

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CLONACION DEL DNAc DE UNA HEMOLISINA DE
Entamoeba histolytica DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD
DE FOSFOLIPASA A₂

POR

ISAIAS BALDERAS-RENTERIA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

DICIEMBRE, 1997

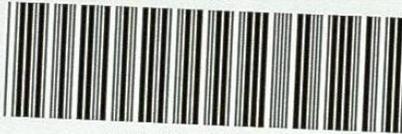
TM

Z5521

FCO

1998

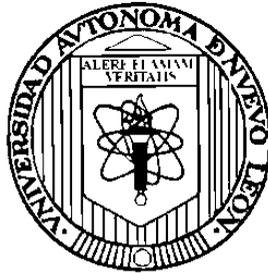
M4



1020121307

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CLONACIÓN DEL DNA_c DE UNA HEMOLISINA DE
Entamoeba histolytica DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD DE
FOSFOLIPASA A₂

POR

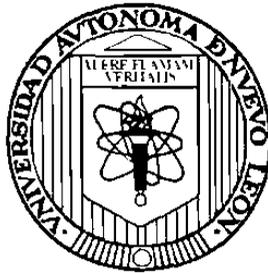
ISAÍAS BALDERAS-RENTERÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA.

DICIEMBRE, 1997

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Clonación del DNAc de una Hemolisina de *Entamoeba histolytica*
Dependiente de Actividad de Fosfolipasa A₂**

Por

ISAÍAS BALDERAS-RENTERÍA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología.**

Diciembre, 1997



FONDO TESIS

**CLONACIÓN DEL DNA_c DE UNA HEMOLISINA DE
Entamoeba histolytica DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD DE
FOSFOLIPASA A₂**

Aprobación por Comité de Tesis.



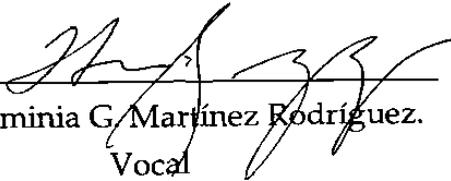
Dr. Salvador L. Said-Fernández.
Presidente



Dra. Adriana Elizondo Herrera.
Secretario



Dr. Mario R. Morales Vallarta.
Vocal



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.
Vocal



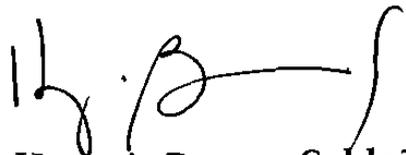
Dr. Javier Vargas Villarreal.
Vocal

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresiones Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Salvador L. Said-Fernández.

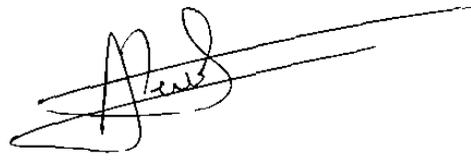
ASESORES:



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña



Dra. Agnès Revol de Mendoza



Dr. Javier Vargas Villarreal

DEDICATORIA

El esfuerzo, empeño y creatividad personales dejados en este trabajo le pertenecen a quienes sabiéndolo o sin saberlo me inspiraron a realizarlo:

Al Gran YHWH: La vida es un ciclo de ciclos reciclándose; verás que el próximo será mucho mejor.

A mi mamy, Lydia Rentería: Sé que todo lo sufres, todo lo crees, todo lo esperas y todo lo soportas por mí. No tengo con qué pagarte.

*A la memoria de mi padre César E. Balderas y de mi abuela Juanita Ortega:
See you later...*

A Claudia, Esther, Dalila y mi abuelo Ricardo: MIZPAH.

A BBJFCOCS: Serás grande si te lo propones. Serás mi orgullo.

A Pepe, Juan, Nico y Micky: Desde la infancia aprendí con su amistad, aprecio, lealtad, tolerancia y sentido del humor el valor y la belleza de las cosas sencillas de esta vida.

A todos mis amigos que no son de este mundo: “Ahora conozco una parte, veo borroso como con un espejo, pero veré claramente y lo sabré todo; cara a cara, conoceré como fui conocido”.

“... Y CONOCERÉIS LA VERDAD, Y LA VERDAD OS HARÁ LIBRES.”

San Juan 8:32

MUCHAS GRACIAS...

A *ΙΧΘΥΣ*, que ha sido el *MOLDE* que ha servido como ejemplo en mi formación espiritual eternamente.

A *mi familia*, por haberme proporcionado la energía de activación necesaria, fungiendo como verdaderos *CATALIZADORES* (positivos y negativos) en mi formación moral y social.

A los Doctores *Herminia Martínez y Salvador Said* quienes han sido los *INICIADORES* que me impulsaron a involucrarme en serio en el mundo científico y sin los cuales no hubiera sido posible la elongación de mi formación académica.

A los Doctores *Hugo A. Barrera, Agnès Revol, Mario Morales y Javier Vargas*, con quienes establecí enlaces de muy alto valor; por proporcionarme las *BASES* para emprender el vuelo hacia mi futuro destino.

A la Comisión de Tesis y los Asesores por sus acertadas recomendaciones en la revisión del manuscrito, el equipo y espacio facilitados y la experiencia transmitida.

A mi amigo *Esdras Villegas* por facilitarme amablemente su equipo para el acabado de esta tesis.

A la Dra. *Mercedes Alvarez Leal* y sus muchachos: *Tomasín, Cata, Panti, Gaspar y Carlos*; por poner a disposición en muchas ocasiones su equipo y espacio; por su comprensión y tolerancia.

A mis amigos de la ULIEG: *Claudio, Norma, Ata, Ana, Martín, Mario, Lolita, Carmen B., Carmen V., Gil, Martha, Marcos, Paty, Don Pancho, Raúl, Raquel y Vicky*; por dejarse sablear en su momento, pero por encima de todo, por brindarme cabida en su realidad virtual.

A la QBP *Pilar Carranza* por la aguda, crítica y detallada revisión, por su amistad y por dejarme entrar en su universo alterno.

A la Dra. *Ma. Teresa González* y todas sus “*niñas*” por tolerar a este “*alumnin*” en su laboratorio.

A la Sra. *Ma. del Refugio Mendoza* y el Sr. *Abel Navarro* por todas las facilidades otorgadas en la recuperación de referencias bibliográficas y su amistad.

A *Dalia, Julio y Esteban* por brindarme su confianza y amistad.

Al Q.F.B. *Antonio Narro* por dejarme disponer de su equipo de cómputo y los momentos agradables con los NICE.

A las MC *Adriana Sampayo y Delia Cruz* por enseñarme los trucos de la SDS-PAGE.

A la MC *Diana Leal* por orientarme en la parte de biología molecular al principio de la realización de este trabajo.

Al Dr. *Antonio Luna* y el Sr. *Francisco Treviño* por su insuperable trabajo gráfico y agradable compañía.

Al MC *Benito D. Mata* por orientarme en la parte estadística de este trabajo.

Al MVZ *Gerardo Lozano* por su ayuda en el manejo de animales de experimentación.

Al personal sindicalizado y becarios que laboran en el CIBIN, IMSS y que agilizan y facilitan el trabajo de los demás

A *Luis, Edna, Juany, Cora y Carlos* por convencerme de que vivir de y para la ciencia tiene raíces muy amargas pero posee frutos muy dulces.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA AMIBIASIS.....	1
1.1.1 Un problema de salud pública.....	1
1.1.2 Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	1
1.1.3 Factores de virulencia amibianos.....	2
1.2 MECANISMO CITOLÍTICO DE <i>E. histolytica</i>	2
1.2.1 Factores involucrados en la citólisis por <i>E. histolytica</i>	2
1.2.2 Aspectos moleculares de las citolisinas amibianas.....	3
1.3 LAS FOSFOLIPASAS A ₂	3
1.3.1 Características generales de las PLA ₂	3
1.3.2 Las PLA ₂ como factores de virulencia.....	4
1.3.3 Las PLA ₂ de protozoarios.....	4
1.3.4 Análisis comparativo de las secuencias protéicas de las PLA ₂	5
1.4 LA TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE.....	6
1.4.1 Clonación Molecular.....	6
1.4.2 Bibliotecas de DNAc.....	7
1.4.3 Características generales del bacteriófago λ.....	7
1.4.4 El bacteriófago λ gt-11 como vector de clonación.....	8
1.4.5 Identificación de clones de DNAc.....	11
1.5 IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO.....	12
1.6 HIPÓTESIS.....	13
1.7 OBJETIVOS.....	14
1.7.1 Objetivo general.....	14
1.7.2 Objetivos específicos.....	15
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS.....	16
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
2.3 EQUIPO.....	18
2.4 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	20
2.5 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO....	27

2.6	MÉTODOS.....	28
2.6.1	Estrategia general.....	28
2.6.2	Tamizaje de la biblioteca.....	29
2.6.2.1	Preparación de bacterias para plaqueo.....	29
2.6.2.2	Titulación de la biblioteca.....	30
2.6.2.3	Amplificación de la biblioteca.....	30
2.6.2.4	Estrategia de tamizaje.....	31
2.6.2.5	Aislamiento de UFP recombinantes.....	32
2.6.2.6	Preparación del stock de UFP.....	33
2.6.3	Caracterización de actividad enzimática.....	33
2.6.3.1	Cuantificación de proteínas.....	33
2.6.3.2	Radioensayo.....	33
2.6.4	Determinación de la actividad hemolítica.....	36
2.6.4.1	Actividad hemolítica.....	36
2.6.4.2	Relación temporal de la actividad hemolítica de las clonas seleccionadas.....	36
2.6.4.3	Relación entre el porcentaje de hemólisis y la concentración del inhibidor de Rosenthal.....	37
2.6.4.4	Análisis estadístico.....	37
2.6.5	Subclonación en pBS II SK +.....	37
2.6.5.1	Infección a alta multiplicidad.....	38
2.6.5.2	Purificación del bacteriófago recombinante.....	38
2.6.5.3	Extracción de DNA de los bacteriófagos purificados.....	39
2.6.5.4	Digestión del DNA de la clona EhA12 con <i>Eco</i> RI.....	40
2.6.5.5	Preparación de fragmentos de ligación.....	40
2.6.5.6	Preparación de bacterias calcio-competentes.....	42
2.6.5.7	Ligación y transformación con el inserto purificado.....	43
2.6.5.8	Propagación y extracción de DNA plasmídico recombinante con el inserto de la clona pBS12.....	44
2.6.5.9	Búsqueda de sitios de restricción en la clona pBS12.....	45
2.6.5.10	Segunda subclonación en <i>Pst</i> I.....	46
2.6.6	Secuenciación del DNAC.....	47
2.6.6.1	Secuenciación cíclica.....	47
2.6.6.2	Obtención de DNA a partir de la colonia bacteriana.....	49
2.6.6.3	Reacción en cadena de la polimerasa.....	49
2.6.6.4	Reacción de terminación.....	50

2.6.6.5	Preparación y corrimiento del gel de secuencia.....	50
2.6.6.6	Secado y exposición del gel a la película sensible a rayos X.....	51
2.6.7	Hibridación tipo <i>Dot-Blot</i> de las clonas EhA12 en fago λ gt-11 y pBS12 en pBLUESCRIPT II SK +.....	53
2.6.7.1	Marcaje radioactivo de la sonda proveniente de la clona pBS12.....	53
2.6.7.2	Fijación del DNA de las clonas EhA12 y pBS12 a membrana de nitrocelulosa e hibridación.....	54
2.6.8	Digestión con cuatro enzimas de restricción del inserto de la clona EhA12 en λ gt-11 y del inserto de la clona pBS12 en pBLUESCRIPT II SK+.....	55
2.6.9	Hibridación tipo <i>Dot-Blot</i> del DNA genómico de rata y de <i>Entamoeba histolytica</i> con la sonda construida a partir de la clona pBS12.....	56
2.6.9.1	Marcaje con ^{32}P de la sonda proveniente de la clona pBS12.....	57
2.6.9.2	Fijación del DNA genómico de rata y de <i>E. histolytica</i> a una membrana de nitrocelulosa, e hibridación con la sonda proveniente de la clona pBS12.....	58
2.6.10	Electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas.....	58
2.6.10.1	Preparación de la muestra.....	58
2.6.10.2	Preparación y corrimiento del gel.....	58
2.6.10.3	Tinción del gel.....	59
III	RESULTADOS.....	60
3.1	ESTRATEGIA DE TAMIZAJE.....	60
3.1.1	Titulación de la biblioteca.....	60
3.1.2	Tamizaje no específico para observar actividad enzimática de PLA.....	60
3.2	DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA MOSTRADA POR LAS CLONAS RECOMBINANTES.....	62
3.2.1	Radioensayo y cromatografía en capa fina.....	62
3.2.2	Determinación de actividad específica.....	62

3.3	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	63
3.3.1	Actividad hemolítica.....	63
3.3.2	Relación temporal de hemólisis.....	65
3.3.3	Determinación de la actividad hemolítica de la clona EhA12 en presencia del inhibidor de Rosenthal.....	66
3.4	SUBCLONACIÓN DEL DNAC DE LA CLONA EhA12.....	67
3.4.1	Purificación del bacteriófago y extracción del DNAC.....	67
3.4.2	Digestión con <i>Eco</i> RI de la clona EhA12 para liberar el fragmento recombinante... ..	67
3.4.3	Purificación del inserto, ligación a pBS II SK+ y transformación de bacterias con pBS12 recombinante.....	67
3.4.4	Detección de un sitio <i>Pst</i> I interno en el inserto de la clona pBS12.....	68
3.5	DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA.....	70
3.5.1	Secuencia de nucleótidos de la clona pBS12.....	70
3.5.2	Comparación de la secuencia de la clona pBS12 con secuencias registradas en el Genbank.....	71
3.5.3	Traducción de la secuencia nucleotídica de la clona pBS12 a secuencia de aminoácidos.....	72
3.6	COMPARACIÓN ENTRE EhA12 Y pBS12.....	72
3.6.1	Hibridación tipo <i>Dot-Blot</i>	72
3.6.2	Digestión de los insertos de la clona EhA12 y de la clona pBS12 con cuatro enzimas de restricción.....	73
3.7	HIBRIDACIÓN TIPO <i>DOT-BLOT</i> DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA CLONA pBS12 CON DNA GENÓMICO DE <i>E. histolytica</i>	75
3.8	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	75
IV	DISCUSIÓN.....	79
V	CONCLUSIONES.....	84
VI	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	86

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
Tabla I	Composición de la reacción de digestión para liberar el fragmento de la clona EhA12.....	40
Tabla II	Composición de la reacción de digestión para linearizar al vector pBS II SK+ con extremos cohesivos <i>Eco</i> RI.....	42
Tabla III	Composición de la mezcla de reacción que se utilizó para lograr la ligación del DNA de interés al vector.....	43
Tabla IV	Composición de la mezcla de reacción de digestión preparativa para liberar un fragmento del DNA de la clona pBS12 y subclonar.....	46
Tabla V	Composición de la reacción de ligación utilizada para conseguir la subclona en extremos <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I.....	47
Tabla VI	Composición de la reacción de secuenciación cíclica.....	49
Tabla VII	Composición de la reacción de desfosforilación de la sonda preparada a partir de la clona pBS12.....	54
Tabla VIII	Composición de la reacción de incorporación de fósforo radioactivo de la sonda desfosforilada, preparada a partir de la clona pBS12.....	54
Tabla IX	Composición de la reacción de digestión de los insertos de las clonas EhA12 y pBS12 con diversas enzimas de restricción.....	56

Tabla X	Composición de la reacción de marcaje de la sonda preparada a partir de la clona pBS12.....	57
Tabla XI	Resultados del radioensayo de las 10 clonas aisladas con actividad de fosfolipasa A en cuentas por minuto.....	63
Tabla XII	Actividad específica de PLA₂ en las 3 clonas elegidas.....	64
Tabla XIII	Actividad hemolítica de las clonas EhA11, EhA12 y EhA221.....	64
Tabla IV	Patrón de restricción del inserto de las clonas EhA12 y pBS12 con cuatro enzimas de restricción.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Regulación de la expresión de la β -Galactosidasa.....	9
2. Mapa de restricción del bacteriófago λ gt-11.....	10
3. Diagrama de la estrategia general de trabajo.....	29
4. Diagrama de la estrategia de tamizaje de actividad de PLA.....	32
5. Diagrama del protocolo para clasificar la actividad de PLA en las clonas.....	34
6. Esquema del proceso de recuperación de inserto.....	41
7. Mapa físico de pBS SK+.....	42
8. Secuencia del experimento de subclonación en extremos <i>Pst</i> I para facilitar la lectura de la secuencia nucleotídica.....	46
9. Diagrama general de la estrategia de secuenciación cíclica.....	48
10. Tamizaje no específico de la biblioteca.....	61
11. Relación temporal de la actividad hemolítica mostrada por las clonas recombinantes.....	65
12. Efecto del inhibidor de Rosenthal sobre la actividad hemolítica de la clona EhA12.....	66
13. Identificación del inserto de la clona EhA12 subclonado en pBS12.....	68
14. Patrón electroforético del inserto de la clona pBS12 con diversas enzimas de restricción.....	69
15. Secuencia de nucleótidos del DNAC del inserto de la clona pBS12.....	70

16.	Comparación de la secuencia de la clona pBS12 con el fragmento de la apolipoproteína E de rata con la cual mostró el mayor porcentaje de similitud.....	71
17.	Secuencia de aminoácidos traducida del DNAc del inserto de la clona pBS12.....	72
18.	Hibridación tipo <i>dot-blot</i> de las clonas EhA12 y pBS12.....	73
19.	Patrones electroforéticos de los insertos de <i>E. histolytica</i> liberados de la clona EhA12 y de la clona pBS12 con <i>BglI</i> , <i>BglII</i> , <i>PstI</i> y <i>PvuI</i>	74
20.	Hibridación <i>dot-blot</i> del DNA genómico de <i>E. histolytica</i> con la sonda construida a partir de pBS12.....	76
21.	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	77
22.	Curva estándar de pesos moleculares de proteínas en geles de poliacrilamida.....	78

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A Adenina	DO Densidad Óptica
AGL Acidos Grasos Libres	DH50 Dosis Hemolítica al 50%
Apo E Apolipoproteína E	<i>E. coli</i> <i>Escherichia coli</i>
β -Gal β -Galactosidasa	EDTA Ácido Etilendiaminotetraacético
C Citosina	<i>E. histolytica</i> <i>Entamoeba histolytica</i>
¹⁴ C Carbono Radioactivo	FC Fosfatidilcolina
°C Grados Celsius	Fig Figura
cols Colaboradores	G Guanina
CPM Cuentas por Minuto	g gramos
dATP Trifosfato de Desoxiadenosina	h horas
dCTP Trifosfato de Desoxicitosina	IPTG Isopropil tio- β -D-galactósido piranosa
ddATP Trifosfato de Didesoxiadenosina	kb kilobases
ddCTP Trifosfato de Didesoxicitosina	kDa kilodaltones
ddGTP Trifosfato de Didesoxiguanosina	l litros
ddNTP Trifosfato de Didesoxinucleósidos	lac Z Gen de la β -Gal
ddTTP Trifosfato de Didesoxitimidina	LB Medio de Cultivo Luria Bertani
DE Desviación Estándar	lb/pulg ² Libras por pulgada cuadrada
dGTP Trifosfato de Desoxiguanosina	LFC Lisofosfatidilcolina
DNA Ácido Desoxirribonucleico	M Concentración Molar
DNAc DNA complementario al RNAm	μ Ci Microcuries
DNAsa Enzima que Digiere DNA	μ l Microlitros
dNTP Trifosfato de Desoxinucleósidos	μ M Concentración Micromolar
dTTP Trifosfato de Desoxitimidina	μ m Micrómetros

mCi Milicuries	pmol Picomoles
mg Miligramos	p:v Peso/Volumen
min Minutos	RNA Ácido Ribonucleico
ml Mililitros	RNAm RNA mensajero
mM Concentración Milimolar	RNAse Enzima que digiere RNA
mm Milímetros	SAB Seroalbúmina Bovina
mmol Milimoles	SDS Dodecil Sulfato de Sodio
mOsm/kg Miliosmoles por kilogramo	SDS-PAGE Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Cond. Desnaturalizantes
mU Miliunidades	seg Segundos
N Concentración Normal	SEVAG Cloroformo-Alcohol Isoamílico (96:4)
ng Nanogramos	SMC Sitio Múltiple de Clonación
nm Nanómetros	T Timina
nmol Nanomoles	TCA Ácido Tricloroacético
NZCYM Medio de Cultivo con NZ-amina	TEMED N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
pb Pares de Bases	U Unidades
pCi Picocuries	UFP Unidades Formadoras de Placa
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa	UV Ultravioleta
pH Logaritmo Negativo de la Concentración de Iones Hidrógeno	V Voltios
PLA Fosfolipasa de Tipo A	X Número de Veces la Concentración de la Solución
PLA ₁ Fosfolipasa de Tipo A ₁	x g Número de Veces la Fuerza de Gravedad
PLA ₂ Fosfolipasa de Tipo A ₂	YH-R6G Yema de Huevo y Rodamina 6G
PLB Fosfolipasa de Tipo B	X-gal 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D galactopiranosido

Resumen

Isaías Balderas Rentería
Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de Graduación: Diciembre de 1997
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: CLONACIÓN DEL DNAC DE UNA HEMOLISINA DE *Entamoeba histolytica* DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA A₂

Número de páginas: 92

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con especialidad en Microbiología

Propósito y Método del Estudio: Una característica de la amibiasis es la destrucción de tejidos en las zonas invadidas por los trofozoítos. Se ha propuesto que en este proceso interviene un mecanismo citolítico en el que participan varias citolisinas, entre ellas, las fosfolipasas A₂ (PLA₂). Hasta la fecha no se cuenta con una evidencia que demuestre que las PLA₂ amibianas son factores de virulencia. Una estrategia que podría aportar las pruebas directas sobre esta hipótesis consiste en aislar la secuencia que codifique para una hemolisina cuya actividad dependa de PLA₂ amibiana e insertarla en el genoma de una clona de *E. histolytica* no virulenta, con muy escasa actividad de PLA₂ y observar si se incrementa significativamente la virulencia de esta clona transformada. Este trabajo constituyó el primer paso de dicho enfoque. Los objetivos fueron aislar e identificar clonas de una biblioteca de DNAC de *E. histolytica*, construida en bacteriófago l gt-11, que expresaran actividad hemolítica dependiente de PLA₂, a pH 8.0 y en presencia de Ca²⁺ 1 mM, elegir una de ellas y liberar dicha secuencia del vector, subclonarla, secuenciarla y analizar la secuencia. El método de detección consistió en producir un césped bacteriano infectado con los bacteriófagos de la biblioteca en cajas de agar NZCYM y después de incubación, aplicar sobre la superficie del cultivo, una base de agar adicionado con yema de huevo, CaCl₂ y rodamina 6G. Después de aislar las clonas que presentaron un halo de color púrpura sobre fondo naranja (presencia de AGL) determinamos el tipo de fosfolipasa para la que estaban codificando cada una de las clonas aisladas. Para ello usamos como sustrato L-1,2 dipalmitoil [2-palmitoil¹⁴C] fosfatidilcolina. Analizamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina. Enseguida determinamos la actividad y relación temporal de hemólisis de cada una de las clonas con secuencias de PLA₂. Como último paso liberamos el inserto de dicha clona, el cual subclonamos en pBluescript SK+. El proceso de secuenciación lo llevamos a cabo bajo la técnica de secuenciación cíclica mediante PCR e hicimos el análisis correspondiente de dicha secuencia.

Contribuciones y Conclusiones: Identificamos tres clonas que expresan actividad de PLA₂ y una clona que expresa actividad de PLA₁. Encontramos que tanto la actividad como la relación temporal de hemólisis fueron características para una de las clonas aisladas, la EhA12; Determinamos la secuencia de nucleótidos de EhA12, que consta de 610 pb incluyendo los componentes del extremo poli(A). Con el presente trabajo, hemos descrito un método de detección de clonas que expresan y/o inducen una actividad de fosfolipasas A, utilizando la lecitina de la yema de huevo como sustrato de la enzima y la Rodamina 6G como indicador fluorescente de la presencia de AGL. Determinamos que la clona EhA12 es una hemolisina con una secuencia que tiene una similitud del 92% con el extremo 3' de la secuencia que codifica para la apolipoproteína E de rata. Se sintetiza un péptido de 14.9 KDa el cual induce una actividad hemolítica notable en los lisados de *E. coli* infectados por la clona EhA12. La secuencia del inserto de la clona EhA12 está presente en el genoma de *E. histolytica* y pudiera tener un significado en la virulencia de este parásito si el péptido es producido por las amibas y/o las células blanco. Al término del trabajo global, nuestro grupo podrá determinar la importancia de las PLA₂ en el mecanismo patogénico de *E. histolytica*, y aprovechar estos conocimientos para un posible desarrollo de una vacuna. Los lisados de *E. coli* infectada con la clona EhA12 mostraron una actividad hemolítica dependiente de PLA₂ muy potente, lo cual podría tener importantes implicaciones en la virulencia de *E. histolytica*.

FIRMA DEL ASESOR: _____



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 LA AMIBIASIS

1.1.1 Un problema de salud pública

La amibiasis es un problema de salud pública, principalmente en los países en desarrollo, (Walsh, J. A. 1988). Esta enfermedad es producida por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*. Las formas clínicas mas frecuentes son la disentería clásica y el absceso hepático.

Se considera que existen en el mundo 500 millones de personas infectadas por *E. histolytica* (Sepúlveda B., 1982) y que solamente una de cada 10 muestran síntomas de la enfermedad (Walsh, J. A. 1988). Por otro lado, en México es considerado un problema muy importante de salud pública en algunos estados como Chiapas, Guerrero, México, Jalisco, Oaxaca, Veracruz y el D. F. (Epidemiología, 1997).

1.1.2 Ciclo biológico de *E. histolytica*

Las formas biológicas representativas del ciclo vital de *E. histolytica* son: trofozoíto (formas invasivas y nutricionalmente activas), prequiste, quiste (formas infectivas) y amibas metaquísticas.

Los trofozoítos se reproducen en la luz intestinal, donde pueden permanecer como comensales o de ahí diseminarse a otros órganos, principalmente al hígado. Cuando existen condiciones favorables, los trofozoítos se diferencian a quistes, los cuales salen del intestino a través de las heces fecales y si contaminan alimentos o agua para consumo humano, infectan a un nuevo hospedador completando su ciclo (Martínez-Palomo, A.; 1982).

1.1.3 Factores de virulencia amibianos

Uno de los temas de estudio mas relevantes de la amibiasis, es la identificación y caracterización del o los factores involucrados en su patogenia.

La patogenia de la amibiasis es un mecanismo multifactorial. Los principales factores de dicho mecanismo son: quimiotaxis, adhesión a células blanco, citólisis por contacto, fagocitosis y degradación intracelular (Ravdin, J. I.; Guerrant, R. L. 1982; Roa, V. G.; Padma, M. C. 1971; López- Revilla, R.; Cano Mancera, R. 1982; Eaton, R. D.; Meerouitch, E. 1970; Joyce, M. P. 1988;). Nuestro grupo se ha enfocado al estudio de los factores citolíticos.

1.2 MECANISMO CITOLÍTICO DE *Entamoeba histolytica*.

1.2.1 Factores involucrados en la citólisis por *E. histolytica*

En el mecanismo citolítico de *E. histolytica* se han implicado la proteína formadora de poros (Young, J. D.; Cohn, Z. A.1985), una citolisina dependiente del potencial de óxido-reducción (Castro-Garza, J.; Said-Fernández, S. 1992), tres hemolisinas encontradas a pH 7.5 (Jansson, A.; Gillin, F. 1994), dos hemolisinas membranales (Rosales Encina, J. L.; Schlie-Guzmán, M. A. 1992) y una fosfolipasa A₂ (PLA₂), asociada a membrana, alcalina y dependiente de calcio (Long-Krug, S.A.; Fisher, K. J. 1985 y Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1982). Excepto por las PLA₂ y la proteína formadora de poros, aún no se conoce la naturaleza proteica y/o enzimática del resto de las citolisinas.

1.2.2 Aspectos moleculares de las citolisinas amibianas

Se conoce ya la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la proteína formadora de poros. Además, las clonas hemolíticas descritas por Jansson y cols (1994) se secuenciaron a nivel nucleotídico y se han traducido a aminoácidos. Por otro lado, las hemolisinas membranales encontradas por Rosales Encina y cols tienen un peso molecular de 23.5 y 25 kDa. Estas proteínas tienen un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (36% y 50% respectivamente). De estas últimas se sugiere pudiesen estar relacionadas con otros factores amibianos causantes de daño tisular.

1.3 LAS FOSFOLIPASAS A₂

1.3.1 Características generales de las PLA₂

Las PLA₂ son acil-hidrolasas (Lehninger, A. L. 1979 y Van Den Bosch, H. 1974), contienen numerosos puentes disulfuro (Dijkstra, W. B.; Drenth, J. 1978; Hawthorne, S. N.; Ansell, G. B. 1982 y Wells, M. A. 1974) y se encuentran en forma soluble o asociadas a membrana. Entre las solubles se encuentran las PLA₂ de los mamíferos y las componentes del veneno de algunos reptiles, insectos y arácnidos. Las PLA₂ asociadas a membranas se han encontrado en todas las células animales que han sido estudiadas. Estas fosfolipasas están implicadas en la regulación metabólica de las células, en el recambio y digestión de fosfolípidos en las biomembranas (Shier, W. T. 1979; Van Den Bosch, H. 1974 y Van Den Bosch, H. 1980), y en la producción de ácidos grasos libres (AGL) a partir de los cuales las ciclooxigenasas sintetizan prostaglandinas.

Las PLA₂ funcionan a diferentes valores de pH. En términos generales, las PLA₂ lisosomales dedicadas al metabolismo de fosfolípidos, funcionan en medios ácidos, mientras que las fosfolipasas de venenos animales lo hacen en medios alcalinos (Verheij, H. M.; Slotboon, A. J. 1981).

1.3.2 Las PLA₂ como factores de virulencia

Las PLA₂ son enzimas lipolíticas que hidrolizan la posición sn-2-fosfoglicérido, liberando el ácido graso de la posición 2 y un monoacil-1-glicerofosfátido, en forma equimolar (Hawthorne, S. N.; Ansell, G. B. 1982; Van Den Bosch, H. 1974 y Van Den Bosch, H. 1980). Algunas de las funciones biológicas más importantes de estas enzimas son las siguientes: capacidad para digerir fosfolípidos en los fagosomas (Van Den Bosch, H. 1974), neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles (Chang, J.; Musser, J. H. 1987) y participación en procesos inflamatorios (Vadas, P.; Wasi, S. 1981).

1.3.3 Las PLA₂ de protozoarios

Las PLA₂ forman parte del mecanismo patogénico de varias especies de protozoarios, como *Trypanosoma cruzi* (Oppenheimer, F. R.; Van Roy, J. 1982) y *Toxoplasma gondii* (Saffer, L. D.; Long-Krug, S. A. 1989).

Long-Krug y cols (Long-Krug, S. A.; Fisher, K. J. 1985) encontraron que los trofozoítos de *E. histolytica* tienen en su superficie dos PLA₂, cuya actividad depende de calcio y que funcionan a pH diferente (una a pH de 3.5 y otra a pH de 7.5). Se ha sugerido que la PLA₂ que funciona a pH de 7.5 es la responsable de la actividad citolítica de los trofozoítos porque dicha actividad se inhibe cuando se impide el influjo de calcio o cuando las amibas se preincuban con el inhibidor de Rosenthal, específico para fosfolipasas A. Estas conclusiones fueron confirmadas y ampliadas por Said-Fernández y cols. Estos mismos autores encontraron que la PLA₂ responsable de la actividad citolítica es alcalina y se encuentra asociada a membrana (Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1982).

Recientemente se encontraron ocho PLA₂ de *E. histolytica* en una fracción subcelular denominada P30 (que es producto de una sedimentación obtenida después de centrifugar a 30000 x g los extractos amibianos) cuyas propiedades cromatográficas

fueron determinadas (Vargas-Villarreal, J. 1991). Una de estas PLA₂ ha sido purificada a homogeneidad. Esta enzima tiene un peso molecular aparente de 15 kDa y actúa como una citolisina directa. Es decir, no requiere de otros factores indirectos como AGL o fosfolisoderivados para lisar células (Vargas-Villarreal, J. 1991) como sucede con la mayoría de las fosfolipasas de venenos de reptiles e insectos (Verheij, H. M.; Slotboon, A. J. 1981).

El patrón cromatográfico de esta enzima se determinó mediante isoelectroenfoque y cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad se realizó con una columna diseñada específicamente con este propósito, utilizando como ligando el inhibidor de Rosenthal (Vargas-Villarreal, J. 1991). Esta PLA₂ tiene propiedades idénticas a la actividad hemolítica en extractos libres de células (P30) de *E. histolytica*. Dichas propiedades son las siguientes: (a) depende de calcio 1 mM; (b) su pH óptimo es de 8.0 y (c) se inhibe con el inhibidor de Rosenthal y (d) está asociada a membranas. (Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1982; Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1983 y Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1988).

Las características anteriormente mencionadas sugieren que las fosfolipasas A₂ están relacionadas al mecanismo patogénico de los trofozoítos de *E. histolytica*. (Vargas-Villarreal, J. 1991).

1.3.4 Análisis comparativo de las secuencias protéicas de las PLA₂

Por su secuencia de aminoácidos, las PLA₂ se clasifican en dos grupos: el grupo I comprende PLA₂ del jugo pancreático, y de serpientes de las familias Elapidae (cobras) e Hydrophyidae (serpientes marinas). El grupo II está compuesto por PLA₂ de las familias Crotalidae (serpientes de cascabel) y Viperidae (Heinrikson, R. L.; Krueger, E. T. 1977). Recientemente han surgido evidencias de la existencia de un tercer grupo de PLA₂, formado por las PLA₂ del veneno de abeja y del monstruo de Gila mexicano *Heloderma horridum horridum* (Sosa, B. P.; Alagón A. C. 1986).

Verheij y cols compararon las secuencias de 34 fosfolipasas de diferentes fuentes pertenecientes a los grupos I y II, y encontraron que 32 residuos de aminoácidos están completamente conservados. Además, otros 29 residuos usualmente están sustituidos por aminoácidos con tamaño, carga e hidrofobicidad similares (Verheij, H. M.; Slotboon, A. J. 1981). Estos resultados sugieren que existe cierta conservación de la estructura de las PLA₂.

Sin embargo, las secuencias de fosfolipasas de protozoarios no han sido reportadas hasta la fecha. Estos estudios se han limitado a enzimas de organismos eucariontes superiores.

1.4 LA TECNOLOGÍA DEL DNA RECOMBINANTE

1.4.1 Clonación molecular

La revolución en las ciencias biológicas ha estado dirigida principalmente al desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, que es una herramienta útil para obtener nuevas secuencias de interés. Esta tecnología ha aportado métodos que permiten definir ciertos aspectos de mecanismos y estructuras moleculares, responsables de procesos tan complejos como la división, crecimiento celular, metabolismo, diferenciación y desarrollo. Además han permitido manipular moléculas esenciales para dichos procesos y observar los cambios en sistemas vivos a los que se ha incorporado las moléculas alteradas.

La clonación molecular se considera una rama muy importante de dicha tecnología y consiste en la introducción de un fragmento de DNA específico dentro de un vector, el cual es introducido en un organismo hospedador para obtener poblaciones en masa de una sola secuencia de interés con el objeto de manipularla y realizar estudios específicos directamente relacionados a dicha molécula.

1.4.2 Bibliotecas de DNAc

Una biblioteca de DNAc, consiste en una colección de secuencias de DNAc que representan la mayoría de los RNA mensajeros (RNAm), los cuales a su vez, corresponden a genes que se expresan en el tipo celular del que se extrajeron los mensajeros. Las secuencias de DNAc se insertan en diversos vehículos moleculares, principalmente bacteriófagos (como λ), plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), etc.

Las bibliotecas de DNAc se construyen a partir de RNAm total, el cual debe ser de buena calidad. Este material se incuba con una enzima transcriptasa reversa, que en presencia de los substratos adecuados y bajo condiciones favorables sintetiza DNAc de una cadena. La cadena de RNA original se elimina con una enzima RNAsa y la segunda cadena de DNAc se sintetiza usando como molde la primera cadena. Para su síntesis son necesarios oligonucleótidos (como iniciadores) apareados en sitios al azar a la primera cadena de DNA. Entonces, la DNA polimerasa I de *E. coli* actúa produciendo la segunda cadena de DNAc y finalmente, se unen intramolecularmente los fragmentos producidos de la segunda cadena por acción de una ligasa (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. 1989).

1.4.3 Características generales del bacteriófago λ

El genoma del bacteriófago λ es una doble hélice de DNA de aproximadamente 50 kb. Tiene extremos cohesivos y complementarios de 12 nucleótidos.

Después de que el genoma entra a la bacteria hospedadora, los extremos cohesivos se asocian por apareamiento para formar una molécula circular con 2 muescas (*nick's*) inestables, separadas por 12 nucleótidos. Estos *nick's* son sellados rápidamente por la DNA ligasa del hospedador para dar una molécula de DNA circular cerrada que sirve como molde para la transcripción durante la fase temprana de la infección.

En la lisis de la célula hospedadora y la liberación del bacteriófago, juega un papel determinante la proteína S viral.

Las mutaciones en el gen S inhiben o retardan la lisis permitiendo que el ensamblaje de partículas de la progenie continúe por un extenso periodo de tiempo. Las partículas intracelulares acumuladas pueden liberarse tratando los cultivos con cloroformo, al provocar la lisis de la célula infectada. La mayoría de los vectores de uso común llevan mutación S⁻ porque permiten una alta producción de partículas fágicas (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. 1989)

1.4.4 El bacteriófago λ gt-11 como vector de clonación

El bacteriófago λ gt-11 es un vector de clonación de doble cadena lineal de 43.7 kb con un brazo izquierdo de 19.5 kb y un brazo derecho de 24.2 kb, diseñado exclusivamente para clonación de secuencias con sitios de restricción para la enzima *EcoRI* hacia sus extremos (Ver figura 2). El único sitio *EcoRI* en el fago λ gt-11 usado para insertar DNA externo está localizado cercano al extremo 5' del gen *lacZ*, por esta razón, está diseñado para permitir la expresión de DNAc como una proteína de fusión con la β -Galactosidasa (β -gal).

Bibliotecas recombinantes generadas de λ gt-11 pueden ser tamizadas con anticuerpos o sondas, ya que los anticuerpos pueden detectar la proteína de fusión expresada por el bacteriófago recombinante.

El fundamento de la identificación de clonas como proteínas de fusión a la β -Galactosidasa, se explica de la siguiente forma: La síntesis de la β -gal está inhibida por unión del represor al gen operador. Cuando la fuente de carbono es el glicerol (condiciones normales) el gen *lac I* (represor de la β -gal) se transcribe y es sintetizado el represor. Entonces las unidades de represor se unen al gen operador bloqueando la transcripción del gen *lacZ*. En cambio, cuando la fuente de carbono es la lactosa, una vez que éste azúcar es transportado al interior de la célula, se une a las moléculas del represor liberando al operador y permitiendo la síntesis de la β -Galactosidasa, de tal forma que dicha enzima hidroliza a la lactosa en glucosa y galactosa (Ver figura 1). Por otro lado, el IPTG es un análogo no metabolizable de la lactosa de manera que actúa como un inductor gratuito y permite la síntesis de β -gal o de la β -gal-proteína de fusión

recombinante Finalmente, se utiliza el X-gal como indicador de clonas recombinantes ya que se trata de un sustrato cromogénico para la β -Gal, de tal forma que una proteína de fusión a la β -Gal interrumpe la síntesis de esta enzima y dicho proceso produce colonias bacterianas blancas en un cultivo en caja, mientras que la síntesis correcta de la β -Gal portada en un vector no recombinante producirá una proteína activa, que al actuar sobre el X-gal permitirá observar colonias bacterianas de color azul

La cepa Y1090 de *E. coli* es el hospedador recomendado al utilizar este vehículo de clonación

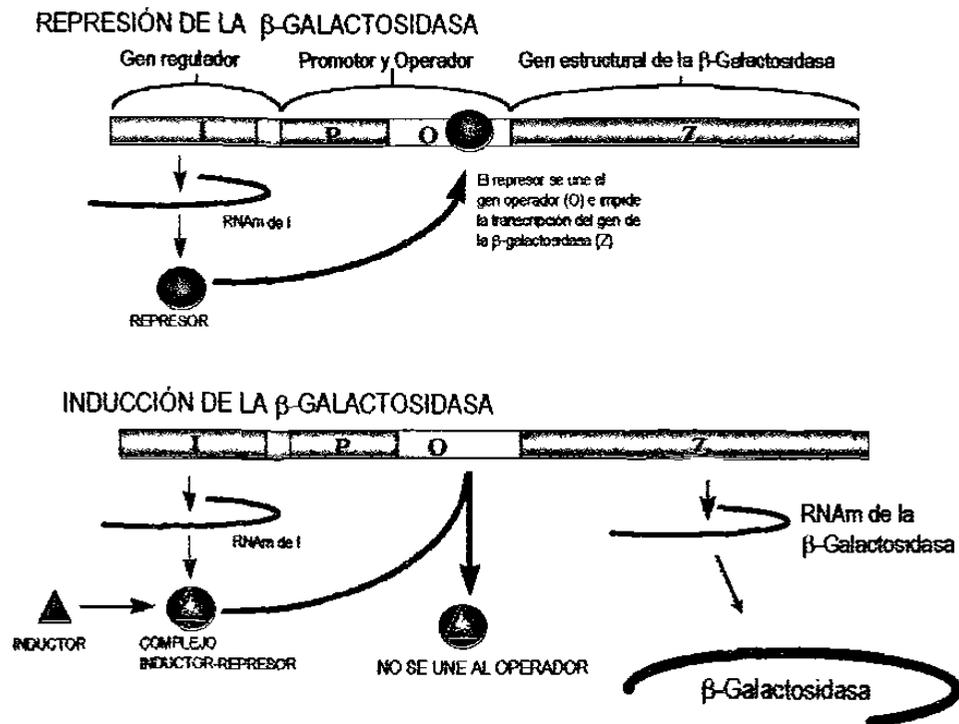


Figura 1. Regulación de la expresión de la β -Galactosidasa

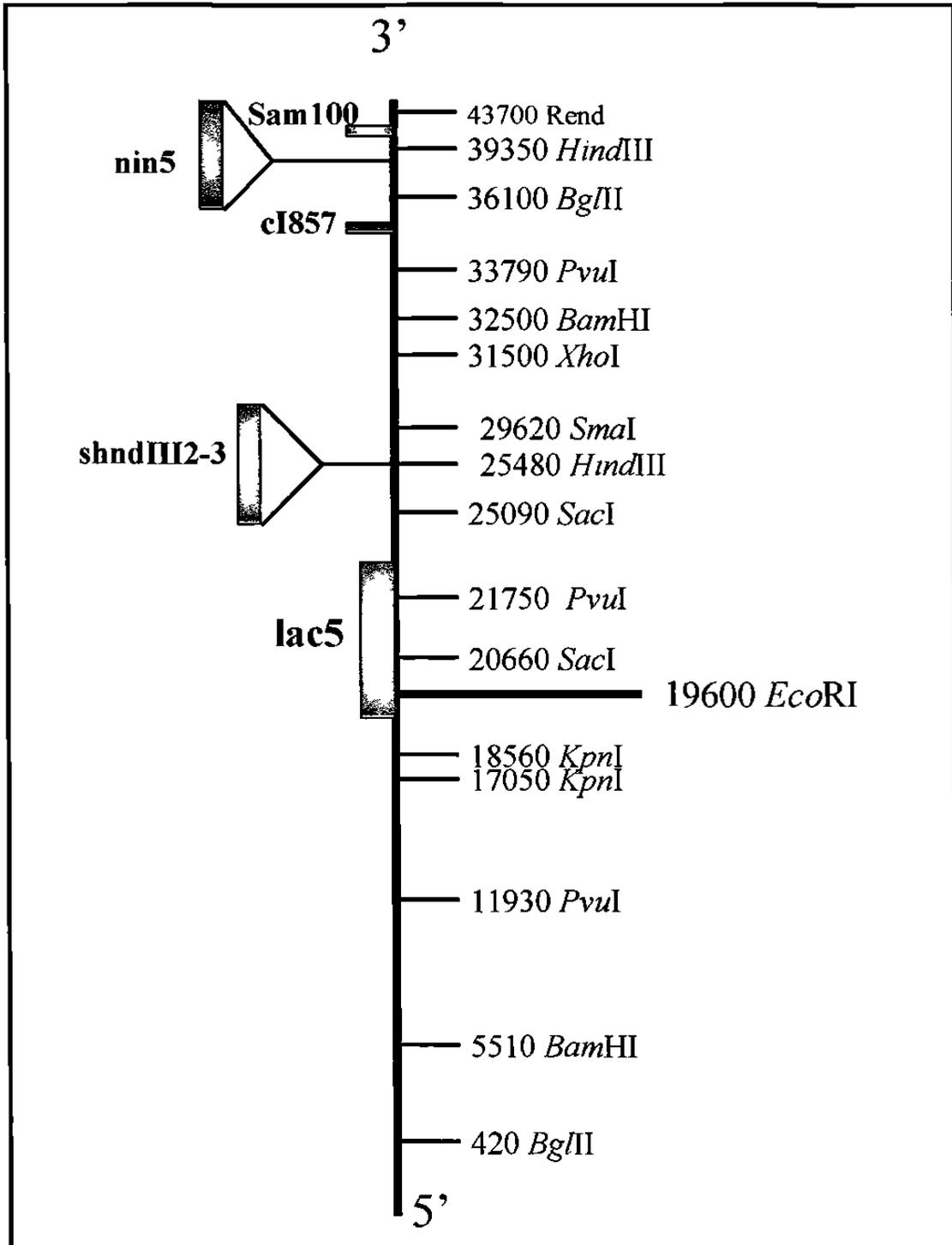


Figura 2. Mapa de restricción del bacteriófago λ gt-11

1.4.5 Identificación de clonas de DNAc

Existen tres métodos principales para identificar clonas en bibliotecas de DNAc:

- 1) Hibridación de ácidos nucleicos
 - 2) Detección inmunológica de antígenos específicos
 - 3) Retención específica de mRNA por hibridación con plásmidos recombinantes
- candidatos e identificación del producto sintetizado después de traducido.

La mayoría de los proyectos de clonación han estado enfocados al aislamiento de secuencias de DNAc correspondientes a mensajeros poco comunes o escasos. Para ello se han utilizado con mayor frecuencia dos tipos de reactivos: anticuerpos y/o sondas moleculares.

Las sondas moleculares son empleadas por los investigadores debido a que pueden usarse bajo condiciones de hibridación mas o menos estrictas (*stringency*), que minimizan el riesgo de reacciones cruzadas indeseables y además no dependen de la conservación de la fase de lectura.

La hibridación de ácidos nucleicos es un método confiable y muy usado para la clonación molecular, usando bancos de datos como fuente para el diseño de sondas (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. 1989). Sin embargo, la identificación de clonas portadoras de secuencias que codifican para proteínas que matan o lisan a las células, como las hemolisinas se pueden tamizar directamente en las placas de agar sangre (Jansson, A.; Gillin, F. 1994 y Rosales Encina, J. L.; Schlie-Guzmán, M. A. 1992).

1.5 IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO

Se ha propuesto que la virulencia de *E. histolytica* es multifactorial y que las PLA₂ alcalinas juegan un papel fundamental en la citólisis cuyo objetivo principal es la destrucción de tejidos (Long-Krug, S. A.; Ravdin, J. I. 1988 y Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1988). Sin embargo aún no se dispone de evidencias directas que apoyen dicha suposición. Una estrategia para poner a prueba esta hipótesis consiste en clonar la secuencia de una hemolisina dependiente de actividad de PLA₂ alcalina y después transformar con el inserto recombinante una clona no patógena de *E. histolytica* con baja actividad de PLA₂ y nula capacidad para producir abscesos hepáticos en hámsters infectados experimentalmente, para luego investigar si la clona transformada es capaz de producir abscesos hepáticos en hámsters inoculados experimentalmente. Esto daría una evidencia directa de que la actividad de PLA₂ es un factor de virulencia de *E. histolytica*. Por otro lado, al término del trabajo global, nuestro grupo podrá dar un poco más de luz al mecanismo de patogénesis de la amibiasis y establecer las bases para alternativas futuras en el tratamiento de la amibiasis. Este trabajo constituye la primera parte de dicha estrategia.

1.6 HIPÓTESIS

"Es posible aislar y caracterizar una clona que expresa actividad hemolítica dependiente de fosfolipasa A₂ ambiental a partir de una biblioteca de DNAC de *Entamoeba histolytica*"

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL

A partir de una biblioteca de DNAc de *Entamoeba histolytica* construida en fago λ gt-11, identificar y aislar una clona con un inserto que codifique para una hemolisina dependiente de fosfolipasa A₂.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Titular la biblioteca de DNAC de *E. histolytica* construida en bacteriófago λ gt-11.
- 2.- Amplificar dicha biblioteca.
- 3.- Diseñar un método para identificar clonas que muestren actividad significativa de PLA.
- 4.- Identificar las clonas portadoras de inserto que codifiquen para una hemolisina dependiente de actividad de fosfolipasa A.
- 5.- Clasificar la fosfolipasa A de la cual depende la citolisina que expresa el inserto.
- 6.- Conocer la relación temporal y la influencia de la dosis en la actividad hemolítica dependiente de PLA₂ codificada por el inserto de DNAC en las clonas seleccionadas.
- 7.- Extraer, purificar, subclonar y secuenciar el DNAC de la clona que muestre la mayor actividad hemolítica dependiente de PLA₂.
- 8.- Analizar la secuencia de la hemolisina dependiente de PLA₂.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos utilizados se adquirieron a las siguientes compañías:

De Sigma Chemical Co. de St. Louis, Missouri, US:

SDS, glucosa, SAB (fracción V), reactivo de Folín-Ciocalteau, Trizma base, Trizma-HCl, polietilenglicol, fosfolipasa A₂ de veneno de abeja, ácido bórico, extracto de levadura, NZ amina, rodamina 6G, Tritón X-100, EDTA, Fenol, X-gal, IPTG, ampicilina, tetraciclina, polivinilpirrolidona, formamida, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicina y TEMED.

De Merck de Alemania:

2,5 difeniloxazole (PPO)

De Merck de México:

NaCl, sulfato de magnesio y tolueno.

De Reactivos Monterrey:

NaOH, HCl, cloruro de calcio, fosfato monobásico y dibásico de potasio, ácido tricloroacético y acetato de potasio.

De Técnica Química de México:

Cloruro de potasio.

De J. T. Baker de México:

Bicarbonato de sodio, alcohol etílico absoluto, sulfato de cobre, ácido acético, ácido nítrico, formaldehído y alcohol isoamílico.

De Control Técnico y Representaciones de México:

Tartrato de sodio y potasio, cloroformo, K₂Cr₂O₇, AgNO₃ y metanol.

De Amersham LIFE SCIENCE de Inglaterra:

L-1-dipalmitoil-[palmitoil-1-¹⁴C]-fosfatidilcolina, α ³²P-dATP y α ³³P-dATP

De Roche Molecular Systems, Inc, de Branchburg, New Jersey, U.S.A.:

Kit de secuenciación AmpliCycle™ PERKIN ELMER y reactivo para extracción de DNA Chelex®.

De Bio-Rad, Richmond, CA:

Acrilamida, persulfato de amonio y N,N-metilenbisacrilamida.

De ICN, Costa Mesa, CA:

Urea ultrapura.

Las endonucleasas de restricción, la taq DNA polimerasa, proteinasa K, DNAsa, RNAsa y ligasa fueron adquiridas a **Bethesda Research Laboratories Inc. (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)** y a **New England Biolabs (NEB, Beverly, MA U.S.A.)**. Para las digestiones enzimáticas realizadas, ligaciones y reacciones de secuenciación, se utilizaron los amortiguadores y las recomendaciones señaladas por las respectivas casas comerciales.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1 Biblioteca de DNAc

Utilizamos una biblioteca donada por la Dra. Isaura Meza del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, que fue construida en el bacteriófago λ gt-11 con los DNAc sintetizados a partir de RNAm de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS cultivada en medio TYI, (Edman U., Meza I., Agabian N. 1987).

2.2.2 Cepa hospedadora de la biblioteca

El hospedador recomendado para el bacteriófago en el que se construyó la biblioteca es la cepa Y1090 de *Escherichia coli*, y fue la que utilizamos para titulación, propagación y tamizaje de la misma. Esta cepa fue obtenida de American Type Culture Collection y mantenida en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2.3 Vector de subclonación

Una vez liberado el fragmento de interés, utilizamos pBluescript II SK+ para subclonarlo. Dicho vector tiene el mismo origen que la cepa mencionada anteriormente.

2.2.4 Cepa utilizada para subclonación

Utilizamos la cepa XL-1 Blue de *Escherichia coli* donada por la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresiones Genéticas de la Fac. de Medicina de la UANL.

2.2.5 Glóbulos rojos de rata

Preparamos una suspensión de glóbulos rojos de rata Sprague Dawley. Dichas ratas se obtuvieron del bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

2.3 EQUIPO

El equipo utilizado en la fase experimental comprende un termociclador MiniCycler™ de MJ Research, USA, una incubadora GCA/Precision Scientific de

THELCO, una campana de acrílico para sembrar, un desionizador Sybron/Barstead Co. Div. de Sybron Corporation, (Boston, MA, USA) centrífugas de diversos tipos y tamaños marcas Eppendorf (Hamburg Germany) modelos 5402, 5403 y 5415, así como marca Sorvall Instruments, modelo RC-3B y marca DAMON/IEC modelo IEC B-20A; un horno de microondas marca Goldstar Co. Ltd. (Seúl, Corea) modelo MA-857M, una cámara de electroforesis y fuente de poder BioRad (Richmond, CA. USA) modelo 200/2.0, un agitador de tubos Maxi-Mix marca Termolyne (Bubuque. IO., USA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning (N.Y. USA) modelo PC320, un ultracongelador marca So-Low (Cincinnati, OH. USA), una campana de flujo laminar marca Labconco (Kansas City, MI, USA). También se utilizó una báscula digital marca Sartorius (Göttingen, Germany) modelo 1206MP, un evaporador-concentrador marca Labconco (Kansas, MI, USA) modelo 78100-00, un transiluminador de luz UV marca Fotodyne (New Berlín, WI, USA) modelo Photo//Phoressis I, un contador de centelleo líquido (Beckman Instrument Inc. modelo LS 9,800 Irvine. California, EUA), un espectrofotómetro de luz UV marca Zeiss (Zeiss, West Germany) modelo PMQ 3, una incubadora con agitación marca New Brunswick Schientifico (New Brunswick, N.J. USA) modelo G-25 y una cámara de electroforesis vertical, fuente de poder BioRad (Richmond, CA. USA) modelo 4000/2.0, aparato para hibridación marca Gibco BRL (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A) modelo Hybri-dot 96-well filtration manifold, una cámara de electroforesis vertical y un secador de geles BIO-RAD Dual temperature slab gel dryer, modelo 1125B.

El análisis computacional se realizó en varios microcomputadores, incluyendo de Apple Computer, Inc. (Cupertino, CA. USA) una Macintosh Classic II, Macintosh LCII, Power Macintosh 6100/66 con modem marca Global Village A801 y PC de ACER modelo Acermate 433.

Las aplicaciones utilizadas como ayuda para la elaboración de este trabajo fueron las siguientes: *MicrosoftWord* versión 6.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Microsoft PowerPoint* versión 3.5 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1 (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y UMAX Scan (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.). Los programas tanto locales como utilizados vía INTERNET en un servidor remoto para analizar y comparar

secuencias de DNA y de aminoácidos del inserto seleccionado por nosotros con las secuencias de PLA₂ y otras proteínas, fueron DNA Strider™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A. 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), Findseq (Intelligenetics, Trieste, It.), Gene Align (Intelligenetics, Trieste, It.), Clustal W (Thompson, J.D.; Higgins, D.G. 1994), Blast y Retrieve (National Center for Biotechnology Information).

2.4 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Se utilizó agua bidestilada y desionizada en la preparación de todas las soluciones.

2.4.1 Amortiguador PBS:

Se disuelven 6.5 g de NaCl, 2.8 g de K₂HPO₄ y 0.4 g de KH₂PO₄ en 1 l de agua y se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 10 N, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.4.2 Amortiguador SSB:

Se afora a 1 l de agua, 0.07 g de CaCl₂, 1.00 g de Glucosa, 7.2 g de NaCl, 0.4 g de KCl, 0.2 g de MgSO₄ y 0.12 g de Trizma base; se ajusta su pH a 8.0 con HCl 1N y su osmolaridad a 300±10 mOsm/kg con NaCl. En este caso en particular, se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore Corporation, Bedford Ma01730) y las alícuotas se almacenan a -20°C.

2.4.3 Solución de Alsever:

Para este reactivo se mezclan 5.37 g de citrato trisódico, 1.87 g de ácido cítrico-H₂O, 5.36 g de glucosa y 5.27 g de NaCl para 100 ml de reacción en agua, esterilizando por filtración a través de filtros de 0.22 µm de poro y almacenando a -20°C.

2.4.4 Soluciones para detectar actividad de PLA:

2.4.4.1 Preparación de la solución de yema de huevo:

Se lava la superficie de un huevo de gallina fresco con SDS al 1% y se extrae la yema en condiciones de asepsia. Se coloca la yema en un tubo estéril de 50 ml. Se mezclan 12 ml de la yema de huevo fresco con 36 ml de NaCl al 0.85% estéril. Se pone la mezcla en un tubo cónico graduado para centrifuga de 50 ml de capacidad. Se centrifuga a 300 x g. Se separa el sobrenadante y se desecha el sedimento. Se toma una alícuota de 10 ml de la yema de huevo recién preparada para realizar los primeros experimentos y el resto se almacena a -20°C.

2.4.4.2 Agar YH-R6G:

Reactivo 1: yema de huevo. Se prepara como ya se describió antes.

Reactivo 2: Se mezclan 15 g de agar en 500 ml de trizma-HCl 100mM, pH 8.0, y 400 ml de una solución de rodamina 6G al 1% en agua desionizada. Se calienta en una olla de presión hasta que se alcanzan 15 lb/pulg² y dejamos enfriar hasta 50°C.

Reactivo 3: Se disuelven 111 mg de CaCl₂ en 100 ml de agua para obtener una solución 10 mM.

Se mezcla lo siguiente: 52 ml de Reactivo 1.

 458 ml de Reactivo 2.

 5 ml de Reactivo 3.

Se vierten 15 ml de la mezcla en cajas de petri estériles.

Testigo Negativo: SAB (10 ml) 1 mg/ml de SAB al 0.1% en NaCl al 0.85% y se guarda a 4°C.

Testigo positivo: 10 µl de fosfolipasa de veneno de abeja (100 mU/10 µl).

2.4.5 Mezcla para parar la reacción de actividad fosfolipásica en el radioensayo por el método de Oppendoerfer:

Se mezclan 18 mg de un digerido de fosfolípidos (3 mg de ovolécitina más 300 mU de PLA₂ de veneno de abeja incubadas por 30 min a 37°C se ajusta la concentración de los productos de hidrólisis y del sustrato no hidrolizado a 10 mg/ml (por peso seco) con 1 mg de fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo y 1 mg de lisofosfatidilcolina (LFC). Se evapora a sequedad con una corriente de nitrógeno y se redisuelve el material seco en 1 ml de TCA en butanol al 5%, se almacena en alícuotas de 1 ml a -20°C.

2.4.6 Preparación de la solución de glóbulos rojos al 3%:

Se toman 2 ml de sangre de una rata de 3 meses de edad, de la cepa Sprague Dawley, y se agregan a 2 ml de solución de Alsever, se centrifuga la mezcla a 600 x g por 10 min a 4°C, se lava 2 veces con SSB y se centrifuga en cada lavado. Después de cada centrifugación se elimina por aspiración el sobrenadante y la interfase blanca (leucocitos) que se forma sobre el botón de los eritrocitos. Se suspenden 90 µl del paquete de eritrocitos con 2.91 ml de SSB. La suspensión se almacena a 4°C hasta por 5 días.

2.4.7 Preparación de soluciones para determinación de proteínas por el método de Lowry.

2.4.7.1 Reactivo A:

Se mezclan 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2 % más 0.5 ml de sulfato de cobre al 1% y 49 ml de carbonato de sodio en NaOH 0.1N. Se prepara al momento de utilizarse y el sobrante se desecha.

2.4.7.2 Reactivo B:

Se mezclan 2.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu con 2.5 ml de HCl 1 N. Se utiliza al momento de prepararse y el resto se desecha.

2.4.8 IPTG:

Se disuelven 2 g de IPTG en 8 ml de agua. Se ajusta el volumen de la solución a 10 ml con agua y se esteriliza por filtración con membranas desechables de 0.22 μm de diámetro de poro. Se almacena en alícuotas de 1 ml, a -20°C

2.4.9 X-gal:

Se disuelven 20 mg en 1 ml de dimetilformamida, en tubos de vidrio o polipropileno y se protege de la oxidación catalizada por la luz con papel aluminio. Se almacena a -20°C .

2.4.10 Amortiguador SM:

SM es un amortiguador de almacenamiento y dilución de bacteriófagos λ . Este se prepara disolviendo 5.8 g de NaCl, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 50 ml de tris-HCl (pH 7.5) en 1 l de agua, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Se deja enfriar la solución y se divide en alícuotas de 50 ml en contenedores estériles hasta su uso.

2.4.11 Amortiguador TE:

Se disuelven 1.2 g de trizma-base y 37 mg de EDTA en 1 l de agua, se ajusta el pH a 8.3 con HCl 1*N*.

2.4.12 Amortiguador TBE 5X:

Se disuelven 54 g de trizma-base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0.5 *M* (pH 8.0) en 1 l de agua.

2.4.13 Ampicilina:

Se disuelven 50 mg en 1 ml de agua, se esteriliza por filtración. La solución se almacena a -20°C hasta su uso.

2.4.14 Tetraciclina:

Se disuelven 5 mg en 1 ml de etanol y se almacena a -20°C. Los iones magnesio son antagonistas de la tetraciclina, por lo que se recomienda utilizarla sólo en medios de cultivo libres de magnesio.

2.4.15 Soluciones para la obtención de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina, a partir de cultivo bacteriano (miniprep).

2.4.15.1 Solución I:

La solución I se prepara disolviendo 901 mg de glucosa mas 303 mg de Trizma base y 372 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en 90 ml de agua. Se ajusta el pH a 8.0 con HCl y se afora a 100 ml conteniéndolos en recipientes esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min. La solución se almacena a 4°C.

2.4.15.2 Solución II:

La solución II se prepara de acuerdo al número de minipreparaciones (miniprep) que se realizarán. Se usa inmediatamente después de preparada. Generalmente se elaboran de 5 a 10 ml de la solución II. Para 10 ml se añaden 200 µl de NaOH 10 N a 8 ml de agua, se agita bien para disolver, se agrega 1 ml de SDS al 10% y se afora a 10 ml. La solución obtenida es de 0.2 N de NaOH y 1% de SDS. Se almacena a temperatura ambiente.

2.4.15.3 Solución III:

Para preparar la solución III se mezclan 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. La solución se almacena a 4°C.

2.4.16 SEVAG:

Para preparar 1 l de esta solución se agregan 40 ml de alcohol isoamílico a 960 ml de cloroformo.

2.4.17 Soluciones para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

2.4.17.1 Amortiguador concentrador:

Se mezclan 47.4 g de Tris-HCl en 90 ml de agua; se ajusta el pH de 8.7 a 8.9 y se afora a 100 ml.

2.4.17.2 Amortiguador separador:

Se mezclan 7.9 g de Tris-HCl en 90 ml de agua; se ajusta el pH de 6.7 a 6.9 y se afora a 100 ml.

2.4.17.3 Amortiguador de muestras 2X:

Se mezclan en 30 ml de agua 0.45 g de Trizma-Base, 1.2 g de SDS, 6 ml de glicerol, 0.06 g de azul de bromofenol y 3 ml de β -mercaptoetanol.

2.4.17.4 Bufer de cámara 10X:

Se agregan a 900 ml de agua 144.1 g de glicina, 30.3 g de Tris-HCl y 10 g de SDS; se ajusta el pH a 8.3 y se afora a 1000 ml.

2.4.17.5 Solución de Acrilamida/Bisacrilamida:

Se disuelven 29 g de Acrilamida y 1 g de N,N-metilenbisacrilamida en 100 ml de agua.

2.4.17.6 Solución de persulfato de amonio al 1.5%:

Se disuelven 30 mg de persulfato de amonio en 2 ml de agua.

2.4.17.7 Gel separador:

Se disuelven 6 ml de la solución de acrilamida/bis, 2.8 ml de amortiguador de separación, 225 μ l de SDS 10X, 12.34 ml de agua, 1.125 ml de persulfato de amonio y 11.25 μ l de N,N,N',N' Tetrametiletildiamina (TEMED).

2.4.17.8 Gel concentrador:

Se disuelven 1.25 ml de la solución de acrilamida/bis, 2.5 ml de amortiguador concentrador, 100 µl de SDS 10X, 5.65 ml de agua, 500 µl de persulfato de amonio y 7.5 µl de TEMED.

2.4.18 Soluciones para hibridación tipo *Dot-blot*:

2.4.18.1 Solución SSC 20X:

Se disuelven 175.3 g de NaCl y 88.2 g de Citrato de sodio en 800 ml de agua y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 10N. Se afora a 1 l y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.4.18.2 Solución SSPE 20X:

Se disuelven 175.3 g de NaCl, 27.6 g de NaH₂PO₄·H₂O y 7.4 g de EDTA en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se afora a 1 l. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.4.18.3 Solución de Denhardt:

Para preparar una solución 50X se mezclan 5 g de Ficoll mas 5 g de polivinilpirrolidona, y 5 g de SAB (fracc. V); se disuelven en 500 ml de agua.

2.4.18.4 Solución de prehibridación:

Para preparar 50 ml de esta solución se mezclan 25 ml de formamida, 12.5 ml de solución SSPE 20 X, 2 ml de solución de Denhardt 50X, 0.5 ml de SDS 10X y 10 ml de agua.

2.5 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

2.5.1 NZCYM:

Se disuelven 10 g de NZ- Amina, 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 1 g de casaminoácidos, 2 g de MgSO₄ y 2 g de maltosa en 1 l de agua, ajustando el pH a 7.5, y esterilizando con autoclave a 121°C durante 15 min.

2.5.2 NZCYM en agar suave:

El medio de cultivo con agar fundido a 60°C para aplicar sobre las cajas de petri con medio sólido; se prepara con la misma formulación de componentes del NZCYM (Ver 2.5.1), mas 7.5 g de agar por cada litro de medio.

2.5.3 NZCYM en agar base:

Este medio se utilizó como base en las cajas de petri para sembrar el césped bacteriano, utilizando 15 g de agar por cada litro de medio preparado bajo la misma formulación del medio líquido NZCYM.

2.5.4 LB:

Siguiendo el mismo procedimiento de preparación y esterilización que los medios anteriores, éste consta de los siguientes componentes: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl.

Todas las soluciones relacionadas con ensayos de biología molecular fueron preparadas como recomienda el manual de clonación molecular de Sambrook y cols. (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. 1989)

2.6 MÉTODOS

2.6.1 Estrategia general

Realizamos un tamizaje en la biblioteca de DNAC de *E. histolytica*, construida en bacteriófago λ gt-11 (Edman, U.; Meza, I.; Agabian, N. 1987) para identificar y aislar las clonas portadoras de secuencias que codifican para la síntesis de PLA y que expresan una proteína enzimáticamente activa, en las condiciones siguientes: pH = 8.0 y CaCl₂ 1 mM, (condiciones de actividad máxima de las PLA₂ encontradas en la fracción P30). Para lo anterior sembramos directamente la cepa bacteriana previamente infectada con bacteriófagos de la biblioteca de DNAC de *E. histolytica*, para obtener el césped bacteriano y las unidades formadoras de placa (UFP) sobre cajas de agar NZCYM. Una vez que se formaron los halos de lisis, pusimos en contacto con los cultivos una capa de 2 mm de espesor de agar-YH-R6G el cual contiene yema de huevo y rodamina 6G. Diseñamos éste método considerando que la lecitina de la yema de huevo es un sustrato natural de las PLA y la rodamina 6G es un indicador fluorescente de la presencia de ácidos grasos libres. Éstos últimos son uno de los productos de hidrólisis de las PLA₂. El otro producto son los lisoderivados. Tanto el medio de cultivo para el césped bacteriano como la base de agar-YH-R6G las trabajamos en presencia de CaCl₂ 1mM y pH = 8.0. Utilizamos SAB como testigo negativo y como testigo positivo PLA₂ de veneno de abeja (Ver figura 3). Una vez obtenidas las clonas que dieron resultados positivos, reclonamos tres veces. Cada clona se propagó en bacterias suspendidas en medio líquido y se procedió a certificar el tipo de actividad de fosfolipasa presente, para determinar su actividad hemolítica, su relación temporal de hemólisis y elegir a una de ellas para secuenciar el DNAC. Almacenamos todas las clonas a -70°C.

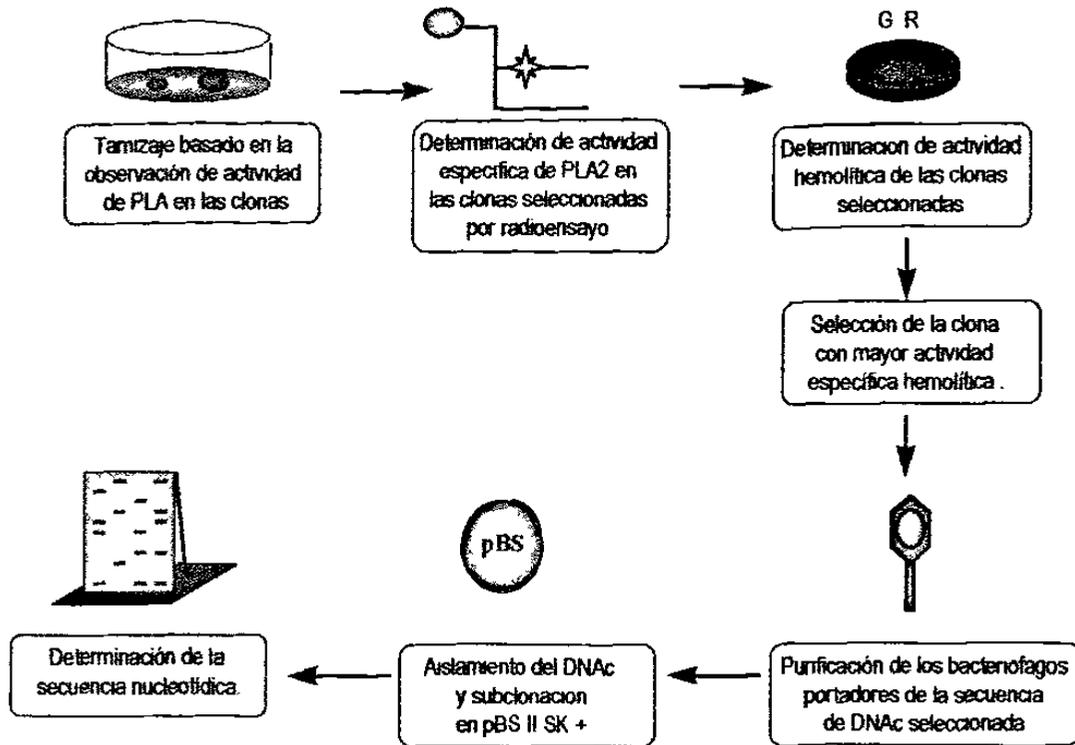


Figura 3. Diagrama de la estrategia general de trabajo.

2.6.2 TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA

2.6.2.1 Preparación de bacterias para plaqueo

En un matraz estéril de 250 ml colocamos 50 ml de medio NZCYM con ampicilina (50 mg/ml) e inoculamos con una colonia bacteriana de la cepa Y1090 de *E. coli*. Incubamos durante la noche a 37°C, con agitación moderada (250 ciclos/min) Enseguida sedimentamos las bacterias por centrifugación a 4000 x g, a temperatura ambiente, por 10 min Descartamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla celular con ayuda de un vortex en 20 ml de MgSO₄ 0.01 M estéril. Almacenamos la suspensión de bacterias a 4°C Ésta puede ser usada por mas de 3 semanas, sin embargo, para obtener una alta eficiencia de plaqueo, titulamos la biblioteca cuando las bacterias estaban recién preparadas (Sambrook, J, Fritsch, E F 1989)

2.6.2.2 Titulación de la biblioteca (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. 1989)

Para determinar el título de la biblioteca, mezclamos 200 μl de bacterias *E. coli* de la cepa Y1090 con alícuotas de 0.1 a 10 μl de la biblioteca. Incubamos las suspensiones por 20 min a 37°C. Mezclamos las preparaciones con 4 ml de medio NZCYM en agar suave fundido a 60°C. Agitamos suavemente cada tubo con ayuda de un vortex e inmediatamente vaciamos el contenido completo del tubo al centro de una caja de petri preincubada a 37°C por 8 h, que contenía 35 ml de NZCYM en agar al 1.5%. Giramos suavemente la placa para asegurar una distribución uniforme de las bacterias infectadas y el medio sólido fundido de superficie. Repetimos la operación descrita con cada uno de los otros tubos. Tapamos las cajas y las dejamos reposar por 5 min a temperatura ambiente, para permitir que solidificara el medio de la superficie. Invertimos las cajas y las incubamos a 37°C. Después de 7 h de incubación, contamos el número de UFP obtenidas de cada caja. Expresamos el título como UFP/ μl .

2.6.2.3 Amplificación de la biblioteca

Infectamos 600 μl de bacterias *E. coli* de la cepa Y1090 con 1×10^5 UFP. Incubamos dicha mezcla por 20 min a 37°C. Posteriormente mezclamos con 4 ml de NZCYM en agar suave fundido a 60°C. Inmediatamente después de mezclar vaciamos todo el contenido en una caja de petri de 150 mm de diámetro con agar NZCYM solidificado y preincubado a 37°C. Una vez que solidificó el medio fundido con la mezcla de infección incubamos por 12 h a 42°C. Cuando aparecieron las placas de lisis agregamos 15 ml de SM a temperatura ambiente a la superficie de la caja de petri. Incubamos la preparación por 2 h mas a temperatura ambiente. Después colectamos el mayor volumen posible del amortiguador SM con los bacteriófagos suspendidos y restos de las bacterias lisadas que había sobre la placa. Descartamos los desechos celulares por centrifugación a $7000 \times g$ a 4°C, por 30 min. Adicionamos a la solución resultante cloroformo al 2% de concentración final y la almacenamos a 4°C, mientras que para

conservar los bacteriófagos por tiempo indefinido añadimos a la suspensión dimetilsulfóxido al 0.7% de concentración final, y almacenamos a -70°C hasta su uso.

2.6.2.4 Estrategia de Tamizaje

Sembramos las bacterias no infectadas (testigos negativos) y las bacterias infectadas con los bacteriófagos en medio NZCYM, siguiendo el mismo procedimiento que para titular la biblioteca (densidad 1×10^5 bacteriófagos por caja). Sembramos 30 cajas. Una vez que se formaron los halos de lisis colocamos sobre los cultivos una capa de 2 mm de espesor de agar-YH-R6G, la cual preparamos como describimos en 2.4.4.2.

Como ya mencionamos, sobre todas las cajas con el césped bacteriano infectado y no infectado sobrepusimos la segunda placa de agar-YH-R6G previamente solidificada. Los resultados esperados consistieron en la aparición de un halo de color púrpura sobre un fondo naranja en la placa de agar-YH-R6G al observar las cajas con un transiluminador de luz UV. Este halo se formó alrededor de cada halo de lisis formado por una UFP portadora de secuencia de PLA recombinante que se expresó al medio de cultivo. Procedimos a aislar todas las UFP que dieron resultados positivos y una UFP con resultados negativos, la cual usamos después como testigo negativo. Para las pruebas con la PLA₂ de veneno de abeja, hicimos 12 pozos de 3 mm de diámetro sobre cajas de petri con agar YH-R6G, con una pipeta pasteur de punta corta. Extrajimos los bocados de agarosa aplicando un ligero vacío. En estos pozos colocamos 10 µl de diluciones seriadas al 50%, partiendo de la solución de 100 mU/10 µl de la fosfolipasa de veneno de abeja .

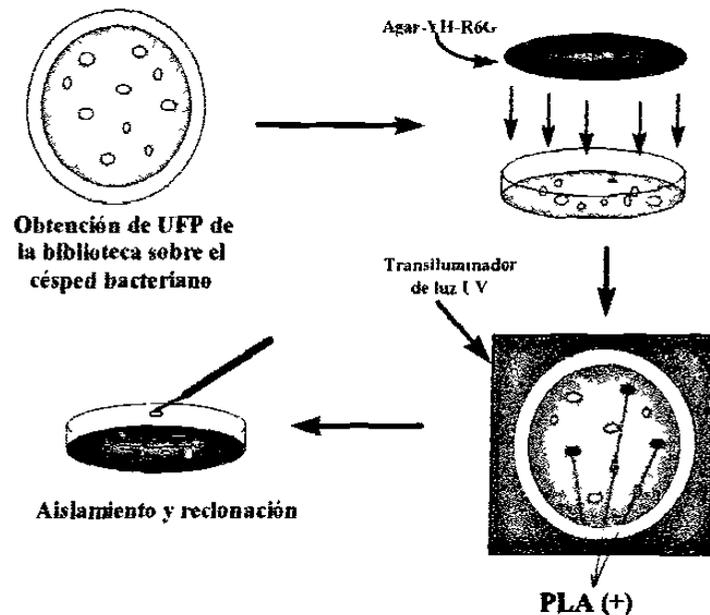
Incubamos las cajas de petri a 37°C por 48 h. Las que contenían la fosfolipasa de veneno de abeja en posición normal mientras que las preparaciones con bacterias y fagos en posición invertida.

Consideramos como resultados positivos la formación de halos color púrpura alrededor de los halos de lisis. La figura 4 muestra el procedimiento de tamizaje.

2.6.2.5 Aislamiento de UFP recombinantes

Para levantar las UFP que dieron resultados positivos y un testigo negativo, agregamos 1 ml de SM a un tubo de polipropileno estéril y añadimos una gota de cloroformo. Enseguida hundimos una pipeta pasteur (equipada con un bulbo) en el agar con la UFP elegida y aplicamos un poco de succión para que la UFP y el agar quedaran en la pipeta. Transferimos los bocados de agar al tubo previamente preparado con amortiguador SM y cloroformo y dejamos a temperatura ambiente por 1 h para permitir que las partículas fágicas difundieran fuera del agar. Con este procedimiento es posible coleccionar de 10^6 - 10^7 partículas fágicas infecciosas, las cuales se pueden almacenar indefinidamente a 4°C sin pérdida de viabilidad.

Repetimos el procedimiento anterior 3 veces a fin de obtener clonas recombinantes puras.



4. Diagrama de la estrategia de tamizaje de actividad de PLA.

Utilizamos una base de agar con rodamina 6G y yema de huevo para observar actividad de PLA mediante la presencia de ácidos grasos libres que se detectan en forma de coloración purpura sobre fondo naranja en un transiluminador de luz UV.

2.6.2.6 Preparación del stock de UFP

Mezclamos 10^5 UFP con 0.1 ml de la suspensión de bacterias e incubamos por 20 min a 37°C. Enseguida añadimos 3 ml de agar suave fundido, mezclamos y vaciamos inmediatamente a una caja de petri de 90 mm de diámetro con 35 ml de agar NZCYM. Incubamos la caja por 7 h a 37°C, después de este tiempo añadimos 5 ml de SM y almacenamos a 4°C por 4 h con agitación suave e intermitente. Al tiempo de la cosecha recogimos todo el líquido posible con pipeta pasteur y lo transferimos a un tubo de polipropileno. Añadimos 0.1 ml de cloroformo y agitamos el tubo brevemente con ayuda del vortex. Centrifugamos a 4000 x g, por 10 min, a 4°C y recuperamos el sobrenadante, al cual agregamos una gota de cloroformo. Almacenamos la preparación a 4°C.

2.6.3 CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.6.3.1 Cuantificación de proteínas

Determinamos la concentración de proteínas en muestras biológicas particuladas mediante el método de Lowry y cols (Lowry, O. H.; Rosbrough, N. S.; 1951).

2.6.3.2 Radioensayo

Utilizamos como sustrato para determinar la actividad de PLA L-1-dipalmitoil-[palmitoil]-2- 14 C]-FC (14 C]-FC). La presencia de 14 C]ácido palmítico, indicó que la fosfolipasa en estudio era de tipo A₂.

Diluimos el sustrato radioactivo con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una actividad específica de 1800 mCi/mol y 0.4% de tritón X-100. Analizamos los productos de hidrólisis, según el método descrito por Oppendoes y cols (Oppendoes, F. R.; Van Roy, J. 1982) donde el ensayo final (0.02 ml) contiene: 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 0.138 mM de FC, 0.2% de tritón X-100 y la muestra.

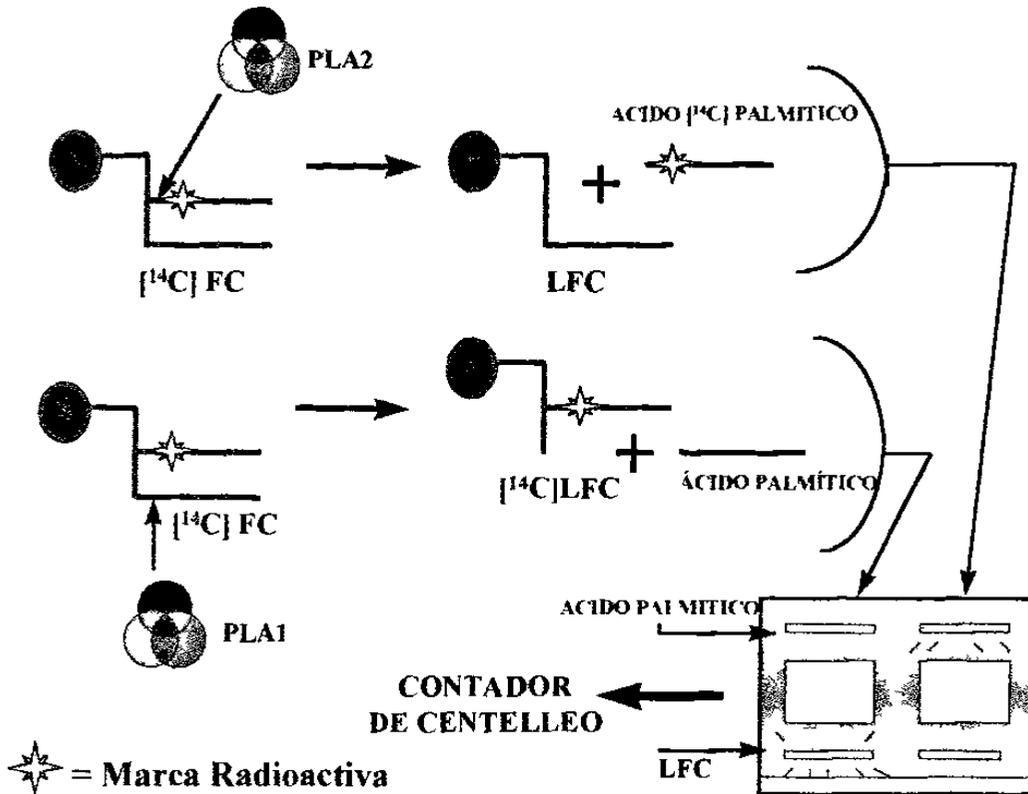


Figura 5. Diagrama del protocolo para clasificar la actividad de PLA en las clonas.

El ensayo consiste en mezclar 25 ml del lisado (restos de bacterias y clonas recombinantes de fago) con la mezcla de ensayo para PLA. Una vez terminada, se analizan los productos de la reacción mediante cromatografía en placa fina. El ácido ^{14}C -palmitico liberado por efecto de la PLA_2 se identifica por su migración característica, como mostramos en la figura. La presencia de marca en los lisoderivados indica que la actividad mostrada por las clonas recombinantes fue de tipo PLA_1 .

Después de incubar a 37°C por 3 h, paramos la reacción con 25 μl de la mezcla para parar la reacción (ver 2.4.5). Agitamos los tubos con ayuda de un vortex y aplicamos 25 μl de cada muestra a placas cromatograficas de silica gel (Whatman de borosilicato, 10 x 10 x 1 cm) con una mezcla de disolventes para lipidos polares (cloroformo-metanol-acido acetico-agua, 170:40:16:8).

Después colocamos las placas en una camara saturada con vapor de Iodo, con lo cual las manchas de lipidos se revelan como puntos amarillos o

café sobre fondo blanco. (Skipsky, J. P.; Barclay, M. 1969). Finalmente, raspamos la sílica y mezclamos cada mancha lipídica con 5 ml de mezcla para centelleo líquido en viales de borosilicato de 20 ml de capacidad. Determinamos el número de cuentas por min (CPM) en un contador de centelleo líquido a una eficiencia del 90.6%.

Para calcular la concentración de FC hidrolizada seguimos el siguiente proceso para el cual ejemplificamos con la clona EhA12.

1.- Calculamos las DPM partiendo de que:

CPM promedio: 4130 y % de eficiencia del contador 90.6%. (Las muestras utilizadas no tienen *quenching*)

$$4130 \text{ CPM} \rightarrow 90.6\%$$

$$X \text{ CPM} \rightarrow 100\% \quad X = 4557.5 \text{ DPM}$$

2.- Calculamos la radiactividad contenida en los ácidos grasos considerando que $1 \mu\text{Ci} = 2.2 \times 10^6 \text{ DPM}$

$$2.2 \times 10^6 \text{ DPM} \rightarrow 1 \mu\text{Ci}$$

$$4557.5 \text{ DPM} \rightarrow X \quad X = 2.1 \text{ pCi}$$

3.- Calculamos la cantidad de pmoles de ácidos grasos libres partiendo de que 1 pmol de FC hidrolizada = 58 pCi

$$58 \text{ pCi} \rightarrow 1 \text{ pmol} \quad X = 0.036 \text{ pmoles de FC}$$

$$2.1 \text{ pCi} \rightarrow X \quad \text{hidrolizados en 3 h}$$

Para calcular la actividad específica de fosfolipasa que expresaba cada clona, tomamos en cuenta la cantidad de proteína que utilizamos, que para este caso fueron 3.18 mg de proteínas totales del lisado bacteriano infectado con los fagos de la clona EhA12 para la reacción con la FC:

$$0.36 \text{ pmoles} \rightarrow 3.18 \text{ mg}$$

$$X \text{ pmoles} \rightarrow 1 \text{ mg} \quad X = 11 \text{ nmoles}$$

2.- Como seguimos una reacción de incubación por 3 h:

$$11 \text{ nmoles} \rightarrow 3 \text{ h}$$

$$X \text{ nmoles} \rightarrow 1 \text{ h} \quad X = 3.66 \text{ nmoles}$$

Por lo tanto, la clona EhA12 tiene una actividad específica de 3.66 nmoles de FC/mg/h.

2.6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

2.6.4.1 Actividad hemolítica

Determinamos la actividad hemolítica en los lisados de bacterias con fagos recombinantes mediante la estimación de la liberación porcentual de hemoglobina (Said-Fernández S.; López-Revilla, R. 1982). En tubos de polipropileno de 1.5 ml con 25 µl de una solución de eritrocitos de rata al 3%, agregamos 25 µl de una serie de diluciones del lisado bacteriano infectado con bacteriófagos de cada una de las clonas EhA12, EhA11, EhA221 y Eh0 a diluciones con amortiguador SSB de 1:2, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 del extracto obtenido al centrifugar los cultivos de las clonas aisladas o sólo de amortiguador SSB (testigo negativo) y un tercer grupo al que agregamos 0.5 ml de agua (testigo positivo) e incubamos a 37°C en un baño de agua por 90 min al cabo de los cuales añadimos 1 ml de amortiguador PBS (Diamond, L. S. (1968). Centrifugamos los tubos por 9 min a 600 x g y medimos la DO de los sobrenadantes a 415 nm y a 700 nm (Said-Fernández S.; López-Revilla, R. 1982).

2.6.4.2 Relación temporal de la actividad hemolítica de las clonas seleccionadas

Siguiendo el método antes descrito (2.6.4.1), centrifugamos los lisados bacterianos de cada una de las clonas EhA12, EhA11, EhA221 y Eh0. Ajustamos la cantidad de proteínas para obtener una dosis hemolítica que produjera 50% de lisis (DH50) e incubamos 25 µl del extracto obtenido con 25 µl de la suspensión de eritrocitos, a tiempos variables (0, 15, 30, 45, 90 y 180 min) de incubación a 37°C, para obtener la curva de porcentaje de hemólisis contra el tiempo.

2.6.4.3 Relación entre el porcentaje de hemólisis y la concentración del inhibidor de Rosenthal

Ajustando a 25 µl una doble cantidad de la concentración del lisado bacteriano de la clona EhA12 que produce un 50% de hemólisis, incubamos con un volumen igual de la suspensión de eritrocitos a 37°C por 90 min y diferentes concentraciones del inhibidor de Rosenthal (0, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 µM) específico para PLA, y graficamos el porcentaje de hemólisis contra la dosis del inhibidor de Rosenthal.

2.6.4.4 Análisis estadístico

Para la determinación de la actividad de PLA y hemolítica, empleamos estadística descriptiva (media, desviación estándar, rango) para los valores de los grupos en estudio.

Esperábamos que los valores de los grupos tanto control como problemas, mostraran una distribución normal con lo cual procedimos a realizar un análisis de varianza de una vía (ANOVA ONE-WAY) y prueba de Tukey para comparar -si existieran- diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$), en el programa estadístico SPSS™.

2.6.5 SUBCLONACIÓN EN pBS II SK +

Para iniciar el análisis a nivel molecular, elegimos la clona EhA12 por ser la que presentó un tiempo de inicio de actividad hemolítica mas corto y mayor actividad hemolítica. Subclonamos el fragmento de DNAC de la clona EhA12 en el vector pBS II SK+ siguiendo los pasos que se describen a continuación:

2.6.5.1 Infección a alta multiplicidad

Para obtener una solución concentrada de bacteriófagos purificados de la clona EhA12 y subclonar el inserto de interés, pusimos 10 ml de NZCYM en un matraz de 50 ml e incubamos con una colonia de *E coli* Y1090, toda la noche a 37°C con agitación vigorosa (300 ciclos/min). Con 1 ml de dicho cultivo inoculamos cuatro matraces de 2 litros de capacidad con 500 ml de NZCYM e incubamos a 37°C con agitación vigorosa hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0.5. Enseguida inoculamos cada matraz con 10¹⁰ UFP del bacteriófago λ gt-11 recombinante y continuamos la incubación a 37°C con agitación vigorosa hasta que ocurrió la lisis para posteriormente añadir 10 ml de cloroformo a cada matraz y continuar la incubación en las mismas condiciones por 10 min mas. Procedimos entonces a purificar el bacteriófago.

2.6.5.2 Purificación del bacteriófago recombinante

Enfriamos los cultivos lisados de la clona EhA12 a temperatura ambiente y añadimos DNasa I pancreática y RNAsa, a una concentración final de 1 mg/ml de cada una. Incubamos por 30 min a temperatura ambiente y enseguida añadimos NaCl sólido a concentración final de 1 M. Disolvimos la sal por agitación y dejamos la preparación en hielo por 1 h para posteriormente eliminar los desechos por centrifugación a 11,000 x g por 10 min a 4°C. Recuperamos el sobrenadante en un matraz limpio y añadimos polietilenglicol PEG8000 a una concentración final de 10% peso/volumen (50g por 500 ml de sobrenadante) disolviendo con agitación suave utilizando un agitador magnético a temperatura ambiente. Enfriamos la suspensión en agua-hielo y mantuvimos ésta al menos por 1 h sobre hielo para permitir que las partículas del bacteriófago formaran un precipitado, el cual fue recolectado por centrifugación a 11000 x g por 10 min a 4°C. Descartamos el sobrenadante y dejamos el tubo de centrifugación en una posición inclinada por 5 min para permitir al fluido remanente drenarse y así separarlo del

precipitado. Removimos el fluido con una pipeta y usando otra pipeta equipada con un bulbo, suspendimos suavemente el precipitado de bacteriófagos en SM (8 ml por cada 500 ml de sobrenadante). Extrajimos el polietilenglicol y los desechos celulares de la suspensión de bacteriófagos añadiendo un volumen igual de cloroformo, agitando con el vortex por 30 seg y separando las fases acuosa y orgánica, por centrifugación a 3000 x g por 15 min a 4°C. Colectamos las partículas fágicas por centrifugación de la fase acuosa a 55000 x g por 2 h a 4°C. Mezclamos la pastilla resultante con 2 ml de SM y dejamos toda la noche a 4°C sobre una plataforma móvil. Finalmente suspendimos las partículas en el SM y procedimos a realizar la extracción de DNA.

2.6.5.3 Extracción de DNA de los bacteriófagos purificados

A la suspensión obtenida de bacteriófagos purificados de la clona EhA12 le añadimos proteinasa K, a una concentración final de 50 mg/ml y SDS de una solución stock de 10% (p:v), en agua, a una concentración final de 0.5%. Mezclamos la preparación por inversión del tubo, varias veces, e incubamos por 1 h a 56°C. Enseguida enfriamos la mezcla, a temperatura ambiente, y añadimos un volumen de fenol saturado. Mezclamos por inversión y separamos las fases por centrifugación a 3000 x g por 5 min a temperatura ambiente. Transferimos cuidadosamente la fase acuosa a otro tubo y extrajimos una vez mas con una mezcla de fenol saturado y cloroformo (1:1). Recuperamos nuevamente la fase acuosa, bajo el mismo proceso descrito. Precipitamos el DNA con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, a -20°C toda la noche. Centrifugamos a 14000 x g por 10 min a 4°C y lavamos la pastilla con 2.5 volúmenes de etanol al 70% para finalmente eliminar todo el etanol y resuspenderla en amortiguador TE, conteniendo RNAsa a una concentración de 20 mg/ml.

2.6.5.4 Digestión del DNA de la clona EhA12 con *Eco* RI

Una vez que aislamos el DNA de los bacteriófagos de la clona EhA12, comprobamos su pureza observando la presencia de una sola banda en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y estimamos su concentración; preparamos una mezcla de reacción de digestión, la cual incubamos a 37°C por toda la noche, con el objeto de observar la liberación del inserto en una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción del mismo con bromuro de etidio (0.2 mg/ml en amortiguador TBE) y estimar su tamaño con ayuda de marcadores moleculares. Las condiciones de reacción y concentración fueron las recomendadas por el fabricante, mismas que presentamos en la tabla I:

Tabla I. Composición de la reacción de digestión para liberar el fragmento de la clona EhA12

REACTIVO	CANTIDAD
DNA (450 ng/ μ l)	6 μ l
enzima <i>Eco</i> RI (10 U/ μ l)	1 μ l
amortiguador 10X	1 μ l
agua para aforar	2 μ l
total	10 μ l

2.6.5.5 Preparación de fragmentos de ligación

Después de la digestión hicimos una electroforesis en gel preparativo de agarosa al 1% del DNA de la clona EhA12 para purificar el inserto de la siguiente forma: cortamos la banda correspondiente al fragmento liberado de la clona EhA12 en el gel de agarosa, con una hoja de bisturí, tratando de tomar la menor cantidad posible de fragmentos del gel. Por otro lado, preparamos un tubo de 0.5 ml esterilizado, al cual le hicimos una perforación en la parte de abajo con aguja estéril, de manera que quedó un

Tabla II. Composición de la reacción de digestión para linearizar al vector pBS II SK + con extremos cohesivos *Eco* RI

REACTIVO	CANTIDAD
DNA (100 ng/μl)	3 μl
enzima <i>Eco</i> RI (10 U/μl)	1 μl
amortiguador 10X	1 μl
agua para aforar	5 μl
total	10 μl

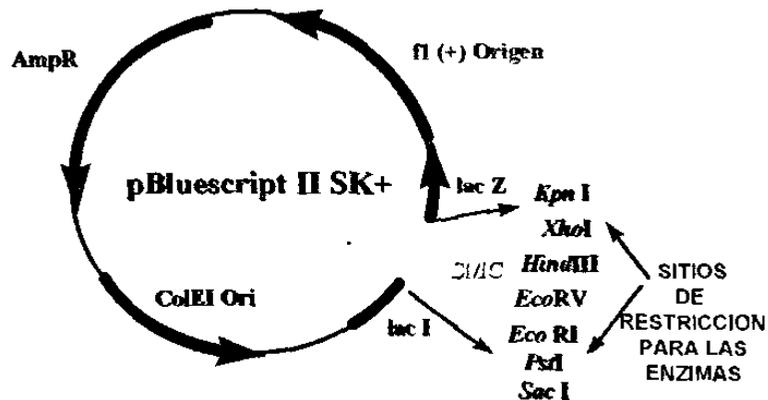


Figura 7. Mapa físico de pBS II SK +

2.6.5.6 Preparación de bacterias calcio-competentes

Inoculamos una colonia de la cepa bacteriana *E. coli* XL-1 Blue, en 4 ml de medio LB e incubamos durante la noche con agitación vigorosa a 37°C. Utilizamos 0.5 ml de este cultivo para inocular un matraz de 500 ml con 50 ml de medio LB, incubamos a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0.3. Enseguida dejamos el matraz en hielo durante 10 min e inoculamos 40 ml del cultivo en un tubo nuevo para uso

posterior. El resto fue vaciado a un tubo de polipropileno cónico graduado de 50 ml, frío y estéril, centrifugamos a 7500 x g por 5 min y desechamos el sobrenadante. Llevamos a cabo el procedimiento descrito en hielo y frente al mechero. Resuspendimos las bacterias con ayuda de un vortex, en 20 ml de CaCl₂ 100mM frío y dejamos en hielo por 20 min. Centrifugamos a 7500 x g por 5 min y desechamos el sobrenadante. Resuspendimos la pastilla en 1 ml de CaCl₂ 100 mM. Conservamos las bacterias hasta por 4 días, a 4°C.

2.6.5.7 Ligación y transformación con el inserto purificado

Realizamos la ligación del inserto a pBS II SK + previamente cortado, mediante un proceso de unión covalente en una reacción catalizada por DNA ligasa del bacteriófago T4 y considerando que cada par de bases nucleotídicas en el DNA tienen un peso molecular promedio de 660 daltones, (GIBCO BRL. 1992) mantuvimos una relación molar de 3:1 de inserto-vector. En la tabla III mostramos las proporciones de la mezcla.

Tabla III. Composición de la mezcla de reacción que se utilizó para lograr la ligación del DNA de interés al vector

REACTIVO	CANTIDAD
DNA del inserto (50 ng/μl)	4 μl
pBS linearizado en <i>Eco</i> RI (10 ng/μl)	1.5 μl
enzima ligasa (10 U/μl)	1 μl
amortiguador 5 X	2 μl
agua para aforar	1.5 μl
total	10 μl

solución II y que el tubo estuviera con contacto con el hielo durante la mayor parte del tiempo. Inmediatamente después añadimos 150 µl de solución III enfriada en hielo y mezclamos el tubo con ayuda de un vortex, en posición invertida, por 10 seg. Dejamos el tubo en hielo, por 5 min, y centrifugamos a 12000 x g, a 4°C, por 5 min. Transferimos el sobrenadante a otro tubo y añadimos medio volumen de fenol pH 8.0 (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. 1989). Mezclamos dicha solución con ayuda de un vortex por 1 min y añadimos otro medio volumen de SEVAG, mezclando nuevamente. Centrifugamos a 12000 x g a 4°C por 2 min y transferimos la fase acuosa a un tubo nuevo. A esta solución le agregamos dos volúmenes de etanol absoluto, a temperatura ambiente. Mezclamos la solución con ayuda de un vortex y dejamos 2 min a temperatura ambiente para después centrifugar a 12000 x g a 4°C por 5 min y eliminar el sobrenadante por aspiración. Dejamos el tubo en posición invertida sobre papel secante para permitir que se drenara todo el fluido. Lavamos la pastilla agregando 700 µl de etanol al 70% a 4°C. Después mezclamos la preparación brevemente con ayuda de un vortex. Centrifugamos nuevamente y eliminamos el sobrenadante como en el paso anterior. Dejamos secar al aire la pastilla por 10 min. Finalmente, resuspendimos la pastilla de DNA de la clona pBS12 en 20 µl de amortiguador TE con RNAsa (20 mg/ml).

2.6.5.9 Búsqueda de sitios de restricción en la clona pBS12

Con el propósito de buscar sitios internos de corte en el inserto para llevar a cabo una segunda subclonación, de acuerdo con el diagrama que muestra la figura 8, digerimos el vector recombinante pBS12 con algunas endonucleasas de restricción, tales como *AccI*, *Alu I*, *Bam HI*, *Hind III*, *Kpn I*, *Pst I*, *PvuII*, *Sac I*, *Sma I* y *Xho I*.

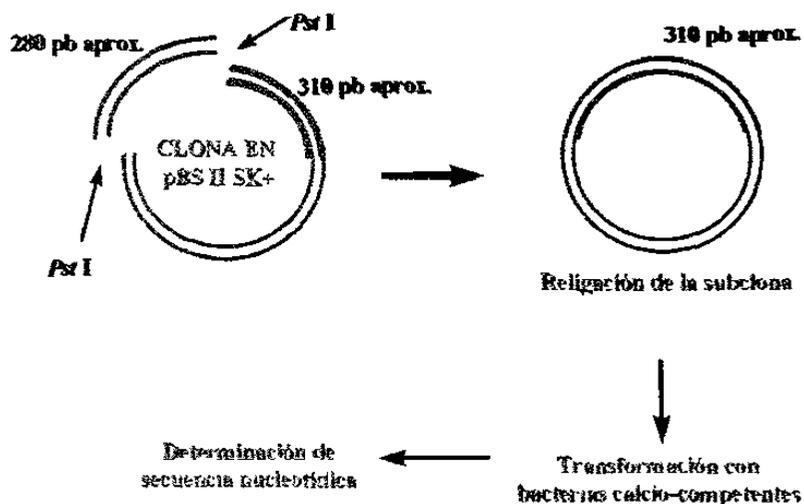


Figura 8. Secuencia del experimento de subclonación en extremos *Pst* I para facilitar la lectura de la secuencia nucleotídica.

2.6.5.10 Segunda subclonación en *Pst* I

Preparamos una mezcla de digestión preparativa de nuestra clona pBS12 con *Pst* I de acuerdo con la tabla IV.

Tabla IV. Composición de la mezcla de reacción de digestión preparativa para liberar un fragmento del DNA de la clona pBS12 y subclonar

REACTIVO	CANTIDAD
DNA de la clona recombinante (100 ng/ μ l)	5 μ l
enzima <i>Pst</i> I(10 U μ l)	1 μ l
amortiguador 10 X	1 μ l
agua para aforar	3 μ l
total	10 μ l

Incubamos esta mezcla a 37°C por toda la noche y la sometimos a las mismas condiciones de preparación de fragmentos de ligación (ver 2.6.5.5) En este caso, colectamos el vector con la porción del inserto. Posteriormente sometimos también a los

mismos protocolos de ligación, transformación, colección, propagación y aislamiento de DNA que la clona previamente procesada. (ver 2.6.5.7 y 2.6.5.8). Mostramos las proporciones utilizadas en la ligación en la tabla V:

Tabla V. Composición de la reacción de ligación utilizada para conseguir la subclona en extremos *Eco* RI -*Pst* I

REACTIVO	CANTIDAD
DNA del plásmido con el inserto digerido con <i>Pst</i> I (100 ng/ μ l)	2 μ l
enzima ligasa (10 U/ μ l)	1 μ l
amortiguador 5 X	2 μ l
agua para aforar	5 μ l
total	10 μ l

2.6.6 SECUENCIACIÓN DEL DNAc

2.6.6.1 Secuenciación cíclica (PERKIN ELMER 1992)

Para cumplir con el último objetivo de nuestro trabajo, utilizamos una variante de la técnica de secuenciación enzimática de Sanger, ya estandarizada en nuestro laboratorio, que consiste en el uso del kit AmplyCycle™ (Perkin Elmer) en donde se usa PCR combinando la desnaturalización del templado con el alineamiento y extensión/terminación del iniciador de secuenciación. (Ver figura 9).

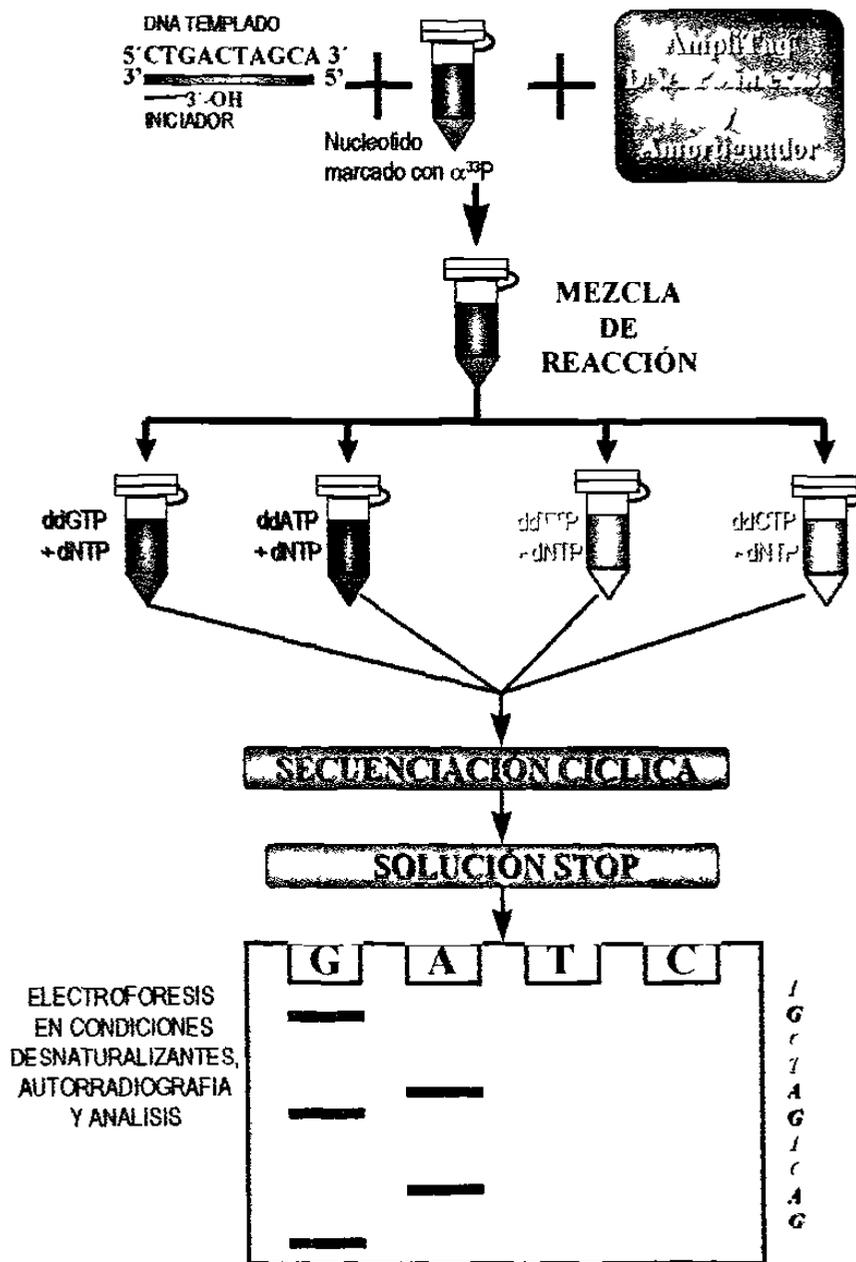


Figura 9. Diagrama general de la estrategia de secuenciación cíclica.

Tabla VII. Composición de la reacción de desfosforilación de la sonda preparada a partir de la clona pBS12

REACTIVO	CANTIDAD
DNA (200 ng/μl)	10 μl
amortiguador 10X	5 μl
enzima (fosfatasa alcalina)	1 μl
agua	34 μl
total	50 μl

Tabla VIII. Composición de la reacción de incorporación de fósforo radioactivo de la sonda desfosforilada, preparada a partir de la clona pBS12

REACTIVO	CANTIDAD
DNA	10 μl
amortiguador 10X	2.5 μl
enzima (polinucleótido kinasa)	1 μl
α^{32} -dATP	2 μl
agua	9.5 μl
total	25 μl

2.6.7.2 Fijación del DNA de las clonas EhA12 y pBS12 a membrana de nitrocelulosa e hibridación

Una vez marcada la sonda, procedimos a realizar la preparación de la membrana para la fijación del DNA. Este proceso consiste en humedecer una pieza de nitrocelulosa en agua y dejarla después en SSC 20X por 1 h a temperatura ambiente. Mientras se empapa la membrana, lavamos el molde *slot* con NaOH 0.1N y enjuagamos bien con

agua estéril. Enseguida pusimos 2 filtros previamente humedecidos en SSC 20X en el molde *slot* y arriba de ellos pusimos la membrana, una vez que cumplió el tiempo de impregnación de SSC y evitando la formación de burbujas con la parte superior. Luego llenamos los orificios *slots* con SSC 10X y aplicamos vacío hasta que pasó a través del filtro. Apagamos el vacío y volvimos a llenar los *slots* con SSC 10X. Enseguida desnaturalizamos las muestras a fijar calentándolas a 68°C por 15 min y posteriormente enfriándolas a 4°C; añadimos 2 volúmenes de SSC 20X a cada muestra a fijar y aplicamos vacío al *slot* para pasar el SSC con el que habíamos rellenado anteriormente. Después que pasó el SSC, apagamos el vacío y aplicamos las muestras. Encendimos el vacío y lavamos los *slots* una vez que se fijaron las muestras con 1 ml de SSC 10X por dos ocasiones. Finalmente continuamos con el vacío por 5 min y dejamos secar la membrana a temperatura ambiente durante 1 h para pasar a la incubadora con vacío a 80°C por 2 h mas. Enseguida pasamos la membrana a la solución de prehibridación y la dejamos en el horno de hibridación por 2 h a 42°C, para finalmente agregar la sonda marcada en solución y dejar en el horno por 12 h mas. El último paso consistió en realizar un par de lavados a la membrana el primero a temperatura ambiente por 20 minutos en una solución de SSC 2X y 0.1% de SDS y el segundo a 68°C por 10 min por tres veces en una solución de SSC 1X y 0.1% de SDS.

2.6.8 DIGESTIÓN CON CUATRO ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DEL INSERTO DE LA CLONA Eha12 EN FAGO λ gt-11 Y DEL INSERTO DE LA CLONA pBS12 EN pBLUESCRIPT II SK +

Preparamos varias mezclas de digestión de los insertos purificados tanto de la clona en fago λ gt-11 como de la clona en pBS II SK + con el propósito de corroborar que corresponden al mismo fragmento.

La tabla IX muestra las mezclas de digestión preparadas para cada inserto con las enzimas *Bgl* I, *Bgl* II, *Pst* I y *Pvu* I.

Incubamos las mezclas durante la noche a 37°C y observamos los cortes en gel de agarosa mediante electroforesis.

Tabla IX. Composición de la reacción de digestión de los insertos de las clonas EhA12 y pBS12 con diversas enzimas de restricción

REACTIVO	CANTIDAD
DNA (200 ng/ μ l)	10 μ l
amortiguador 10X	1.5 μ l
enzima de restricción	1 μ l
agua	2.5 μ l
total	15 μ l

2.6.9 HIBRIDACIÓN TIPO *DOT-BLOT* DEL DNA GENÓMICO DE RATA Y DE *Entamoeba histolytica* CON LA SONDA CONSTRUIDA A PARTIR DE LA CLONA pBS12

Este experimento tuvo el propósito de confirmar la presencia de la secuencia de la clona pBS12 en el DNA genómico de *Entamoeba histolytica*, utilizando como testigos positivos el DNA genómico de rata y las clonas EhA12 y pBS12; y como testigos negativos el DNA de pBLUESCRIPT SK + y del bacteriófago λ gt-11.

Para estos ensayos, cortamos con *EcoRI* y *PstI* el inserto que porta nuestra clona en pBS II SK +, posteriormente purificamos y cuantificamos la sonda obtenida por métodos antes descritos (ver 2.6.5.5) y marcamos con α^{32} -dATP para ser utilizada en la hibridación en membrana de nitrocelulosa con los DNA ya mencionados.

2.6.9.1 Marcaje con ^{32}P de la sonda proveniente de la clona pBS12

El marcaje de la sonda de 290 pares de bases proveniente del inserto de la clona pBS12 la efectuamos como un marcaje al azar utilizando hexámeros aleatorios y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Iniciamos desnaturalizando 50 ng de DNA de la sonda disueltos en 10 μl de agua a 95°C por 5 minutos y enfriando inmediatamente después en hielo. Enseguida añadimos todos los reactivos que se presentan en la tabla X a un tubo de reacción el cual mantuvimos en hielo todo el tiempo de manipulación. Mezclamos brevemente e incubamos por 2 h a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación agregamos 5 μl de una solución de EDTA al 0.5 M para detener la reacción.

Tabla X. Composición de la reacción de marcaje de la sonda preparada a partir de la clona pBS12

REACTIVO	CANTIDAD
DNA (50 ng) en agua	10 μl
dCTP 500 μM	1 μl
dTTP 500 μM	1 μl
dGTP 500 μM	1 μl
Solución random primer 2.5X	20 μl
dATP[$\alpha^{32}\text{P}$] 3000 Ci/mmol	5 μl
Frag. Klenow de DNA pol. I	1 μl
agua	11 μl
total	50 μl

2.6.9.2 Fijación del DNA genómico de rata y *E. histolytica* a una membrana de nitrocelulosa, e hibridación con la sonda proveniente de la clona pBS12

Una vez marcada la sonda, procedimos a realizar la preparación de la membrana para la fijación de las muestras de DNA genómico de *E. histolytica* y de rata, así como las de el fago λ gt-11 y pBS II SK en sus formas nativa y recombinante como las clonas EhA12 y pBS12; y su posterior hibridación. Hemos descrito este proceso anteriormente y lo ejecutamos de la misma manera (Ver 2.6.7.2).

2.6.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEÍNAS

Preparamos una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con el propósito de determinar la presencia y el tamaño aproximado del péptido expresado por las clonas EhA12 en fago λ gt-11 y pBS12 en pBS II SK +.

2.6.10.1 Preparación de la muestra

Antes de correr la SDS-PAGE, preparamos la muestra diluyéndola 1:1 con el amortiguador de muestra 2X, para después poner a hervir en baño de agua por 3 min y dejar enfriar antes de cargar al gel.

2.6.10.2 Preparación y corrimiento del gel

Elaboramos el gel separador con los componentes y en las cantidades que se muestran en el apartado de preparación de reactivos (ver 2.4.17.7). De la misma forma preparamos el gel concentrador como se indica en 2.4.17.8. Armamos los vidrios y

vaciamos primero el gel separador. Después que éste polimerizó, vaciamos el gel concentrador. Una vez polimerizada la acrilamida, realizamos la electroforesis horizontal por 3.5 h a 150 V y procedimos a teñir un gel con nitrato de plata y otro con azul de Coomasie simultáneamente.

2.6.10.3 Tinción del gel

La tinción con nitrato de plata se realizó como sigue: Tomamos el gel y lo lavamos con agua destilada. Después lo pusimos en un recipiente con una solución acuosa de metanol al 50% y ácido acético al 12%. Enseguida lavamos el gel por 3 veces con una solución de etanol 10% y ácido acético al 5%. Tiramos la solución y lavamos dos veces con agua para posteriormente agregar al gel una solución de dicromato de potasio 0.0034 *M* y ácido nítrico 0.0032 *N*. Después lavamos el gel 4 veces con agua destilada y agregamos una solución de nitrato de plata 0.012 *M*. Entonces enjuagamos el gel 2 veces con agua destilada y finalmente agregamos por 3 veces una solución de carbonato de sodio 0.28 *M* y formaldehído 0.05% durante 1 min las dos primeras ocasiones y el tiempo necesario para colorear las proteínas en la última. Una vez coloreadas las proteínas agregamos una solución de ácido acético al 1% y finalmente el gel se mantuvo conservado en agua destilada.

Para la tinción con azul de Coomasie, una vez terminada la corrida, mantuvimos el gel durante 30 min mínimo en un reactivo decolorante compuesto por una solución acuosa de metanol al 50% y ácido acético al 12%. Después lo dejamos durante la noche en agitación leve con azul de Coomasie. Después destañimos con el mismo reactivo decolorante hasta que aparecieron las bandas y finalmente dejamos los geles en solución acuosa conservadora de ácido acético al 7%.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 ESTRATEGIA DE TAMIZAJE

3.1.1 Titulación de la biblioteca

El título promedio de la biblioteca fue de 4.4×10^7 UFP/ μ l. Los cálculos realizados se basaron en la determinación por cuenta en placa de la cantidad de UFP en cada una de las diluciones hechas de la solución stock.

3.1.2 Tamizaje no específico para observar actividad enzimática de PLA

Analizamos 30 cajas con medio de cultivo y el césped bacteriano infectado con los bacteriófagos de la biblioteca, con un título de 1×10^5 UFP por caja. Detectamos 10 UFP que presentaron una coloración púrpura al observar las cajas con un transiluminador de luz UV. Estas placas se presentaron sobre los halos de lisis correspondientes. Repetimos 3 veces el proceso de aislamiento con las 10 clonas encontradas, asegurándonos siempre de observar los halos de color púrpura. El aspecto de como se presentan las clonas que expresan actividad de PLA en el medio se puede observar en la figura 10:

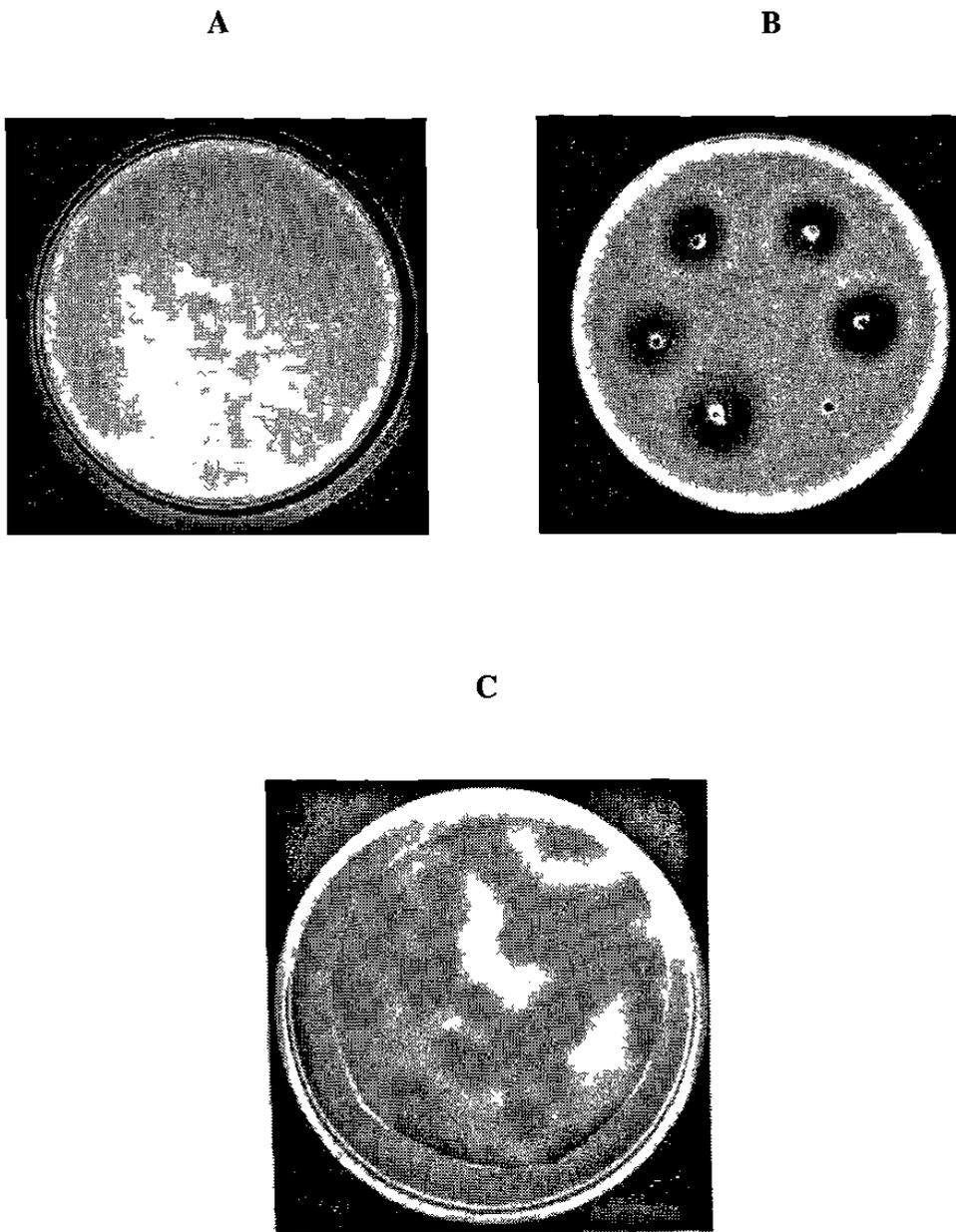


Figura 10. Tamizaje no específico de la biblioteca.

Las fotografías muestran (A) una placa con bacterias infectadas con una clona recombinante negativa (Eh0), (B) los halos de hidrólisis de yema de huevo revelados con 1% de rodamina 6G producidos por 10 mU de PLA₂ pura de veneno de serpiente *Naja mocambique mocambique*, y (C) placas de hidrólisis de yema de huevo producidas por la clona EhA12.

3.2 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA MOSTRADA POR LAS CLONAS RECOMBINANTES

3.2.1 Radioensayo y cromatografía en capa fina

De las 10 clonas aisladas con actividad de PLA, 6 clonas no presentaron actividad de PLA₂ o PLA₁ significativamente mayor al testigo negativo, para el cual utilizamos una clona que no presentó actividad de PLA al no observar un halo de color púrpura. De las 4 restantes, una de ellas presentó actividad de PLA₁ considerablemente mayor al resto y las tres últimas clonas presentaron una actividad de PLA₂ significativamente mayor al testigo negativo.

Determinamos la actividad específica a las clonas EhA11, EhA12 y EhA221, ya que fueron las que presentaron una cantidad considerable de cuentas por minuto (CPM). En la tabla XI mostramos los resultados en cuentas por minuto de cada una de las 10 clonas aisladas.

3.2.2 Determinación de actividad específica

Calculamos para las clonas EhA12, EhA11, EhA221 y Eh0, los valores de actividad específica presentados en la tabla XII. Hablando en términos de actividad específica relativa y tomando como punto de referencia a la clona que no presentó el halo característico de la presencia de actividad de PLA a la que denominamos Eh0, podemos reportar que la clona EhA221 presentó 2.63 veces mayor actividad, la clona EhA11 2.50 y la clona EhA12 1.72 veces.

Tabla XI. Resultados del radioensayo de las 10 clonas aisladas con actividad de fosfolipasa A en cuentas por minuto.

Clona	CPM en AGL	*	CPM en LFC	**	Identificación y apreciación de la actividad de PLA
EhA12	4130	1	69	0.03	Alta PLA ₂
EhA11	4934	1.19	180	0.09	Alta PLA ₂
EhA221	3463	0.84	81	0.04	Alta PLA ₂
EhA21	39	0.009	1860	1	Alta PLA ₁
EhA222	520	0.126	576	0.31	Media en ambas (PLB)
EhA431	0	0	791	0.42	Media PLA ₁
EhA15	0	0	443	0.24	Media PLA ₁
EhA432	242	0.06	781	0.42	Media PLA ₁
EhA22	15	0.0036	130	0.07	Baja en ambas
EhA23	0	0	12	0.006	Baja en ambas
Eh0	1025	0.24	201	0.10	Baja en ambas

* CPM relativas de actividad de PLA₂ con respecto a las CPM de la clona EhA12

** CPM relativas de actividad de PLA₁ con respecto a las CPM de la clona EhA21

3.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

3.3.1 Actividad hemolítica

Determinamos la actividad hemolítica de nuevo solamente en las tres clonas que presentaron una actividad de PLA₂ significativamente mayor al testigo negativo (EhA11, EhA12 y EhA221). Detallamos los resultados en la tabla XIII y de la misma forma que en los resultados de la sección anterior, podemos reportar una actividad hemolítica relativa de 2.17 para EhA221, 5.43 para EhA11 y 7.7 para EhA12.

Tabla XII. Actividad específica de PLA₂ en las 3 clonas elegidas.

Nombre de la clona	Actividad específica absoluta^a
Eh0	1.16
EhA221	5.6*
EhA11	5.33*
EhA12	3.66*

^a La actividad específica absoluta es expresada como nmoles del sustrato hidrolizados por mg de proteína en 1 h a 37°C

* Son significativamente diferentes a Eh0 con una $p \leq 0.05$

Tabla XIII. Actividad hemolítica de las clonas EhA11, EhA12 y EhA221.

Nombre de la clona	Actividad hemolítica absoluta^a
Eh0	6.59
EhA221	14.32*
EhA11	35.81*
EhA12	50.69*

^a Unidades hemolíticas/mg/90 min de reacción.

1 unidad hemolítica = 0.05 unidades de DO a 415 nm de longitud de onda.

* Son significativamente diferentes a Eh0 con una $p \leq 0.05$; mientras que EhA221 y EhA11 no son diferentes entre sí ni comparadas con EhA12 con una $p \geq 0.05$

3.3.2 Relación temporal de hemólisis

Una vez que determinamos la DH50 de cada una de las clonas seleccionadas, a un tiempo fijo, procedimos a determinar la relación temporal del % de hemólisis producida por cada una de dichas clonas variando ahora los tiempos de incubación. En la figura 11 mostramos que la clona EhA12 fue hemolítica desde el inicio del experimento, es decir, no mostró un tiempo de activación, comparada con el testigo negativo. La clona EhA11 mostró un incremento paulatino con respecto al tiempo de incubación. Del min 90 al min 180, la actividad se incremento del 30% al 70%, es decir, 2.33 veces. El testigo negativo (clona Eh0) y la clona EhA221 mostraron un comportamiento muy parecido.

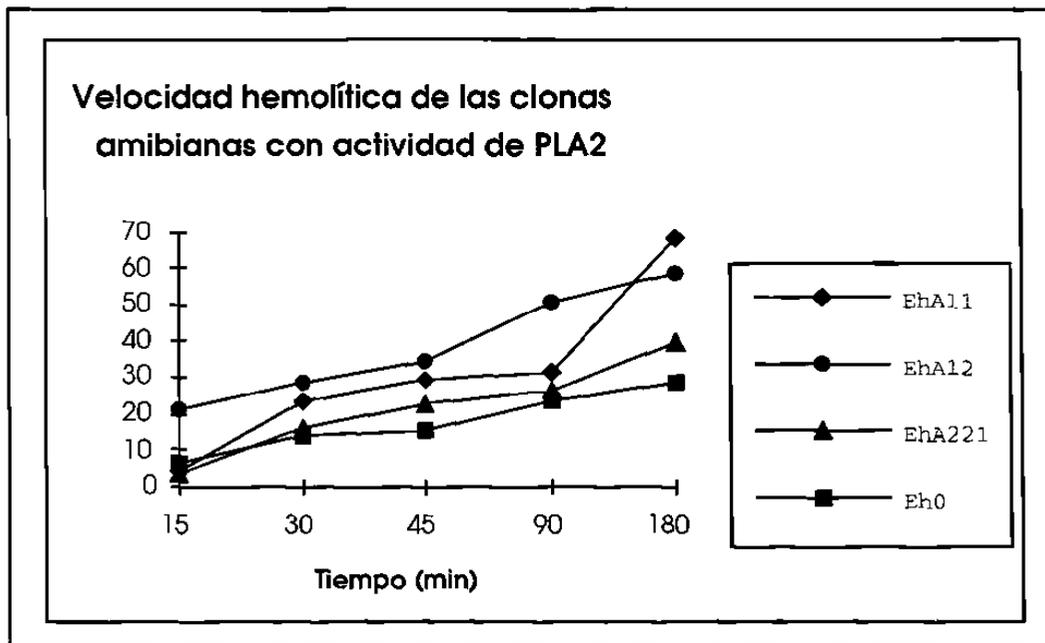


Figura 11. Relación temporal de la actividad hemolítica mostrada por las clonas recombinantes.

Determinamos la relación temporal de la actividad hemolítica de las clonas EhA12, EhA11, EhA221 y Eh0 incubando a 37°C, 25 µl del lisado bacteriano infectado con cada clona y 25 µl de suspensión de eritrocitos a tiempos variables (0, 15, 30, 45, 90 y 180 min).

Promedios ± DE de tres experimentos por triplicado

3.3.3 Determinación de la actividad hemolítica de la clona EhA12 en presencia del inhibidor de Rosenthal

Con el objeto de comprobar que la fuerte actividad hemolítica dependía de la actividad de fosfolipasa observada en la clona EhA12, procedimos a realizar un ensayo para determinar el porcentaje de hemólisis a un tiempo fijo de 90 min, utilizando diferentes concentraciones del inhibidor de Rosenthal, el cual es específico para fosfolipasas A. En la figura 12 mostramos la gráfica obtenida.

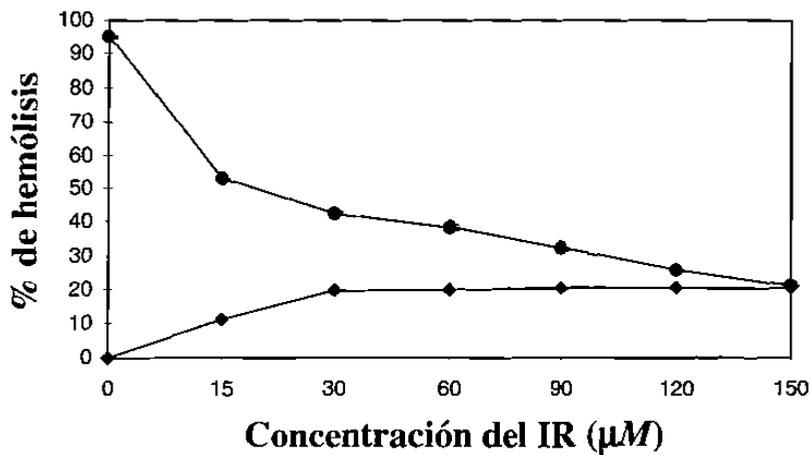


Figura 12. Efecto del inhibidor de Rosenthal sobre la actividad hemolítica de la clona EhA12.

La curva superior (●) indica el efecto del lisado de la cepa Y1090 de *E. coli* infectada con la clona EhA12 mas el inhibidor de Rosenthal. La curva inferior (◆) indica el efecto del inhibidor de Rosenthal *per se* sobre la solución de eritrocitos. Incubamos a 37°C por 90 min, 25 μl de una suspensión de la fracción particulada de bacterias infectadas con la clona EhA12 y 25 μl de una suspensión de eritrocitos al 3 % con concentraciones variables del inhibidor de Rosenthal (0, 15, 30, 90, 120 y 150 μM).

Promedios \pm DE de tres experimentos por triplicado.

3.4 SUBCLONACIÓN DEL DNAC DE LA CLONA EhA12

3.4.1 Purificación del bacteriófago de la clona EhA12 y extracción del DNA

Elegimos la clona EhA12 para el análisis del DNAC. Para ello, realizamos una propagación a gran escala de los bacteriófagos de la clona mencionada y extrajimos su DNA. La concentración obtenida del mismo fué de 500 ng/ μ l, con un aceptable grado de pureza observado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

3.4.2 Digestión con *Eco* RI de la clona EhA12 para liberar el fragmento recombinante

Realizamos una digestión con *Eco* RI para observar, mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, la presencia y el tamaño de la banda que correspondería al inserto que porta nuestra clona, la cual presentamos en la figura 13. El tamaño observado con ayuda de un marcador de peso molecular fue de aproximadamente 600 pares de bases.

3.4.3 Purificación del inserto, ligación a pBS II SK + y transformación de bacterias con pBS12 recombinante.

Obtuvimos aproximadamente 150 ng del inserto después de someterlo al proceso de purificación. Lo ligamos con el vector linearizado y utilizamos 80 ng aproximadamente del producto de ligación, para transformar 200 μ l de bacterias calcio-competentes. De la transformación observamos la presencia de dos colonias blancas, (lo

cual indicaba la presencia de un plásmido recombinante en el interior de la bacteria) las cuales aislamos y propagamos para su posterior análisis.

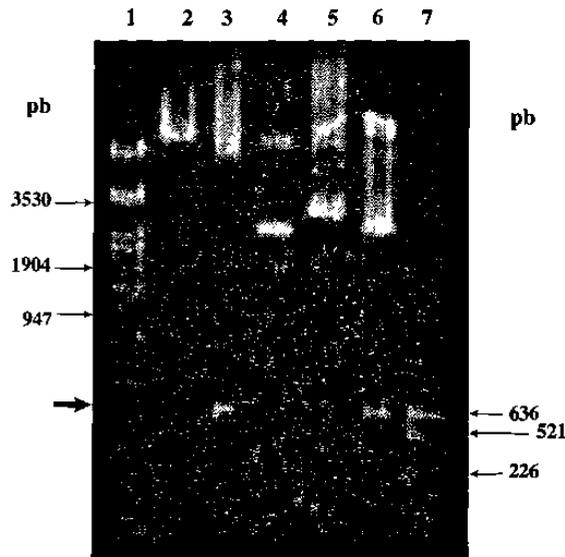


Figura 13. Identificación del inserto de la clona EhA12 subclonado en pBS12.

En los carriles 1 y 7 se observan los marcadores de tamaño molecular (DNA de fago λ cortado con *EcoRI* y *HindIII* y DNA de pUC19 cortado con *AluI*, respectivamente), en el carril 2 la clona EhA12 intacta y en el carril 3 la clona EhA12 cortada con *EcoRI*. El carril 4 corresponde al vector pBSII SK+ y el carril 5 a la clona en pBSII SK+ intacta (pBS12), mientras que el carril 6 representa la clona en pBSII SK+ cortada con *EcoRI*. La flecha sola indica la posición de los insertos que codifican para la hemolisina dependiente de PLA₂. Los números en el marco derecho del recuadro indican el número de pares de bases de los marcadores de menor peso molecular.

3.4.4 Detección de un sitio *Pst* I interno en el inserto de la clona pBS12

Después que digerimos con *EcoRI* y algunas otras enzimas de restricción (*Acc I*, *Alu I*, *Bam HI*, *Hind III*, *Kpn I*, *Pst I*, *Pvu II*, *Sac I*, *Sma I*, *Xho I*) los dos plásmidos

recombinantes que portaban el inserto de interés, determinamos el patrón de restricción de ambas clonas, observando que ambas presentaban el mismo inserto de acuerdo al patrón de restricción similar, y las tomamos como una sola clona, a la que denominamos pBS12, en la cual observamos también solamente la presencia de un sitio *Pst* I interno que posteriormente fue aprovechado en la etapa de secuenciación. En la figura 14 presentamos la fotografía del gel obtenido al correr una electroforesis con dichas digestiones

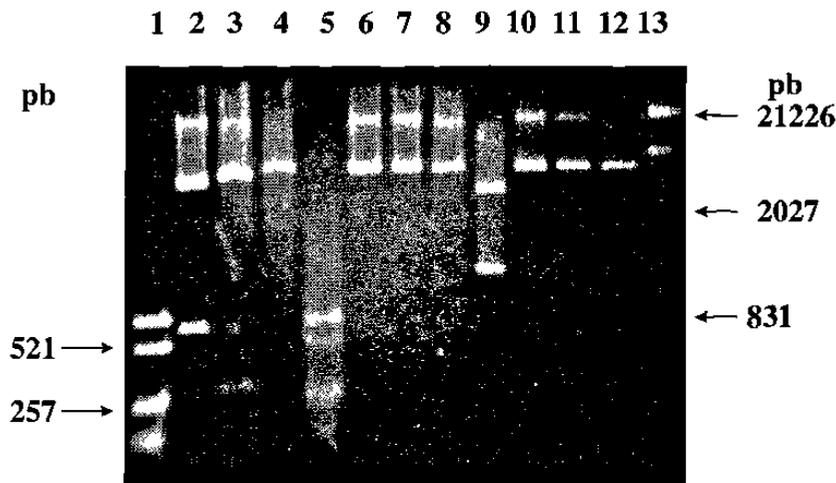


Figura 14. Patrón electroforético del inserto de la clona pBS12 digerido con diversas enzimas de restricción.

En esta figura podemos observar, en los carriles 1 y 13 los marcadores de tamaño molecular (DNA de pUC19 cortado con *AluI* y DNA de fago λ cortado con *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente). Del segundo al 12° carril se muestran las digestiones hechas con *EcoRI* (2), *Pst* I (3), *Acc* I (4), *Pvu* II (5), *Bam* HI (6), *Hind* III (7), *Kpn* I (8), *Alu* I (9), *Sac* I (10), *Sma* I (11), *Xho* I (12). Se observan las dos bandas características que muestra pBSII SK+ nativo al cortarlo con *AluI* y las tres bandas al cortarlo con *PvuII*. El tamaño del fragmento que se libera con *Pst* I es de aproximadamente 290 pares de bases.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA

3.5.1 Secuencia de nucleótidos de la clona pBS12

Determinamos una secuencia de 610 pb del inserto de la clona pBS12 incluyendo las bases de la cola de poli(A). Presentamos la secuencia de bases en la figura 15, mostrando el arreglo por tripletes, con los codones correspondientes al marco de lectura de la β -Galactosidasa expresada por el gen lac Z del fago λ gt-11.

```
GAATT CAG GCG CTT GCG CAT CTT GCG CAG GTG TGT  
GGA GAG GCC GGG GCA CAG GAG GGC GCC GAG CGC GGT  
GTG AGT GCT ATC CGT GAG CGC CTG GGG CCA CTG GTG  
GAG CAG GGT CGT CAG CGC ACA GCC AAC CTA GGC GCT  
GGC GCC GCC CAG CCC CTT CGA TCG CGT CCA GGC TTT  
GAG TGA  
CCGCATCCGAGGCTGGCTGGAGGAAGTGGGCAACCAGGCC  
GAGACCGCCTAGAGGAGGTGCGTGAGCAGATGGAGGAGGT  
GCGCTCCAAGATGGAGGAGCAGACCCAGCAGATACGCCTGC  
AGGCCGAGATCTTCCAGGCCCGCATCAAGGGCTGGTTCGAG  
CCGCTAGTGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCAAACCTAAT  
GGAGAAGATACAGGCCTCTGTGGCTACCAACTCCATTGCCT  
CCACCACAGTGCCCCTGGAGAATCAA7GATCATCCCTCACCT  
ACGCCCTGCCGCAACATCCATGACCAGCCAGGTGGCCCTGT  
CCCAAGCACCACTCTGGCCCTCTGGTGGCCCTTGCTTAATAA  
AGATTCTCCAAGCAAAAAA
```

Figura 15. Secuencia de nucleótidos del DNAC del inserto de la clona pBS12

Las primeras cinco bases corresponden al plásmido, dentro de las cuales se encuentra el sitio *EcoRI* GAATTC. La citosina del sitio *EcoRI* es la primera base de la secuencia del inserto. Se encuentra encerrado en cajas el primer sitio GTG y el primer sitio TGA que se presentan en el marco de lectura que corresponde al de la β -Galactosidasa expresada por el fago λ gt-11.

3.5.2 Comparación de la secuencia de la clona pBS12 con secuencias registradas en el Genbank

Con ayuda de un servidor remoto, nos fue posible hacer una comparación de la secuencia que obtuvimos, con el banco de genes de los Estados Unidos. En la figura 16 mostramos la alineación de la secuencia de la clona pBS12 con el fragmento de la Apolipoproteína E de rata con la cual tuvo el mayor porcentaje de similitud (92%) en dicha comparación.

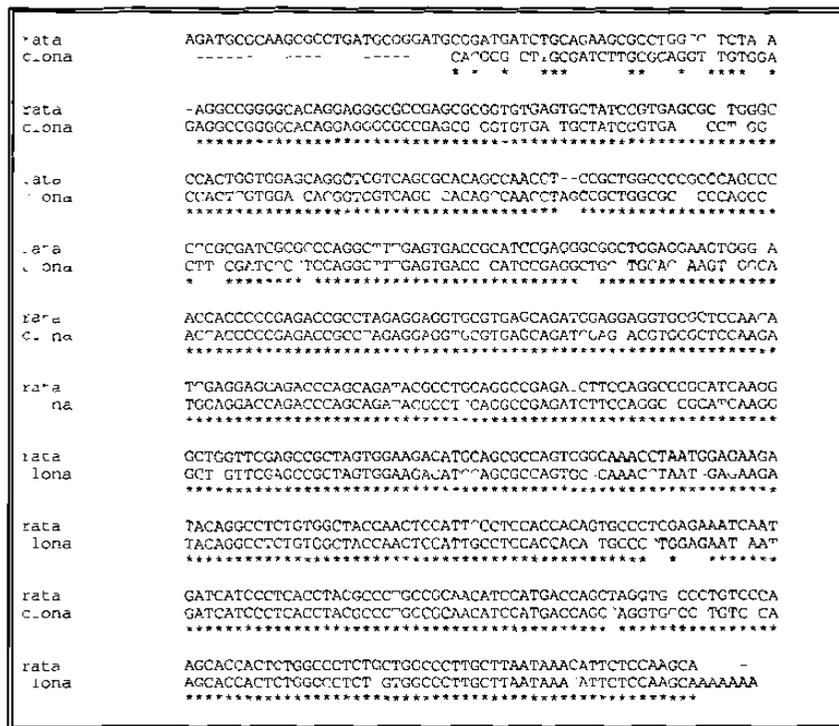


Figura 16. Comparación de la secuencia de la clona pBS12 con el fragmento de la Apolipoproteína E de rata con la cual mostró el mayor porcentaje de similitud.

3.5.3 Traducción de la secuencia nucleotídica de la clona pBS12 a secuencia de aminoácidos

Después de que localizamos un sitio de terminación TGA en el marco de lectura de la β -Galactosidasa, procedimos a determinar la secuencia de residuos de aminoácidos correspondiente, utilizando el código genético. En la figura 17 mostramos dicha secuencia que consta de 59 residuos de aminoácidos y un peso molecular calculado de 6.104 kDa mediante un programa de cómputo especializado, tomando en cuenta solamente los aminoácidos correspondientes a la región del inserto que se está traduciendo con el marco de lectura de la β -Galactosidasa.

**gln ala leu ala his leu ala gln val cys gly glu ala gly ala gln glu gly
ala glu arg gly val ser ala ile arg glu arg leu gly pro leu val glu
gln gly arg gln arg thr ala asn leu gly ala gly ala ala gln pro leu
arg ser arg pro gly phe glu OPA**

Figura 17. Secuencia de aminoácidos traducida del DNAC del inserto de la clona pBS12.

3.6 COMPARACIÓN ENTRE EhA12 Y pBS12

3.6.1 Hibridación tipo *Dot-Blot*

Con el objeto de asegurarnos que el inserto secuenciado de la clona pBS12 era el mismo inserto que el de la clona aislada EhA12 en fago λ , con actividad de PLA₂, procedimos a realizar este experimento marcando primero una sonda construida a partir

del inserto obtenido de pBS12 y después haciéndola hibridar con los DNA de ambas clonas. En la figura 18 mostramos los resultados obtenidos.

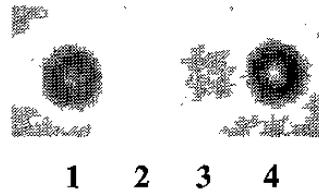


Figura 18. Hibridación tipo *Dot-Blot* de las clonas EhA12 y pBS12.

La primera y la cuarta marca muestran las manchas correspondientes a 50 ng de pBS12 y 50 ng de EhA12 respectivamente. La tercera marca corresponde a 25 ng de la clona EhA12 y la segunda corresponde a 50 ng del control negativo (DNA de pBLUESCRIPT SK +).

3.6.1.2 Digestión de los insertos de la clona EhA12 y la clona pBS12 con cuatro enzimas de restricción

Un segundo experimento en esta etapa consistió en hacer cuatro digestiones con enzimas de restricción a ambos insertos, el obtenido a partir de la clona EhA12 y el obtenido a partir de la clona pBS12, previamente purificados, encontrando que poseen un patrón de restricción idéntico. Mostramos los resultados en la figura 19, y en la tabla XIV mostramos el patrón de corte observado con cada una de las enzimas en ambos insertos.

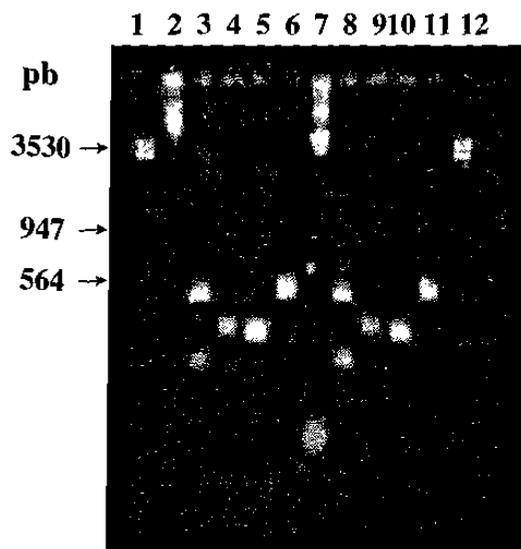


Figura 19. Patrones electroforéticos de los insertos de *E. histolytica* liberados de la clona EhA12 y de pBS12 con *Bgl*II, *Bgl* II, *Pst* I y *Pvu* I.

Los carriles 1 y 12 corresponden al marcador de tamaño molecular molecular (DNA de fago λ cortado con *Eco*RI y *Hind*III). El carril 2 corresponde a la clona EhA12 cortada con *Eco*RI. El carril 7 corresponde a la clona pBS12 cortada con *Eco*RI. Los carriles 3, 4, 5 y 6, 8, 9, 10 y 11 muestran las digestiones con las cuatro enzimas en EhA12 y pBS12 respectivamente. Nótese que los tamaños de los insertos liberados de EhA12 y pBS12 son iguales, también lo son los patrones de restricción.

Tabla XIV. Patrón de restricción del inserto de las clonas EhA12 y pBS12 con cuatro enzimas de restricción.

ENZIMA	PATRÓN EN PARES DE BASES
<i>Bgl</i> I	420 y 190
<i>Bgl</i> II	330 y 280
<i>Pst</i> I	307 y 303
<i>Pvu</i> I	450 y 160

3.6.2 HIBRIDACIÓN TIPO *DOT-BLOT* DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA CLONA pBS12 CON DNA GENÓMICO DE *Entamoeba histolytica*

Con el propósito de cerciorarnos que la secuencia nucleotídica del inserto de la clona pBS12 estaba presente en el DNA genómico de *E. histolytica*, procedimos a realizar este experimento marcando primero una sonda construida a partir del inserto obtenido de pBS12 y después haciéndola hibridar con DNA genómico de amibas. En la figura 20 mostramos los resultados obtenidos.

3.6.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Nuestro último experimento consistió en correr una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para observar la presencia y el tamaño aproximado de cualquier banda que nos diera indicio de lo que se estaba expresando a nivel de la traducción. Encontramos de esta forma, una banda de peso molecular aparente de 14.9 kDa (Fig 21) de acuerdo a los marcadores de peso molecular que se presentó en la clona EhA12 aislada del fago λ (Fig 22). Dicha banda no se presentó ni en la clona pBS12, ni en el resto de las clonas estudiadas (EhA11, EhA221 y Eh0) así como tampoco en las bacterias utilizadas como cepas hospedadoras ni en los bacteriófagos purificados. En la figura 22 mostramos la gráfica de interpolación donde calculamos el peso molecular de la proteína que expresó la clona EhA12.

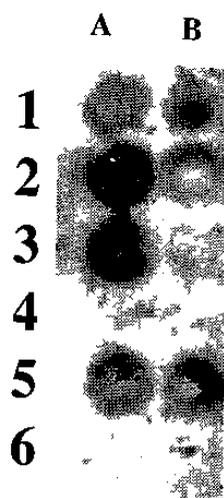


Figura 20. Hibridación *Dot-Blot* del DNA genómico de *E. histolytica* con la sonda construida a partir de pBS12.

Las manchas en la autorradiografía corresponden a las siguientes muestras:

DNA de rata, (1A, 10 mg y 1B, 5 mg); DNA de *E. histolytica* (2A, 1 mg y 2B, 0.5 mg); DNA del bacteriófago de la clona EhA12 (3A, 50 ng y 3B, 25 ng); DNA de una clona de fago λ -gt-11 negativa para actividad de PLA₂ (4A, 50 ng y 4B, 25 ng); DNA de la clona pBS12 (5A, 5 ng y 5B, 2.5 ng); DNA de pBLUESCRIPT SK+ (6A, 5 ng y 6B 2.5 ng); Todas las muestras se hibridaron con 50 ng de la sonda marcada con ³²P a partir de pBS12 durante 12 h a 42°C y formamida al 50%.

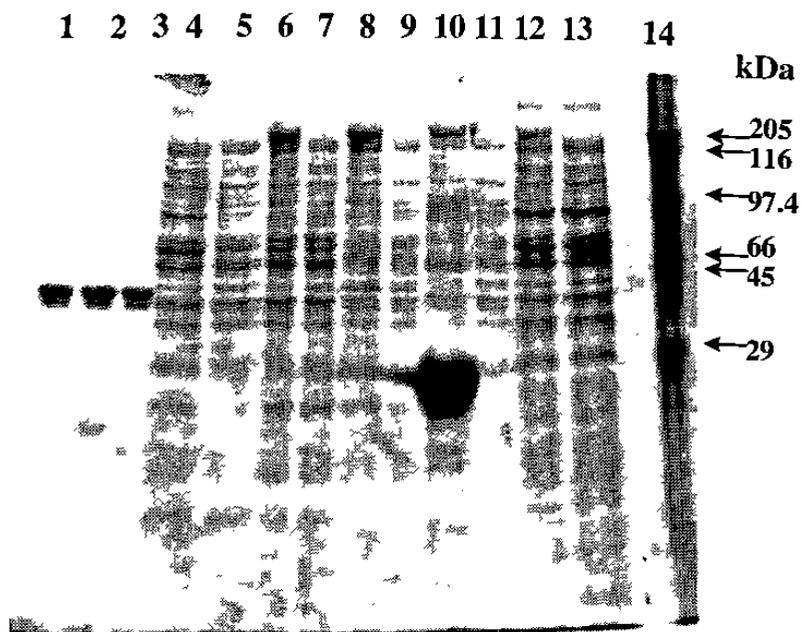


Figura 21. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

En esta figura, mostramos en los carriles 1, 2 y 3 las proteínas de cápside de los fagos purificados de las clonas EhA12, EhA11 y EhA221 respectivamente. En los carriles 4 y 5 mostramos las cepas bacterianas *E. coli* Y1090 y XL1-Blue respectivamente. En los carriles 6 y 7, el lisado de la clona EhA221 con y sin IPTG 100 mM. En los carriles 8 y 9, el lisado de la clona EhA11 con y sin IPTG 100 mM, en los carriles 10 y 11 el lisado de la clona EhA12 con y sin IPTG 100 mM. En los carriles 12 y 13 mostramos el lisado de la clona pBS12 con y sin IPTG 100mM y el carril 14 es un marcador de peso molecular para proteínas.

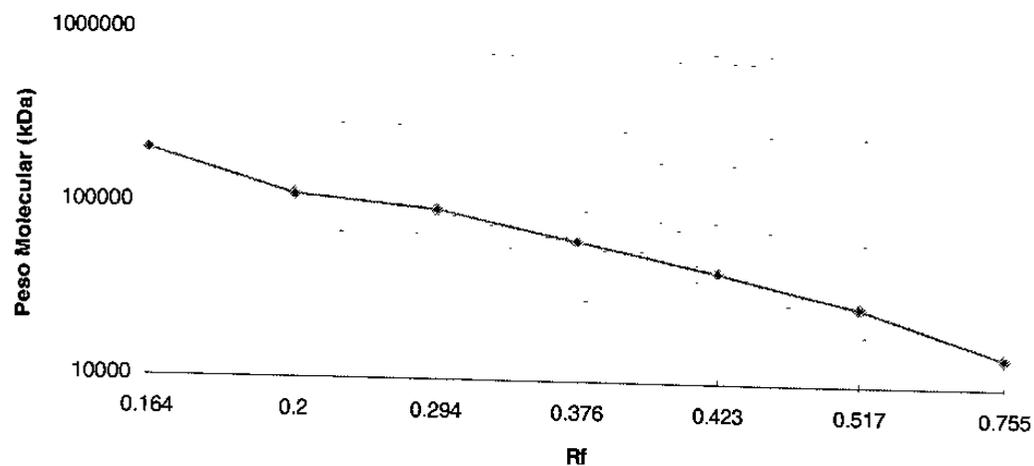


Figura 22. Curva estándar de pesos moleculares de proteínas en geles de poliacrilamida.

Esta curva se utilizó para calcular por interpolación el peso molecular de la proteína expresada en la clona EhA12 que se muestra en la figura 21.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Originalmente pensamos que era posible aislar clonas que produjeran proteínas biológicamente activas que pudieran estar involucradas en el mecanismo citolítico de *E. histolytica* a partir de una biblioteca de expresión. Para ello, contamos con el antecedente de las PLA₂ como probables factores de virulencia de *E. histolytica*, por lo que diseñamos un método para tamizar clonas *in situ* que expresen actividad de PLA directamente o que estimulen la actividad de PLA de la cepa Y1090 de *E. coli*. El tamizaje se llevó a cabo directamente sobre la base de agar donde crecieron las bacterias infectadas con la biblioteca de bacteriófagos λ gt-11 y formaron las placas de lisis.

Para diseñar dicho método consideramos lo siguiente: (a) que los eritrocitos son blanco de la actividad citolítica (Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1980), (b) que la fosfatidilcolina de yema de huevo es el sustrato de las PLA, y (c) que las condiciones de ensayo que implementamos fueran las específicas para las fosfolipasas A₂ encontradas en la fracción P30 de *E. histolytica* (Vargas-Villarreal, J. 1991).

Las condiciones para aceptar como adecuado el procedimiento de tamizaje descrito fueron las siguientes:

1. Que crecieran bien las bacterias a pH 8.0, condiciones en las que se ha reportado la actividad máxima de la fosfolipasa-hemolisina amibiana (Long-Krug, S. A.; Fisher, K. J. 1985 y Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. 1988).
2. Que las bacterias no produjeran halos de hidrólisis en la base de agar-YH-R6G.
3. Que los fagos fueran capaces de infectar y lisar a las bacterias en el medio establecido.
4. Que pudieran observarse bien con ayuda del indicador fluorescente los halos de lisis en el césped bacteriano producido por los fagos y también los halos de hidrólisis de lecitina producidos por la fosfolipasa A amibiana recombinante en las UFP.

Con esto en mente, pensamos que cultivando la cepa Y1090 en el medio habitual (agar-NZCYM) adicionado con Ca^{2+} 1mM y yema de huevo a pH 8.0 podríamos tener halos de lisis de la yema de huevo sobrepuestos a las placas de lisis de las bacterias. También podríamos visualizar las clonas positivas agregando una capa de rodamina 6G a las placas de lisis. Nuestra suposición resultó correcta y pudimos distinguir claramente las clonas con una alta actividad de PLA sobre las que tenían la actividad basal de esta enzima. Aislamos 10 clonas que expresaron actividad de PLA de acuerdo al método diseñado. De estas 10 clonas, solamente 4 presentaron actividad significativamente superior a la actividad de la clona usada como testigo negativo y a la de las bacterias solas. De las cuatro clonas, una de ellas expresó actividad de PLA_1 . Sólo 3 clonas (EhA12, EhA11 y EhA221) expresaron actividad de PLA_2 y fueron utilizadas para los estudios posteriores.

Por otro lado, EhA12 presentó una actividad hemolítica significativamente mayor a la de las clonas EhA11 y EhA221 y además, en el curso temporal de hemólisis de los lisados de *E. coli* infectados con esta clona la actividad hemolítica fué inmediata, a diferencia de las otras dos, en las que la hemólisis se manifestó después de cierto tiempo de incubación. Sin embargo, EhA12 presentó la menor actividad específica de PLA_2 en forma significativa respecto a EhA11 y EhA221.

A pesar de esto último, decidimos usar la clona EhA12 para terminar el presente trabajo, porque las características encontradas eran las mas parecidas a la PLA_2 purificada previamente por nuestro grupo de trabajo (Vargas Villarreal J., 1991).

En cuanto a las características del inserto portado por la clona EhA12, el tamaño aproximado esperado era de 409 a 820 pares de bases, pues las PLA_2 tienen un peso molecular de 15 a 30 kDa. (Oppendoes, F. R.; Van Roy, J. 1982). Nuestro inserto tiene 610 pares de bases, lo cual es congruente con lo esperado, sin embargo, en contra de lo esperado, la secuencia nucleotídica de nuestro inserto no mostró ninguna similitud con secuencias de DNAC conocidas de PLA_2 , pero si mostró similitud del 92% con apolipoproteína E de rata y 67 % con apolipoproteína E de humano. En ambos casos dicha similitud correspondió sólo a un segmento de aproximadamente 50% de la

secuencia total de las apolipoproteínas E hacia el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos.

Por otro lado, no apareció un codón típico de iniciación en el inserto, lo cual indica que la clona EhA12 es probablemente portadora de un DNAC incompleto, que es frecuente en bibliotecas construídas hace 5 o mas años, como la que utilizamos. (Lorenz Mertz, Life Technology, comunicación personal).

En la secuencia de nucleótidos existe un codón de terminación (TGA) que corresponde al aminoácido en posición 60.

Todos los resultados anteriores dieron pie a la formulación de las siguientes preguntas: (A) ¿fue correcta y sin riesgo de contaminación la subclonación que se hizo de fago λ a pBLUESCRIPT SK + para poder secuenciar?, (B) ¿el inserto correspondiente a la clona EhA12 es en realidad una PLA₂ con secuencia distinta a las reportadas, o es un péptido que sobreestimula la actividad de PLA₂ de la cepa Y1090 de *E. coli*? y (C) ¿la secuencia obtenida de la clona está realmente presente en el genoma de *E. histolytica*?

Para responder a la primera pregunta, consideramos lo siguiente: (i) secuenciar directamente el inserto en el fago de la clona EhA12, pero esto no estaba a nuestro alcance de momento. (ii) determinar la actividad hemolítica y de fosfolipasa en el vehículo de subclonación (la clona pBS12), pero esto no fue posible porque el inserto en el plásmido tiene un marco de lectura diferente. Por lo tanto purificamos los insertos de ambas clonas, la construída en fago y la subclonada en pBS II SK+ (EhA12 y pBS12) y los incubamos en presencia de varias nucleasas para analizar los patrones de restricción correspondientes. Encontramos que dichos patrones fueron idénticos (ver fig. 17). Por otro lado, hibridamos el DNA de las clonas EhA12 y pBS12 con una sonda construída a partir de la clona en pBS II SK+. Encontramos que las sondas sí hibridaron con el DNA de la clona en fago λ . Estos dos últimos experimentos nos permiten concluir que el inserto original en la clona EhA12 y el inserto subclonado en la clona pBS12 tienen exactamente la misma secuencia.

La otra pregunta importante a responder fue si la secuencia que encontramos corresponde a una secuencia del genoma de *E. histolytica*.

Esto pudo comprobarse mediante la hibridación del DNA genómico de *E. histolytica* con una sonda construida a partir de la clona pBS12. Los resultados fueron positivos en la hibridación de la sonda con el genoma de *E. histolytica* y con el genoma de rata y negativos con los vectores pBLUESCRIPT II SK + y bacteriófago λ gt-11 nativos, lo cual apoya fuertemente que la secuencia de la clona EhA12 está presente en el genoma de *E. histolytica*.

Como último experimento, realizamos una SDS-PAGE para proteínas para analizar el aspecto de la banda y el peso molecular aparente de la proteína expresada por la clona EhA12, con la cual pudimos evidenciar una banda de aproximadamente 14.9 kDa que no está presente en ninguno de los testigos incluidos en el gel. Esta banda es muy ancha, lo que indica que la proteína está sobreexpresándose y está inducida por IPTG. La proteína de 14.9 kDa no se encontró en la clona pBS12, lo cual también era de esperarse, pues al traducir la secuencia de nucleótidos, utilizando su propio marco de lectura, inmediatamente al principio, después de 22 aminoácidos hay un codón de terminación. En la clona EhA12, además de la banda de 14.9 kDa, también fue posible encontrar la banda correspondiente a la β -Galactosidasa. Como no se determinó la secuencia del péptido de 14.9 kDa, cuya síntesis dirigió el DNA de *E. histolytica*, no podemos determinar en este momento si se trata de un péptido de fusión compuesto por un segmento de β -Galactosidasa y otro de la proteína de *E. histolytica*, o la totalidad de la secuencia corresponde a una proteína amibiana.

6.1 Posible significación biológica de la presencia de una secuencia de Apolipoproteína E en el genoma de *E. histolytica*

Existen evidencias de que dos fragmentos de cualquiera de las 3 principales isoformas de ApoE (2, 3 y 4) generados por proteasas de las mismas células, poseen actividad citostática y citotóxica hacia linfocitos T dependientes de interleucina 2 (Clay-MA; Anantharamaiah-GM; Mistry-MJ; 1995). Por lo tanto no es totalmente inesperado

que el péptido que se sintetiza dirigido por el inserto de la clona EhA12 que tiene similitud con Apo E, tenga actividad hemolítica *per se*.

Nuestros resultados demostraron que la actividad hemolítica observada en los lisados de *E. coli*, cepa Y1090 infectadas con la clona EhA12 depende de la actividad de PLA₂, porque dicha actividad se inhibió con un inhibidor específico de PLA₂, el inhibidor de Rosenthal (ver fig. 10). Por otro lado, existen también evidencias del efecto de ApoE sobre la hidrólisis de FC y triacilglicerol por una lipasa hepática, encontrándose que la lipasa aumenta su actividad 1.8 veces mas hacia la FC por acción de la ApoE y la hidrólisis de triacilglicerol se aumenta en 1.5 veces mas; mientras que las otras apolipoproteínas conocidas inhiben la hidrólisis (Thuren-T; Sisson-P; Waite-M; 1991). Este hallazgo sugiere que el péptido de 14.9 kDa de la clona EhA12 está sobreestimulando la actividad de PLA₂ de las células bacterianas hospedadoras del fago y éstas a su vez producen una fuerte actividad hemolítica. Sin embargo, con los resultados obtenidos en el presente trabajo, no es posible descartar una actividad de PLA₂ y hemolítica intrínsecas en el péptido de 14.9 kDa antes mencionado.

Se han descrito hasta ahora 4 isoformas de ApoE, las cuales tienen una sola cadena polipeptídica y su secuencia es conservada. Las ApoE son constituyentes de varias lipoproteínas del plasma. Estas proteínas tienen un peso molecular de 34 kDa y son importantes en el metabolismo del colesterol y otros lípidos en los mamíferos (Elishourbagy, N.; Mahley, W.; Taylor, J. 1985). El DNAC de la ApoE posee alrededor de 1090 nucleótidos y aproximadamente 360 aminoácidos; estos valores corresponden a casi el doble de la secuencia de nucleótidos de la clona EhA12. De ahí que posiblemente de la parte media de la ApoE hacia el extremo 3' se encuentra la mayor parte de la región activa de dicha proteína. Por otro lado, en esta región se localizan la actividad citostática del péptido reportado por Clay-MA y cols (Clay-MA; Anantharamaiah-GM; Mistry-MJ; 1995) y el dominio de unión al receptor (Elishourbagy, N.; Mahley, W.; Taylor, J. 1985).

El conjunto de todas las evidencias parecen indicar que la proteína podría tener un significado en la virulencia de *E. histolytica*, si ésta es procesada por las amibas y/o las células blanco para generar el péptido que encontramos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- 1.- Con el presente trabajo, hemos descrito un nuevo método para tamizar *in situ* clonas portadoras de secuencias de DNAC que codifiquen para fosfolipasas A₁, A₂ o B o para factores que sobreestimulen la actividad de estas mismas enzimas de la cepa *E. coli* Y1090.
- 2.- Aislamos la clona EhA21, que expresa actividad de PLA₁
- 3.- Aislamos las clonas EhA11, EhA12 y EhA221 que expresan actividad de PLA₂.
- 4.- La clona EhA12 induce la mayor actividad hemolítica de las clonas aisladas en lisados de la cepa *E. coli* Y1090. Esta actividad es inmediata.
- 5.- La actividad hemolítica mostrada por la clona EhA12 en lisados de la cepa Y1090 depende de una actividad de PLA₂.
- 6.- El inserto de la clona EhA12 tiene una secuencia con un 92% de similitud con el extremo 3' de la secuencia que codifica para la apolipoproteína E de rata y un 67% con respecto a la ApoE de humano
- 7.- Se encontró un péptido de 14.9 kDa que indujo una actividad hemolítica notable.
- 8.- El péptido de 14.9 kDa fué sintetizado por las bacterias infectadas con la clona EhA12 y su síntesis fué dirigida por el inserto de *E. histolytica* clonado en este trabajo.
- 9.- La secuencia de DNAC de la clona EhA12 está presente en el genoma de *E. histolytica*.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

La siguiente etapa de este trabajo consistirá en conocer la secuencia completa del DNAC que codifica para el péptido con alta homología para Apolipoproteína E.

Es necesario investigar si dicha secuencia dirige la síntesis de una proteína con las mismas propiedades que encontramos en la clona EhA12 y/o se genera un péptido igual al que analizamos en el presente trabajo.

Otra posibilidad sería investigar si las amibas tienen este péptido y/o la Apolipoproteína E, y si ésta proteína y/o péptido tiene actividad sobre leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos y/o macrófagos; o directamente sobre hepatocitos. Además será importante establecer si transformando con el inserto de la clona EhA12 una clona no virulenta de *E. histolytica* proveniente de una cepa virulenta, es posible que dicha clona recupere su virulencia. Esto mismo deberá hacerse con la secuencia completa del DNAC que codifica para la proteína análoga amibiana.

Por otro lado para continuar con esta línea de investigación ya establecida, se secuenciarán las otras clonas que mostraron actividad de PLA₂, PLA₁ o PLB. Es importante probar si alguna de las otras clonas con actividad de fosfolipasa aisladas incrementan la virulencia de clonas de *E. histolytica* con escasa actividad de fosfolipasa A y nula capacidad de producir abscesos hepáticos en hámsters infectados experimentalmente. Finalmente, otra interrogante a responder, es conocer si los protozoarios expresan la Apolipoproteína E y, de ser así, cual es el papel de estas proteínas en los dichos organismos. Este trabajo nos ha permitido avanzar un poco más en el estudio acerca de los factores de virulencia en el mecanismo patogénico de *E. histolytica*.

“La verdad es un fuego fatuo que sólo puede ser captado con la red de los que despreciándola llevan a cabo pacientes experimentos, es una gran coqueta; no hay que buscarla con demasiada pasión, pues con frecuencia se rinde más bien a la indiferencia. Se escapa cuando parece que la tenemos presa, pero se entrega si se le espera pacientemente; se revela ella misma después de habernos despedido de ella, pero es inexorable cuando se le ama con excesivo fervor”

Ernesto Renán

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castro-Garza, J.; Said-Fernández, S. (1992). Immediate cell membrane damage produced by *Entamoeba histolytica* subcellular extracts. *Archives of Medical Research*. **23**:191-192.
- Chang, J.; Musser, J. H.; McGregor, H. (1987). Phospholipase A₂: Function and pharmacological regulation. *Bioch. Phar.* **36**:2429-2436.
- Clay, M.; Anantharamaiah, G.; Mistry, M.; Balasubramaniam, A.; Harmony, J. (1995). Localization of a Domain in Apolipoprotein E with both Cytostatic and Cytotoxic Activity. *Biochemistry*. **34**:11142-11151.
- Dennis, E. A. (1983). Phospholipases in *The enzymes* (ed. Boyer, P.). **16**:307-353.
- Diamond, L. S. (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba histolytica*-like amebae. *Journal of Protozoology*. **54**:1047-1056.
- Dijkstra, W. B.; Drenth, J.; Kalk, K. H.; Van Der Maelen, P. J. (1978). Three-dimensional structure and disulfide bound connections in bovine pancreatic phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* **129**:53-60
- Eaton, R. D.; Meerouitch, E.; Costerton, J. W. (1970). The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. & Para.* **64**:299-304.
- Edman, U.; Meza, I.; Agabian, N. (1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba hitolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**:3024-3028

Elishourbagy, N.; Liao, W.; Mahley, R.; Taylor, J. (1985). Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:203-207.

EPIDEMIOLOGÍA, Boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, S.S.A. (Septiembre 1997) **39**: Vol. 14.

GIBCO BRL. Catálogo y Guía de Referencia (1992).

Haberman, E.; Hardt, K. L. (1972). A sensitive and specific test for the quantitation of phospholipases. *Annals of Biochemistry.* **50**:163-173.

Hawthorne, S. N.; Ansell, G. B. (1982). Phospholipids. Edición ElsevierBiomedical Press Amsterdam, New York, Oxford. 313-426.

Heinrikson, R. L.; Krueger, E. T.; Keim, P. S. (1977). Aminoacid sequence of phospholipase A₂ a from venom of *Crotalus adamanteus* a new classification of phospholipase A₂ based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.* **252**:4913-4921.

Jansson, A.; Gillin, F. (1994). Coding of hemolysins within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. *Science.* **263**:1440-1443.

Joyce, M. P. (1988). Pathology of human amebiasis. In *Amebiasis*. Ravdin JI (ed) John Wiley & Sons, Inc. New York. 129-146.

Kretschmer, R. R. (1990). Amebiasis: Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. CRC Press. 19-58

- Lehninger, A. L. (1979). Bioquímica. Ed. Omega, S. A., Barcelona España. 307-312.
- Long-Krug, S. A.; Fisher, K. J.; Hygmith, R. M.; Ravdin, J. I. (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. J. Infect. Dis. **152**:536-541.
- Long-Krug, S. A.; Ravdin, J. I. (1988). The role of amebic phospholipases in cytolysis of target cells by *Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis Ravdin JI (ed). Human Infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- López-Revilla, R.; Cano Mancera, R. (1982). Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. Infect. Immun. **37**:281-285.
- Lowry, O. H.; Rosbrough, N. S.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. **183**:265-275.
- Martínez-Palomo, A. (1982) Cell Biology, The Cyst. En: The biology of *Entamoeba histolytica*. (ed) John Wiley & Sons. New York. Cap. 2: 56-59.
- Opperdoes, F. R.; Van Roy, J. (1982). The phospholipase of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and cultured procyclics. Mol Biochem. Parasitol. **5**:309-319.
- PERKIN ELMER AmpliCycle Sequencing kit. Guía rápida de referencia. (1992)
- Ravdin, J. I.; Guerrant, R. L. (1982). A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Infect. Dis. **4**:1185-1207.

- Ravdin, J. I.; Guerrant, R. L. (1982). Separation of adherence, cytolytic and phagocytic event in the cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. **13**(3):123.
- Roa, V. G.; Padma, M. C. (1971). Some observations on the pathogenicity of strains mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Infect. Dis. **4**:1185-1207.
- Rosales-Encina, J. L.; Schlie-Guzmán, M. A. (1992). Purification and partial characterization of an hemolytic activity from *Entamoeba histolytica*. Archives of Medical Research. **23**(2):243-248.
- Saffer, L. D.; Long-Krug, S. A.; Schwartzman, J. D. (1989). The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **40**:145-149.
- Said-Fernández, S. (1990). Factores de virulencia de *Entamoeba histolytica*. Archivos de Investigación Médica. **21**:253-262.
- Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. (1980). Cytopathogenicity of *E. histolytica*: Hemolytic activity of trophozoite homogenates. J. Trop. Med. Hyg. **29**:209-212.
- Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. (1988). Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect. Immun. **56**:874-879.
- Said-Fernández, S.; López-Revilla, R. (1983). Latency and heterogeneity of *Entamoeba histolytica* hemolysins. Z. Parasitenk. **69**:435-438.

- Said-Fernández S.; López-Revilla, R. (1982). Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Z. Parasitenk.* **67**:249-254.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second ed. New York. Cold Spring harbor Laboratory Press.
- Scott, D. L.; Whitw, S. P. (1990). Interfacial Catalysis: the Mechanism of Phospholipase A₂. *Science*. **250**:1541-1546
- Shier, W. T. (1979). Activation of high levels of endogenous phospholipase A₂ in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**:195-199.
- Skipsky, J. P.; Barclay, M. (1969). Thin-layer chromatography of lipids, In J. M. Lowenstein (ed). *Methods in Enzymology*, Vol. 14. Academic Press, N. Y. 530-589
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**:4673-4680.
- Thuren, T.; Sisson, P.; Waite, M. (1991). Activation of hepatic catalyzed phosphatidylcholine hydrolysis by apolipoprotein E. *Biochim Biophys Acta*. **1083**:217-220.
- Vadas, P.; Wasi, S.; Mouat, H. Z.; Hay, J. B. (1981). Extracellular phospholipase A₂ mediates inflammatory hyperaemia. *Nature*. **293**:583-585.

- Van Den Bosch, H. (1980). Intracellular phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta.* **604**:191-246.
- Van Den Bosch, H. (1974). Phosphoglycerides metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **43**:243-277.
- Vargas-Villarreal, J. (1991). Aislamiento y Caracterización de una Fosfolipasa A₂ de *Entamoeba histolytica* con actividad lítica directa. UNAM, Unidad académica de los ciclos profesionales y de posgrado. Tesis Doctoral.
- Verheij, H. M.; Slotboon, A. J.; Haas, G. H. (1981). Structure and Function of Phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.***91**:91-203.
- Walsh, J. A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In Amebiasis. Ravdin JI (ed) New York: John Wiley & Sons. 93-105.
- Wells, M. A. (1974) A phospholipase A₂ model system. Calcium enhancement of the amine-catalysed methanolysis of phosphatidilcholine. *Biochim.* **13**:2258-2264.
- Young, J. D.; Cohn, Z. A. (1985). Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*: characterization of a pore-forming protein (PFP). *Journal of Cellular Biochemistry.* **29**:299-308.
- Young, R. A.; Davis, R. W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:1194-1198.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Isaías Balderas-Rentería

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis:

CLONACION DEL DNAC DE UNA HEMOLISINA DE
Entamoeba histolytica DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD DE
FOSFOLIPASA A₂

Campo de Estudio: Ciencias Básicas.

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 11 de Octubre de 1971, hijo de César Eduardo Balderas Alejandro y Lydia Rentería Ortega.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 1993.

