

RECONOCIMIENTO DE TROFOZOÍTOS DE *E. HISTOLYTICA* UTILIZANDO APTÁMEROS DE DNA

Alondra Cisneros-Sarabia^a, Juan David Ospina-Villa^b, Esther Ramírez-Moreno^a, Gregorio A. Mancilla-Martínez^a, Laurence A. Marchat^a

^a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México

acisneross1903@alumno.ipn.mx, maramirezmo@ipn.mx
gmancillam1500@alumno.ipn.mx, lmarchat@ipn.mx

^b Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Antioquia, Colombia
jospina@ces.edu

RESUMEN

Las limitantes existentes en el diagnóstico de la amibiasis intestinal causada por *Entamoeba histolytica*, evidencian la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para detectar al parásito. Los aptámeros (secuencias de DNA o RNA de cadena sencilla) representan una herramienta novedosa y de bajo costo para el reconocimiento de proteínas y otros tipos de blancos, por lo que pueden utilizarse para el tratamiento o diagnóstico de diversas enfermedades. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue obtener aptámeros de DNA que reconozcan a los trofozoítos de *E. histolytica*. En este estudio, se realizó la estrategia Bio-SELEX para la obtención de aptámeros de DNA dirigidos contra las proteínas de membrana de *E. histolytica* y se empleó la técnica de *Dot Blot* para su validación. Las secuencias de ssDNA obtenidas de la última ronda de selección del Bio-SELEX fueron capaces de reconocer a las proteínas de *E. histolytica* en el ensayo de *Dot Blot*, a diferencia de las secuencias no unidas proveniente de la primera ronda de selección.

Palabras claves: *Entamoeba histolytica*, aptámeros, Bio-SELEX, proteínas de membrana

ABSTRACT

The limitations in the diagnosis of intestinal amoebiasis caused by *Entamoeba histolytica* highlight the need to develop new alternatives for detecting the parasite. Aptamers (single-stranded DNA or RNA sequences) represent a novel and low-cost tool for the recognition of proteins and other types of targets and can therefore be used for the treatment or diagnosis of various diseases. Therefore, the objective of this work was to obtain DNA aptamers that recognize *E. histolytica* trophozoites. In this study, the Bio-SELEX strategy was used to obtain DNA aptamers directed against *E. histolytica* membrane proteins, and the *Dot Blot* technique was used for their validation. The ssDNA sequences obtained from the last round of Bio-SELEX selection were able to recognize *E. histolytica* proteins in the *Dot Blot* assay, unlike the unbound sequences from the first round of selection.

Key words: *Entamoeba histolytica*, aptamers, Bio-SELEX, membrane proteins

1. INTRODUCCIÓN

La amibiasis intestinal es ocasionada por el parásito protozoario extracelular *Entamoeba histolytica*, el cual presenta la forma de trofozoíto y quiste (forma infectiva) y causa aproximadamente 40,000 a 100,000 muertes al año. En 2025, hasta el mes de mayo, se han reportado más de 25,000 casos de amibiasis intestinal en México, afectando diferentes estados de la República Mexicana como, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Tabasco, *etc.*, [1]. En los laboratorios clínicos de rutina, es necesario contar con un diagnóstico adecuado para evitar tratamientos innecesarios en personas que albergan especies de *Entamoeba* no patógenas. Sin embargo, esto representa un desafío ya que se basa en síntomas clínicos y pruebas de laboratorio, como la microscopía, que carecen de alta sensibilidad y especificidad, ya que no se puede distinguir *E. histolytica* de las especies morfológicamente idénticas, pero no patógenas *E. dispar*, *E. moshkovskii* y *E. bangladeshi* [2]. Debido a estos problemas, las técnicas inmunológicas y moleculares serían una gran alternativa; no obstante, el costo, así como la necesidad de infraestructura, equipos específicos y personal altamente capacitado, siguen siendo una barrera para su uso en laboratorios clínicos en la mayoría de las zonas endémicas, por lo tanto es necesario la búsqueda de nuevas alternativas para el diagnóstico de la amibiasis intestinal [3].

2. TEORÍA

Los aptámeros también llamados anticuerpos químicos son moléculas de DNA y RNA de cadena sencilla, de aproximadamente 80 nucleótidos cuya secuencia les permite adquirir estructuras tridimensionales únicas para el reconocimiento de diferentes blancos como: antibióticos, péptidos, proteínas, virus, hormonas, parásitos *etc.* Estas moléculas de DNA o RNA, con ventajas superiores a los anticuerpos, se obtienen a través de una estrategia denominada Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento EXponencial (SELEX, por sus siglas en inglés), la cual sigue cuatro etapas principales: incubación, selección, amplificación y secuenciación [4]. Actualmente, se han descrito diferentes variantes de esta metodología SELEX; entre ellas, la estrategia Bio-SELEX permite obtener aptámeros que tengan como función la identificación de biomarcadores a partir de muestras biológicas, con el objetivo de ser utilizados en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y no infecciosas [5]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener aptámeros de DNA que permitan el reconocimiento de trofozoítos de *E. histolytica* a través de una proteína de membrana (biomarcador).

3. METODOLOGÍA

Se realizó la estrategia denominada Bio-SELEX con una biblioteca de DNA de cadena sencilla (ssDNA) de 80 bases y proteínas de membrana de *E. histolytica*. Primeramente, la biblioteca de DNA (50 μ L a 220 ng/ μ L+ 50 μ L de buffer SELEX) se puso en contacto con las proteínas de membrana de la amiba (300 ng) previamente fijadas en una placa de 96 pozos con buffer de carbonatos pH 9.6. Las secuencias de ssDNA no unidas se eliminaron y las moléculas unidas se amplificaron por PCR para hacer las siguientes rondas de selección

positiva. Finalmente, para la ronda de selección negativa, se utilizaron proteínas de membrana de la especie no patógena *E. dispar* (300 ng) (Figura 1), siguiendo el procedimiento previamente mencionado. El ensayo se realizó por duplicado. Posteriormente, se verificó la unión del pool de aptámeros (100 ng) seleccionados a las proteínas de membrana de *E. histolytica* (1500 y 750 ng) goteadas en una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 μm . En este ensayo de *Dot Blot*, se usaron aptámeros biotinilados y la detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia

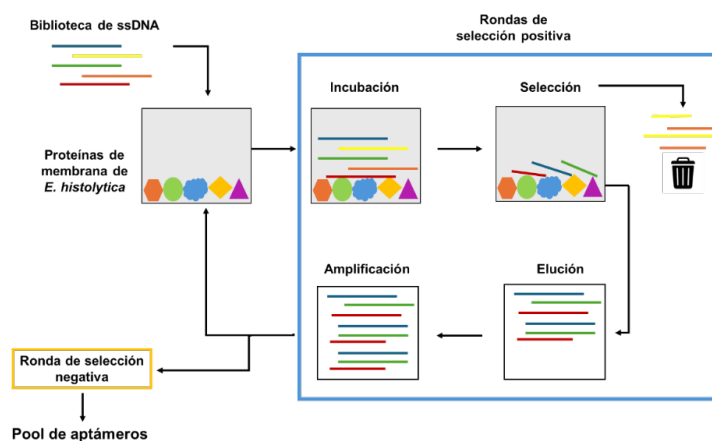


Figura 1. Estrategia Bio-SELEX para la obtención de aptámeros de DNA para el reconocimiento de trofozoítos de *E. histolytica*

4. RESULTADOS

Los resultados de la estrategia Bio-SELEX permitieron obtener un pool de secuencias de ssDNA seleccionadas por su interacción con proteínas de membrana de *E. histolytica*. Mediante la técnica de *Dot Blot* se pudo confirmar que los aptámeros biotinilados obtenidos (ssDNA unido) reconocen a las proteínas de membrana de *E. histolytica* (1500 y 750 ng) fijadas en una membrana de nitrocelulosa, mientras que las secuencias no seleccionadas (ssDNA no unido) no presentan ningún reconocimiento hacia estas proteínas; de manera interesante, la intensidad de la señal depende de la concentración (Figura 2). Aún se sigue validando el reconocimiento de las proteínas de membrana de *E. histolytica* por el pool de aptámeros a través de otras metodologías como Aptablot o ensayos de ELASAs (*Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay*) con la finalidad de caracterizar la afinidad, especificidad y selectividad de los aptámeros.

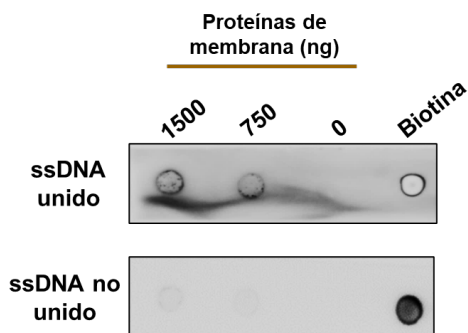


Figura 2. Ensayo de *Dot Blot* para confirmar la detección de proteínas de membrana de *E. histolytica* por el pool de aptámeros de DNA (ssDNA unido) seleccionados por el método de Bio-SELEX

5. CONCLUSIONES

La estrategia Bio-SELEX permitió obtener aptámeros de DNA que reconocen a las proteínas de membrana de *E. histolytica*. Estas secuencias podrían servir en el futuro para desarrollar un nuevo método de diagnóstico económico, fácil de usar, y rápido, para la identificación de trofozoítos en muestras de heces de pacientes infectados.

6. REFERENCIAS

- [1]. Secretaría de Salud, «Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica / Sistema Único de Información: Semana 20, 2025», Boletín Epidemiológico, 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/998327/sem20.pdf>
- [2]. J. C. Carrero *et al.*, Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries, *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 310, n. 1, p. 151358, ene. 2020, doi: [10.1016/j.ijmm.2019.151358](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358).
- [3]. S. Saidin, N. Othman, y R. Noordin, «Update on laboratory diagnosis of amoebiasis», *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 38, n.º 1, pp. 15-38, ene. 2019, doi: [10.1007/s10096-018-3379-3](https://doi.org/10.1007/s10096-018-3379-3).
- [4]. J. D. Ospina, «Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología», *biomedica*, vol. 40, n. Supl. 1, pp. 148-165, may 2020, doi: [10.7705/biomedica.4765](https://doi.org/10.7705/biomedica.4765).
- [5]. M. Morales-Velásquez, J. P. Barón-Vera, M. I. Pulgarín-Osorio, M. M. Sánchez-Jiménez, y J. D. Ospina-Villa, «Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease», *Biomarkers*, vol. 28, n. 7, pp. 599-607, oct. 2023, doi: [10.1080/1354750X.2023.2255756](https://doi.org/10.1080/1354750X.2023.2255756).