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Medical Microbiology and Immunology*, 191: 55-62, 2002.
- KENNETT, M. J., HOOK, R. R., FRANKLIN, C. L., RILEY, L. K., *Acanthamoeba castellanii*: characterization of an adhesin molecule. *Experimental Parasitology*, 92: 161-169, 1999.
- KERR, J., Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defense against microbial infection. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 220-230, 1999.
- LEHER, H., ALIZADEH, H., TAYLOR, W., SHEA, A., SILVANY, R., VAN KLINK, F., JAGER, M., NIEDERKORN, J., Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39: 2666-2673, 1998.
- MARCIANO-CABRAL, F., CABRAL, G. A., *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 273-307, 2003.
- MATIN, A., RYOUL JEONG, S., STINS, M., KHAN, N. A., Effects of human serum on *Balamuthia mandrillaris* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 30-35, 2007.
- NORIEGA, L., SOSA, A., SABANERO, L., ÁVILA, M., Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stage of growth. *Micron*, 42: 600-607, 2011.
- ROCHA-AZEVEDO, B., JAMERSON, M., CABRAL, G., SILVA-FILHO, F., MARCIANO-CABRAL, F., *Acanthamoeba* interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56: 270-278, 2009.
- SIDDIQUI, R., KHAN, N. A., Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5: 6, 2012.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, 76: 4350-4354, 1979.
- VISVESVARA, G., MOURA, H., SCHUSTER, F., Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50: 1-26, 2007.