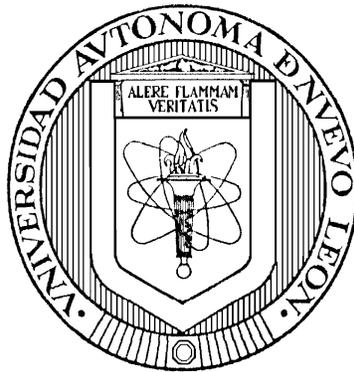


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Entamoeba histolytica* VIRULENTA

Por

QFB. OLIVIA FLORES CUEVAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Junio, 2012

IDENTIFICACIÓN DE ANTIGÉENOS DE *Entamoeba histolytica* VIRULENTA

Aprobado por Comité de Tesis

Dr. Isaías Balderas Rentería
Presidente

Dr. Benito Mata Cárdenas
Secretario

Dr. Omar González Santiago
Vocal

Dra. Ma. Teresa Garza González
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Junio, 2012

IDENTIFICACIÓN DE ANTIGÉENOS DE *Entamoeba histolytica* VIRULENTA

Revisado por Comité de Tesis

Dr. Omar González Santiago

Dra. Patricia González Barranco

Dra. Mónica Noel Sánchez González

Junio, 2012

La parte experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, que pertenece al Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Benito Mata Cárdenas y en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Isaías Balderas Rentería.

RESUMEN

Olivia Flores Cuevas

Fecha de Graduación: Junio, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: IDENTIFICACIÓN DE *Entamoeba histolytica* VIRULENTE

Número de páginas: 95

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con orientación en Farmacia

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método del Estudio: La amebiasis es la tercera enfermedad parasitaria más importante en el mundo por ser causa de muerte. Alrededor de 45 mil personas mueren al año por esta causa. Es una infección entérica potencialmente invasiva ocasionada por el parásito *Entamoeba histolytica*. En esta investigación se trató de identificar las secuencias de proteínas que están sobreexpresadas en la Cepa Virulenta de *Entamoeba histolytica*, ya que esas proteínas pueden utilizarse como antígenos para construir una vacuna eficaz contra la amebiasis; la identificación de las proteínas sobreexpresadas se realizó mediante la construcción de una biblioteca genómica sustractiva de la Cepa Virulenta, la ventaja de dicha biblioteca es, que al obtenerse proteínas plegadas, estas pueden ser secuenciadas y además se pueden utilizar para realizar tamizajes inmunológicos.

Contribuciones y Conclusiones: Se obtuvo la cepa virulenta de *E. histolytica* mediante pasaje de trofozoítos por hígado de hámster, la virulencia de la cepa se confirmó mediante una RT-PCR para el gen Cisteín-proteínasa 5, que es un gen característico de cepas virulentas de *E. histolytica*. La cepa virulenta de *E. histolytica* expresa RNAm diferenciales en comparación con la cepa no virulenta, estos se aislaron mediante extracción de RNA con Trizol y se confirmó la presencia de los RNAm diferenciales a través de una RT-PCR para el gen Cisteín-proteínasa 5. Se logró obtener una biblioteca sustractiva con una eficiencia de empaquetamiento sumamente baja. El tamizaje inmunológico de las proteínas de los fagos con el suero de los pacientes con absceso hepático amebiano, resultó negativo. La metodología propuesta en este proyecto presentó complicaciones, debido a todas esas complicaciones, resulta claro que el diseño de la metodología para obtener genes diferenciales de *E. histolytica* virulenta, que expresen proteínas y que alguna de éstas pueda utilizarse para la fabricación de una vacuna, es bastante complicado. Es por eso que se propone probar otras metodologías que están más ampliamente estudiadas como el differential display o la hibridación de microarreglos con las cuales también se pueden identificar genes sobreexpresados de *E. histolytica* virulenta y después estos genes podrían ser aislados y clonados en *E. coli* utilizando un kit de clonación para facilitar la obtención de la proteína, la cual posteriormente deberá ser purificada mediante western blot o con columnas de afinidad, para que se pueda realizar el tamizaje inmunológico.

FIRMA DEL ASESOR:

DEDICATORIA

A Dios...

Por darme la Vida y la Fortaleza que he necesitado para realizar mis más grandes sueños.

A mis Padres...

Porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado apoyándome en todo.

Papá gracias por enseñarme a hacer mi trabajo con dedicación pero sobretodo con mucha pasión.

Mamá gracias por enseñarme a nunca darme por vencida, contigo aprendí que en Dios todo se puede. LOS AMO!!!

A mis Hermanos...

Oscar y Erikc ustedes me motivan a que yo de mi mayor esfuerzo, esta tesis les pertenece, porque estuvieron a mi lado durante todo el trayecto y jamás me abandonaron. LOS QUIERO CON TODO MI CORAZÓN!!!

Agradecimientos

Al Conacyt.

Por otorgarme la beca económica para poder estudiar la maestría y realizar una estancia en el extranjero.

Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Por darme la oportunidad de desarrollarme como alumna de posgrado en sus instalaciones.

Biomédicas del IMSS.

Por permitirme utilizar sus instalaciones para aprender el cultivo de las amibas.

Al Dr. Isaías Balderas.

Por confiar en mí y a pesar de los mil inconvenientes que se presentaron siempre estuvo ahí en las buenas y en las malas, gracias porque más que un asesor se convirtió en un amigo.

Al Dr. Benito Mata.

Por transmitirme su conocimiento en el cultivo de amibas, que me sirvió como base para ejecutar este proyecto y darme el ánimo para concluirlo.

Al Dr. Javier.

Por explicarme detalle a detalle la inoculación de los hámsters con amibas, para poder obtener la cepa virulenta.

A la Dra. Pilar Carranza.

Por proporcionarme los primers del gen Cisteín Proteinasa 5, que fueron de gran ayuda para desarrollar este proyecto.

A mi comité tutorial.

La Dra. Paty Gzz., la Dra. Mónica y el Dr. Omar gracias por esas correcciones y aportaciones que hicieron a este proyecto.

A la Dra. Lucy.

Por darme ese empujoncito para que pudiera llegar al final de esta meta, gracias por escucharme, comprenderme y apoyarme.

A mis compañeros de Biomédicas.

Chuy y Magda que me ayudaron muchísimo con el cultivo de las amibas, cuando no tenía tiempo de ir a resembrar.

A mis compañeros de Generación.

Nallely, Laurita, Ericka, Panchito y Dario, por que con ustedes compartí esos momentos de aprendizaje en el salón y ese estrés incomparable que dejan las tareas, los trabajos finales y los exámenes.

A mis compañeros de Laboratorio.

Sonia, Nallely, Ivette, Ángel, Raúl Favela, Juan (el muchacho), Raúl Reyna, Héctor y Eder. Gracias porque todos ustedes de una u otra forma contribuyeron a la realización de los diferentes experimentos de esta tesis, gracias por todas esas comidas en las cuales reíamos tanto y de las cuales guardo muy gratos recuerdos. ¡Los quiero mucho!

A mis amigas.

Magaly, Claudia, Ale (mi veci), Jamie, Viri y Celic por escucharme hablar tantas veces de cosas que no entienden, por vivir esta experiencia conmigo desde una perspectiva diferente.

A la Dra. Natalia y a su Familia.

Por ser tan cariñosos conmigo y estar pendientes de mí en todo momento. Dra. Naty gracias a su apoyo logre hacer realidad uno de mis más grandes sueños. Javi gracias por brindarme tu amistad.

Al Dr. Aguayo.

Por enseñarme el cultivo de células madre y por recibir de una forma muy cálida en su laboratorio.

A mis amigos Chilenos.

Vale A., Fran, Liska, Casandra, Vale G., Paula, Paola, Nico, Carlitos, Chelo, Sara, Vania, Fernando, Jorge, Paulina, Mario, Dra. Claudia y Dra. Liliana, por transmitir su conocimiento en células madre, por recibirme con los brazos abiertos en el laboratorio y hacerme sentir como parte del GIFE. Me la pase bakan con ustedes.

A la familia Aguilera y a la familia Díaz.

Por todo ese cariño que me dieron, porque me hicieron sentir como en mi casa, porque esa sensación de que los conocía de años atrás fue increíble, gracias por dejar huella en mi corazón. ¡Los quiero muchísimo!

A mis compañeros de estancia.

Mayra, Pepe y Carlos, porque gracias a ustedes esa estancia fue genialmente divertida e inolvidable, e incluso ustedes fueron los primeros que estuvieron presentes en la escritura de esta tesis.

A Aldo.

Porque a pesar de que no había terminado la maestría, confiaste en mí y me estas dando la oportunidad de trabajar en Debbiom en un área en la cual no tengo experiencia.

A mis compañeros de trabajo.

Arturo, Juany, Sandra, Fabricio, Fabiola, Ceci, Liz y Cess, porque siempre se preocuparon por preguntarme como me iba en la maestría.

A toda mi familia.

Tíos, Primos, Sobrinos y Abuelos gracias porque siempre han confiado en que llegaré muy lejos y porque me han regalado fines de semana muy divertidos y relajantes cuando mas estrés tenía. Quiero agradecer en especial a mi familia Cuevas Tamez por dejarme ser parte de ustedes. FAMILIA LOS QUIERO MUCHO!!!

A Héctor.

Gracias porque llegaste a mi vida en el momento en que más te necesitaba, estuviste conmigo en la etapa más difícil de la maestría y fuiste una pieza clave para que yo lograra concluir este ciclo.

TE AMO!!! H₂O

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> y la amebiasis.....	18
1.1.1 <i>E. histolytica</i>	18
1.1.2 Ciclo de Vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
1.1.3 Clasificación de la Amebiasis.....	20
1.1.4 Patogenia de la Amebiasis.....	20
1.1.4.1 ¿Cómo se Produce la Patogenia de la Amebiasis?.....	20
1.1.4.2 Mecanismos de Destrucción del Tejido.....	21
1.2 Mecanismo de Transmisión y Síntomas.....	22
1.3 Epidemiología de la Amebiasis.....	22
1.4 Diagnóstico y Tratamiento.....	23
1.4.1 Diagnóstico.....	23
1.4.2 Tratamiento.....	24
1.4.2.1 Tratamiento.....	24
1.4.2.2 Perspectivas en el Desarrollo de una Vacuna.....	25
1.5 Métodos Moleculares para la Detección de Factores de Virulencia.....	25
1.5.1 Cepa Virulenta y Cepa No Virulenta de <i>E. histolytica</i>	25
1.5.2 Identificación de Factores de Virulencia.....	26
1.6 Bibliotecas Sustractivas.....	27
1.6.1 Bacteriófago λ	27
1.6.2 Bibliotecas de DNA complementarias.....	27
1.6.3 Bibliotecas Sustractivas.....	28
1.6.3.1 Construcción de Bibliotecas Sustractivas.....	28
1.6.3.2 Presentación de Péptidos y Proteínas en la Cápside de Bacteriófagos Filamentosos.....	29
Capítulo II	
ANTECEDENTES.....	30
2.1 Identificación de la Virulencia de <i>E. histolytica</i>	30
2.2 Identificación de Genes Asociados a la Virulencia.....	31
2.3 Silenciamiento de Genes Asociados a la Virulencia.....	33
2.4 Factores de Virulencia.....	34
2.4.1 Lectina Gal/GalNAc.....	35
2.4.2 Amebaporo.....	37
2.4.3 Cisteín Proteasas.....	38
2.5 Motilidad de <i>E. histolytica</i>	39
2.6 <i>E. histolytica</i> y el Sistema Inmune del Hospedador.....	40
2.7 Vacunas contra <i>E. histolytica</i>	41

Capítulo III

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
3.1 Justificación.....	42
3.2 Hipótesis.....	44
3.3 Objetivos.....	44
3.3.1 Objetivo General.....	44
3.3.2 Objetivos Específicos.....	44

Capítulo IV

MÉTODOS.....	45
4.1 Estrategia de Trabajo.....	45
4.2 Metodología.....	46
4.2.1 Obtención de Cultivos Amebianos.....	46
4.2.1.1 Cultivo Axénico Amebiano de <i>E. histolytica</i>	46
4.2.1.2 Inducción del Absceso Hepático Amebiano.....	46
4.2.1.3 Cultivo de Amibas a Partir del Absceso Amebiano.....	47
4.2.1.4 Curva de Crecimiento.....	48
4.2.2 Extracción de RNA.....	48
4.2.2.1 Obtención de la Pastilla de Amibas.....	48
4.2.2.2 Extracción de RNA.....	49
4.2.2.3 Cuantificación de RNA.....	49
4.2.2.4 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	50
4.2.2.5 Identificación del Gen Cisteín-Proteinasa 5.....	51
4.2.2.5.1 Retrotranscripción.....	51
4.2.2.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	52
4.2.2.5.3 Gel de Agarosa al 1%.....	53
4.2.3 Hibridación de RNAm-cDNA.....	53
4.2.3.1 Retrotranscripción.....	53
4.2.3.2 Hibridación RNAm-cDNA.....	54
4.2.3.3 Extracción de RNAm Diferenciales.....	54
4.2.3.4 Identificación del Gen CP5.....	54
4.2.4 Clonación de los Insertos al Vector Fágico.....	55
4.2.4.1 Alineación de los Iniciadores para Formar los Adaptadores 3' y 5'.....	55
4.2.4.2 Unión del Adaptador 3'.....	56
4.2.4.2.1 Unión del Adaptador 3' a los RNAm Diferenciales.....	56
4.2.4.2.2 Digestión con la Enzima Spe I.....	56
4.2.4.2.3 Retrotranscripción.....	57
4.2.4.2.4 Síntesis de la Segunda Cadena.....	57
4.2.4.3 Unión del Adaptador 5' al DNA-Adaptador 3'.....	58
4.2.4.4 Cuantificación de DNA más los Adaptadores.....	58
4.2.4.5 Reacción de Ligación de los Insertos al Vector SurfZAP.....	60
4.2.5 Construcción de la Biblioteca Sustractiva.....	63
4.2.5.1 Empaquetamiento del Vector en los Extractos de Fagos.....	63

4.2.5.2 Titulación de la Biblioteca Sustractiva.....	64
4.2.5.2.1 Preparación de Bacterias Hospederas.....	64
4.2.5.2.2 Crecimiento de Células para el Césped Bacteriano...	64
4.2.5.2.3 Titulación de la Reacción de Empaquetamiento.....	64
4.2.5.3 Ensayo de Eficiencia de los Extractos de Fagos.....	65
4.2.6 Amplificación por PCR de los Genes Aislados.....	66
4.2.6.1 Extracción de DNA Plasmídico.....	66
4.2.6.2 Gel de Agarosa al 1 %.....	66
4.2.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	66
4.2.6.4 Electroforesis.....	67
4.2.7 Cuantificación de Proteínas.....	68
4.2.8 Tamizaje Inmunológico.....	70
4.2.8.1 Bloqueo de la Membrana.....	70
4.2.8.2 Incubación con Anticuerpo Primario.....	70
4.2.8.3 Incubación con Anticuerpo Secundario.....	70
4.2.8.4 Desarrollo de Color.....	71
4.2.9 Disposición de Residuos.....	71

Capítulo V

RESULTADOS.....	72
5.1 Obtención de Cultivos Amebianos.....	72
5.1.1 Cepa No Virulenta.....	72
5.1.2 Cepa Virulenta.....	73
5.1.3 Curva de Crecimiento de Ambas Cepas.....	74
5.1.3.1 Gráficas de Curvas de Crecimiento.....	75
5.2 Extracción de RNA.....	76
5.2.1 Cuantificación de RNA.....	76
5.2.2 Gel de Agarosa al 1 %.....	77
5.2.3 Identificación del Gen Cisteín-Proteínasa 5.....	77
5.2.3.1 Cuantificación de cDNA.....	78
5.2.3.2 Gel de Agarosa al 1 % de la PCR para CP5.....	79
5.3 Cuantificación de cDNA para realizar la Hibridación.....	79
5.4 Extracción de RNAm diferenciales.....	80
5.4.1 Cuantificación de RNAm Diferenciales.....	80
5.4.2 Identificación del Gen Cisteín-Proteínasa 5 (CP5).....	81
5.5 Cuantificación de DNA-Adaptadores.....	82
5.6 Crecimiento de Bacterias Hospedadoras.....	83
5.7 Titulación de la Biblioteca.....	84
5.7.1 Propagación de la Clona 2 de la Biblioteca Sustractiva.....	84
5.8 Extracción de DNA Plasmídico.....	85
5.8.1 Cuantificación de DNA Plasmídico.....	86
5.8.2 Identificación del DNA Plasmídico.....	86
5.9 Amplificación de Genes de Interés.....	87
5.10 Cuantificación de Proteínas.....	88
5.11 Tamizaje Inmunológico.....	89

Capítulo VI	
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	91
Capítulo VII	
CONCLUSIONES.....	96
Capítulo VIII	
PERSPECTIVAS.....	97
Capítulo IX	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
Capítulo X	
APÉNDICES.....	109
Capítulo XI	
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	112

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
4.1 Condiciones para Electroforesis.....	51
4.2 Secuencia de los Primers CP5.....	52
4.3 Condiciones de PCR para CP5.....	52
4.4 Condiciones para RT.....	53
4.5 Secuencias de los iniciadores.....	55
4.6 Concentraciones de los iniciadores.....	55
4.7 Mix para Sintetizar la Segunda Cadena.....	57
4.8 Reacción de ligación.....	60
4.9 Condiciones para PCR.....	67
4.10 Secuencias de los Primers T7 y Not I.....	67
4.11 Volúmenes (μ l) Utilizados para la Curva Estándar en la Cuantificación de Proteínas (Estándares de 1mg/ μ l y 2 mg/ μ l).....	67
5.1 Conteo de trofozoítos durante 5 días.....	74
5.2 Cuantificación de RNA cepa virulenta.....	76
5.3 Cuantificación de RNA cepa no virulenta.....	76
5.4 Cuantificación de cDNA cepa virulenta.....	78
5.5 Cuantificación de cDNA cepa no virulenta.....	78
5.6 Cuantificación de RNAm diferenciales.....	80
5.7 Cuantificación de DNA-Adaptadores.....	82
5.8 Cuantificación de DNA plasmídico.....	86
5.9 Densidad Óptica del Estándar 1 mg/mL.....	88
5.10 Densidad Óptica del Estándar 2 mg/mL.....	88
5.11 Cuantificación de Proteínas.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1 Ciclo de Vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	19
1.2 Clasificación de la Amebiasis.....	20
2.1 Proteínas Expresadas/Secretas por el Trofozoíto de <i>E. histolytica</i> Consideradas Factores de Virulencia.....	35
4.1 Unión de los RNAm Diferenciales a los Adaptadores.....	59
4.2 Vector SurfZAP.....	61
4.3 Fagémido pBluescript Sk-.....	61
4.4 Secuencia del Vector SurfZAP.....	62
4.5 Estándares colocados por triplicado en la placa de 96 pozos utilizada en la cuantificación de proteínas por la técnica de BCA.....	68
5.1 Pastilla de Amibas de la Cepa No Virulenta.....	72
5.2 Hígado de Hámster con Abscesos Amebianos.....	73
5.3 Curva de Crecimiento Cepa Virulenta.....	75
5.4 Curva de Crecimiento Cepa No Virulenta.....	75
5.5 Identificación de RNA.....	77
5.6 Identificación del Gen CP5 en RNA de la Cepa Virulenta y No Virulenta de <i>E. histolytica</i>	79
5.7 Identificación del Gen CP5 en RNAm Diferenciales.....	81
5.8 Bacteria <i>E. coli</i> VCS 257.....	83
5.9 Bacteria XL1-Blue Sembrada en Presencia de Tetraciclina.....	83
5.10 Titulación de la Biblioteca Sustractiva.....	84
5.11 Propagación de la Clona 2.....	85
5.12 Identificación del DNA Plasmídico.....	86
5.13 Genes Amplificados.....	87
5.14 Gráfica de la Curva de Calibración para Cuantificación de Proteínas.....	88
5.15 Tamizaje Inmunológico.....	90

LISTA DE NOMENCLATURA

BSA	Albúmina Sérica Bovina
BCA	Ácido Bicinconínico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
EDTA	Ácido Dietilenaminotetracéico
AP-A	Amebaporo A
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
RNA _t	Ácido Ribonucleico de transferencia
RNA _{ss}	Ácido Ribonucleico de cadena simple
Agar LB	Agar Luria Bertani
β	Beta
Caldo LB	Caldo Luria Bertani
CHO	Células de Ovario de Hámster Chino
cm	Centímetros
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
CP-5	Cisteín Proteinasa 5
col.	Colaboradores
PC-Chol	Colesterol-fosfatidilcolina
EhCPADH	Complejo heterodimérico adhesina/cisteín proteasas
SAP	Componentes amebianos solubles
OD	Densidad Óptica
dNTP's	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EhSINES	Elementos transponibles cortos intercalados
EhLINES	Elementos transponibles largos
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
EST	Etiquetas de Secuencia Expresada
NF-kappa β	Factor nuclear kappa - cadena ligera – potenciador de células B activadas
g	Gramos
Gal	Galactosa
GPI	Glucosilfosfatidilinositol

h	Hora
RNasin	Inhibidor de RNasa
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
INF-gamma	Interferon-gamma
IL-1B	Interleucina-1B
IL-4	Interleucina-4
IL-8	Interleucina-8
kDa	Kilo Daltones
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
Gal/Nac	N-acetil-D-galactosamina
ng	Nanogramo
No.	Número
EhSTIRP	Proteína de <i>E. histolytica</i> rica en serina, treonina e isoleucina
L220	Proteína de membrana de 220 kDa
RT	Retrotranscripción
RNasa	Ribonucleasa
Lg1	Subunidad liviana
Hg1	Subunidad pesada
LC3	Subunidad pesada de la lectina
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de base
PBS	Tampón de fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEHPS	Peptona, Extracto de Hígado, Páncreas y Sueros
pfu/mL	Unidades formadoras de placa/mililitros
PGE2	Prostaglandinas E2
PGE4	Prostaglandina E4
Pmol	Picomol
rpm	Revoluciones por minutos
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
SP	Secreción de proteínas
SREHP	Proteína rica en serina
starp	Proteína rica en treonina-asparagina

TBE	Tampón de Tris/Borato/EDTA
TBST	Tampón de Tris Salino con Tween 20
u	Unidades
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrometro
°C	Grados Centígrados
%	Por ciento
Λ	Lambda
5-Azac	5-Azacidina
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3 indoilfosfato/Nitro azul de tetrazolio

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 *Entamoeba histolytica* y la Amebiasis

La amebiasis es una infección entérica potencialmente invasiva ocasionada por el parásito *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*)¹.

1.1.1 *E. histolytica*

E. histolytica es un parásito eucariota unicelular (uno de los organismos eucarióticos más primitivo)² que durante su ciclo de vida presenta dos morfologías: trofozoítos y quistes. Los trofozoítos contienen un núcleo único, con un diámetro de 20-40 µm. Los quistes son de 10 a 16 µm de diámetro, con cuatro núcleos cuando están maduros, un sólo núcleo cuando están inmaduros, con glucógeno en una vacuola y a menudo con cuerpos cromáticos. El núcleo de los quistes es vesicular, esférico, con una membrana revestida con pequeños gránulos de cromatina y con un pequeño cariosoma, esférico y central³.

1.1.2 Ciclo de Vida de *E. histolytica*

E. histolytica infecta naturalmente sólo a los seres humanos y algunos primates superiores. La infección se ha establecido por la ingestión de la fase del quiste del parásito. En la Figura 1.1 se muestra el ciclo de vida de *E. histolytica*; donde se observa que después de que los quistes pasan por el estómago y el intestino delgado proximal, eclosionan a la forma de trofozoítos móviles, que colonizan y pueden penetrar la mucosa del colon. En

condiciones aún no definidas en el colon, los trofozoítos se enquistan y los quistes infectantes se transmiten en las heces, donde pueden infectar a nuevos huéspedes. Los trofozoítos pueden pasar a las heces, pero no son infecciosos⁴.

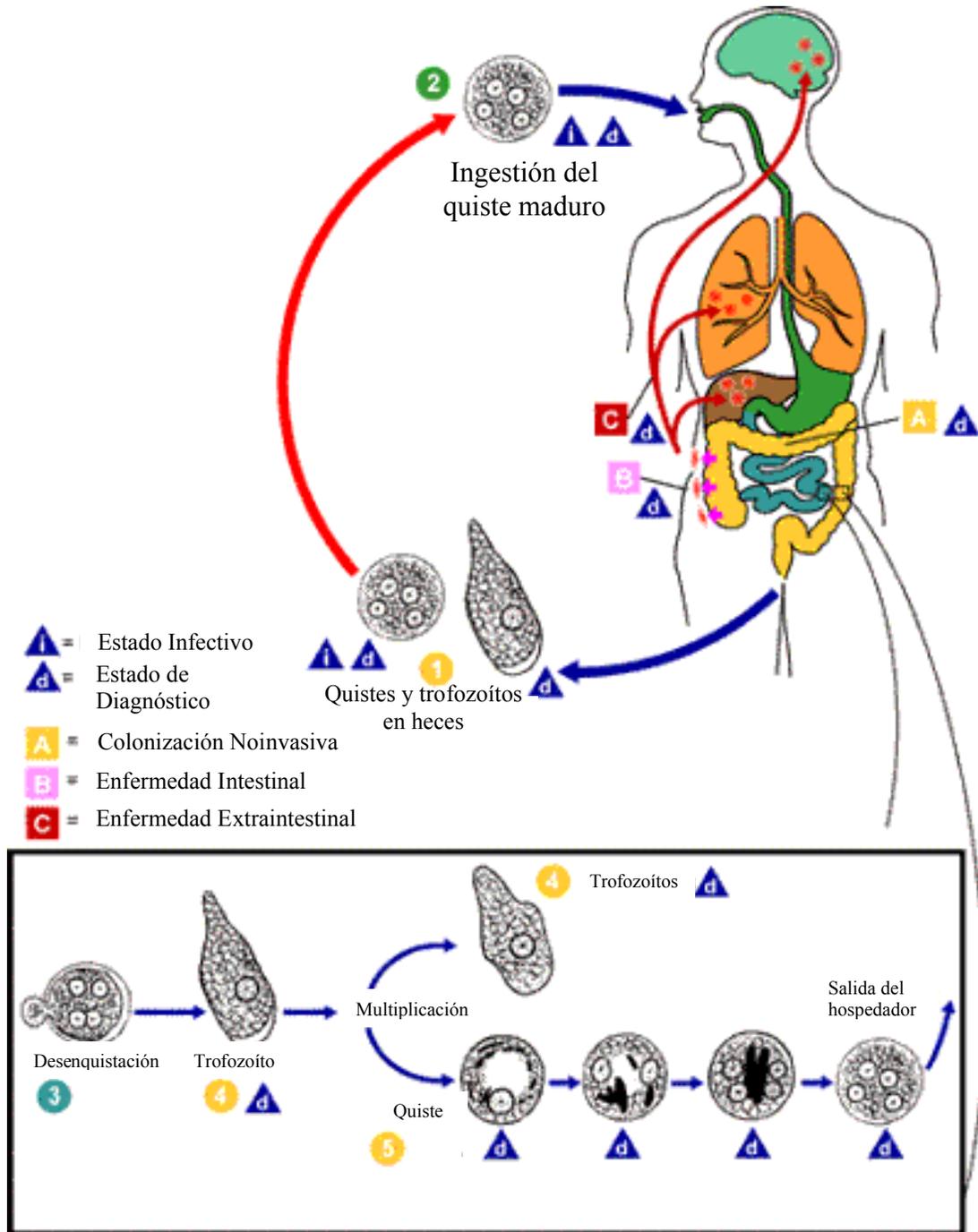


Figura 1.1 Ciclo de Vida de *E. histolytica*. Modificado de

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>

1.1.3 Clasificación de la Amebiasis

La amebiasis se clasifica principalmente en dos tipos, amebiasis intestinal y amebiasis extraintestinal⁵, en la Figura 1.2 se muestra una clasificación más detallada de la amebiasis.

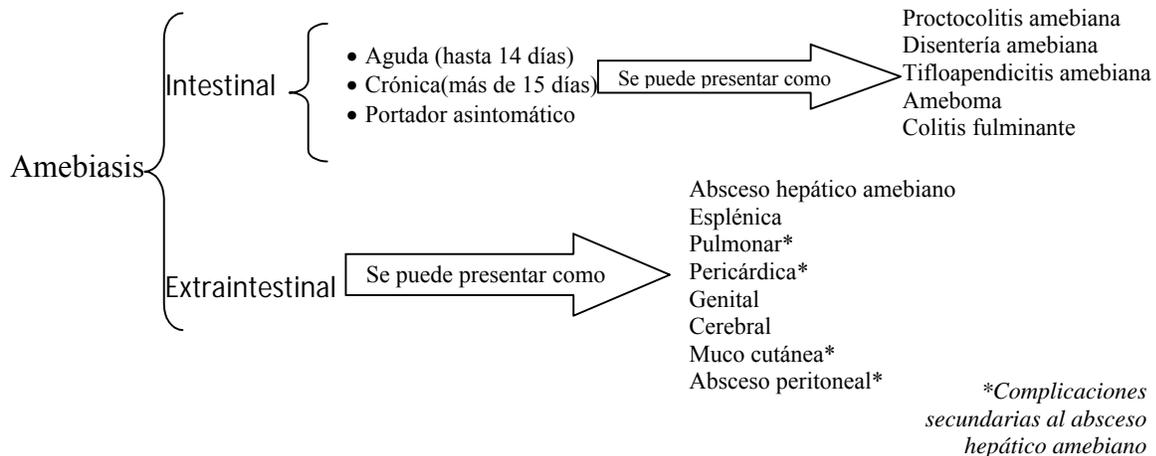


Figura 1.2 Clasificación de la Amebiasis

1.1.4 Patogenia de la Amebiasis

1.1.4.1 ¿Cómo se Produce la Patogenia de la Amebiasis?

La patogenia de *E. histolytica* en el colon se produce en forma escalonada. Comienza con la colonización de la capa de mucina, que es seguida por la estimulación de una respuesta proinflamatoria que causa daño a los tejidos no específicos que pueden facilitar la invasión del parásito a la mucosa del colon. El parásito y/o factores del huésped que estimulan una respuesta proinflamatoria en el intestino son poco conocidos⁶. Pero se sabe que los trofozoítos amebianos activan el factor de transcripción NF-kappa β en las células epiteliales intestinales, iniciando un programa de respuesta inflamatoria con perjuicio para el tejido intestinal⁷.

E. histolytica se adhiere a la mucosa y a células epiteliales del colon y a otras células a través de las moléculas de galactosa (Gal) y N-acetil-D-galactosamina (GalNac), inhibiendo la lectina de superficie, esta adhesión es específica en la colonización^{8,9}.

1.1.4.2 Mecanismos de Destrucción del Tejido

La infección por *E. histolytica* tiene un resultado variable, pero cuando la enfermedad es invasiva, se produce la potente actividad citotóxica del parásito, dicha actividad es probable que sea un contribuyente importante al daño tisular extenso. Hay otros factores que tienden a aumentar la destrucción de los tejidos, como las proteasas del parásito y la reacción inflamatoria inmune del huésped.

E. histolytica es citotóxico para los neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y una variedad de líneas de cultivo de tejidos. La potente actividad citotóxica del parásito parece ser la base de la patogénesis de la enfermedad, aunque el mecanismo exacto por el que actúa *E. histolytica* sigue siendo un enigma. En un proceso paso a paso, *E. histolytica* se adhiere a la célula, induce su muerte, y luego fagocita la célula muerta. La muerte de la célula blanco parece ser principalmente a través de la activación de la apoptosis, es decir, el parásito le da una señal engañosa a la célula huésped para que se mate a sí misma¹⁰.

La fagocitosis de células apoptóticas controla la inflamación y a su vez impide la liberación de los componentes citotóxicos de la célula huésped en el medio. Por lo que *E. histolytica* induce la apoptosis en las células diana humanas y la fagocitosis ulterior de estas células ya sea por los parásitos y/o los macrófagos del huésped¹¹. La muerte apoptótica de la célula huésped seguida de la fagocitosis puede limitar la inflamación y permitir a las amibas eludir la respuesta inmune del huésped¹².

1.2 Mecanismo de Transmisión y Síntomas

La amebiasis se adquiere al ingerir alimentos o bebidas contaminadas con heces fecales, a través del contacto bucal con personas infectadas. Los síntomas de la amebiasis aparecen aproximadamente a las 48 horas de la ingesta del quiste, van de leves a graves, de acuerdo con el avance del padecimiento. Si el problema es pequeño, la amebiasis puede causar náusea, diarrea, pérdida de peso, fatiga, dolor abdominal, molestias al evacuar y hasta fiebre. Si se torna grave la infección, hay diseminación al hígado, pulmones, cerebro y otros órganos^{13,14}.

1.3 Epidemiología de la Amebiasis

Cifras a nivel internacional revelan que existen 50 millones de casos de amebiasis en el mundo y mueren alrededor de 45 mil personas al año por esta causa. La amebiasis, es la tercera enfermedad parasitaria más importante en el mundo por ser causa de muerte. Entre el 10 y 20 % de la población mundial está infectada y solo 10 % de la población sufre la enfermedad. Generalmente las tasas de prevalencia son más altas en algunas zonas del trópico, donde el saneamiento es deficiente¹³. La tasa de incidencia de amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano durante el año 2000 en México fueron 1,353.43 y 6.37 por 100, 000 habitantes, respectivamente^{15,14}.

La infección por *E. histolytica* es todavía un grave problema de salud pública en México así como en muchos otros países alrededor del mundo. Los dos principales obstáculos en la erradicación de la misma consisten en la falta de medidas sanitarias y de una vacuna generada a partir de biomoléculas amebianas que sean potentemente

inmunorreactivas, y una prueba diagnóstica rápida, económica y de fácil aplicación para realizar una eficiente discriminación entre amibas virulentas y no virulentas.

1.4 Diagnóstico y Tratamiento

1.4.1 Diagnóstico

La identificación de *E. histolytica* sigue siendo un objetivo importante del laboratorio de parasitología clínica y diagnóstico molecular, ya que representan un paso crucial para el diagnóstico de confirmación de pacientes que pueden estar infectados con *E. histolytica* y requieren un tratamiento específico (OMS, 1997)¹⁶.

Clasificación de los Métodos para el diagnóstico de *E. histolytica*:

Métodos clásicos^{13,17}:

- Análisis coproparasitoscópico (Observación de quistes o trofozoítos en heces)
- Determinación de anticuerpos específicos por medio de ensayos serológicos contra *E. histolytica*, a través de la prueba de ELISA.
- Detección de antígenos del parásito en heces, por medio de la prueba de ELISA.

Estudios de serodiagnóstico de mayor grado de sensibilidad¹³:

- Hemaglutinación indirecta.
- Inmunofluorescencia.
- Inmunoelectrotransferencia.
- Radioinmunoensayo.

Métodos basados en el DNA^{13,17}:

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional y en tiempo real).
- Desarrollo de microarreglos

El diagnóstico de amebiasis extraintestinal es más difícil porque en general el examen de las heces es negativo y rara vez puede demostrarse la presencia de trofozoítos en material purulento ¹³.

1.4.2 Tratamiento

1.4.2.1 Tratamiento

El fármaco más utilizado para tratar el absceso hepático amebiano es el metronidazol de 500 a 750 mg por vía oral o intravenosa, tres veces al día durante 7 días o hasta 10 días, la misma posología es usada para la amebiasis intestinal. La tasa de curación es mayor al 90 % ¹⁸.

El metronidazol se usa como fármaco de primera línea. Fármacos como tinidazol u ornidazol pueden ser utilizados como segunda línea en caso de intolerancia al metronidazol. La nitazoxanida es eficaz en el tratamiento de la amebiasis intestinal invasiva y en la eliminación de la colonización del tracto intestinal. Se puede utilizar nitazoxanida cuando existe intolerancia a los imidazoles ¹⁹.

A pesar de la importancia de la enfermedad como problema de salud pública, se cuenta con un número relativamente reducido de medicamentos para el tratamiento de la disentería y el absceso hepático amebianos. La mayoría de ellos con un margen terapéutico estrecho y con diversos efectos secundarios en el hombre ²⁰. Además, han aparecido informes de resistencia de *E. histolytica* a algunos de los fármacos antiamebianos más usuales en la práctica médica. Por ello resulta conveniente la búsqueda permanente de compuestos antiamebianos más eficientes y mejor tolerados por el hombre ^{21,22}.

1.4.2.2 Perspectivas en el Desarrollo de una Vacuna

En la actualidad no existe una vacuna para prevenir la amebiasis, pero existen muchas investigaciones alrededor del mundo en busca de una vacuna antiamebiana, porque si se llega a encontrar una vacuna que fuera efectiva, teóricamente se podría erradicar dicha enfermedad, ya que ésta solo afecta a humanos y a algunos primates²³.

La principal molécula que se tiene como candidata para formular una vacuna contra la amebiasis, es la subunidad pesada de la lectina galactosa N-acetil galactosamina (Gal/GalNAc), esta subunidad tiene de 7 a 10 sitios potenciales de N-glicosilación^{24,25}. La inhibición de la síntesis del N-glicano da como resultado lectinas Gal/GalNAc que no son capaces de enlazarse a los azúcares de las células epiteliales del hospedero²⁵. Varios estudios han demostrado que *E. histolytica* crece o sobrevive mejor en medios que contienen glucosa, esto explica que los carbohidratos son la principal fuente de energía para el parásito²⁶.

1.5 Métodos Moleculares para la Detección de Factores de Virulencia

1.5.1 Cepa Virulenta y Cepa No Virulenta de *E. histolytica*

Uno de los factores de *E. histolytica* que puede explicar la diversidad de los cuadros clínicos que se observan en la amebiasis humana es la variabilidad del grado de virulencia que presentan las diferentes cepas de *E. histolytica* (avirulenta, intermedia o altamente virulenta)²⁷. Los trofozoítos de *E. histolytica* HM-1: IMSS son menos virulentos después de mantenimiento a largo plazo en cultivos axénicos. Los factores responsables de la pérdida de virulencia durante el cultivo siguen sin estar claros. Sin embargo, se sabe que en el

cultivo *in vitro* de la ameba en el medio de cultivo suplementado con colesterol restaura su virulencia²⁸.

Debido a que la virulencia de este parásito no ha podido explicarse solamente por la actividad de sus moléculas citotóxicas (adhesinas, fosfolipasas y amebaporos) o proteolíticas (proteasas de cisteína)²⁹, varios investigadores se han enfocado en estudiar los mecanismos de virulencia de *E. histolytica* mediante la comparación funcional y molecular entre *E. histolytica* virulenta (por causar lesiones en hígado de hámster) y *E. histolytica* no virulenta (por la incapacidad de causar lesiones en hígado de hámster debido al cultivo prolongado)³⁰.

1.5.2 Identificación de Factores de Virulencia

Los métodos tradicionales para buscar factores de virulencia (antígenos inmunorreactivos) se basan en la búsqueda de péptidos inmunológicamente activos en lisados o extractos crudos del organismo en cuestión y posterior identificación de los mismos mediante secuenciación de proteínas. En este trabajo se propuso echar mano de la tecnología de DNA recombinante mediante la clonación de genes que expresen este tipo de proteínas inmunoreactivas y que además sean específicos de la cepa virulenta. Existen diversos métodos para la identificación de este tipo de genes, todos ellos basados en las tecnologías de detección de expresión génica diferencial como la generación de EST (Etiquetas de Secuencias Expresadas), el differential display, la hibridación de microarreglos y la construcción de bibliotecas sustractivas. En el presente trabajo se utilizó esta última, ya que con esta técnica se obtienen proteínas, las cuales pertenecen a los genes sobreexpresados y además éstas proteínas se obtienen plegadas por lo que se pueden utilizar para realizar inmunoensayos sin necesidad de purificarlas³¹.

1.6 Bibliotecas Sustractivas

1.6.1 Bacteriófagos λ

Los vectores contruidos a partir del bacteriófago λ son alrededor de mil veces más eficientes que los plásmidos para clonar grandes cantidades de fragmentos de DNA. La infección de las células huésped de *E. coli* por viriones λ tiene lugar a una frecuencia alrededor de mil veces superior que la transformación por plásmidos, y pueden crecer mucho más clonas λ que colonias transformadas y las clonas λ pueden ser detectadas en una placa única de cultivo.

Cuando un virión λ infecta una célula de *E. coli*, puede realizar un ciclo de crecimiento lítico durante el cual el DNA del fago se replica y se ensambla formando una progenie de más de 100 fagos completos, que se liberan al lisarse la célula infectada. Si se coloca una muestra del fago λ sobre una capa de *E. coli* que crece en una placa de Petri, cada virión infectará una única célula. Los consiguientes ciclos de crecimiento del fago darán origen a una región visible y clara, denominada placa de lisis, donde las células se han lisado y las partículas del fago se han liberado. Un virión λ consiste en una cabeza que contiene el genoma de DNA del fago y una cola, que funciona para infectar células huésped de *E. coli*³².

1.6.2 Bibliotecas de DNA complementario

El primer paso para preparar una genoteca de DNA complementario (cDNA) es aislar todo el RNA mensajero (RNAm) del tipo celular o del tejido de interés. Para preparar los cDNA bicatenarios para la clonación, se ligan moléculas cortas de DNA de hebra doble que contienen el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción en particular a

ambos extremos de los cDNA utilizando DNA ligasa del bacteriófago T4. Esta ligasa puede unir moléculas de DNA de hebra doble con “extremos romos o extremos cohesivos”. Luego las moléculas resultantes se tratan con la enzima de restricción específica para el conector adherido, lo cual genera moléculas de cDNA con ambos extremos adhesivos. En un procedimiento separado, primero se trata el DNA λ con la misma enzima de restricción para producir fragmentos denominados brazos de los vectores λ , que contienen extremos adhesivos y que en conjunto contienen todos los genes necesarios para el crecimiento lítico.

Luego los brazos λ y la colección de cDNA, todos los cuales contienen extremo adhesivos complementarios, se mezclan y se unen de manera covalente por acción de la DNA ligasa. Cada una de las moléculas de DNA recombinantes resultantes contienen un cDNA localizado entre los dos brazos del DNA del vector λ . Los viriones que contienen los DNA recombinantes ligados son luego ensamblados *in vitro*. Sólo las moléculas de DNA del tamaño correcto pueden ser empaquetadas para producir fagos λ recombinantes infecciosos. Por último, los fagos λ recombinantes se siembran sobre un cultivo de células de *E. coli* para generar un gran número de placas de lisis individuales.

Puesto que cada placa de lisis se origina a partir de un fago recombinante individual, toda la progenie de fagos λ que se desarrollan son genéticamente idénticos y constituyen un clon portador de un cDNA derivado de un único RNAm³².

1.6.3 Bibliotecas Sustractivas

1.6.3.1 Construcción de Bibliotecas Sustractivas

La construcción de bibliotecas de cDNA es uno de los procesos por los cuales puede llevarse a cabo la clonación molecular. Una biblioteca de cDNA, consiste en una colección de secuencias de cDNA que representan los RNAm. Una biblioteca sustractiva, en este

caso, consiste en retar los RNAm de la cepa virulenta contra el cDNA de la cepa no virulenta y recuperar los RNAm libres que corresponderían a los genes específicos o “sustraídos” de la cepa virulenta. Estos genes se insertan en diversos vehículos moleculares, principalmente bacteriófagos y plásmidos, desde donde es posible expresar las proteínas correspondientes y posteriormente retarlas en masa contra sueros de humanos infectados, para encontrar aquellas que son inmunológicamente reactivas a todos o la mayoría de los sueros probados^{31,33}.

1.6.3.2 Presentación de Péptidos y Proteínas en la Cápside de Bacteriófagos

Filamentosos

La tecnología de presentación de péptidos y proteínas sobre la cápside de los fagos filamentosos requiere de procedimientos básicos de microbiología y biología molecular.

Para poder llevar a cabo la presentación de péptidos en bacterias primero se debe realizar una selección y crecimiento del hospedero. La infección por los fagos tipo M13 ocurre sólo en cepas de *E. coli* portadoras del episoma F', por lo que es sumamente importante la utilización de cultivos puros. Las células infectivas tienen la tendencia de perder el episoma F' lo que hace necesario una adecuada selección de las colonias. Los cultivos puros de bacterias portadoras del episoma se preparan a partir de colonias aisladas seleccionadas en placas de agar. A temperaturas por debajo de 34 °C el Pili F' no se forma apropiadamente y se bloquea la infección. Por esto es crítico realizar las incubaciones a 37 °C.³⁴

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Identificación de la Virulencia de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* se vuelven menos virulentos después de mantenimiento a largo plazo en cultivos axénicos. Los factores responsables de la pérdida de virulencia durante el cultivo *in vitro* siguen sin estar claros. La virulencia de *E. histolytica* se mide en función del tamaño de la lesión en el hígado de hámster, Lushbaugh y colaboradores reportaron en 1978 un aumento de la virulencia de *E. histolytica*, conforme se hacen varios pasajes por hígado de hámster alternado con cultivos axénicos³⁵. También se sabe que *in vitro*, el cultivo de amibas en medio de cultivo suplementado con colesterol restaura su virulencia. En el 2010 Serrano Luna y col. analizaron el efecto de la adición de liposomas de colesterol-fosfatidilcolina (PC-Chol) en el medio de cultivo. La adición de liposomas PC-Chol al medio de cultivo mantiene la virulencia de estos parásitos, debido a que estas amibas se mantuvieron sin pasaje por hígado de hámster durante 18 meses, una vez transcurridos los 18 meses se realizó un pasaje en hígado de hámster y ocasionaron abscesos en el mismo nivel que la cepa virulenta original; los trofozoítos también mostraron aumento de la endocitosis, eritrofagocitosis, y la expresión de los residuos de carbohidratos en la superficie amebiana³⁶.

Existe una variabilidad genómica entre cultivos virulentos y no virulentos. La virulencia de *E. histolytica* está asociada a varias proteínas, la ubiquitina, podría ser una proteína importante que participa en el mecanismo de invasión de *E. histolytica*, ya que hay

una asociación entre las secuencias de ubiquitina de *E. histolytica* y su relación con el desarrollo de absceso hepático en hamsters, esto lo demuestra el estudio de M. Crisóstomo y col. en el 2006, en el cual utilizaron una biblioteca de cDNA para *E. histolytica* y aislaron trofozoítos de 11 pacientes, los cuales cultivaron en condiciones monoaxénicas, después fueron inoculados en hígado de hámster; de los cuales obtuvieron secuencias para ubiquitina, precursor de lectina, factor de replicación MCM3 y antígeno de superficie. La relación obtenida entre secuencias y absceso hepático fue 11/11 para ubiquitina, 9/11 para precursor de lectina, 4/11 para el factor de replicación y 1/11 para el antígeno de superficie³⁷.

2.2 Identificación de Genes asociados a la Virulencia

Para investigar si el genoma del parásito está relacionado con los resultados de la virulencia, en el 2007 Ibne y colaboradores investigaron la distribución de los genotipos entre los individuos infectados por *E. histolytica* en Bangladesh. Las muestras fueron obtenidas de individuos asintomáticos, con diarrea o disentería, y los que habían desarrollado un absceso hepático. Los genotipos se determinaron mediante el uso de seis marcadores polimórficos de RNAt. Una diferencia significativa de la población en la distribución de los genotipos se encontró en cuatro de los seis marcadores individuales, así como para los genotipos combinados, lo que sugiere que el genoma del parásito contribuye de alguna manera con el resultado de la infección con *E. histolytica*. Los marcadores no indican la naturaleza de las diferencias genéticas subyacentes, pero pueden estar ligados a los loci que tienen un impacto en el resultado de la infección³⁸.

Para identificar genes de *Entamoeba*, los cuales están asociados estrictamente con cepas virulentas se pueden usar perfiles de expresión como lo hizo en el 2006 R. C. MacFarlane y U. Singh. En el 2007 I. Balderas y cols. investigaron la sobrerregulación transcripcional de los genes relacionados con la activación de la virulencia de *E. histolytica* en hígado de hámster y encontraron un incremento en el nivel de la transcripción de varios RNAm. La técnica de amplificación del DNA polimórfico al azar permitió confirmar las diferencias en número y tamaño de las bandas de marcadores polimórficos entre las cepas virulentas y no virulentas. Ocho genes diferentes (Una fosfatasa ácida de unión a membrana, cisteína proteasa, dos proteínas ribosomales, un factor de transcripción de choque térmico, el RNA ribosomal, acetaldehído deshidrogenasa-1 y una fosfolipasa de estructura semejante a la patatina) fueron secuenciados y pueden estar asociados con una función biológica en relación con la virulencia de *E. histolytica*³⁹. Un gen, el cual fue nombrado EhSTIRP (Proteína de *E. histolytica* rica en serina, treonina e isoleucina) fue exclusivamente expresado en cepas virulentas de *E. histolytica*. Con el fin de caracterizar su función en la biología amebiana, se utilizó un RNA de doble cadena y fue capaz de ser selectivo para regular la baja expresión de esta familia de genes. Al disminuir la regulación de EhSTIRP, fueron capaces de atribuirle propiedades citotóxicas y adhesivas mediante la liberación de lactato deshidrogenasa y ensayos de adhesión celular en células de ovario de hámster chino (CHO). EhSTIRP comúnmente representa un factor determinante de virulencia en *E. histolytica* (Ryan C MacFarlane y Upinder Singh, 2007)⁴⁰.

Varias especies y cepas de *Entamoeba* con diferentes niveles de virulencia fueron identificadas por Ryan C. MacFarlane y Upinder Singh; en general, 29 genes disminuyeron la expresión tanto en especies y cepas no virulentas en comparación con *E. histolytica* HM-

1:IMSS. Interesantemente, un número de genes con posibles funciones en la respuesta al estrés y la virulencia habían disminuido en la expresión, ya sea en una o ambas cepas no virulentas de especies de *Entamoeba*. Estos incluyen genes que codifican para peroxirredoxina, flavoproteína tipo A, lisozima, esfingomielinasa C, hemaglutinina estreptocócica y una proteína que hipotéticamente tiene homología para *Plasmodium esporozoito*, dicha proteína es rica en treonina-asparagina (starp). La función de estos genes en *Entamoeba* y sus funciones específicas en la virulencia del parásito necesitan ser determinadas. También encontraron que varios de los retrotransposones largos y cortos intercalados (EhLINES y EhSINES), que modulan la expresión de genes y la evolución genómica, tuvieron una menor expresión en las especies o cepas no virulentas comparadas con *E. histolytica* HM-1:IMSS⁴¹.



2.3 Silenciamiento de Genes Asociados a la Virulencia

Se sabe que en eucariotas superiores la metilación del DNA regula las funciones biológicas importantes como el silenciamiento de la expresión génica y la protección de los efectos adversos de retrotransposones. En el protozoario *E. histolytica*, una metiltransferasa de DNA fue identificada⁴² y el tratamiento con 5-azacitidina (5-AzaC), un potente inhibidor de la metiltransferasa del DNA, atenúa la virulencia del parásito, de acuerdo a la investigación de Karim, M. Ali y col. en el 2007, en la cual utilizaron microarreglos para explicar el mecanismo por el cual se atenúa la virulencia del parásito⁴³. En el mismo año Abhik Sen y col. demostraron que el antígeno de superficie 29-kDa de *E. histolytica* muestra actividades peroxidativas y antioxidantes protectoras. La inhibición del gen eh29 por RNA de antisentido, ocasionó una baja viabilidad de los trofozoítos durante el estrés

oxidativo. Al mismo tiempo las actividades de citopatogenicidad y citotoxicidad disminuyeron⁴⁴.

La reducción del contenido del amebaporo A (AP-A) en trofozoítos transfectados tuvo un efecto directo en la virulencia amebiana. Se encontró que los trofozoítos transfectados en los que se inhibió el AP-A la virulencia disminuyó significativamente esto se determinó tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuanto más inhibidos eran, los transfectantes resultaron menos virulentos, no está demostrado pero se sugiere que hay un nivel umbral en el nivel del AP-A, un contenido por debajo del cual la virulencia es afectada⁴⁵.

Hay una molécula semejante a CD59 que se expresa en trofozoítos de *E. histolytica* en las lesiones del colon ocasionadas por amibas. Esta molécula semejante a CD59 se detectó mediante Western blot en todo el lisado de *E. histolytica*, así como en la membrana plasmática por inmunocitoquímica. Estos resultados sugieren que *E. histolytica* puede utilizar CD59 como la proteína frente a la acción lítica del complejo de ataque de la membrana⁴⁶.

2.4 Factores de Virulencia

Durante muchos años se ha sugerido que las amibas patógenas utilizan tres factores de virulencia:

- Lectina Gal / GalNAc
- Amebaporo
- Cisteín Proteasas

Estos factores están involucrados en la adhesión, inmunoevasión, la colonización y la invasión, y a menudo son responsables de causar la enfermedad⁴⁷, en la Figura 2.1 se

muestran los tres factores de virulencia mencionados anteriormente y otros factores que también están involucrados en la patogenia de la enfermedad⁴⁸:

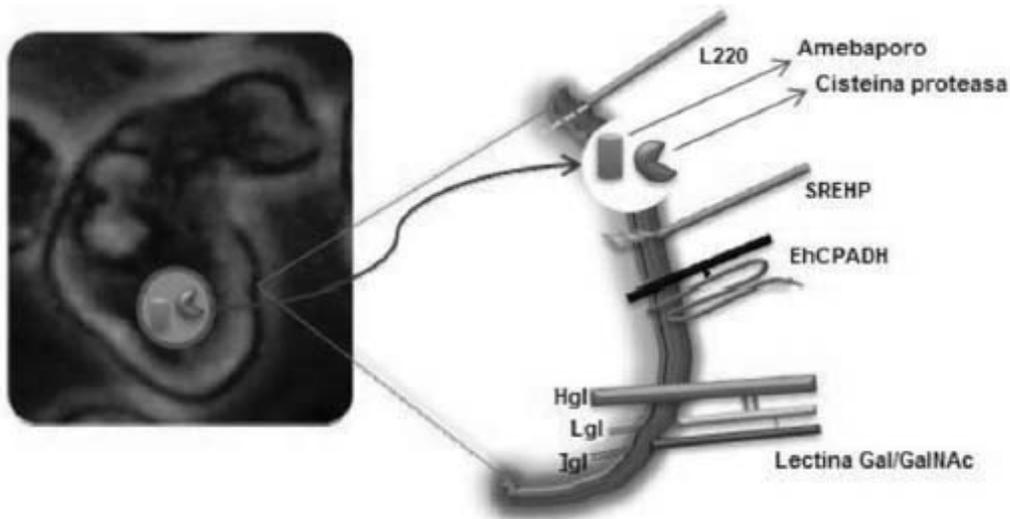


Figura 2.1 Proteínas Expresadas/Secretadas por el Trofozoíto de *E. histolytica* Consideradas Factores de Virulencia (modificado de Laughlin).

Las principales proteínas estudiadas a la fecha son: proteínas de membrana de 220 kDa (L220), amebaporos, proteasas de cisteínas, proteína rica en serina (SREHP), complejo heterodimérico adhesivo/cisteín proteasas (EhCPADH) y la lectina de adhesión Gal/GalNAc.

2.4.1 Lectina Gal/GalNAc

La lectina es una molécula central en el proceso de colonización, enquistamiento e invasión de *E. histolytica*. Se ha demostrado que las células de los mamíferos que no expresan residuos de galactosa o N-acetil-D-galactosamina, son resistentes a la muerte por *E. histolytica* y que una inhibición de lectina torna a la ameba incapaz de adherirse y de causar citólisis de las células del huésped⁴⁸. Esta lectina es una glucoproteína multimérica

de 260 kDa que reconoce residuos expuestos de galactosa/N-acetil-D-galactosamina en las glucoproteínas de la membrana de la célula diana^{48,49}.

La lectina Gal/GalNAc consta de un heterodímero compuesto por la subunidad pesada (Hgl) de 170 kDa, disulfuro ligado a un glucosilfosfatidilinositol (GPI), este complejo se encuentra ligado por puentes disulfuro a la subunidad liviana (Lgl) de 31 o 35 kDa. Hgl-Lgl⁵⁰; la subunidad pesada está codificada por 5 genes; el dominio citoplasmático reconoce específicamente la galactosa/N-acetil-D-galactosamina y su secuencia presenta homología con las integrinas $\beta 2$ y $\beta 7$ ⁵⁰. También se ha sugerido que la señalización del dominio pesado puede controlar la actividad adhesiva extracelular de la lectina amebiana y propone un papel importante de la lectina en la virulencia⁴⁹

La subunidad liviana de la lectina contribuye a la regulación de la adherencia y a la señalización de eventos asociados con la virulencia^{49, 50}. Cada subunidad de la lectina está representada por múltiples genes dentro del genoma de *E. histolytica*⁵¹. Además, se han realizado estudios que demuestran la existencia de una subunidad de 37 kDa que puede servir como receptor de la fibronectina^{49, 52, 53}.

Esta proteína polimérica tiene un papel principal, no sólo en la adhesión, sino también en la señal de transducción y en la evasión del sistema del complemento del huésped¹⁹. Sin embargo, como mecanismo de defensa del huésped, la mucina del intestino puede inhibir la acción de la lectina Gal/GalNAc, a lo que *E. histolytica* responde con la secreción de diferentes enzimas que degradan carbohidratos, como la glucosidasa, manosidasa, galactosidasa, fucosidasa, xilosidasa, glucoronidasa y N-acetil-D-galactosaminidasa, para generar la alteración de la mucosa y aumentar su afinidad por las proteasas y otras sustancias que la ameba secreta^{54,55}.

Debido a que la lectina tiene un parecido estructural con CD59, el cual se une al componente C9 del complemento, se presenta reactividad antigénica cruzada, inhibiendo el complejo de ataque a membrana, del sistema del complemento, función propuesta para esta molécula CD59⁵⁴. La lectina es, por lo tanto, una proteína multifuncional cuya actividad es crucial para la evasión de la respuesta inmune del huésped y la citotoxicidad de la ameba⁵⁶.

2.4.2 Amebaporo

La característica más relevante de *E. histolytica* es su capacidad citolítica extensa, la que constituye su función patogénica principal. Se ha reportado que después del contacto trofozoíto-célula diana, la ameba libera una proteína dentro del espacio intercelular la cual se inserta en la membrana, formando un canal iónico similar al que producen los linfocitos citotóxicos. Este evento es iniciado por el contacto íntimo entre el parásito y la célula diana que se establece principalmente a través de una molécula de tipo lectina⁵⁷. En unos cuantos minutos, se observan cambios importantes en la célula diana, como hinchazón y alteraciones de la superficie que finalmente ocasionan que la membrana pierda sus funciones y muera. El factor que produce el canal o poro se denomina amebaporo^{57, 45}. Uno de los problemas con esta hipótesis fue que no había posibilidad de probarla en trofozoítos intactos. Los anticuerpos contra amebaporos no inhiben la muerte de las células por trofozoítos porque los amebaporos no están expuestos en la superficie de la ameba. Así, para investigar el papel del amebaporo *in vivo*, se han desarrollado otros métodos para modular la concentración interna de amebaporo A (AP-A) en la célula⁴⁵.

El amebaporo fue purificado a partir de trofozoítos axénicamente crecidos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS. El procedimiento de purificación se hizo mediante cromatografía de intercambio aniónico y electroelución. El análisis de la secuencia del

producto final reveló que AP-A fue totalmente puro. Los anticuerpos policlonales contra el amebaporo purificado se obtuvieron de conejos, y los estudios de Western blot han demostrado su especificidad. Durante experimentos de fase aguda (días 1, 2, 3 y 4), se obtuvieron abscesos amebianos de hígado producidos en hámster, estos abscesos fueron teñido con el anticuerpo anti-amebaporo; en todas las etapas del análisis, el amebaporo apareció como una molécula expresada constitutivamente en el citoplasma de los trofozoítos. Cabe mencionar que el amebaporo fue encontrado en la membrana de hepatocitos⁵⁸.

2.4.3 Cisteín Proteasas

La evidencia que apoya el rol de las cisteín proteasas extracelulares de *E. histolytica* como factores de virulencia, son la producción y liberación de 10-1000 veces más cisteínas a partir de lisados de las células de *E. histolytica* que a partir de lisados de *E. dispar* no invasiva. Las cisteín proteasas son responsables del desprendimiento de las monocapas de cultivo de tejidos, la prueba más utilizada para las toxinas amebianas y otros factores de virulencia. El efecto citopático en monocapas de fibroblastos como resultado de los sobrenadantes de las cepas clínicas de *E. histolytica* es completamente inhibido por la Z-Phe-Arg-CH₂F, un inhibidor específico e irreversible de las cisteín proteasas que no es tóxico para las células del huésped. Además las cisteín proteasas interfieren con la función del sistema inmune del hospedador. Las cisteín proteasas purificadas de *E. histolytica* pueden específicamente romper al C3 por un único mecanismo. Las proteasas también degradan inmunoglobulina A (IgA) y las anafilotoxinas C3a y C5a, lo cual podría explicar la relativa escasez de neutrófilos en los abscesos hepáticos amebianos. Las proteasas deben

ser liberadas en el transcurso de la amebiasis invasiva, porque más del 80 % de los pacientes infectados poseen anticuerpos para cisteín proteasas⁵⁹.

Para probar el papel de las cisteín proteasas amebianas en la patogénesis de la colitis amebiana, se hizo un trasplante de xenoinjertos intestinales humanos en ratones SCID y fueron infectados con trofozoítos de *E. histolytica*. La deficiencia de las cisteín proteasas amebiana no indujo en las células epiteliales intestinales la producción de las citocinas inflamatorias interleucina IL-1B e IL-8, y por lo tanto causó significativamente menos inflamación intestinal y menos daños a la barrera de permeabilidad intestinal. Estos resultados demuestran por primera vez que las cisteín proteasas amebianas son un factor clave de virulencia en la colitis amebiana, y proporcionan un nuevo mecanismo para su actividad⁷.

E. histolytica degrada oligosacáridos de mucina, lo cual, puede facilitar la invasión parasitaria del colon⁶⁰. Las cisteín proteasas secretadas por las amibas alteran la red de polímeros de mucina, superando así la barrera mucosa protectora. Según M. E. Lidell y col. en el 2006 muestran que la O-glicosilación y los dominios de mucinas resistentes a proteasas caracterizan la formación gelificante de mucinas. Los resultados sugieren un papel importante de las cisteín proteasas de *E. histolytica* en el traspaso de la barrera de moco protector en la patogénesis de la amebiasis invasiva⁶¹.

2.5 Motilidad de *E. histolytica*

La motilidad de *E. histolytica* en el intestino y durante la invasión es poco conocida. M. Zaki y col. durante su investigación en el 2006 utilizaron un medio condicionado para observar la motilidad de *E. hitolytica*, ellos encontraron que al colocar trofozoítos de *E. hitolytica* en un medio condicionado se observaba un aumento en la velocidad y la

quimiotaxis negativa. Es fundamental mencionar que los comensales no patógenos y *E. dispar* no mostraron ningún tipo de comportamiento en el medio condicionado, lo que implica que la quimiotaxis negativa puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la amebiasis extraintestinal, ya que estos resultados sugieren que existe un mecanismo que impulsa a las células de *E. histolytica* a migrar desde el lumen intestinal y la capa mucosa hacia el epitelio subyacente⁶².

2.6 *E. histolytica* y el Sistema Inmune del Hospedador

Otro mecanismo que explica el inicio y la amplificación de la inflamación aguda asociada con la amebiasis intestinal es la producción de interleucina-8 (IL-8) en respuesta a los derivados de Prostaglandina E2 (PGE2) de *E. histolytica*, ya que produce proteínas secretadas (SP) y componentes amebianos solubles (SAP) que pueden aumentar notablemente la expresión del RNAm de IL-8 y la producción de proteínas en células epiteliales del colon. Los trofozoítos tratados con inhibidores de la ciclooxigenasa inhiben la biosíntesis de la PGE2 y eliminan la producción de IL-8 inducida por parásitos o componentes de amibas. Además, cuando se ha utilizado prostaglandina específica 2 y receptores agonistas y antagonistas de Prostaglandina E4 (PGE4), se ha encontrado que la PGE2 se une exclusivamente a través de receptores PGE4 a células epiteliales del colon para estimular la producción de IL-8. El silenciamiento de los receptores PGE4 con una molécula pequeña de RNA interferente elimina completamente SP y SAP que inducen la producción de IL-8. Estos estudios identificaron PGE2 bioactiva como uno de los principales factores de virulencia producido por *E. histolytica* que pueden estimular a la potente quimioquina de neutrófilos y al activador de IL-8, el cual puede provocar una respuesta inflamatoria aguda (I. Dey y K. Chadee y col. 2008) ⁶.

2.7 Vacunas contra *E. histolytica*

En el 2007 se diseñó una vacuna de subunidades contra la amebiasis que se construyó con cuatro péptidos de epítomos de la subunidad pesada de la lectina galactosa inhibida, estos cuatro péptidos fueron reconocidos por la inmunoglobulina A secretora intestinal (IgA) de seres humanos. Estos epítomos se encuentran en la región que comprende los aminoácidos 758 a 1134 de la subunidad pesada de la lectina, designado LC3. Los babuinos (*Papio anubis*) son huéspedes naturales de *E. histolytica*, los babuinos infectados criados en cautiverio tienen anticuerpos IgA en suero para los mismos cuatro epítomos LC3 como los seres humanos. Con la aplicación intranasal de la vacuna consiguieron inmunizar a babuinos sanos, después realizaron ensayos ELISA a los sueros de los babuinos inmunizados y estos presentaron anticuerpos IgA e IgG que reconocen a la proteína recombinante LC3 y a la proteína nativa de la lectina²³.

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Justificación

La amebiasis es la tercera enfermedad parasitaria más importante en el mundo por ser causa de muerte. Alrededor de 45 mil personas mueren al año por esta causa. Cabe mencionar que México es considerado un país endémico para las infecciones amebianas¹³.

En la actualidad la amebiasis sigue siendo un problema de salud mundial, a pesar de la disponibilidad de tratamiento eficaz, debido a que la mayoría de las infecciones pasan como asintomáticas y no son tratadas, por lo tanto, las amibas son estimuladas a enquistarse cuando las heces formadas comienzan a deshidratarse en la parte posterior del intestino grueso, los quistes formados son liberados en las heces¹⁴, estos quistes son el punto clave para la transmisión de dicha enfermedad. Actualmente no existe una vacuna contra la amebiasis, ni tampoco, una prueba diagnóstica disponible públicamente que permita diferenciar el tipo de cepa que está ocasionando la enfermedad. La existencia de especies morfológicamente indistinguibles de *Entamoeba* ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1997) a recomendar el desarrollo y aplicación de mejores métodos para el diagnóstico específico de la infección por *E. histolytica*^{16,63}.

A pesar de que las respuestas inflamatorias del huésped juegan un papel importante en la aparición y progresión de la amebiasis invasiva, poco se sabe sobre los factores del parásito que inician este evento. Se sabe aún menos, acerca de los componentes del parásito

que son secretados o liberados en el intestino y son capaces de modular las funciones de las células epiteliales del colon⁶, por lo cual, ha sido muy difícil crear una vacuna para dicha enfermedad, ya que no se conoce claramente el mecanismo por el cual actúan estos parásitos y no hay una elevación evidente o clave de algún anticuerpo para *E. histolytica*, por lo que, es complicado saber cuál es el antígeno que pueda utilizarse como modelo para una vacuna contra la amebiasis; además el no tener identificado este antígeno también afecta la construcción de una prueba diagnóstica eficaz.

Los avances en biología molecular y genética, aplicados a la investigación amebiana, permiten una búsqueda más precisa, de los marcadores de la diversidad dentro de la especie *E. histolytica* asociada con la capacidad invasiva intestinal o extraintestinal de este protozooario en los seres humanos. Si se logra encontrar a esos marcadores específicos para la cepa virulenta de *E. histolytica*, se podrá elaborar una vacuna para dicha enfermedad. Tales marcadores también podrían utilizarse para crear una prueba diagnóstica de laboratorio específica para el reconocimiento de *E. histolytica*¹³.

Una vez que se cuente con la biblioteca sustractiva, tanto de la cepa virulenta, como de la no virulenta, se dejan las bases para investigaciones posteriores acerca de cómo elaborar una vacuna o una prueba diagnóstica de fácil empleo, con una alta especificidad y que dé resultados rápidos.

Una prueba diagnóstica con las características mencionadas anteriormente, permitiría su uso en lugares alejados de la tecnología; debido a que los lugares tropicales y sobre todo las zonas rurales son las más propensas a padecer este tipo de infección por la falta de higiene y la pobreza.

3.2 Hipótesis

La cepa virulenta de *Entamoeba histolytica* expresa genes diferenciales que codifican proteínas inmunogénicas potentes en comparación con la cepa no virulenta.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Identificar antígenos específicos de la cepa virulenta de *Entamoeba histolytica* mediante el tamizaje de una biblioteca de cDNA sustractiva retada contra suero de pacientes con amebiasis invasiva.

3.3.2 Objetivos específicos

- Obtención de la cepa virulenta de *Entamoeba histolytica* en hígado de hámster y posterior cultivo axénico.
- Mantenimiento de la cepa no virulenta de *Entamoeba histolytica*.
- Extracción de los RNAm diferenciales de la cepa virulenta de *Entamoeba histolytica*.
- Construcción de una biblioteca sustractiva de cDNA de la cepa virulenta.
- Tamizaje inmunológico de la biblioteca de cDNA de la cepa virulenta con suero de pacientes diagnosticados con amebiasis asintomática, también se realizará el tamizaje con suero de pacientes que presenten amebiasis con absceso hepático.
- Identificación de los genes y las proteínas que presentaron una inmunoreacción.

4.2 Metodología

4.2.1 Obtención de Cultivos Amebianos

La obtención de las amibas se realizó en un cuarto de cultivo, el cual fue previamente sanitizado; se trabajó en una campana con mechero para crear un área estéril en la cual se realizaron ambos cultivos amebianos.

La cepa de referencia se ha conservado mediante subcultivos en el medio PEHPS (Peptona, Extracto de hígado, Páncreas y Suero), además se tienen dos grupos de referencia de la cepa HM1:IMSS⁶⁴. En el primer grupo se encuentra la cepa no virulenta y en el segundo grupo se ha conservado la virulencia mediante pasajes en hígado de hámster.

4.2.1.1 Cultivo Axénico Amebiano de *E. histolytica*

Las amibas se cultivaron en tubos de ensayo con 5 mL de medio PEHPS durante 48 horas a 36.5 °C. Después de cada 48 horas se hizo un pasaje a un tubo de ensayo nuevo con medio para mantener la cepa viva^{65,66}.

4.2.1.2. Inducción del Absceso Hepático Amebiano

Como modelo experimental para producir amibiasis hepática, se utilizaron hámsters sirio dorados (*Mesocricetus auratus*), machos recién destetados, con un peso de 40-60 g⁶⁷, los cuales fueron criados y mantenidos en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

Cada hámster fue inoculado con 10⁶ trofozoítos crecidos en medio PEHPS, por cada experimento se utilizaron 2 animales. Los hámsters fueron anestesiados por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/mL de pentobarbital sódico de uso veterinario

(Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 mL y aguja calibre No. 25 en dosis de 6.3 mg/100 g de peso corporal. Con esta dosis se indujo una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Se procedió entonces a rasurar el vientre del hámster y se desinfectó el área operatoria con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después fue colocado el campo estéril y con tijeras se realizó una pequeña incisión en abdomen de 1.5 cm en la línea media, por abajo del apéndice xifoides del esternón, exponiendo el hígado. Cada hámster fue inoculado con 10^6 amibas, suspendidas en 0.1 mL de medio PEHPS basal, directamente en el lóbulo ventral del hígado, con una aguja calibre No. 25. Después de la inoculación se hizo hemostasia en el punto de la inoculación con gelfoam esponja estéril hemostática (Upjohn), y se suturó la incisión, mediante súrgete continuo con candado, abarcando los planos peritoneal muscular y cutáneo, con seda estéril calibre 000 ⁶⁸.

4.2.1.3 Cultivo de Amibas a Partir del Absceso Amebiano

La evaluación de las lesiones hepáticas se realizó 7 días después de la inoculación, mediante una laparotomía exploratoria, practicada a cada animal. Para demostrar la presencia de los trofozoítos vivos en los abscesos hepáticos, se tomaron piezas del tejido afectado de 0.5 cm y se observaron en el estereoscopio para confirmar la presencia de los abscesos. Los abscesos que estuvieron presentes se colocaron directamente en el medio de cultivo PEHPS. Después de 72 horas se observaron los tubos bajo el microscopio invertido para confirmar la presencia de los trofozoítos vivos, una vez que se confirmó la presencia de los trofozoítos a las 72 horas se realizó un pasaje de trofozoítos (0.3 mL) a un tubo de ensayo que contenía 5 mL de medio PEHPS y se incubó a 37 °C con 5 % CO₂. Los pasajes se realizaron cada 48 horas para mantener la cepa viva.

4.2.1.4 Curva de Crecimiento

La curva de crecimiento se realizó para conocer el tiempo en el que las amibas se encuentran en su fase estacionaria, ya que en esta fase hay mayor cantidad de amibas con un metabolismo estable, lo cual genera mejores resultados para obtener una pastilla de amibas grande y así obtener más cantidad de RNA en la extracción.

Para realizar la curva de crecimiento primero se realizó un conteo de trofozoítos de amibas, colocando una gota de medio con trofozoítos en una cámara Neubauer, se contaron las amibas vivas que se encontraban en los cuadrantes, una vez realizado el conteo por triplicado se obtuvo un promedio y se hizo una regla de tres simple para conocer la cantidad de microlitros a inocular en los tubos de ensayo con medio PEHPS que fueran equivalentes a 27, 500 amibas. Este conteo se realizó para ambas cepas. Fueron inoculados 30 tubos de ensayo con medio PEHPS, la mitad de los cuales contenían 0.5 mL de Suero Bovino (el experimento se realizó por triplicado), los 15 tubos que contenían además del medio los 0.5 mL de Suero Bovino fueron inoculados con 0.3 mL de la cepa virulenta y los otros 15 tubos se inocularon con 0.3 mL de la cepa no virulenta. Cada 24 horas se tomaron 3 tubos de cada cepa y se realizó el conteo en la cámara Neubauer, este conteo se realizó durante 5 días. Una vez obtenidos todos los datos, estos fueron graficados con ayuda del programa Excel® para obtener la curva de crecimiento.

4.2.2 Extracción de RNA

4.2.2.1 Obtención de la Pastilla de Amibas

Las amibas contenidas en 5 tubos de ensayo se colocaron en un tubo cónico de 50 mL. Para obtener la pastilla de amibas el tubo cónico fue centrifugado a 1,500 rpm durante

15 minutos a 5 °C, después el medio fue retirado con una pipeta Pasteur. Se agregó 1 mL de PBS para lavar la pastilla, se mezcló y se transfirió la mezcla a un tubo eppendorf, el cual fue centrifugado a 5,000 rpm durante 10 minutos. Por último se retiró el PBS. Se repitió 2 veces más el lavado con PBS. Se decantó el PBS y la pastilla quedó lista para la extracción de RNA.

4.2.2.2 Extracción de RNA

Se realizó en una campana de acrílico, previamente sanitizada. Al tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía el pellet de trofozoítos de amibas se le agregaron 500 µL de trizol frío a 4 °C, para lisar las amibas, el tubo se agitó por inversión durante 10 segundos, se incubó la muestra homogenizada por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo para separar en la mezcla dos fases, una acuosa y otra orgánica. Se mezcló por inversión vigorosamente durante 20 segundos, se incubó por 5 minutos a 4 °C, después la muestra fue centrifugada a 12,000 rpm durante 15 minutos (preferentemente a 4 °C).

Una vez centrifugado el tubo, se formaron las dos fases. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo estéril eppendorf de 1.5 mL, después se agregaron 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión para después centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos (la temperatura debe estar entre 4 - 25 °C), una vez concluidos los pasos anteriores se observó un precipitado en la pared del tubo eppendorf (RNA aislado).

Por último el pellet fue lavado con 500 µL de etanol al 75 %, se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos, se decantó el etanol y se dejó secar el pellet por 5 minutos. Para finalizar la extracción se suspendió el pellet en 50 µL de agua mili-Q estéril.

4.2.2.3 Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA se realizó en el equipo biofotómetro, se utilizó una celda de plástico, antes de leer la muestra se eligió el programa, en este caso, RNAss, después se ajustó la absorbancia del equipo con el blanco, se utilizó como blanco el disolvente que se usó para el RNA a medir (el disolvente puede ser agua DEPC o agua mili-Q). Para leer la concentración de la muestra se colocaron 99 μL de agua DEPC más 1 μL de muestra en la celda de plástico y después se oprimió el botón “sample” del biofotómetro, para que el equipo mostrara las concentraciones de las muestras. Los resultados se obtuvieron en $\mu\text{g/mL}$, además el equipo desplegó una relación de absorbancias 260/280 que indica la pureza de la muestras, una relación de 2.0 pertenece a preparaciones puras de RNA.

4.2.2.4 Electroforesis en Gel de Agarosa

Se pesó 1 gramo de agarosa, y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 100 mL de TBE 1X y se calentó en el microondas para disolver la agarosa, después la agarosa se colocó en el molde para que polimerizara, antes de que sucediera la polimerización se agregó bromuro de etidio, el cual se usa para poder revelar el gel y ver las bandas correspondientes.

Las muestras de RNA fueron tratadas antes de colocarlas en el gel, el tratamiento fue el siguiente: En un tubo eppendorf de 200 μL se colocaron 2 μL de jugo azul, 3 μL de agua DEPC y 5 μL de muestra; este mix fue calentado a 65 °C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron colocadas en el gel y se corrió la electroforesis con las condiciones descritas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Condiciones para Electroforesis

Paso #	Voltaje (Volts)	Tiempo (Minutos)
1	70	5
2	120	30

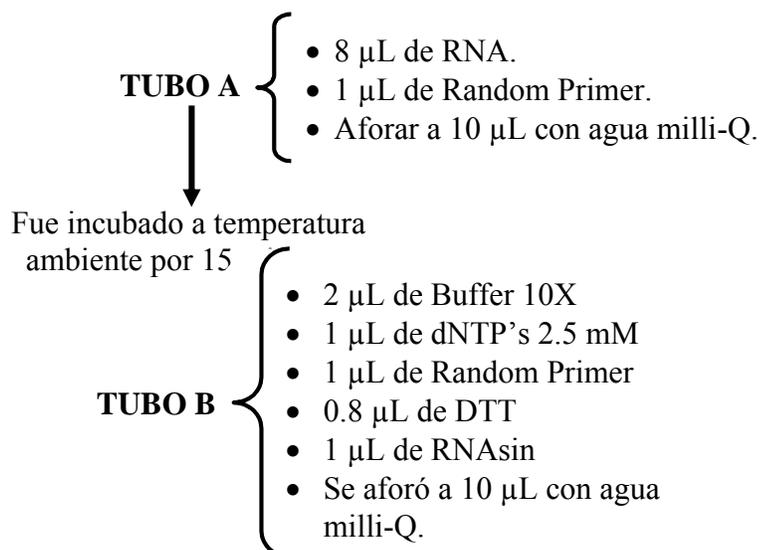
Finalmente el gel de agarosa se observó en el fotodocumentador utilizando el programa Quantity One® de BioRad para ver las bandas características de RNA, al final se tomó una foto al gel ya revelado.

4.2.2.5 Identificación del Gen Cisteín-Proteínasa 5

Para identificar el gen Cisteín-Proteínasa 5 (CP5) que está presente solo en Cepas Virulentas de *E. histolytica* se realizó una RT-PCR⁶⁹ y posteriormente se observó el gen amplificado en un gel de agarosa al 1%.

4.2.2.5.1 Retrotranscripción.

Se realizó una retrotranscripción (RT) para el RNA de la Cepa No Virulenta. La RT se llevo a cabo en tubos eppendorf de 200 µL el procedimiento se indica a continuación:



Después de que transcurrieron los 15 minutos se mezclaron los dos tubos y fueron incubados a 65 °C por 5 minutos y enseguida a 37 °C durante 10 minutos. Después de los 10 minutos se agregó 1 µL de enzima transcriptasa reversa y se incubó a 37 °C por 50 minutos, inmediatamente se elevó la temperatura a 95 °C por 15 minutos y por último se aplicó un choque térmico disminuyendo la temperatura a 0 °C durante 5 minutos.

Una vez que se sintetizó el DNA complementario se procedió a realizar una PCR.

4.2.2.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en el termociclador, utilizando primers específicos (Tabla 4.2) para amplificar el gen CP5 en ambas cepas, bajo las siguientes condiciones descritas en la Tabla 4.3:

Tabla 4.2 Secuencia de los Primers CP5

Nombre	Secuencia	# nucleótidos
Cisteín-Proteinasa 5 Forward	TTC AGC AGC AAC ATA TGG	18
Cisteín-Proteinasa 5 Reverse	ATT TGC TGC TAT GAC TGA GG	20

Tabla 4.3 Condiciones de PCR para CP5

Temperatura	Tiempo
94°C	5 minutos
94°C	30 segundos
65°C	30 segundos
72°C	30 segundos
72°C	5 minutos

30 Ciclos

4.2.2.5.3 Gel de Agarosa al 1 %. Se hizo un gel de agarosa al 1 % para observar la banda característica del gen CP5 a 376 pb, el gel se elaboró de acuerdo al apartado 4.2.2.4.

4.2.3 Hibridación RNAm-cDNA

4.2.3.1 Retrotranscripción

Para poder realizar la hibridación del RNAm-cDNA, primero se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) de la Cepa No Virulenta utilizando la técnica de Retrotranscripción, la cual se describe en el apartado 4.2.2.5.1 y en la tabla 4.4 se describen de forma resumida las condiciones de la RT, al final de esta tabla se mencionan los pasos que se realizaron después de la RT para obtener solamente el cDNA de la Cepa No Virulenta.

Tabla 4.4 Condiciones para RT

Temperatura	Tiempo
65°C	5 minutos
37°C	10 minutos
SE AGREGÓ LA ENZIMA RT	
37°C	50 minutos
95°C	15 minutos
0°C	5 minutos

Se agregó a los tubos 2 µL de RNasa y se incubaron por 1 hora a 37 °C y por último se eleva la temperatura a 70 °C por 10 minutos, esto se realizó para degradar el RNA y que solo quedara el DNA complementario.

Para finalizar se agregó 1 mL de etanol absoluto, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el etanol y se dejó secar el precipitado, el cual una vez seco se resuspendió en 20 μ L de agua DEPC.

4.2.3.2 Hibridación RNAm-cDNA

Se incubaron 80 μ g de RNA de la cepa virulenta en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se le agregaron 25 μ L de buffer de hibridación, esta mezcla se llevó a 65°C por 10 minutos, se aplicó un choque térmico en hielo, después se añadió el cDNA de la cepa no virulenta, el cual fue precalentado a 65 °C por 10 minutos. Se agregaron 2 μ L de NaCl 5 M y se ajustó el volumen a 50 μ L con agua DEPC. La mezcla fue incubada 24 horas a 25 °C a 250 rpm.

4.2.3.3 Extracción de RNAm Diferenciales

La extracción de RNAm diferenciales se hizo por medio de la técnica trizol, la cual fue descrita en el apartado 4.2.2.2.

4.2.3.4 Identificación del Gen CP5

Los RNA mensajeros diferenciales obtenidos, son los que están sobreexpresados en la cepa virulenta; para comprobar que se obtuvieron dichos RNA, se identificó mediante una RT-PCR el gen Cisteín-Proteinasa 5, que es un gen que está reportado en la literatura, como gen sobreexpresado en las cepas virulentas de *E. histolytica*. Para identificar el gen CP5, se hizo una RT-PCR utilizando las mismas condiciones que se usaron en el apartado 4.2.2.5.

4.2.4 Clonación de los Insertos al Vector Fágico

4.2.4.1 Alineación de los Iniciadores para Formar los Adaptadores 3' y 5'

Los iniciadores (oligonucleótidos) se prepararon a partir de secuencias repetitivas de DNA blanco únicas de la especie patogénica y no patogénica de *E. histolytica*, la tabla 4.5 presenta la secuencia de los cuatro iniciadores utilizados.

Tabla 4.5 Secuencias de los Iniciadores

Nombre	Secuencia	# nucleótidos
Spe I 5'	G GCC GCA GGT CTC CTC CTC TTA GCA GCA CAA CCA GCA ATG GCC	43
Spe I 3'	CGT CCA GAG GAG GAG AAT CGT CGT GTT GTT CGT TAC CGG	39
Not I 5'	TTT TTT TTT ACT AGT GAT GCT	21
Not I 3'	TGA TCA CTA CGA	12

Los iniciadores se resuspendieron en agua milli-Q, quedando con las concentraciones mostradas en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Concentraciones de los Iniciadores

<i>Iniciadores</i>	<i>Contenido μL</i>	<i>Concentración pmol</i>
Spe I 3'	261	72105.97
Spe I 5'	494	73954.31
Not I 3'	533	44080.27
Not I 5'	518	47359.94

Posteriormente se hizo una dilución 1:10 para poder tomar una alícuota de 32.5 pmol de cada oligonucleótido. Para alinear los iniciadores se colocaron en un mismo tubo

32.5 pmol del iniciador Spe I 3' y 32.5 pmol del iniciador Spe I 5'; en otro tubo se colocaron 32.5 pmol pero ahora del iniciador Not I 3' y Not I 5'. Los dos tubos se aforaron a 15 μ L con agua milli-Q. Después se añadió a cada tubo 5 μ L de buffer L10X. Por último se calentaron a 90 °C durante 5 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente por 45 minutos.

Después de estos experimentos los adaptadores quedaron listos para ser unidos a los RNAm diferenciales, en la Figura 4.1 se muestra un proceso general de la preparación de los adaptadores y la unión de los mismos a los RNAm diferenciales.

4.2.4.2 Unión del Adaptador 3'

4.2.4.2.1 Unión del Adaptador 3' a los RNAm Diferenciales.

Se colocaron aproximadamente 50 ng de RNAm diferenciales. Se agregaron 16 μ L de agua milli-Q y 2 μ L de buffer T4 DNA ligasa 10X, se agregó 1 μ L del adaptador 3' más 1 μ L de T4 DNA ligasa 10 u. Todo este mix se incubó durante 5 horas a 15 °C. Los RNAm se unieron al adaptador 3' a través de la cola poli A de los RNAm.

4.2.4.2.2 Digestión con la Enzima Spe I.

Posteriormente se hizo una digestión con la enzima Spe I para obtener extremos cohesivos en el adaptador 3', estos extremos cohesivos se unieron al vector SurZAP. Para que se llevara a cabo la digestión del adaptador 3' unido a los RNAm que estaban en un volumen total de 22 μ L se le agregó 1 μ L de enzima Spe I, más 1 μ L de buffer 10X Spe I y 3 μ L de agua milli-Q, esta reacción se incubó a 37°C por 12 horas. Después de esta incubación se obtuvieron los extremos cohesivos en el adaptador 3'.

4.2.4.2.3 Retrotranscripción.

Antes de realizar la RT se precipitó el RNAm-Adaptador 3' con extremos cohesivos con 1 mL de etanol absoluto y 100 μ L de acetato de sodio, se dejó incubando por 1 hora a -20 °C, una vez transcurrida la hora se centrifugó y se decantó el contenido, al pellet se le agregó 1 mL de etanol al 70 % para lavarlo, se volvió a centrifugar y decantar, y al final se resuspendió en 20 μ L de agua milli-Q. La RT se realizó siguiendo el protocolo del apartado 4.2.3.1, pero se realizó una modificación ya que no se agregó RNasa.

4.2.4.2.4 Síntesis de la Segunda Cadena.

Para sintetizar la segunda cadena se realizó el siguiente mix (tabla 4.7).

Tabla 4.7 Mix para Sintetizar la Segunda Cadena

<i>Reactivo</i>	Cantidad μL
Buffer PCR 10X	2.5
Taq DNA Polimerasa 5u	1
dNTP's 2.5 mM	1
MgCl ₂ 50 mM	1
Muestra	10



Aforar todo este mix a 25 μ L con agua milli-Q.

Condiciones:

- Desnaturalización a 92 °C/1 minuto
 - Alineamiento a 40 °C/1 minuto
 - Extensión por 2 minutos a 72 °C
- } 30 Ciclos

Después de la síntesis de la segunda cadena se procedió a precipitar el DNA-Adaptador 3' agregando 1 mL de etanol absoluto más 100 µL de acetato de sodio 3 M, se dejó reposar 1 hora a -20 °C y después fue centrifugado a 14, 000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó y fue descartado, el pellet fue lavado con etanol al 75 %, para volver a obtener el pellet se volvió a centrifugar 14, 000 rpm por 10 minutos, el etanol se decantó y se descartó, el pellet ya lavado se dejó secando durante 5 minutos, para finalizar el pellet fue disuelto en 10 µL de agua milli-Q.

4.2.4.3 Unión del Adaptador 5' al DNA-Adaptador 3'

Se agregaron 16 µL de agua milli-Q a los 10 µL de DNA-Adaptador 3', posteriormente se agregaron 2 µL de buffer T4 DNA ligasa 10X, 1 µL de T4 DNA ligasa 10 u y por último se agregó 1 µL del Adaptador 5'. Se incubó toda esta mezcla de reacción por 5 horas a 15 °C⁷⁰.

4.2.4.4 Cuantificación de DNA más los Adaptadores

La cuantificación se realizó en el biofotómetro; se colocaron en una celda de plástico 100 µL de agua milli-Q, los cuales se utilizaron como blanco; para leer la muestra, se colocaron 99 µL de agua milli-Q en la celda más 1 µL del DNA unido a los adaptadores, se oprimió el botón “sample” del biofotómetro para que éste desplegara en la pantalla la concentración del DNA-Adaptadores en µg/mL con la relación de absorbancia 280/260 la cual debe estar entre 1.65 a 1.9 para considerar que la muestra se encuentra pura.

4.2.4.5 Reacción de Ligación de los Insertos al Vector SurfZAP

Se prepararon dos controles; uno positivo (+) y otro negativo (-).

Tabla 4.8 Reacción de Ligación.

	Negativo μL	Positivo μL	Muestra μL
Vector SurfZap (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1	1	1
Inserto testigo (+) (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	----	1	----
Inserto Muestra	----	----	2
Buffer T4 DNA ligasa 10X	0.5	0.5	0.5
dNTP's 25 mM	0.5	0.5	0.5
Agua	2.5	1.5	0.5
T4 DNA ligasa (10 u/μL)	0.5	0.5	0.5

Tanto los controles como la muestra se incubaron a 4 °C toda la noche.

En la Figura 4.2 se aprecia el vector Lambda SurfZap; el cual tiene un tamaño de 3732 pb. El vector cuenta con el represor *ci857* que es sensible a la temperatura, se activa a 32 °C, pero se inactiva a 42 °C, lo que permite la selección por lisogenia. El vector contiene el fagémido Bluescript SK- (Figura 4.3) y el hospedador es *E. coli* XL-1-Blue MRF'. En la Figura 4.4 se aprecia la secuencia completa del vector SurfZap.

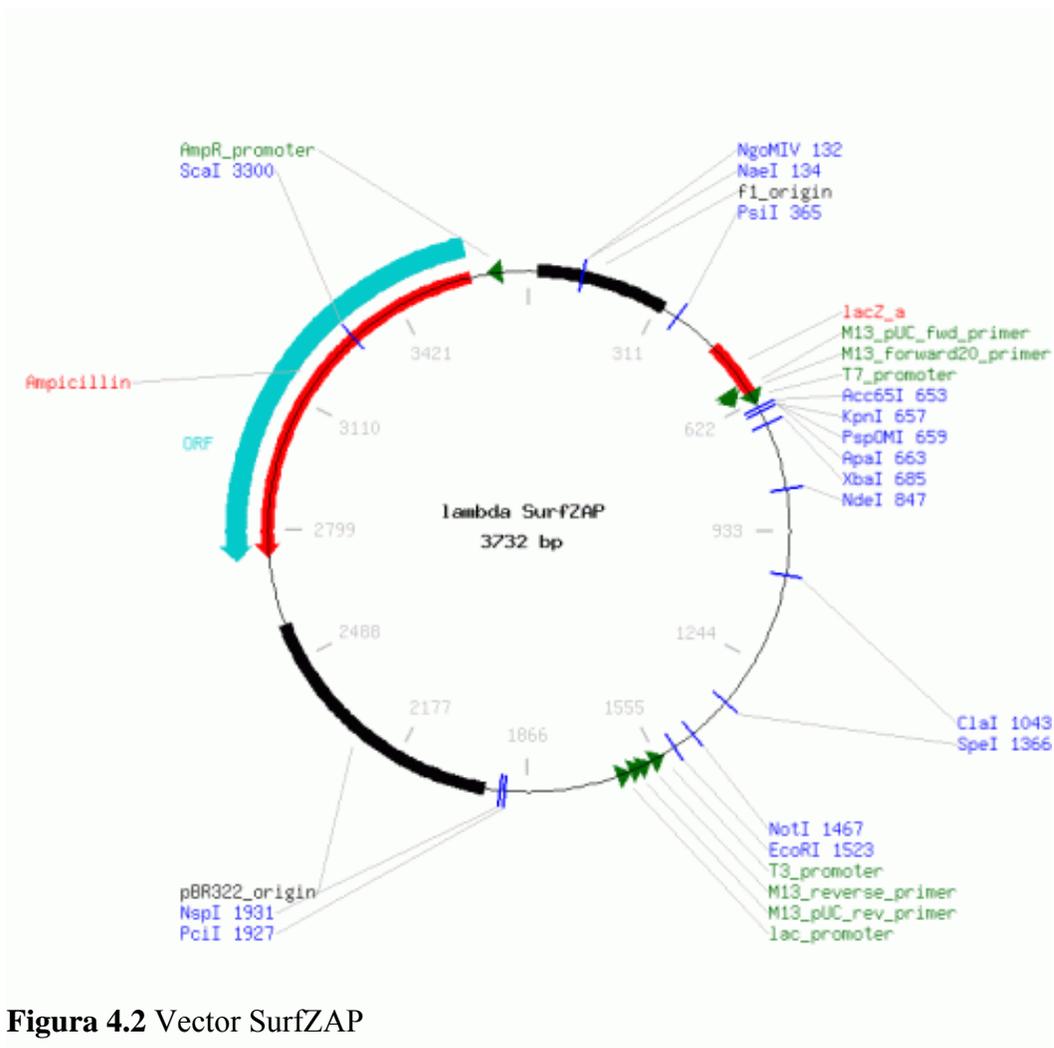


Figura 4.2 Vector SurfZAP

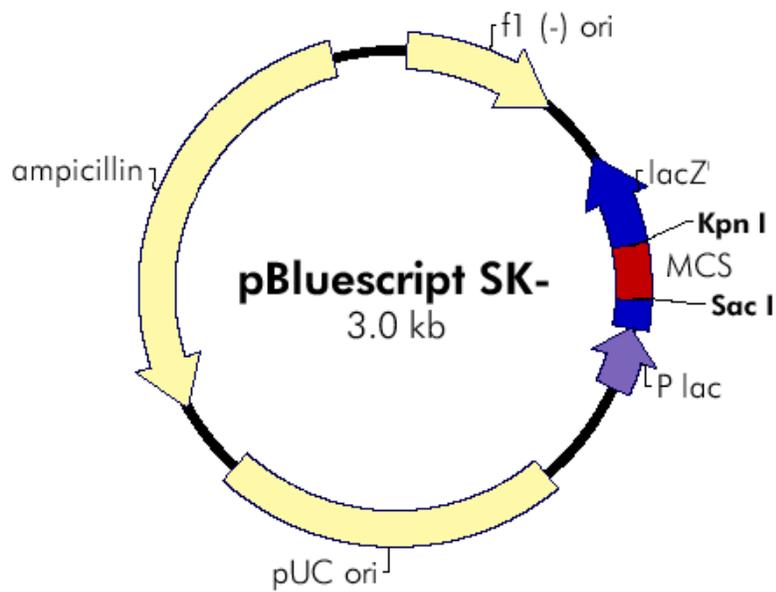


Figura 4.3 Fagémido pBluescript SK-

```

1 CACCTGACGC GCCCTGTAGC GGCGCATTAA GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT
51 ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCTAGCGC CCGCTCCTTT
101 CGCTTCTTC CTTCTCTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG
151 CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC
201 CTCGACCCCA AAAAAGTTGA TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC
251 GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GCCCTTGAC GTTGAGTCC ACGTTCTTTA
301 ATAGTGGACT CTTGTCCAA ACTGGAACAA CACTCAACCC TATCTCGGTC
351 TATTCTTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG ATTTCCGCC ATTTGGTTAAA
401 AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC GAATTTAAC AAAATATTA
451 CGCTTACAAT TTCCATTTCG CATTACAGCT GCGCAACTGT TGGGAAGGGC
501 GATCGGTGCG GGCCCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA AGGGGGATGT
551 GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAAACGCC GGGTTTTCCC AGTCACGACG
601 TTGTAACACG ACGGCCAGTG AATTGTAATA CGACTCACTA TAGGGCGAAT
651 TGGGTACCGG GCCCCCCCTC GACGGCCGCT TAACTCTAGA ATAATGGAAT
701 ACCCTTTTGA ACTGGCATGA TTAAGACTCC TTATTACGCA GTATGTAGC
751 AAACGTAGAA AATACATACA TAAAGGTGGC AACATATAAA AGAAACGCAA
801 AGACACCACG GAATAAGTTT ATTTTGTCAC AAATCAATAGA AAATTCATAT
851 GGTTTACCG CGCCAAAGAC AAAAGGGCGA CATTCAACCG ATTGAGGGAG
901 GGAAGTAAA TATTGACGGA AATTATTCAT TAAAGGTGAA TTATCACCGT
951 CACCGACTTG AGCCATTTGG GAATTAGAGC CAGCAAAATC ACCAGTAGCA
1001 CCATTACCAT TAGCAAGGCC GGAACGTC CCAATGAAAC CATCGATAGC
1051 AGCACCGTAA TCAGTAGCGA CAGAATCAAG TTTGCCTTTA GCGTCAGACT
1101 GTAGCGCGTT TTCATCGGCA TTTTCGGTCA TAGCCCCCTT ATTAGCGTTT
1151 GCCATCTTTT CATAATCAAA ATCACCGGAA CCAGAGCCAC CACCCGAAAC
1201 GCCTCCCTCA GAGCCGCCAC CCTCAGAACC GCCACCTCA GAGCCACCAC
1251 CCTCAGAGCC GCCACCAGAA CCACCACCAG AGCCCGCCGC AGCATTGACA
1301 GGAGGTGAG GCAGGTGAGA CGATTGGCCC TGATATTAC AAACGAATGG
1351 GCTACCTCCA CCTCCACTAG TAAGGACGGC TTCTCATTAG GCCGGTTGGG
1401 CCGCGAGTAA TAACAATCCA GCGGCTGCC TAGGCAATAG GTATTTTCAT
1451 ATGACTGTCT CTTGGCGGC CGCGTAGGC AATAGGTATT TCATTATGAC
1501 TGCTCTCTG GCGAGTAGT AAGAATTCAA GCTCCAGCTT TTGTTCCCTT
1551 TAGTGAGGGT TAATTTCCG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC
1601 TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA
1651 GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA
1701 ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTCCAG TCGGGAACCC TGTCGTGCCA
1751 GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACCGCGGGG GAGAGCGGTT TCGGTATTG
1801 GCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG
1851 CTGCGCGCAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATTCAC
1901 AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GCCCAGCAAA
1951 AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCCGCTTGC TGCGCTTTT CCATAGGCTC
2001 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG
2051 AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCTCC CCGAAGTCCC
2101 TCGTGCCTC TCCTGTCCG ACCCTGCCGC TTACCCGATA CCTGTCCGCC
2151 TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA
2201 TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC
2251 CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCTTAT CCGGTAAC TAAGTCTGAG
2301 TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA
2351 CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT
2401 GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTGCG TATCTGCGCT
2451 CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTGATCCGG
2501 CAAACAAAAC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTGTC AAGCAGCAGA
2551 TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTAGC
2601 GGTCTGACG CTCAGTGGA CAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCA
2651 GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA
2701 GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC
2751 CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCTGTC
2801 ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG
2851 GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA
2901 CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGG
2951 CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT
3001 GCCGGGAAGC TAGAGTAAAT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT
3051 GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC
3101 TTCATTGACG TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA
3151 TGTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCCTCGAT CGTTGTGAGA
3201 AGTAAGTTGG CCGCAGTGT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA
3251 TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT
3301 ACTCAACCAA GTCATTTCTGA GAATAGTGTA TGCCGGGACC GAGTTGCTCT
3351 TGCCCGCGCT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA
3401 AGTGCTCATC ATTGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCT TCAAGGATCT
3451 TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA
3501 TCTTCAGCAT CTTTACTTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG
3551 AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA
3601 TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT
3651 TGCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT
3701 AGGGTTCCG CGCACATTTT CCGAAAAGT GC

```

Figura 4.4 Secuencia del Vector SurfZAP

4.2.5 Construcción de la Biblioteca Sustractiva

4.2.5.1 Empaquetamiento del Vector en los Extractos de Fagos

El kit Packaging extracts se utiliza para empaquetar fagos lambda recombinantes con alta eficiencia. El formato de un solo tubo de extracto Gigapack III simplifica el procedimiento de empaquetamiento y aumenta la eficiencia y la representación de bibliotecas construidas a partir de DNA altamente metilado⁷¹. Para una óptima eficiencia de empaquetamiento, se utilizó 1 μL de la reacción de ligación y nunca más de 4 μL . El polietilenglicol, el cual está presente en algunos buffers, puede inhibir el empaquetamiento.

Se tomaron los tubos que contenían los extractos del congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se colocaron en hielo seco. Rápidamente se descongelaron los extractos colocando el tubo entre los dedos hasta que el contenido comenzó a descongelarse. El DNA experimental (muestra) se agregó inmediatamente (1-4 μL los cuales contienen aproximadamente 0.1-1.0 μg de DNA ligado) al tubo que contenía los extractos. Se agitó el tubo con la punta de la pipeta para mezclar bien. Suavemente se pipeteó evitando introducir burbujas. El tubo fue centrifugado rápidamente (de 3-5 segundos), para asegurarse que todo el contenido estuviera en el fondo del mismo. Los extractos más el DNA fueron incubados a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Después se agregaron 500 μL de buffer SM, más 20 μL de cloroformo y se mezcló el contenido del tubo suavemente. Se centrifugó el tubo suavemente para sedimentar los desechos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El sobrenadante contenía los fagos, los cuales quedaron listos para la titulación, se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este sobrenadante obtenido es la Biblioteca Sustractiva.

4.2.5.2 Titulación de la Biblioteca Sustractiva

4.2.5.2.1 Preparación de Bacterias Hospederas. Las cepas hospederas se tomaron de un stock de glicerol. Para propagarlas se prepararon cajas petri con agar. Para revivir a las células almacenadas en glicerol se raspó el hielo de las células almacenadas en glicerol con un asa bacteriológica estéril y fue sembrado en cajas petri con agar LB con el antibiótico adecuado (se usó antibiótico solo cuando fue necesario). Se incubó la caja petri toda la noche a 37 °C. Posteriormente se selló la caja petri con Parafilm® y se almacenó a 4 °C por una semana.

4.2.5.2.2 Crecimiento de Células para el Césped Bacteriano. Éste se realizó a partir de una caja petri recién sembrada, se utilizó una sola colonia y se cultivó durante toda la noche con agitación vigorosa a 30 °C en 50 mL de caldo LB suplementado con maltosa al 0.2 % p/v y MgSO₄ 10 mM (No se utiliza tetraciclina en presencia de magnesio). A temperaturas más bajas se asegura que las células no crezcan en exceso. Las células se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos y luego se resuspendieron en 10 mL de MgSO₄. Antes de usarlas, se diluyeron las células bacterianas a una OD₆₀₀ de 0.5 con MgSO₄ 10 mM. Las células bacterianas preparadas de esta manera se utilizan para todas las manipulaciones de los fagos descritas en esta tesis. Se obtiene una alta eficiencia si las células son recién preparadas.

4.2.5.2.3 Titulación de la Reacción de Empaquetamiento. Preparación de la Bacteria Hospedadora. La cepa VCS257 se usó solo con el control positivo DNA wild-type lambda. Se sembró la cepa XL1-Blue y VCS257 en cajas petri con agar LB conteniendo el antibiótico apropiado. Las cajas fueron incubadas toda la noche a 37 °C. No se agregó antibiótico al medio del siguiente paso, ya que el antibiótico podría inhibir la pared celular

de la bacteria y esto a su vez podría inhibir la habilidad del fago para infectar a las células. Se prepararon 50 mL de caldo LB con suplementos para el cultivo de la cepa XL1-Blue y VCS257. Se incubaron con agitación a 37 °C por 4-6 horas cuidando que la OD₆₀₀ no pasara de 1.0. Las bajas temperaturas evitan el sobrecrecimiento, así se reduce el número de células no viables, por lo cual las cepas se pueden crecer toda la noche a 30 °C, con agitación a 200 rpm. Los fagos pueden adherirse a células no viables dando como resultado una disminución en la titulación. Las bacterias fueron centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos; y la pastilla se resuspendió suavemente en 25 mL de MgSO₄ 10 mM estéril. Se almacenaron a 4 °C.

Titulación. Las células XL1-Blue se diluyeron con MgSO₄ 10 mM estéril hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.5. Una vez diluidas las bacterias se usaron inmediatamente. Para determinar la titulación de la reacción de ligación, se mezclaron los siguientes componentes: 1 µL de la reacción final de empaquetamiento más 200 µL de células XL1-Blue MRF⁺ con una OD₆₀₀ de 0.5.

Se incubaron los fagos y las bacterias a 37 °C por 15 minutos para permitir que los fagos ataquen a las bacterias. Se agregaron 3 mL de agar suave NZY, el cual fue fundido y enfriado hasta llegar a aproximadamente 48°C, inmediatamente se vació en una caja petri la cual ya tenía agar NZY duro sólido. Se dejó secar el agar suave durante 10 minutos, se incubó la caja petri a 37 °C. Los halos de lisis se hicieron visibles después de 12 horas.

4.2.5.3 Ensayo de Eficiencia de Extractos de Empaquetamiento Gigapack III.

Se usó el siguiente procedimiento para probar la eficiencia del Gigapack III con el control DNA λcI857 Sam7 wild-type lambda. Se descongeló el control DNA wild-type lambda y fue mezclado suavemente. Se utilizó 1 µL del control DNA wild-type lambda con

aproximadamente 0.2 μg , se procedió de la misma forma que en el apartado 4.2.5.1 recordando que con el DNA wild-type λ se utilizó la bacteria VCS257 para realizar la titulación.

4.2.6 Amplificación por PCR de los Genes Aislados

Para poder amplificar el gen de interés antes de realizar la PCR se debe hacer una extracción de DNA Plasmídico.

4.2.6.1 Extracción de DNA Plasmídico

Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano conteniendo los fagos y se centrifugó a toda velocidad durante 1 minuto, después se tomó el sobrenadante y se le adicionaron 300 μL de buffer TENS, se dió vortex por 10 segundos, se adicionaron 150 μL de acetato de sodio pH 4.8-5.2 y se dió vortex por 10 segundos otra vez, para lisar las células. Se centrifugó la mezcla por 10 minutos a toda velocidad. Se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf nuevo, se adicionaron 900 μL de etanol absoluto, se incubó a -20 °C durante 30 minutos después se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad, después de centrifugar se observó un pellet en el fondo del tubo el cual fue lavado con etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales descartando el sobrenadante. Finalmente se disolvió el pellet resultante en 50 μL de agua estéril.

4.2.6.2 Gel de Agarosa al 1 %

Se hizo un gel de agarosa al 1 % para observar la calidad el DNA plasmídico obtenido en la extracción, el gel se realizó de la misma forma que en el apartado 4.2.2.4.

4.2.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para realizar la amplificación de los genes específicos se realizó una PCR, utilizando como primer forward T7 y primer reverso el oligonucleótido NotI 5', se manejaron las condiciones descritas en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Condiciones para PCR

Condiciones PCR	
Temperatura	Tiempo
95 °C	5 minutos
95 °C	1 minuto
48 °C	1 minuto
72 °C	2 minutos
72 °C	5 minutos

Tabla 4.10 Secuencia de los Primers T7 y Not I

Primers	Secuencia
T7 forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
Not I 5' reverse	TTT TTT TTT ACT AGT GAT GCT

4.2.6.4 Electroforesis

Para comprobar que el gen fue amplificado se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, el gel se realizó de la misma forma que en el apartado 4.2.2.4, las condiciones para correr la electroforesis se encuentra en la tabla 4.1; una vez concluida la electroforesis, fue identificada en el transiluminador la banda correspondiente al gen amplificado y posteriormente la banda se purificó usando columnas NucleoSpin® Extrac.

4.2.7 Cuantificación de Proteínas

Las proteínas del extracto se cuantificaron por medio del método en microplaca utilizando ácido bicinconínico (BCA), el cual permite monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{+2} en medio alcalino. Se prepararon estándares de albúmina sérica bovina (BSA) de 1 mg/mL y 2 mg/mL diluidos en agua (también se puede utilizar buffer de lisis). En una microplaca de 96 pozos se colocaron volúmenes de estándar por triplicado (Tabla 4.11) en orden descendente según el diagrama, en la Figura 4.5 se muestra la imagen de la placa utilizada para la cuantificación, en las columnas 1, 2 y 3 se colocó el estándar de 1mg/ml, en las columnas 5, 6 y 7 el estándar de 2 mg/mL y finalmente en las columnas 10, 11 y 12 las muestras de interés.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Estándar SAB
1 mg/ml

Estándar SAB
2 mg/ml

Muestras

Figura 4.5 Estándares colocados por triplicado en la placa de 96 pozos utilizada en la cuantificación de proteínas por la técnica de BCA.

Tabla 4.11 Volúmenes (μl) Utilizados para la Curva Estándar en la Cuantificación de Proteínas (Estándares de $1\text{mg}/\mu\text{l}$ y $2\text{mg}/\mu\text{l}$).

Estándar	Buffer (PBS)	BCA
0	20	200
1	19	200
2	18	200
4	16	200
6	14	200
8	12	200
10	10	200
12	8	200

El reactivo de BCA se preparó justo antes de adicionarlo a los pocillos de la microplaca, se utilizaron 17.4 mL de BCA y 300 μL de sulfato de cobre (al 4 %).

Además de las cantidades antes mencionadas se agregaron 20 μL de muestra (extracto proteico de una cepa virulenta y una cepa no virulenta de *E. histolytica* y extracto proteico de la clona 1 y 2 de los fagos) por triplicado, más 200 μl del reactivo BCA. La placa se incubó por 30 minutos a 37 °C, y se leyó la absorbancia a 562 nanómetros en un lector de microplaca, posteriormente se calculó la concentración de la proteína con ayuda del software Microsoft Excel®.

4.2.8 Tamizaje Inmunológico

El tamizaje inmunológico se realizó con suero de pacientes que presentaron absceso hepático amebiano. El tamizaje se llevó a cabo en filtros de nitrocelulosa, se colocaron en puntos focalizados 5 μ L del sobrenadante de los extractos de la clona 1 y de la clona 2, dejando secar después de cada aplicación.

4.2.8.1 Bloqueo de la Membrana

Se bloqueó la membrana de nitrocelulosa agregando leche sin grasa al 10 % en PBS, se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Después de transcurrida la incubación se descartó la solución bloqueadora.

4.2.8.2 Incubación con Anticuerpo Primario

La membrana se colocó en leche sin grasa al 1 % en PBS y se agregaron 100 μ L de anticuerpo secundario (suero de pacientes con absceso hepático amebiano dilución 1:1) se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Terminado el tiempo de incubación se retiró el anticuerpo primario y la membrana fue lavada rápidamente con TBST (Buffer Tris Salino con Tween 20), posteriormente se hicieron 2 lavados con TBST con agitación por 10 minutos, cada uno.

4.2.8.3 Incubación con Anticuerpo Secundario

Se retiró el TBST y se agregaron 50 ml de leche descremada al 1 % en PBS y 50 μ l del anticuerpo secundario (anti-humano acoplado a fosfatasa alcalina, dilución 1:1000), se incubó una hora en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el anticuerpo

secundario y la membrana fue lavada rápidamente con TBST, posteriormente se hicieron 2 lavados con TBST en agitación por 10 minutos, cada uno.

4.2.8.4 Desarrollo de Color

Una vez que se concluyó con el lavado con TBST, la membrana se sumergió en una solución colorante de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/Nitro azul de tetrazolio (BCIP/NBT), el cual se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente, para observar el desarrollo de color azul, en los puntos donde hubo inmunorreacción.

4.2.9 Disposición de Residuos

Se manejaron residuos tanto químicos como biológicos que se dispusieron en diversos contenedores; como A, B, C, contenedores rojo y amarillo, etc. que se encuentran estratégicamente ubicados en el laboratorio de uso. Al final, el material biológico restante y físico reusable fue esterilizado mediante calor húmedo.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Obtención de Cultivos Amebianos

5.1.1 Cepa No Virulenta

La cepa no virulenta pertenece a la cepa HM1:IMSS que se ha mantenido por varios años bajo cultivo *in vitro* sin agregar factores que activen la virulencia. La cepa se obtuvo inoculando 0.3 mL de trofozoítos en tubos de ensayo que contenía 5 mL de medio PEHPS e incubando a 37 °C con 5 % CO₂. Para obtener la pastilla de amibas, los trofozoítos fueron centrifugados.



Figura 5.1

Pastilla de Amibas de la

Cepa No Virulenta. La pastilla de amibas se observa en el fondo del tubo y es de color blanco opalescente.

5.1.2 Cepa Virulenta

La activación de la virulencia de *E. histolytica* se obtuvo mediante la formación de absceso hepático amebiano; para obtener el absceso amebiano fueron inoculados 10^6 trofozoítos de *E. histolytica* en el hígado de hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), macho recién destetado. Después de 7 días de la inoculación, el hígado del hámster fue observado en un estereoscopio. El hígado presentó formación de abscesos hepáticos amebianos, los cuales tenían una forma redondeada y un color blanco (Figura 5.2). Los trofozoítos de los abscesos hepáticos fueron cultivados a 37 °C con 5 % de CO₂ en tubos de ensayo con 5 mL de medio PEHPS con antibiótico para obtener un cultivo axénico virulento.

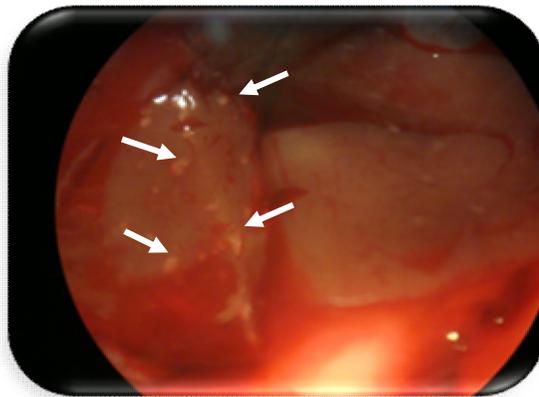


Figura 5.2 Hígado de Hámster con Abscesos Amebianos. Después de la inoculación con trofozoítos de *E. histolytica*, el hígado de hámster presenta abscesos hepáticos amebianos producidos por las amibas, en la figura estos abscesos se encuentran señalados con flechas.

5.1.3 Curva de crecimiento de ambas cepas

Se hizo una curva de crecimiento para cada cepa; para saber en cuanto tiempo alcanzan su mayor crecimiento, con la mejor viabilidad para extraer RNA de buena calidad de ambas cepas. Para obtener las curvas de crecimiento de las cepas de *E. histolytica* se partió de un inóculo que contenía 27, 500 amibas. Las amibas fueron contadas en una cámara de Neubauer. Los resultados del conteo de amibas se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Conteo de trofozoítos durante 5 días.

Horas	Cepa	# de Amibas/mL
24	Cepa Virulenta	27, 500
	Cepa No Virulenta	27, 500
48	Cepa Virulenta	28, 750
	Cepa No Virulenta	30,416
72	Cepa Virulenta	122, 916
	Cepa No Virulenta	118, 333
96	Cepa Virulenta	252,916
	Cepa No Virulenta	195, 832
120	Cepa Virulenta	212, 083
	Cepa No Virulenta	161, 250
144	Cepa Virulenta	199, 166
	Cepa No Virulenta	149583

Para obtener las gráficas de las Curvas de Crecimiento, los datos obtenidos en el conteo de amibas durante una semana fueron graficados y de esta manera se observó que la fase estacionaria se alcanzó a las 72 horas.

5.1.3.1 Gráficas de Curvas de Crecimiento

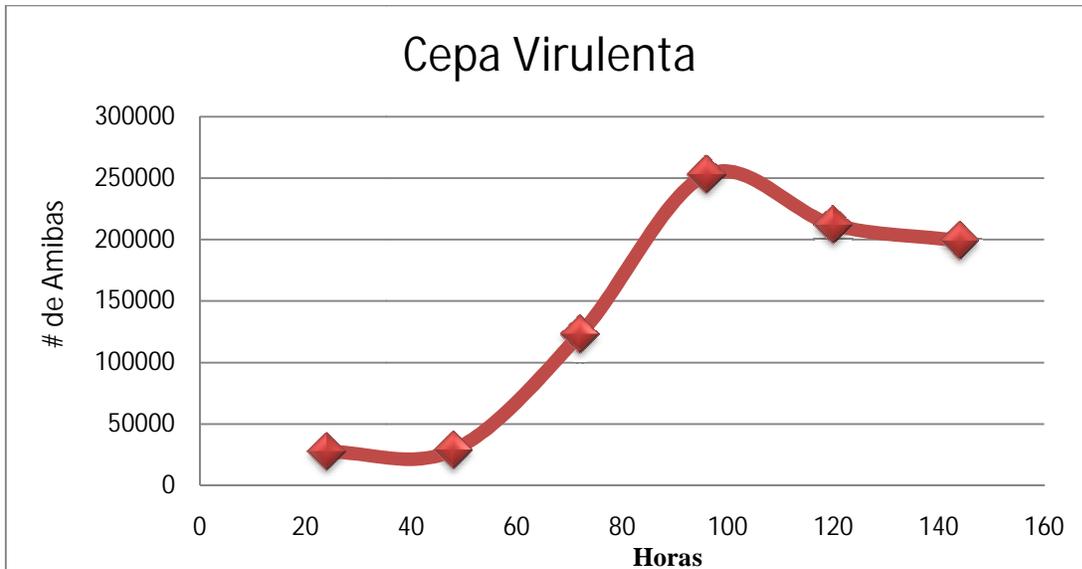


Figura 5.3 Curva de Crecimiento Cepa Virulenta

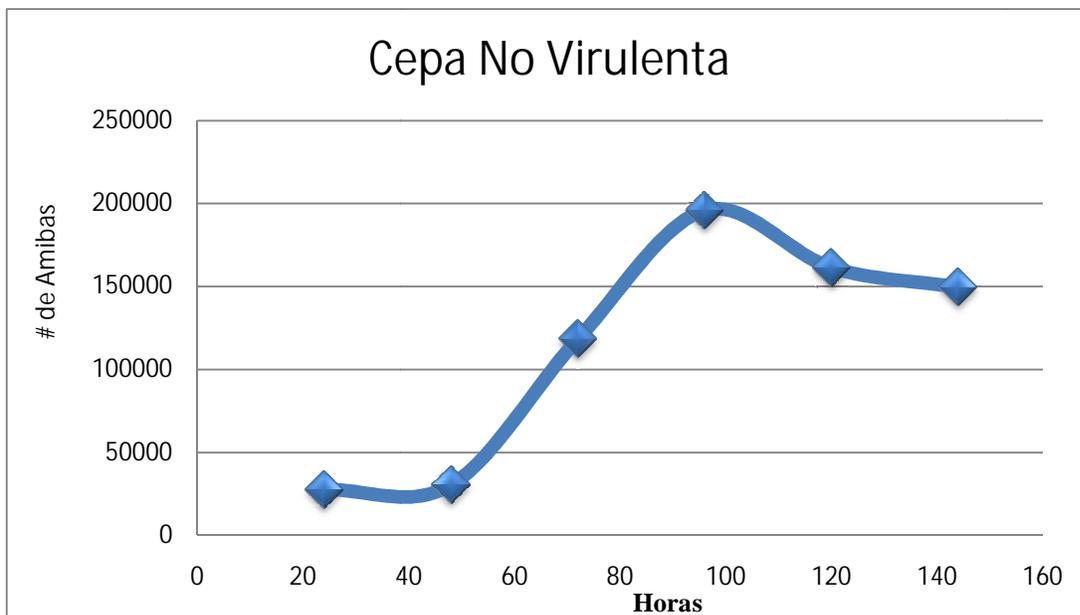


Figura 5.4 Curva de Crecimiento Cepa No Virulenta

5.2 Extracción de RNA

5.2.1 Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA se realizó en el biofotómetro.

Tabla 5.2 Cuantificación RNA cepa virulenta

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
		260/280
A	21.5	1.91
C	22.7	1.81

Tabla 5.3 Cuantificación RNA cepa no virulenta

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
		260/280
B	35.7	1.87
D	44.8	1.84

Las Tablas 5.2 y 5.3 nos muestran que los RNA tanto de la cepa virulenta como de la cepa no virulenta tienen una buena pureza, porque presentan una relación de absorbancias cercana a 2. Las muestras A y C son duplicados de la cepa virulenta, las muestras B y D son duplicados de la cepa no virulenta.

5.2.2 Gel de Agarosa al 1 %

En las cuatro muestras se presentan las dos bandas características del RNA ribosomal; sin embargo, observando el gel de la Figura 5.5 y analizando la relación de absorbancias de las muestras se cree, que las muestras están contaminadas con sales de los reactivos de extracción.

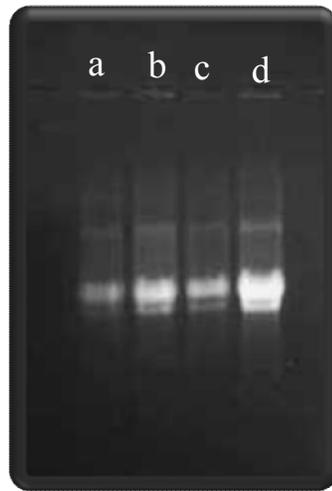


Figura 5.5 Identificación de RNA. En esta imagen se observan las bandas de la extracción de RNA, las muestras a y c son duplicados que pertenecen a la cepa virulenta y las muestras b y d son duplicados que pertenecen a la cepa no virulenta.

5.2.3 Identificación del Gen Cisteín-Proteinasa 5

Se realizó una RT-PCR a las muestras de RNA obtenidos de la cepa virulenta y de la cepa no virulenta, para observar el gen Cisteín-Proteinasa 5 a 376 pb en un gel de agarosa al 1 %, este gen está reportado en la literatura como un gen que sobreexpresan únicamente las cepas virulentas de *E. histolytica*. En el presente trabajo se encontró efectivamente el gen CP5 expresado solamente en la cepa virulenta de *E. histolytica*.

5.2.3.1 Cuantificación de cDNA

Cuando se realiza una retrotranscripción el resultado es un DNA complementario, el cual puede ser utilizado para realizar una PCR, en este caso la PCR se realizó para identificar un gen específico de las cepas virulentas de *E. histolytica*. Antes de realizar la PCR se cuantificó el cDNA para poder calcular la cantidad que se usó en la PCR y además conocer la calidad de dicho cDNA.

Tabla 5.4 Cuantificación cDNA cepa virulenta

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
		$\frac{260}{280}$
A	69.7	1.79
C	41.6	1.80

Tabla 5.5 Cuantificación cDNA cepa no virulenta

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
		$\frac{260}{280}$
B	54.8	1.82
D	66.2	1.84

Las Tablas 5.4 y 5.5 muestran la cuantificación de DNA complementario y la relación 260/280 de absorbancias. Las muestras A y C son duplicados para la cepa virulenta; B y D son muestras duplicadas para la cepa no virulenta; para el DNA la relación óptima de absorbancia 260/280 se debe encontrar en el rango de 1.65 a 1.9. Se puede concluir que el cDNA obtenido es puro y de buena calidad. Por lo tanto se procedió a realizar la PCR para el gen CP5 y después se observaron los resultados en un gel de agarosa, el cual se muestra en la Figura 5.6.

5.2.3.2 Gel de Agarosa al 1 % de la PCR para CP5

En la Figura 5.6 se observan dos bandas cercanas a 400 pb (carril a y b del gel), las cuales representa la amplificación del gen CP5 que tiene un tamaño de 376 pb y que solo lo expresan las cepas virulentas de *E. histolytica*.

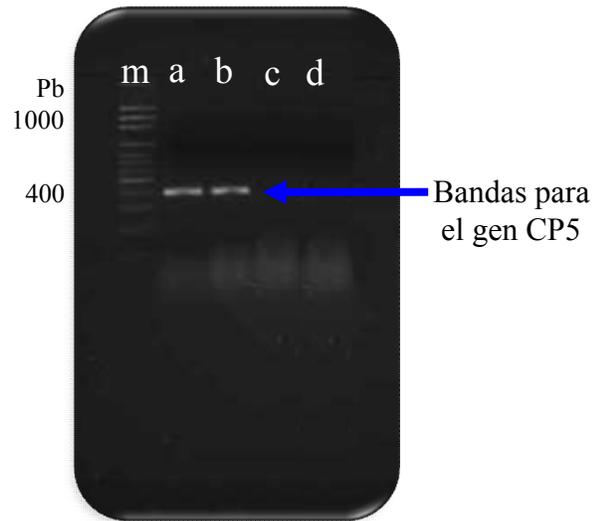


Figura 5.6 Identificación del Gen CP5 en RNA de la Cepa Virulenta y No Virulenta de *E. histolytica*. El carril m es el marcador de peso molecular escalera de 1000 pb. Las muestras de a y b son producto de la PCR de la cepa virulenta, Las muestras c y d son producto de la PCR de la cepa no virulenta, la cuales no presentan la banda porque esta cepa no expresa dicho gen. Las bandas tenues que se ven al final de los cuatro carriles son restos de primers para el gen CP5.

5.3 Cuantificación de cDNA para realizar la hibridación

Para realizar la hibridación se usó del mismo cDNA que se utilizó para hacer la identificación del gen CP5, la muestra utilizada fue la D porque hay mayor concentración de cDNA 66.2 $\mu\text{g/mL}$ con una relación de absorbancia 260/280 de 1.84, lo que indica que la calidad de la muestra D es ligeramente mejor que la muestra B.

5.4 Extracción de RNAm diferenciales

Los RNA mensajeros diferenciales son los que se obtuvieron después de realizar la hibridación entre el RNAm de la cepa virulenta con cDNA de la cepa no virulenta. Durante la hibridación los RNAm sobreexpresados en la cepa virulenta quedaron libres y estos fueron purificados con una extracción de RNA mediante la técnica trizol. Para conocer la calidad de los RNAm diferenciales se realizó una cuantificación en el biofotómetro, no se realizó un gel de agarosa para observar las bandas características del RNA debido a que la muestra obtenida era poca, y toda se utilizó para realizar la ligación al vector SurfZap.

5.4.1 Cuantificación de RNAm diferenciales

Tabla 5.6 Cuantificación de RNAm diferenciales

<i>Muestra</i>	<i>Concentración $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>Absorbancia</i>
		260/280
A	9.1	1.88
B	4.8	1.80

Se observa en la tabla 5.6 que la calidad de las muestras A y B que son muestras duplicadas de los RNAm diferenciales obtenidos es buena, a pesar de que la concentración es pequeña, ya que la relación de absorbancias es cercana a 2 unidades.

5.4.2 Identificación del gen CP5 en RNAm diferenciales

La identificación del gen CP5 se realizó para saber si realmente se estaba aislando RNAm diferencial de la cepa virulenta, ya que este gen como se había mencionado anteriormente está sobreexpresado en aquellas cepas que tienen la capacidad de ocasionar una amebiasis extraintestinal. Con el RNAm diferencial obtenido de la hibridación se hizo una RT-PCR para el gen CP5, la amplificación del gen se observó en un gel de agarosa al 1 %. En este gel se observa una banda entre 300 y 400 pb, por lo tanto se presume que el gen que se amplificó sí es el gen CP5 ya que tiene un tamaño de 376 pb.



Figura 5.7 Identificación del Gen CP5 en RNAm Diferenciales. El carril m es el marcador de peso molecular escalera de 1000 pb. El carril a es la muestra de RNAm diferenciales aislados de la hibridación de RNAm-cDNA.

5.5 Cuantificación de DNA-Adaptadores

El DNA unido a los adaptadores proviene de los RNAm diferenciales. Los RNAm diferenciales primero fueron unidos al adaptador 3' mediante oligos d(T) afines a la cola poli A de los RNAm y después fueron digeridos con la enzima Spe I para dejar extremos cohesivos para la unión al vector; una vez unidos al adaptador 3' fueron sometidos a una retrotranscripción y en seguida a una síntesis de la segunda cadena para formar DNA de doble cadena, el cual fue unido al adaptador 5' que ya tenía los extremos cohesivos para posteriormente ligar los DNA-adaptadores al vector SurfZAP.

Tabla 5.7 Cuantificación de DNA-Adaptadores

<i>Muestra</i>	<i>Concentración $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>Absorbancia</i>
		<i>260/280</i>
DNA-Adaptadores	4.1	2.04

La calidad de los DNA unidos a los adaptadores mostrada en la Tabla 5.7 está por debajo del estándar; sin embargo, la muestra cumplió con los requisitos mínimos para continuar con la siguiente fase experimental.

5.6 Crecimiento de bacterias hospedadoras

Las bacterias hospedadoras se usaron para clonar los fagos λ . Antes de ser infectadas por los fagos, se crecieron en medio LB, una vez que se logró obtener crecimiento, éstas se sembraron en agar con el correspondiente antibiótico y en estría en tres campos para aislar una colonia. La Figura 5.8 muestra el crecimiento de colonias de la bacteria *E. coli* cepa VCS 257 en agar LB sin antibiótico.

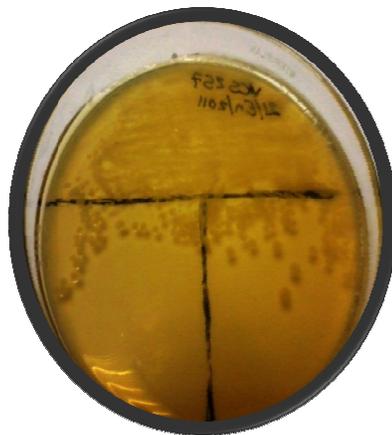


Figura 5.8 Bacteria *E. coli* VCS 257



Figura 5.9 Bacteria *E. coli* XL1-Blue Sembrada en Presencia de Tetraciclina. La Figura 5.9 Presenta crecimiento de colonias de la bacteria *E. coli* cepa XL1-Blue MRF' en agar LB con tetraciclina, esta cepa tiene el gen de resistencia a la tetraciclina.

5.7 Titulación de la biblioteca

La biblioteca genómica sustractiva fue titulada en placas de agar NZY. Para poder observar la titulación, los fagos que contienen el vector surfZAP infectaron bacterias XL1-Blue MRF' a 37 °C, después las bacterias fueron mezcladas con agar NZY suave para que formen un césped bacteriano en agar NZY duro, donde se pueden observar las colonias de bacterias que son lisadas por los fagos. En la Figura 5.10 se observa que hubo una baja eficiencia de titulación, ya que la placa Petri solo muestra 4 halos de lisis. Los halos de lisis aparecen como círculos claros en el césped bacteriano.



Figura 5.10 Titulación de la Biblioteca Sustractiva

5.7.1 Propagación de la clona 2 de la biblioteca sustractiva

Debido a la baja eficiencia de la titulación de la biblioteca sustractiva, se hizo una propagación de los 4 halos de lisis que se obtuvieron. Para llevar a cabo la propagación primero se aislaron en buffer SM los 4 halos de lisis, después con los fagos que se aislaron de los halos de lisis se infectaron otra vez bacterias *E.coli* XL1-Blue y se volvió a repetir la titulación, la única clona que logro propagarse fue la clona 2. En la Figura 5.11 se observan los halos de lisis bien definidos de la clona 2 y con una alta eficiencia de titulación.



Figura 5.11 Propagación de la Clona 2.

5.8 Extracción de DNA plasmídico

Debido a los problemas que se presentaron con la baja titulación de la biblioteca sustractiva y la nula propagación del 75 % de las clonas obtenidas, se tomó como alternativa, realizar una extracción de DNA plasmídico a las bacterias que se infectaron con los fagos que se aislaron de los halos de lisis de la primer titulación.

El DNA plasmídico fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y cuantificado en el biofotómetro para poder conocer la calidad de la extracción del DNA plasmídico.

5.8.1 Cuantificación de DNA plasmídico

Tabla 5.8 Cuantificación de DNA plasmídico

<i>Clona</i>	<i>Concentración $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>Absorbancia</i>
		<i>260/280</i>
1	0.7	1.53
2	1.9	1.58
3	2.6	1.55
4	0.6	0.97

En la Tabla 5.8 se observa que la concentración de DNA plasmídico es pequeña y de baja calidad, ya que la relación de absorbancia se encuentra por debajo del rango óptimo. A pesar de esto, la muestra se utilizó para realizar los siguientes experimentos.

5.8.2 Identificación del DNA plasmídico

En la Figura 5.12 se muestra que está presente una banda de DNA plasmídico arriba de 8000 pb en las 4 clonas. El DNA se observa contaminado por sales de los buffers utilizados en la extracción de DNA plasmídico.

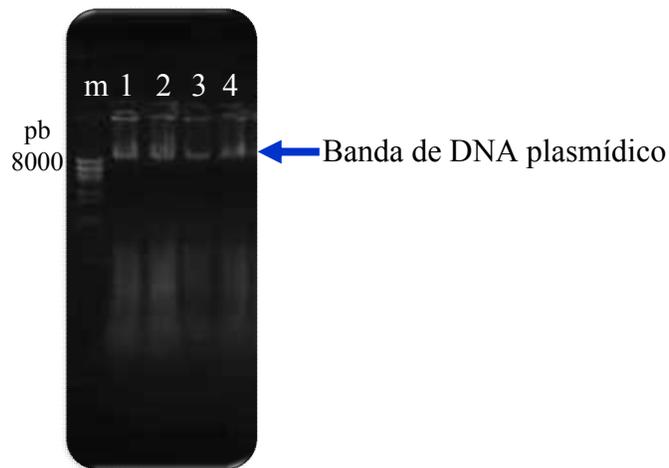


Figura 5.12 Identificación del DNA Plasmídico.

5.9 Amplificación de genes de interés

Para poder amplificar los genes de interés de las 4 clonas obtenidas, se realizó una PCR con los primers T7 forward y Not I 5', dichos primer flanquean la zona donde se encuentran las secuencias de los genes diferenciales que fueron aislados de la cepa virulenta, para saber si los primers amplificaron los genes de interés se corrió un gel de agarosa al 1 %. En la Figura 5.13 se aprecia que la clona 2 presenta una banda a la altura de 700 pb, la cual se presume que es la secuencia del gen de interés. Las bandas que se ven al final del gel de agarosa son primers.

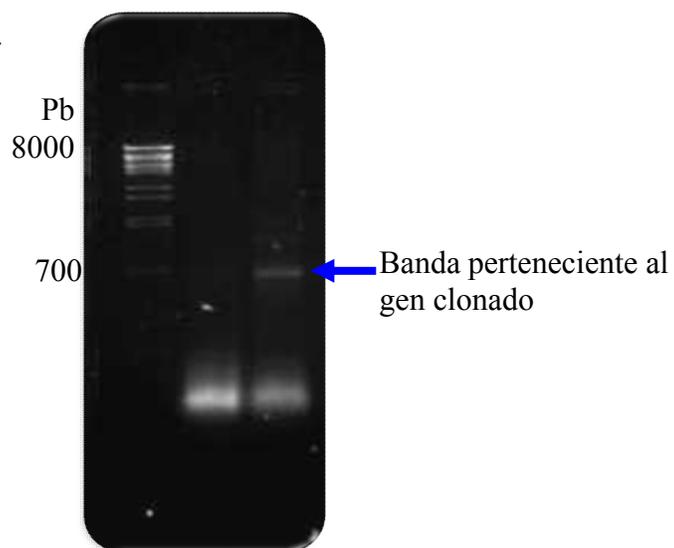


Figura 5.13 Genes Diferenciales Amplificados de *E. histolytica* Virulenta.

5.10 Cuantificación de Proteínas

Tabla 5.9 Densidad Óptica del Estándar 1 mg/mL

Estándar 1 mg/mL	DO
0	0.173
1	0.246
2	0.307
4	0.420
6	0.495
8	0.625
10	0.706
12	0.854

Tabla 5.10 Densidad Óptica del Estándar 2 mg/mL

Estándar 2 mg/mL	DO
0	0.194
1	0.359
2	0.489
4	0.709
6	0.894
8	1.191
10	1.270
12	1.396

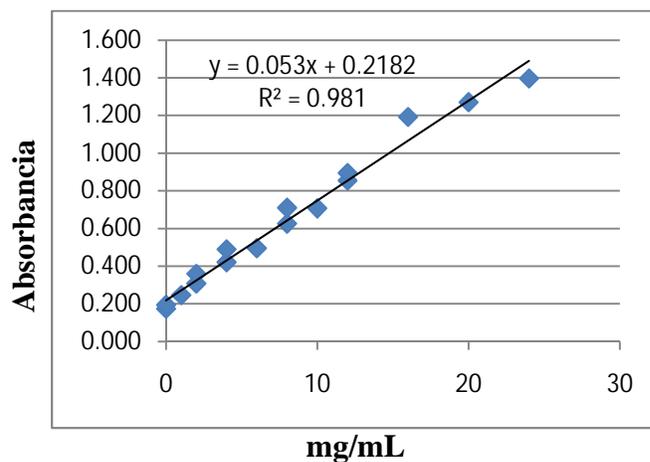


Figura 5.14 Gráfica de la Curva de Calibración para Cuantificación de Proteínas.

La gráfica sirvió para obtener la ecuación de la recta que es $y=0.053x + 0.2182$ con esta ecuación se realizan los cálculos para obtener la concentración de las muestras.

Tabla 5.11 Cuantificación de Proteínas

	Clona 2	Clona 5	Amibas No Virulentas	Amibas Virulentas
Absorbancia 1	1.954	2.106	1.529	1.177
Absorbancia 2	1.978	2.12	1.53	1.196
Promedio	1.966	2.113	1.530	1.187
Dilución	1.000	1.000	1.000	1.000
Microgramos	32.977	35.751	24.742	18.270
Microlitros	5.000	5.000	5.000	5.000
mg/mL	6.595	7.150	4.948	3.654

En la Tabla 5.11 se observa que en todas las muestras hay proteínas, pero hay más cantidad de proteínas en los extractos de las clonas de los fagos que en los extractos de las amibas.

5.11 Tamizaje Inmunológico

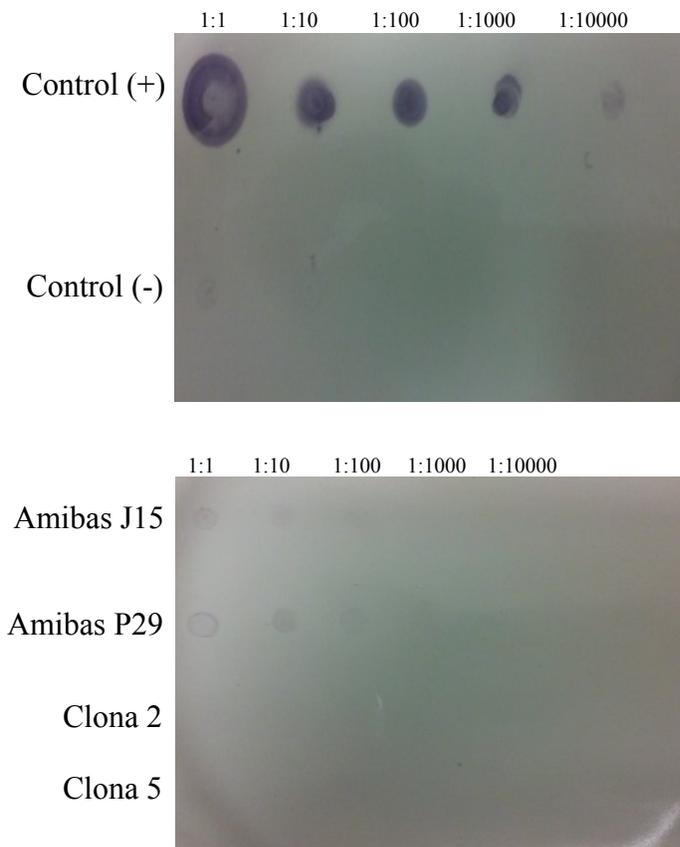


Figura 5.15 Tamizaje Inmunológico

El tamizaje inmunológico se realizó utilizando la técnica dot blot, como lo muestra la Figura 5.15, en la cual podemos observar que el control negativo muestra un ligero color azul, esto se debe a la contaminación de fondo ocasionado por el anticuerpo secundario o por la solución de tinción, los extractos de amibas tanto de J15 (Cepa no virulenta) como de P29 (Cepa virulenta) presentan inmunorreacción con el suero de pacientes con absceso hepático amebiano, pero los extractos de las clonas 2 y 5 pertenecientes a los fagos no presentan inmunorreacción con el suero de pacientes.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

E. histolytica es definido como un parásito patógeno capaz de ocasionar diferentes tipos de amebiasis (Walzer P., Genta R., 1989 y Martínez-Palomo A., 1989).

Muchos investigadores suelen usar los términos virulencia y patogenicidad como sinónimos. Durante el desarrollo de la presente investigación se utilizó el término virulencia como la capacidad relativa que tiene un organismo para causar la enfermedad. (Edman U. et al., 1987; Garfinkel LI. Et. al., 1989 y Tannich E. et al., 1989).

Por muchas décadas los expertos en amebiasis han tratado de encontrar explicación al comportamiento inusual de *E. histolytica*, ya que con frecuencia actúa como comensal y menos habitualmente como invasor. Para dar explicación a ello Martínez Palomo en 1982 propuso tres hipótesis diferentes:

- 1) *E. histolytica* es una sola especie que siempre produce ulceración intestinal; las lesiones pueden dar lugar o no a manifestaciones clínicas.
- 2) *E. histolytica* comprende dos especies diferentes de amibas semejantes morfológicamente, de las cuales solo una es patógena.
- 3) La especie *E. histolytica* está compuesta por un número desconocido de cepas diferentes que pueden actuar, ya sea como comensales en la luz del intestino, o bien como forma patógena, que produce ulceración de la mucosa del intestino y dan lugar a síntomas.

Actualmente los investigadores expertos en amebiasis trabajan solo sobre la segunda y tercer teoría propuestas por Martínez Palomo. Existen muchas controversias

acerca de cual teoría es la verdadera, ya que hay investigaciones que se contraponen; por ejemplo Stanley, Jr., et al. 1991; Clark C.G., y L. S. Daimont también en 1991 con sus investigaciones apoyan la teoría de que existen dos especies diferentes^{72,73}, al igual que C. Sánchez y col. en el 2002. Por otro lado Lushbaugh, et al. 1978, Crisóstomo M., et al. 2006 y Balderas I. et al. 2007 apoyan a través de sus investigaciones la teoría de que solo existen diferentes cepas de *E. histolytica*.

El desarrollo de métodos *in vitro* de cultivo axénicos de *E. histolytica* por Diamond⁶⁶, ha permitido el estudio de muchos aspectos de la virulencia de amibas en ausencia de otros microorganismos con los que los trofozoítos se asocian. Se sabe que los trofozoítos aislados y cultivados axénicamente varían en su grado de virulencia. Varios investigadores han indicado que la virulencia amebiana disminuye en el cultivo axénico prolongado y que aumenta cuando se hacen pasajes de trofozoítos en hígado de hámster, Phillips B. P. A.⁷⁴, Mattern, C.F.T.⁷⁵, entre otros afirman lo mencionado anteriormente.

Lushbaugh y col. en 1978 conforme hicieron varios pasajes de *E. histolytica* por hígado de hámster alternando con cultivos axénicos, observaron que había un aumento de la virulencia. Dentro del presente proyecto se comprobó lo que dice Lushbaugh, realizando pasajes de trofozoítos en hígado de hámster en el laboratorio, ya que la virulencia de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* aumenta conforme se han hecho dichos pasajes en hígado de hámster, se confirmó que al inocular en hígado de hámsters una cepa cultivada axénicamente por mucho tiempo, ésta no ocasiona abscesos amebianos hepáticos. El genotipo de los parásitos influye en los resultados de las infecciones, de acuerdo a lo reportado con Ibne Karim, et al. en el 2007.

Las cisteín proteinasas participan en la degradación de la mucina del colon y en la degradación de la matriz extracelular. La ausencia o bajo nivel de expresión de las cisteín

proteinasas, se traduce en reducción de la actividad fagocítica, reducción de la inflamación intestinal, y reducción de la formación de absceso hepático. Los datos reportados acerca de las cisteín proteinasas se corroboran con varias investigaciones a lo largo de los años, entre ellas tenemos las investigaciones de Que and Reed en el 2000; Bruchhaus et al en el 2003⁷⁶, Lidell M. E. y col. en el 2006, entre otras. Estas investigaciones confirman que las cisteín proteinasas están sobreexpresadas en las cepas virulentas de *E. histolytica*. Debido a los resultados reportados de las cisteín proteinasas nosotros utilizamos primers para flanquear el gen cisteín proteínasa 5 (CP5), esto se hizo con el afán de identificar dicho gen en la cepa virulenta; para confirmar si realmente con pasajes de trofozoítos por hígado de hámster se activa la virulencia. La identificación del gen CP5 se realizó con una RT-PCR; para posteriormente observar la banda característica en un gel de agarosa al 1 %, solamente identificamos la banda para el gen CP5 en la cepa virulenta de *E. histolytica*; por lo tanto estos resultados se unen a la confirmación de que las cisteín proteinasas están sobreexpresadas únicamente en cepas virulentas.

El desplegamiento de fagos es una técnica molecular por la cual se expresan proteínas de interés en la superficie de los fagos, es por esto que los fagos se utilizan para ver interacciones de proteínas y producir anticuerpos recombinantes, esto fue reportado por Willats WG en el 2002; pero es de gran importancia mencionar que existen desventajas al utilizar esta técnica molecular debido a que el tamaño del DNA de interés que se quiere clonar es una limitante, ya que la capacidad de la cápside del fago impide el empaquetamiento de genes que sean excesivamente largos; además los genomas demasiado pequeños tampoco son empaquetados en la cápside, ya que esta admite no sólo un tamaño máximo, sino también un tamaño mínimo⁷⁷.

Como ya se mencionó anteriormente los fagos tienen 2 ciclos de vida, el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. Aun no se comprende completamente que factores arrastran al sistema hacia la lisis o la lisogenia, pero las investigaciones que se han hecho nos permiten elaborar un escenario posible, en el cual, se cree que la proteína CII, es quien toma la decisión. Ya que si CII es muy activa, el fago infectante adopta el ciclo lisogénico; en caso contrario, crece en forma lítica. Una vez que se ha tomado la decisión, los demás pasos del crecimiento vienen determinados por uno u otro de los programas de desarrollo de λ .

Son los factores ambientales quienes, a su vez, determinan la actividad de CII y es de suma importancia mencionar que esta proteína es inestable, debido a que puede ser atacada y destruida por proteasas bacterianas, cuya actividad se ve influenciada por factores ambientales. El crecimiento en un medio rico, por ejemplo, activa a las proteasas, mientras que la privación tiene el efecto opuesto y en consecuencia, λ adopta el ciclo lisogénico con más frecuencia a células en inanición. Esto tiene sentido, ya que las células en inanición son deficitarias en los componentes necesarios para que el crecimiento lítico sea eficaz⁷⁸.

Alguno de los problemas de empaquetamiento mencionados anteriormente, pudo ser la causa por la cual la biblioteca genómica construida en el presente proyecto presentó una baja eficiencia de empaquetamiento.

El tamizaje inmunológico con el suero de pacientes con absceso hepático amebiano resultó negativo, esto puede deberse a que las proteínas diferenciales obtenidas de los fagos no son inmunogénicamente activas contra el suero de pacientes infectados, el resultado negativo también podría deberse a que las proteínas no están correctamente plegadas.

A pesar de todos los avances en investigación, los factores que determinan si una persona infectada con *E. histolytica* desarrolla la enfermedad siguen siendo tema de investigación vigente.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Se obtuvo la cepa virulenta de *E. histolytica* mediante pasaje de trofozoítos por hígado de hámster, la virulencia de la cepa se confirmó mediante una RT-PCR para el gen Cisteín-proteínasa 5, que es un gen característico de cepas virulentas de *E. histolytica*.

Tanto la cepa no virulenta como la virulenta alcanzan su fase estacionaria de crecimiento *in vitro* al mismo tiempo, siempre y cuando las condiciones de incubación sean iguales.

La cepa virulenta de *E. histolytica* expresa RNAm diferenciales en comparación con la cepa no virulenta, estos se aislaron mediante extracción de RNA con Trizol y se confirmó la presencia de los RNAm diferenciales a través de una RT-PCR para el gen Cisteín-proteínasa 5.

Se logró obtener una biblioteca sustractiva con una eficiencia de empaquetamiento sumamente baja.

El tamizaje inmunológico de las proteínas de los fagos con el suero de los pacientes con absceso hepático amebiano, resultó negativo.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Debido a la investigación de los mecanismos fundamentales por los que *Entamoeba histolytica* causa la enfermedad y la respuesta humana inmune a la infección amebiana es necesario evaluar la viabilidad real de una vacuna anti-amebiana.

La metodología propuesta en este proyecto presentó complicaciones, debido a todo lo anterior, resulta claro que el diseño de la metodología para obtener genes diferenciales de *E. histolytica* virulenta, que expresen proteínas y que alguna de éstas pueda utilizarse para la fabricación de una vacuna, es bastante complicado. Es por eso que se propone probar otras metodologías que están más ampliamente estudiadas como el differential display o la hibridación de microarreglos con las cuales también se pueden identificar los genes sobreexpresados de *E. histolytica* virulenta y después estos genes podrían ser aislados y clonados en *E. coli* utilizando un kit de clonación para facilitar la obtención de la proteína, la cual posteriormente deberá ser purificada mediante western blot o con columnas de afinidad, para al final realizar el tamizaje inmunológico.

Los proyectos en los que no se obtiene el o los resultados deseados, dan la pauta para crear nuevas estrategias de investigación, con las que se generarán nuevos conocimientos; en el caso del presente proyecto las nuevas estrategias deberán estar enfocadas a producir conocimientos sobre los mecanismos moleculares del ciclo biológico del parásito y los de la patogenicidad de la enfermedad, una vez que se obtenga información más específica acerca de *E. histolytica*, es entonces cuando se facilitará la obtención de una vacuna antiamebiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walzer P. y Genta R., "Parasitic infections in the compromised host," editorial Marcel Dekker, INC., New York, Estados Unidos de América, p. 385-398. (1989).
2. Martinez-Palomo A., "Amebiasis," primera edición, editorial medica panamericana, D.F., México, p. 17-32. (1989).
3. Boletín Epidemiológico, organización panamericana de la salud, Volumen 18, no 1, marzo 1997, disponible en: <http://www.paho.org/spanish/sha/epibul_95-98/bs971ami.htm> (accesada el 28 de septiembre de 2009).
4. Samuel L. Stanley, Jr., "Progress towards development of a vaccine for Amebiasis," *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.10, No 4: 637-649. (1997).
5. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. Advances in research on virulence factors of *Entamoeba histolytica*. 24(6):457-60. (2006).
6. Dey I., and Chadee K., "Prostaglandin E2 Produced by *Entamoeba histolytica* Binds to EP4 Receptors and Stimulates Interleukin-8 Production in Human Colonic Cells," *Infect. Immun.* 76, no. 11: 5158-5163. (2008).
7. [Zhang Z.](#), [Wang L.](#), [Seydel K.](#), [Li E.](#), [Ankri S.](#), [Mirelman D.](#), [Stanley S. Jr.](#), "Entamoeba histolytica cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis," *Molecular Microbiology* 37, no. 3: 542-548. (2000).
8. Petri W. Jr., Smith R., Schlesinger P., Murphy C. y Ravdin J., "Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*," *The Journal of Clinical Investigation* 80, no. 5: 1238-1244. (1987).

9. Petri Jr., Haque R. y Mann BJ., “The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*,” *Annu Rev Microbiol*, 56:39-64. (2002).
10. Ralston K. y Petri W. Jr., “Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*” *Trends in Parasitology*. Volumen 27, 6: 254-263. (2011).
11. Marion S. y Guillén N., “Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*,” *International Journal for Parasitology*, 36, no. 2: 131-139. (2006).
12. Huston C., Boettner D., Miller-Sims V. y Petri WA Jr., “Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*” *Infection and Immunity*, 71, no. 2: 964–972. (2003).
13. Secretaría de Salud, “Cerca de 50 millones de personas en el mundo presentan amebiasis,” *México Sano*, año 2, núm. 9, México D.F., julio de 2009.
14. Coria-Lorenzo J., Menjívar-Rubio A., Gabaldo-Luí R., Yepes-Mulia L., Coronell-Rodríguez W., Calva-Mercado J., y Dominguez-Sosa F., “Amebiasis intestinal,” *Práctica Médica Efectiva*, CENIDS. Instituto Nacional de Salud Pública, 3, no 3 (2001). disponible en <<http://bvs.insp.mx/articulos/1/13/v3n3.pdf>> (accesada el 27 de septiembre de 2009)
15. Ramos F., Morán P., Gonzáles E., García G., Ramiro M., Gómez A., García M., Melendro E., Valadez A. y Ximénez C., “High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infectio in a rural mexican community,” *Am J Trop Med Hyg* 73, no. 1: 87-91. (2005).

16. World Health Organization. World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis. Wkly. Epidemiol. Rec. 72:97-99. (1997).
17. Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J. y Harkness J., "Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species," *Clinical Microbiology Reviews* 20, no. 3: 511–532. (2007).
18. Leder K, Weller P F. "Extraintestinal *Entamoeba histolytica* amebiasis". (2010). Disponible en: http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=parasite/8435&selectedTitle=1%7E11&source=search_result# (accesada el 21 de noviembre 2011).
19. Delgadillo AT. "Enfermedades hepáticas infecciosas". Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador. GH continuada, 5 (5): 201-207. (2006). Disponible en: <http://www.ghcontinuada.com/contenidos/pdf/v5n5a353pdf001.pdf> (accesada el 21 de noviembre de 2011).
20. Guía práctica clínica GPC. Diagnóstico y tratamiento del absceso hepático amebiano no complicado. Evidencias y recomendaciones. Catálogo maestro de guías prácticas clínicas. IMSS-282-10. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/432_GPC_Absceso_hepatico/GER_Absceso_hepatico_amebiano.pdf (accesada el 21 de noviembre de 2011).
21. Fauci A., Braunwald E., Isselbacher K., [et.al], "Harrison Principios de Medicina Interna". 14 Edición. España: McGraw-Hill Interamericana, 1342, 1347-1351p.il. (1998).

22. Leventhal R., Cheadle R., "Parasitología Medica". 3ra Edición. México: McGraw-Hill Interamericana, 77-80, 147-149, 159, 106. (1992).
23. Abd Alla M.D., White G.L., Rogers T.B., Cary M.E., Carey D.W. y Ravdin J.I., "Adherence-Inhibitory Intestinal Immunoglobulin A Antibody Response in Baboons Elicited by Use of a Synthetic Intranasal Lectin-Based Amebiasis Subunit Vaccine". *Infection and Immunity*, Vol. 75, No. 8: 3812–3822. (2007).
24. Petri W.A.Jr., Haque R., y Mann J.B., "The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*". *Annu. Rev. Microbiol.* 56:39–64. (2002).
25. Carpentieri A., Ratner D.M., Ghosh K.S., Banerjee S., Bushkin G.G., Cui J., Lubrano M., Steffen M., Costello C.E., O'Keefe B., Robbins P.W. y Samuelson J., "The Antiretroviral Lectin Cyanovirin-N Targets Well-Known and Novel Targets on the Surface of *Entamoeba histolytica* Trophozoites" *Eukaryotic Cell*, Vol. 9, No. 11: 1661-1668. (2010).
26. Singh S., Malik B.K. y Sharma D.K., "Choke point analysis of metabolic pathways in *E.histolytica*: A computational approach for drug target identification" publicado en línea: www.bioinformatics.net Bioinformatics, an open access forum © 2007 Biomedical Informatics Publishing Group. (2007).
27. Mirelman D., Bracha R. y Sargeant P.G., "*Entamoeba histolytica*: virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites". *Exp Parasitol.* 57(2):172-7. (1984).
28. Serrano J., Gutiérrez M., Mejía R., Galindo S., Tsutsumi V. y Shibayama M., "Effect of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes on *Entamoeba histolytica* virulence" *Can J Microbiol.* 56 (12): 987-95. (2010).

29. Olivos A., Saavedra E., Ramos E, et al., “Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*”. *Infect Genet Evol.* Vol. 9 (6): 1033-7. (2009).
30. Olivos A., Saavedra E., Nequiz M., y Pérez R., Artículo de Revisión “Amebiasis: mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*” *Revista de la facultad de medicina de la UNAM* Vol. 54, N° 2: 10-20. (2001).
31. Sambrook J., Fritsch E. Y Maniatis T., “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (2000).
32. Lodish, et al., “Biología Celular y Molecular” *Editorial Medica Panamericana*, 5^a Edición, ISBN-13: 84-7903-913-2, Argentina. Páginas 364-366. (2005).
33. Diatchenko L., Lau Y., Campell A., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Guaskaya N., Sverdlov E. y Siebert P., “Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 12: 6025-6030. (1996).
34. Santiago V., COMBINATORIA MOLECULAR, ISBN 959-235-021-3, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 2004, Elfos Scientiae, 2004, La Habana Cuba. (2004).
35. William B. Lushbaugh et al., “Effect of Hamster Liver Passage on the Virulence of Axenically Cultivated *Entamoeba Histolytica*,” *Am J Trop Med Hyg* 27, no. 2: 248-254. (1978).
36. [Serrano J.](#), [Gutiérrez M.](#), [Mejía R.](#), [Galindo S.](#), [Tsutsumi V.](#), [Shibayama M.](#), “Effect of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes on *Entamoeba histolytica* virulence”. *Can J Microbiol* 56 (12): 987-95. (2010).

37. Crisóstomo M., Jiménez E., y Arroyave C., “*Entamoeba histolytica* sequences and their relationship with experimental liver abscesses in hamsters,” *Parasitology Research* 98, no. 2: 94-98. (2006).
38. Ibne M.A., Utpal M., Shantanu R., Rashidul H., Petri W.A. Jr. y Graham C., “Evidence for a Link between Parasite Genotype and Outcome of Infection with *Entamoeba histolytica*” *Journal of Clinical Microbiology* 45, no. 2: 285-289. (2007).
39. Balderas I., García J., Carranza P., Morales L., Galan L. y Muñoz L., “Transcriptional Upregulation of Genes Related to Virulence Activation in *Entamoeba histolytica*,” *Archives of Medical Research* 38, no. 4: 372-379. (2007).
40. MacFarlane R., y Singh U., “Identification of an *Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity,” *Eukaryotic Cell* 6, no. 11: 2139-2146. (2007) .
41. Ryan C., MacFarle y Singh U., “Identification of Differentially Expressed Genes in Virulent and Nonvirulent *Entamoeba* Species: Potential Implications for Amebic Pathogenesis” *Infection and Immunity* 74, no. 1:340-351. (2006).
42. Fisher O., Siman-Tov R., y Ankri S., “Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Eh₅meth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*,” *Nucleic Acids Research* 32, no. 1: 287-297. (2004).
43. Ibne K., Ehrenkauf G., Hackney J., y Singh U., “Growth of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* in 5-azacytidine has limited effects on parasite gene expression,” *BMC Genomics* 8: 7. (2007).
44. Sen A., Chatterjee NS., Akbar MA., Nandi N. y Das P., “The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis

- and survival of the parasite during oxidative stress,” *Eukaryotic Cell* 6|, no. 4: 664-673. (2007).
45. Bracha R., Nuchamowitz Y. y Mirelman D., “Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*” *J. Biosci* 27, no. 6: 579–587. (2002).
46. Ventura J. et al., “Trophozoites of *Entamoeba histolytica* express a CD59-like molecule in human colon,” *Parasitology Research* 104, no. 4: 821-826. (2009).
47. Anaya F. y Padilla F., “Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research.” *Future Microbiology* 6, no. 3: 255-258. (2011).
48. Trejos J. y Castaño J.C., “Virulence factors of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.” *Infect.* 13, no. 2. (2009).
49. Tachibana H., Cheng X.J., Masuda G., Horiki N. y Takeuchi T., “Evaluation of Recombinant Fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin Intermediate Subunit for Serodiagnosis of Amebiasis.” *Journal of Clinical Microbiology* 42, no. 3: 1069-1074. (2004).
50. Laughlin R.C. y Temesvari L.A., “Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention” *Expert Rev Mol Med.* 7: 1-19. (2005).
51. Frederick J.R. y Petri W.A. Jr., “Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation”. *Glycobiology.* 15: 53R-59R. (2005).
52. Talamas P. y Meza I., “Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization”. *J Cell Biol.* 106: 1787-94. (1998).

53. Meza I., "Extracellular matrix induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness". *Parasitol Today*.16: 23-8. (2000).
54. Gomez J.C., Cortes J.A., Cuervo S.I., López M.C., "Amebiasis intestinal". *Infectio*. 11: 36-45. (2007).
55. Pacheco J., Rondan A., Shibayama M., Tsutsumi V. y Campos R., "Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-galatosa/N-acetil D-galactosamina de *Entamoeba histolytica*". *Revista del Centro de Investigacion (México)* 7:13-32. (2006).
56. McCoy J.J., Mann B.J., Petri W.A. Jr., "Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun*.62:3045-50. (1994).
57. Ortiz L. y Rosales D., "Amibiasis: Aspectos relevantes de la respuesta inmunitaria y del diagnóstico de laboratorio." *Revista Médica de la Extensión Portuguesa – ULA* 1, no. 1: 45-54. (2007).
58. González A., Monterrubio D., Nequiz, M., *et al.* "Localization of *Entamoeba histolytica* amebopore in amebic liver abscesses in hamsters." *Ann. NY Acad. Sci.* 1149: 375–379. (2008).
59. Que X. y Reed S. L., "Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis" *American Society for Microbiology* 13, no. 2:196-206. (2000).
60. Moncada D., Keller K. y Chadee K., "*Entamoeba histolytica*-Secreted Products Degrade Colonic Mucin Oligosaccharides," *Infect. Immun.* 73, no. 6: 3790-3793. (2005).

61. Lidell M., *et al.*, “*Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 24: 9298-9303. (2006).
62. Zaki M., Andrew N. y Insall R., “*Entamoeba histolytica* cell movement: A central role for self-generated chemokines and chemorepellents,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 49: 18751-18756. (2006).
63. Sanchez C., *et al.*, “Differentiation of *entamoeba histolytica/entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis,” *Am J Trop Med Hyg* 66, no. 6: 731-737. (2002).
64. Saíd S., Vargas J., Castro J., Mata B., Navarro L., Lozano G. y Martínez H., PEHPS Medium: an Alternative for Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans. Roy. Soc.Trop.Med. Hygiene.* 82: 249-253. (1988).
65. Said s., Mata BD., Castro J., Martínez Rodriguez H., Navarro L., y Lozano G. #Axenic massive cultivation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in spinner flasks and in a microfermentor” *Archives of Medical Resarch.* 23: 57-58: (1992).
66. Diamond L.S., “Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. histolytica-like* amebae”. *J. Parasitol.* 54:1047. (1968).
67. Kretschmer R.R. y López O.M: Mecanismos efectores e inmunidad amibiana, in Kretschmer RR (ed): *Amibiasis. Infeccion y Enfermedad por Entamoeba histolytica.* Mexico, Editorial Trillas, p. 135-154. (1994)
68. González M.T., Castro J., Anaya F., Mata B.D., Lozano G., Carranza M.P., Vargas J. y Fernández Said. “Anti amoebic effect of gossypol in golden hamsters with experimental hepatic amoebic abscess”. *Pharmaceutical Sciences.* 2: 153-156. (1996).

69. Carranza P., Santiago-M.G., Guzmán N.E. et al. "Precision-cut hamster liver slices as an ex vivo model to study amoebic liver abscess". *Experimental Parasitology* 126, p. 117–125. (2010).
70. Rentería, I., "Aislamiento de RNA mensajeros que codifican antígenos recombinants desplegados diferencialmente en estados virulento y no virulento por *Entamoeba histolytica*" Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias con especialidad en biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Páginas: 48-58. (2000).
71. Uni-ZAP XR Vector Kit and Uni-ZAP XR Gigapack Cloning Kits EcoR I/ Xho I/CIAP-Treated. Instruction Manual. Catalog # 237211(Uni-ZAP XR Vector Kit) and #237612 (Uni-ZAP XR Gigapack III Gold Cloning Kit) Revision A. Página 16.
72. Burch D. J., Li E., Reed S., Jackson T.F., y Stanley S.L. Jr., "Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone". *J. Clin. Microbiol.* 29:696–701. (1991).
73. Clark C.G., y Diamond L.S., "Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct". *Mol. Biochem. Parasitol.* 49:297–302. (1991).
74. Phillips, B. P., "*E. histolytica* concurrent irreversible loss of infectivity/pathogenicity and encystment potential after prolonged maintenance in axenic culture *in vitro*". *Exp. Parasitol.* 34:163. (1973).
75. Mattern, C.F., Keister D.B. y Natovitz P.C., "Virulence of *Entamoeba histolytica* upon continuous axenic cultivation". *Arch Invest. Med.* 13:185. (1982).
76. Bruchhaus I., Loftus B.J., Hall N. y Tannich E., "The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small

subset is expressed during in vitro cultivation". Eukaryotic Cell 2, 501–509.
(2003).

77. Genes Benjamin Lewin 2ª edición, editorila reverté, Barcelona, p. 617-624. (1994).

78. Mark Ptashne. Un Regulador Genético el fago λ y los Organismos Superiores, 2ª edición, R. B. Servicios Editoriales S. A., p. 58-72.

APÉNDICES

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

♦ Reactivos para electroforesis en gel de Agarosa

Solución DEPC (Dietil Pirocarbonato)

Se agregan 100 µL de DEPC a cada 100 mL de solución o agua. Se mezcla y se incuba toda la noche a temperatura ambiente; al día siguiente se esteriliza para inactivar el DEPC residual.

Buffer TBE 10X

Disolver 108 g de Trisma base, 55 g de ácido bórico, 9.3 g de EDTA disódico en 800 mL de agua destilada ultrapura. Aforar a 1000 mL.

Buffer TBE 1X

Añadir 100 mL de TBE 10X a 1000 mL de agua DEPC.

Agarosa a l 1 %

Disolver en 100 mL de TBE 1X 1 g de agarosa.

♦ Reactivos para Hibridación RNAm-cDNA

Cloruro de sodio 5 M

Se pesan 58.44 g de NaCl y se disuelven en 200 mL de agua destilada.

Buffer de hibridación 2X

Para preparar 500 μL de buffer se pesan 0.00119 g de HEPES para obtener una concentración 100 mM, para obtener el buffer al 80 % de formamida se agregan 160 μL , añadir 2 μL de EDTA 0.5 mM para tener una concentración de 2 mM y por último para tener una concentración de SDS al 0.2 % colocar 10 μL de SDS al 10 %.

◆ Buffer L10X para la alineación de iniciadores para formar los adaptadores 3' y 5'.

Se disolvieron los siguientes reactivos en agua quedando a las siguientes concentraciones: Tris-HCl 100 mM pH 7.5, MgCl_2 100 mM y DTT 10 mM.

Buffer SM

Disolver 5.8 g de NaCl más 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de Tris-HCl (pH 7.5) aforar en 1 L de Agua, esterilizar en autoclave.

◆ Medios de Cultivos

Medio PEHPS (Peptona, Extracto de Hígado, Páncreas y Suero)

Se disolvió 10 g de peptona de caseína, 0.20 g de ácido ascórbico, 1 g de cisteína, 6 g de glucosa, 1 g H_2HPO_4 y 0.60 g de KH_2PO_4 en 650 mL de agua desionizada; después se agregó 250 mL de extracto de hígado y páncreas (EHP). Por último debes ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10 N y aforar el volumen a 1000 mL con agua desionizada.

Medio LB

Se pesaron 25 g de medio LB, los cuales se aforaron en 1 L de agua; posteriormente fueron esterilizados por autoclave.

Medio LB suplementado

Se preparó medio LB con maltosa al 0.2 % y MgSO_4 10 mM. En 900 mL de agua destilada fueron disueltos 25 g de medio LB, más 2 g de maltosa y 2.464 g de MgSO_4 , y se aforaron a 1 L. Esterilizado por autoclave.

Agar Duro NZY

Se pesaron 5 g de NaCl, 2 g de MgSO_4 , 5 g de Extracto de Levadura, 10 g de Caseína y 15 g de Agar bacteriológico, se aforo a 1 L en agua destilada y se esterilizó por autoclave.

Agar Suave NZY

Se preparó igual que el agar duro NZY con la diferencia de que se pesaron 7 g de agar en lugar de 15 g.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Olivia Flores Cuevas

**Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia**

Tesis:
IDENTIFICACIÓN DE ANTIGÉNO DE *Entamoeba histolytica* VIRULENTO

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Playa Vicente, Veracruz el 30 de Marzo de 1987, hija de Oscar Flores Zamora y Olivia Cuevas Pérez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2009.

Experiencia profesional: Practicante en el Hospital Clínica Nova de Diciembre a Junio de 2009 y Laboratorista en la Preparatoria # 7 de la UANL de Enero a Agosto de 2009. Actualmente Químico Analista en Desarrollos Biomédicos y Biotecnológicos de México (Debbiom) desde agosto de 2011.