

MEJORAMIENTO DE LA SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON ANTICUERPOS ANTI- *Acanthamoeba castellanii*

López-Aguilar Cristal Azucena¹. Huerta-Franco María Raque². Sabanero-López Myrna¹. Pichardo-Molina Juan Luis³ Barbosa-Sabanero Gloria⁴.

¹Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato.

²Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo, Universidad de Guanajuato.

³Centro de investigaciones en óptica.

⁴Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud. Campus León. Universidad de Guanajuato.

RESUMEN

Acanthamoeba castellanii es un parásito de vida libre y el agente causal de infecciones como queratitis amebiana detectada en pacientes inmunocomprometidos y en pacientes sanos que utilizan lentes de contacto, por lo que hay una necesidad de ser conscientes ante los riesgos asociados al utilizarlos, lo que implica contar con nuevas metodologías no invasivas para un diagnóstico oportuno y eficaz. El mejoramiento de la síntesis y funcionalización de nanopartículas para el acoplamiento con anticuerpos anti-*A. castellanii* que previamente logró nuestro grupo de trabajo, es un método propuesto para evaluar el reconocimiento de este patógeno *in vitro*. Se efectuaron cultivos de los trofozoítos de *A. castellanii* para la obtención de fracciones celulares e inmunizar conejos de raza Nueva Zelanda para así obtener anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos fueron acoplados a las nanopartículas metálicas previamente sintetizadas y funcionalizadas al exponerlas a aminoácidos ricos en residuos SH, tales como la cisteamina. Tras varias síntesis se obtuvieron nanopartículas de oro estabilizadas con BSA, nanomaterial que se caracterizó y fue la base para los ensayos del reconocimiento inmunológico del parásito. Los anticuerpos producidos anti-*A. castellanii* al ser acoplados con las nanopartículas previamente sintetizadas y funcionalizadas presentaron una mayor capacidad de reconocimiento específico para los antígenos de *A. castellanii* en los ensayos inmunológicos aumentando así la sensibilidad del método. Se realizó la caracterización de las nanopartículas y del complejo utilizando técnicas de espectroscopía de absorción UV-VIS, por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y por electroforesis en geles de agarosa. A diferencia de trabajos previos, en el que la síntesis y la funcionalización de nanopartículas se realizaban de dos etapas. En el presente trabajo se logró funcionalizar la superficie de las nanopartículas durante el mismo proceso de síntesis. Concluimos que se tiene una metodología simple para la preparación de nanopartículas, la cual le proporciona más estabilidad, evitando su degradación y permitiendo su acoplamiento con el anticuerpo anti-*A. castellanii*. Además los complejos nanopartículas-anticuerpos permiten el reconocimiento de fracciones amebianas *in vitro*.

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.

OBJETIVO

Mejoramiento de la síntesis y funcionalización de nanopartículas para el acoplamiento con anticuerpos anti- *A. castellanii*, para evaluar su reconocimiento *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener anticuerpos contra *Acanthamoeba castellanii*.
- 2) Sintetizar y funcionalizar nanopartículas de oro con anticuerpos anti- *A. castellanii*.
- 3) Evitar la degradación de las nanopartículas funcionalizadas.

METODOS

Cultivo de trofozoítos de *A. castellanii*.

Los 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 2 mM EGTA, 150 mM NaCl, 2% SDS y se aplicaron veinte golpes en un homogenizador Potter en baño de hielo, después se centrifuga a 2000 rpm, 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 800 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 completo e incompleto de Freud, se inyectaron en los conejos vía intramuscular. Se realizaron cuatro inmunizaciones 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 para su reconocimiento contra antígenos de *A. castellanii* por ensayos de ELISA.

Síntesis y funcionalización de nanopartículas metálicas.

Se empleó el método de reducción química en la preparación de soluciones coloidales, utilizando Ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) y Borohidruro de sodio (NaBH_4), posteriormente se recubrió con cistamina y se añadió BSA al 10 % con la finalidad de aumentar su estabilidad ante condiciones de medio ambiente (temperatura, pH, etc.). La gran ventaja que este método ofrece sobre otros métodos es la rapidez, sencillez y bajo costo de preparación.

Biofuncionalización mediante el uso de anticuerpos anti- *A. castellanii*.

Las nanopartículas de oro se recubrieron con cisteamina y BSA obteniendo una molécula cargada negativamente y en su superficie expuesto el grupo funcional amino, permitiendo así la unión con los anticuerpos en una relación 1:10 v/v, las cuales fueron 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 complejo nanopartícula-anticuerpo (NP-Ac). La caracterización óptica del complejo (NP-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 la caracterización por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) 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 25 µg/mL de las fracciones celulares de *A. castellanii*. Se incubó durante 24 h a 4 °C en una placa 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 1 h usando como anticuerpo primario el complejo NP-Ac (se evaluaron diferentes diluciones). Posteriormente se realizaron tres lavados para retirar el conjugado no unido, para enseguida adicionar Silver enhancement (INVITROGEN) en cada uno de los pozos (50 µl), excepto en el blanco y se incubó durante 10 min a 37 °C y 7 min a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 540 nm.

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 una densidad óptica óptima de 0.06.

Asimismo, se sintetizaron nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina y Albumina Sérica Bovina (BSA) para biofuncionalizarse con los anticuerpos anti-*A. castellanii* obtenidos previamente, generando un complejo nanopartícula-anticuerpo (NP-Ac). El complejo fue caracterizado por medio de espectroscopía de absorción UV-Vis y TEM (Figura 1). Una vez concluida la funcionalización se procedió a probar el reconocimiento del complejo NP-Ac hacia las fracciones amebianas. Los resultados actuales muestran que el complejo fue capaz de reconocer los antígenos de *A. castellanii in vitro*. En la Figura 2 se muestran el reconocimiento para diferentes concentraciones de anticuerpos, se evaluó para dos diferentes lotes de antígenos HT1 y HT2, mostrando un reconocimiento mayor de un orden de magnitud, haciendo más sensible el método.

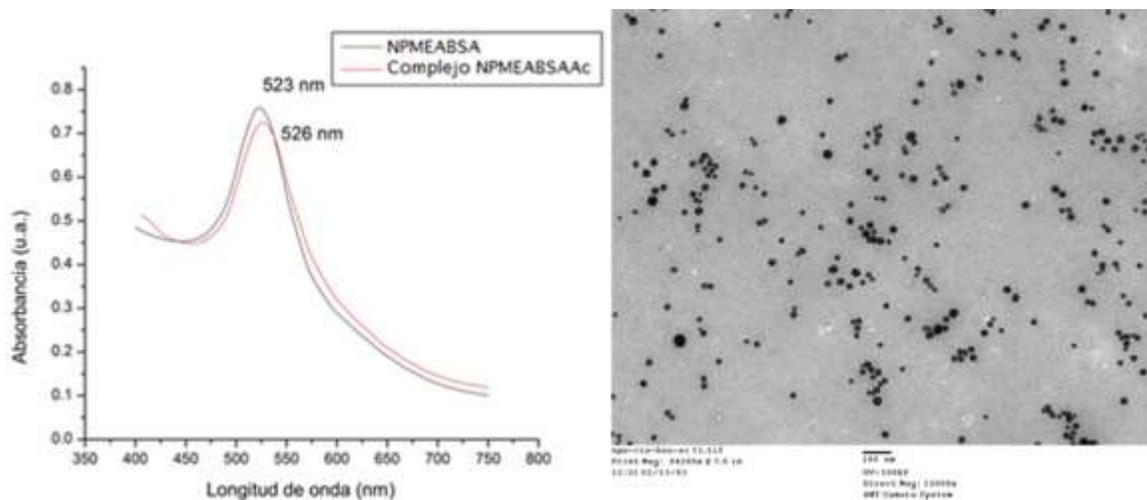


Figura 1. Caracterización del complejo (NP-Ac) por espectroscopía de absorción y TEM.

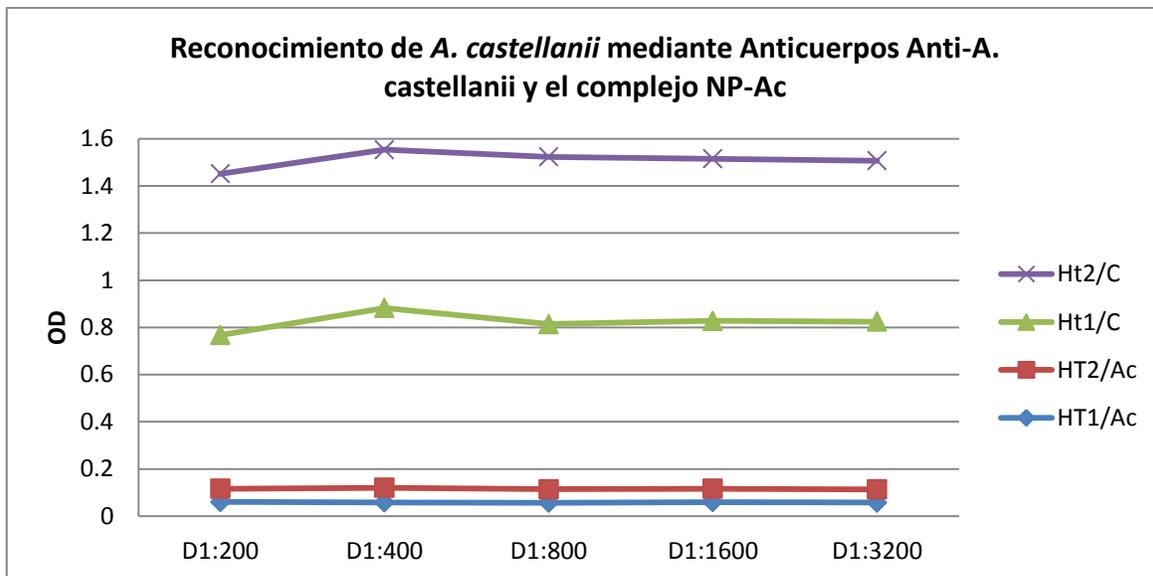


Figura 2. Reconocimiento del primer lote de homogenado con el anticuerpo (HT1/Ac, línea azul). Reconocimiento del segundo lote de homogenado con el anticuerpo (HT2/Ac, línea roja). Reconocimiento del primer lote de homogenado con el complejo NP-Ac (HT1/C, línea verde). Reconocimiento del segundo lote de homogenado con el complejo NP-Ac (HT2/C, línea violeta).

CONCLUSIÓN

El uso de la proteína BSA en la síntesis de nanopartículas de oro recubiertas con cisteamina mejoró la estabilidad con respecto al tiempo, factor importante al momento de la conjugación con los anticuerpos anti- *A. castellanii* aumentando la sensibilidad por el reconocimiento del trofozoíto *in vitro*. Esta metodología permitió que el proceso de síntesis y la funcionalización de las nanopartículas se realizara en una sola etapa haciendo el proceso de producción más sencillo a diferencia de trabajos previos. Con esta nueva metodología podemos generar nanopartículas para probar su capacidad de detección en muestras biológicas con sospecha de la presencia de *A. castellanii*, posibilitando tener alternativas útiles para diagnósticos oportunos y no invasivos en la detección de *Acanthamoeba castellanii*.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto apoyado en la Convocatoria Universidad de Guanajuato-Centro de Investigaciones en Óptica-2014.

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. M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin and C. Kiely, Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995 ; 16: 1655-1656
5. Wangoo, N. et al., 2008. Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: bioconjugation and binding studies. *Journal of colloid and interface science*, 323(2), pp.247–54