



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

**SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON ANTICUERPOS ANTI-
ACANTHAMOEBA CASTELLANII: PARA SU DETECCIÓN EN MUESTRAS DE INTERÉS
CLÍNICO**

Parra Murillo Silvia¹, Cardoso-Ávila Pablo², Huerta-Franco María Raquel³, Sabanero-López Myrna¹,
Pichardo-Molina Juan Luis², Barbosa-Sabanero Gloria⁴.

¹División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. silviapa_82@hotmail.com

²Centro de Investigaciones en Óptica, jpichardo@cio.mx, pecardoso@cio.mx

³Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo, Universidad de Guanajuato.

⁴Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato.
gloriabs70@hotmail.com

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.

Acanthamoeba castellanii es el agente causal de una enfermedad que ponen en peligro la vista, la queratitis amebiana. Esta infección ocular es reconocida como una de las enfermedades parasitarias oculares más difíciles y graves. Su diagnóstico no es efectivo, ya que los métodos empleados son invasivos, lentos, algunos de alto costo y poco específicos. De ahí la necesidad de contar con metodologías alternativas que permitan un método diagnóstico eficiente y competente ante los ya existentes

OBJETIVO:

Síntesis y funcionalización de nanopartículas metálicas usando anticuerpos específicos anti-*A. castellanii*, para evaluar su reconocimiento *in vitro*.

METODOLOGÍA:

La obtención de anticuerpos anti-*A. castellanii* (Ac), se realizó usando como antígeno proteína total del parásito (100ug), la cual fue inmunizada a conejos mediante protocolos estándar. Se sintetizaron nanopartículas (NPs) de oro, por el método de reducción química, y se modificó la superficie con citrato y Albumina Sérica Bovina (BSA). Las NPs se bio-funcionalizaron con los Ac en relación 1:10 v/v, generando conjugados NPs-anticuerpos (NPs-Ac). El complejo fue caracterizado por medio de espectroscopía de absorción UV-Vis (540 nm) y se probó mediante ELISA el reconocimiento de los complejos NPs-Ac contra antígenos de *A. castellanii* (25ug/ml).

RESULTADOS:

Los resultados muestran que los conjugados NPs-Ac son capaces de reconocer los antígenos de *A. castellanii in vitro* en un título de 1:200. Este reconocimiento se mantiene en el mismo título para dos diferentes lotes de antígenos. Al probar los complejos NPs-Ac el día de su preparación y comparar con los complejos sintetizados dos semanas previas, se observó que disminuye el reconocimiento.

CONCLUSIONES:

La metodología desarrollada permitió la síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro usando anticuerpos específicos anti-*A. castellanii* y se mostró su capacidad de reconocimiento *in vitro*. Lo que permite proponerlos como conjugados con potencial aplicación en la detección del patógeno en muestras de interés clínico.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 5, 6 y 7 de junio de 2014 TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

ANTECEDENTES

El género *Acanthamoeba* comprende un grupo de amibas de vida libre, con una amplia distribución alrededor del mundo. *Acanthamoeba castellanii* es el agente causal de una enfermedad que ponen en peligro la vista, la queratitis amebiana. Esta infección ocular es reconocida como una de las enfermedades parasitarias oculares más difíciles y graves (Narasimhan y cols., 2002). Actualmente su diagnóstico no es efectivo, ya que los métodos empleados son invasivos, lentos, algunos de alto costo y poco específicos.

El uso de anticuerpos permiten la detección de diversos patógenos (Sendid y col., 2002). En este sentido, la obtención de anticuerpos dirigidos contra los trofozoítos de especies patógenas de *Acanthamoeba* como *A. castellanii*, es importante en la implementación de metodologías que logren un diagnóstico oportuno el cual se reflejara en el desarrollo de terapias específicas y exitosas contra las infecciones causadas por estos protozoos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Síntesis y funcionalización de nanopartículas metálicas usando anticuerpos específicos anti-*Acanthamoeba castellanii*, para su aplicación en la detección del patógeno en muestras de interés clínico.

Objetivos Específicos

- 1) Desarrollar anticuerpos contra diferentes fracciones de *Acanthamoeba castellanii*
- 2) Sintetizar nanopartículas metálicas de oro y plata
- 3) Funcionalización de nanopartículas metálicas con anticuerpos anti-*A. castellanii*
- 4) Evaluar la capacidad de reconocimiento en las fracciones obtenidas de *Acanthamoeba castellanii*.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Cultivo de trofozoítos de *A. castellanii*. Trofozoítos de *A. castellanii* aislados de pacientes humanos con queratitis fueron donados por la Dra. Mineko Shibayama (CINVESTAV-IPN, Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular). Se estableció un cultivo axénico de amebas en medio Chang adicionado con 10% suero fetal bovino (Gibco). Los trofozoítos se cultivan hasta el final de la fase logarítmica (72 h) a 30°C en botellas de cultivo de 50mL (Corning), según el método de Rivera y col. (1984).

Obtención de Fracciones celulares de *A. castellanii*. A partir de estos cultivos se prepararon homogenados totales adicionando a la pastilla celular un coctel de inhibidores de proteasas y amortiguador con 2mM EGTA, 150mM NaCl, 2% SDS y se aplicaron veinte golpes en un homogenizador Potter en baño de hielo, después se centrifuga a 2000rpm, el sobrenadante fue la fracción donde se realizaron los ensayos.

Obtención de anticuerpos policlonales contra *A. castellanii*. La obtención de los anticuerpos, se realizó en conejos Nueva Zelanda de 700 g. Previo a la inmunización de los conejos, se obtuvo suero mediante un corte en la vena marginal de la oreja. Este suero pre-inmune sirve como control para descartar la presencia de anticuerpos contra *A. castellanii* antes de la inmunización. Como antígeno se empleó el homogenado total de *A. castellanii* (100µg), preparados con adyuvante



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 5, 6 y 7 de junio de 2014 TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

completo e incompleto de Freud, se inyectaron en los conejos vía intramuscular. Se realizaron cuatro periodos de inmunización con intervalos de quince días según el método de Zola (1990), al término se obtuvo el suero inmune conteniendo los anticuerpos contra *A. castellanii*. La presencia de anticuerpos en el suero inmune del conejo se tituló por ensayos de ELISA.

Síntesis y funcionalización de nanopartículas metálicas. Se empleó el método de reducción química en la preparación de soluciones coloidales, la gran ventaja que este método ofrece sobre otros métodos es la rapidez, sencillez y bajo costo de preparación. Nuestro grupo de investigación cuenta con experiencia en síntesis nano-partículas metálicas coloidales, actualmente fabricamos nano-partículas de diversas morfologías con gran reproducibilidad (Sánchez-Hernández, 2011; Cardoso-Ávila, 2011).

Bio-funcionalización de las nanopartículas con anticuerpos. Primeramente se procedió a modificar la superficie de las nanopartículas con la finalidad de aumentar su estabilidad ante condiciones de medio ambiente (temperatura, pH, etc.), y la bio-funcionalización mediante el uso de anticuerpos anti-*A. castellanii*. Las nanopartículas se recubrieron con citrato de sodio el cual deja a la partícula cargada negativamente y expuesta en su superficie por el grupo funcional carboxilo (Vasudevanpillai, 2014), permitiendo así realizar la funcionalización, mediante la preparación de nanopartículas y anticuerpos en una relación 1:10 v/v las que se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar el exceso de anticuerpo no unido y la pastilla resultante se resuspendió en PBS 0.25 mM, resultado un conjugado nanopartícula-anticuerpo (NPs-Ac). La caracterización óptica de las nanopartículas funcionalizadas (NPs-Ac), se realizó mediante espectroscopía de absorción UV-Vis (400-700 nm), así como por electroforesis en geles de agarosa al 0.5% para determinar el grado de movilidad de las partículas y la carga eléctrica que éstas adquieren en su superficie. También se realizó TEM (Microscopía de Transmisión Electrónica) para determinar el tamaño y forma geométrica de las partículas.

Evaluación del reconocimiento de fracciones celulares de *A. castellanii* con las nanopartículas funcionalizadas. Se realizó la detección de antígenos de *A. castellanii* en homogenado celular por el método de ELISA empleando 25µg/ml de las fracciones celulares de *A. castellanii*. Se incubó durante 24 h a 4°C en una microplaca de ELISA. Posteriormente se bloquea con gelatina (0.2% en PBS) durante 2 h. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubó durante 90 min usando como anticuerpo primario los conjugados NPs-Ac (se evaluaron diferentes diluciones). Posteriormente se realizaron tres lavados para retirar el conjugado no unido. Después, se adicionó Silver enhancement (INVITROGEN) en cada uno de los pozos (50µl), excepto en el blanco y se incubó durante 10 min a 37°C y 7 min a temperatura ambiente (Sánchez-Hernández, 2011). La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 540nm.

RESULTADOS.

Usando como antígeno la proteína total del parásito (homogenado), se logró la obtención de anticuerpos anti-*A. castellanii* en conejos. El antígeno fue inmunizado a los animales de experimentación mediante protocolos estándar. Se probó el reconocimiento de los anticuerpos (Ac) hacia antígenos parasitarios, mostrando un título de 1:200.

Asimismo, se sintetizaron nanopartículas (NPs) de oro recubiertas con citrato, las cuales fueron modificadas en su superficie con Albumina Sérica Bovina (BSA) y un aminoácido, en este caso cisteína usando el método reportado por nuestro grupo de investigación (Sánchez-Hernández,



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

2011; Cardoso-Ávila, 2011). Esto último con la finalidad de proceder a realizar la correspondiente funcionalización.

Finalmente se procedió a bio-funcionalizar las nanopartículas con anticuerpos anti-*A. castellanii* obtenidos previamente, generando conjugados NPs-anticuerpos (anti-*A. castellanii*) (NPs-Ac). El complejo fue caracterizado por medio de espectroscopia de absorción UV-Vis (540 nm).

Una vez concluida la funcionalización se procedió a probar el reconocimiento de los complejos NPs-Ac. Los resultados actuales muestran que los conjugados NPs-Ac son capaces de reconocer los antígenos de *A. castellanii in vitro*, en la Figura 1 se muestran las curvas del reconocimiento para diferentes concentraciones de anticuerpos. El reconocimiento se evaluó para dos diferentes lotes de antígenos HT1 y HT2. Para la prueba se evaluaron las NPs-Ac el mismo día de su preparación usando ambos lotes, así como dos semanas después de su preparación, esto último para determinar la estabilidad de la funcionalización.

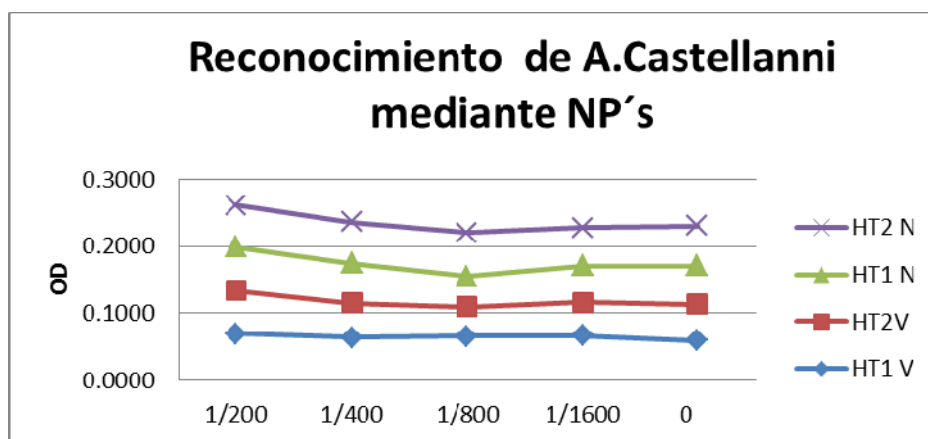


Fig.1. Curvas de reconocimiento de antígenos de *A. castellanii*

CONCLUSIONES

La metodología desarrollada permitió la síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro usando anticuerpos específicos anti-*Acanthamoeba castellanii*. Los complejos nanopartículas-Ac (NPs-Ac) mostraron la capacidad de reconocer antígenos de *A. castellanii in vitro* y permiten considerarlos con utilidad potencial para su aplicación en la detección del patógeno en muestras de interés clínico.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD
5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

BIBLIOGRAFÍA

1. Narasimhan S, Madhavan H, Therese L. Development and application of an *in vitro* susceptibility test for *Acanthamoeba* species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. *Cornea* 2002, 21, 203–205.
2. Sendid, B., Poirot, J.L., Tabouret, M., Bonnin, A., Caillot, D., Camus, D., Poulain, D. 2002. Combined detection of mannanaemia and anti-mannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* 51: 433–442.
3. Zola H. 1990. *Laboratory Methods in Immunology* vol.II. CRC Press. Inc.
4. Sánchez-Hernández María Teresa. 2011. Producción de AGEs y funcionalización de nanopartículas con anticuerpos anti-AGEs: aplicación para su detección en muestras biológicas y alimentos Tesis de Maestría. Departamento de Ciencias Médicas. División de Ciencias de la Salud, Campus león. Universidad de Guanajuato.
5. Cardoso-Avila PE, Pichardo-Molina J L, Upendra KK, Barbosa-Sabanero G, Barbosa-Garcia O. Gold nanoparticles surface modification using BSA and cysteine *Proc. SPIE* 2011, 8011. doi: 10.1117/12.903279
6. Vasudevanpillai B. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 744-7.