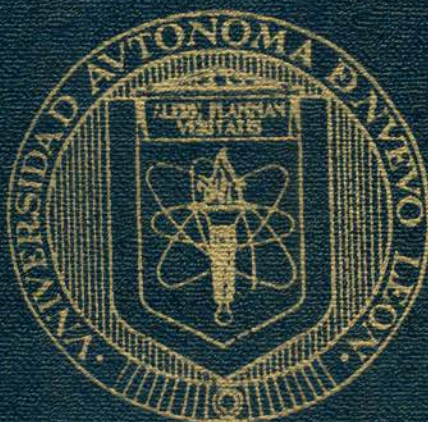


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**AISLAMIENTO DE BANDAS ELECTROFORÉTICAS DE UN
EXTRACTO DE *E. histolytica* POR ELECTROFORESIS EN
ELECTROELUCIÓN CONTINUA**

POR
JULIO HENOC MONJARDÍN HERÁLDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

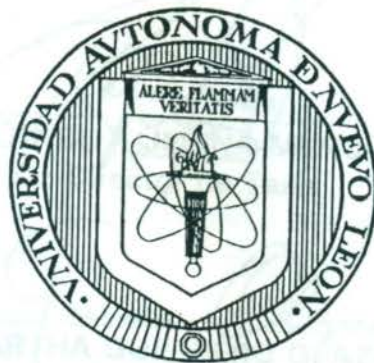
FEBRERO, 2002



1020147050

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**AISLAMIENTO DE BANDAS ELECTROFORÉTICAS DE UN
EXTRACTO DE *E. histolytica* POR ELECTROFORESIS EN
ELECTROELUCIÓN CONTINUA**

Por

JULIO HENOC MONJARDÍN HERÁLDEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad
En Microbiología Médica**

FEBRERO, 2002

**AISLAMIENTO DE BANDAS ELECTROFORETICAS DE UN EXTRACTO DE
E. histolytica, EN ELECTROFORESIS POR ELECTROELUCION CONTINUA**

Aprobación de la Tesis:



DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZÁLEZ
Director de Tesis



DR. ROLANDO TIJERINA MENCHACA
Co-Director de Tesis



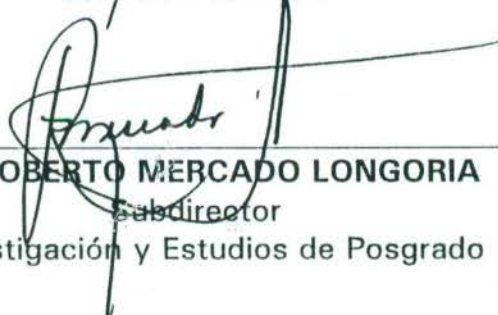
DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN
Comisión de Tesis



DR. FRANCISCO J. BOSQUES PADILLA
Comisión de Tesis



DRA. IRMA M. RIVERA MORALES
Comisión de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme los recursos económicos que me permitieron realizar este trabajo.

Al Dr. José María Flores de la Facultad de Medicina y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haberme proporcionado económicamente para la realización de este trabajo la infraestructura necesaria.

Al Dr. Eduardo Martínez Salgado, Dr. Víctor Manuel Díaz Siqueiros, y al Servicio de Salud en Toluca, por todo el apoyo y paciencia que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Ángel Rodríguez por el gran apoyo brindado.

Al Dr. Rolando Tijerina Menchaca, mi agradecimiento por haberme permitido trabajar en su laboratorio como hombre a profesional.

El presente trabajo se desarrolló en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la dirección de la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda y la codirección del Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca.

Al Dr. Víctor Manuel Díaz Siqueiros, por sus consejos, su paciencia y su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

El presente proyecto fue aprobado por:
SIRREYES 19980602010 y PAICyT SA 255-99

Al Dr. Fernando V. Martínez Rodríguez, Mariana y todos los amigos que me brindaron su apoyo y amistad durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Armando Islas Arce, por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Antonio López, por el gran apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Silvia Guadalupe Rodríguez Ferras, por su amistad y apoyo.

A todos los miembros del C.R.C.E.I. en especial a Haroldo, Carlos, María del Socorro, Blanca, Lucy, Ana María, Angélica, Carlos, Susana, Patricia, Ana María, Nancy, María, Rosa, Leticia y con especial agradecimiento a mi amiga y colega.

Por todo el Departamento de Microbiología, mi agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme los recursos económicos que me permitieron realizar mis estudios.

Al Sistema de Investigación Alfonso Reyes y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por colaborar económicamente para la realización de mi trabajo experimental.

Al Dr. Eduardo Llausás Magaña, Dr. Víctor Manuel Díaz Simental y los Servicios de Salud en Sinaloa, por todo el apoyo y paciencia que tuvieron para conmigo.

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez por el gran apoyo brindado.

Al Dr. Med. Rolando Tijerina Menchaca, mi agradecimiento por su confianza y mi respeto irrestricto como hombre y profesional.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de C., por sus consejos, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por asesorar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Francisco Javier Bosques Padilla, por su colaboración, su tiempo y su apoyo.

A la Dra. Irma Rivera Morales, por su interés, amistad y disposición.

A la Dra. Martha Guerrero de Viader, por sus consejos, su prestancia y sugerencias que enriquecieron mi trabajo.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por permitirme hacer uso de las instalaciones del Departamento de Bioquímica.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, maestra y sobre todo amiga, por su tiempo, consejos y ayuda en momentos difíciles, todo mi aprecio.

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por haber donado la cepa utilizada.

Al Dr. Antonio Luna, Por el gran trabajo fotográfico que realizó en el transcurso del trabajo de tesis.

A la M.C. Elba Guadalupe Rodríguez Pérez, por su amistad y confianza.

A todos los miembros del C.R.C.E.I. en especial a Marcela, Elvira, Ma. de Jesús, Socorro, Blanca, Lucy, Rosaura, Ángeles, Carlos, Sra. Eva, Nora, Aracely, Elba, Patty, Juany, Bruna, Lupita y con énfasis a Don Pancho por su amistad y cariño.

Para todo el Departamento de Microbiología, mi agradecimiento.

DEDICATORIAS

A Dios, amor infinito y verdadero, que me iluminó con su poder para llegar a feliz término una importantísima meta como persona y como profesional.

A mi Padre, José María Monjardín Castro y a mi Madre, María del Carmen Heráldez Cuevas que me guiaron, apoyaron y siempre han estado conmigo, con todo mi amor, respeto y admiración, gracias por todo su apoyo.

A todos mis hermanos: José María, Samuel, Fernando, Paciano, Lucila, Jesús Eduardo, Felipe, Pedro, Ambrosio, Ramiro, Noé, María del Carmen y sus familias, gracias por estar conmigo y siempre tener una palabra y un gesto de aliento que me ayuda a salir adelante.

Al Dr. Eduardo Llausás Magaña, por su amistad y apoyo infinitos, por creer en mí a pesar de las adversidades, por estar siempre dispuesto a escuchar y ofrecer una palabra de aliento en los momentos más difíciles.

A Perla Carrillo Duarte, esposa, amiga y compañera en todo momento, mi eterno amor y entrega, por ser lo más preciado que me ha dado Dios, por sus palabras de apoyo en cada momento que fue necesario, iluminando con su amor y cariño cada una de las cosas y momentos que compartimos,
Gracias Amor.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Definición de Amibiasis.	1
1.2 Antecedentes Históricos.	1
1.3 Organización Celular.	2
1.4 Clasificación.	2
1.5 Ciclo de Vida.	3
1.6 Padecimientos Ocasionados por <i>Entamoeba histolytica</i> .	3
1.7 Epidemiología.	4
1.8 Inmunidad Contra el Parásito.	4
1.9 Determinantes de Patogenicidad.	5
1.10 Antígenos de Superficie.	7
1.11 Adhesinas.	8
1.12 Enzimas.	11
1.13 Proteasas.	12
1.14 Proteínas Formadoras de Poro.	13
1.15 Otros Determinantes de Patogenicidad.	13
1.16 Cultivo de <i>E. histolytica</i> .	14
1.17 Diagnóstico de Amibiasis Intestinal.	15
1.18 Diagnóstico de Amibiasis Invasiva.	15
1.19 Diagnóstico de Amibiasis Invasiva por Western Blot.	16
1.20 Moléculas Inmunodominantes de <i>E. histolytica</i> diagnosticadas por Western Blot.	17

1.21 Técnicas para el Aislamiento de Proteínas.	18
1.22 Propósito del Estudio.	19
2. OBJETIVOS.	20
2.1 Objetivo General.	20
2.2 Objetivos Específicos.	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	21
3.1 Origen de los Reactivos.	21
3.2 Equipo.	22
3.3 Origen de la Cepa de <i>E. histolytica</i> .	23
3.4 Cultivo de <i>E. histolytica</i> .	23
3.4.1 Preparación de la Base del Medio TYI.	23
3.4.2 Preparación de la Mezcla Vitáminica # 18.	23
3.4.3 Preparación del Medio de Cultivo TYI-S-33.	24
3.4.4 Resiembra de Trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	24
3.4.5 Obtención de los Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	25
3.4.6 Liofilización de los Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> Congelados.	25
3.4.7 Lavado del Material Utilizado en el Cultivo de <i>E. histolytica</i> .	25
3.5 Preservación de Antígenos de <i>E. histolytica</i> .	26
3.6 Determinación de la Concentración de Proteínas.	26
3.6.1 Procedimiento Estándar	27
3.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE).	27
3.7.1 Preparación de Geles.	28
3.7.2 Corrimiento de la Electroforesis.	29
3.8 Tinción de Geles con Azul de Coomassie.	29

3.9 Inmunoelectrotransferencia o Western Blot.	30
3.9.1 Electrotransferencia.	30
3.9.2 Western Blot.	30
3.10 Aislamiento de la Proteína de 8 KDa.	31
3.10.1 Preparación de Geles.	31
3.10.2 Electroforesis Preparativa.	33
3.10.3 Lectura Espectrofotométrica de las Fracciones Obtenidas.	33
3.10.4 Concentración de las Fracciones Obtenidas.	33
3.11 Evaluación de Resultados.	35
4. RESULTADOS.	36
4.1 Cultivo de <i>E. histolytica</i> y Obtención de la Fracción IC:MC.	36
4.2 Establecimiento de Tiempos de Elución.	38
4.2.1 Electroforesis con Marcadores de Peso Molecular Conocido.	38
4.2.2 Electroforesis de la Fracción IC:MC.	41
4.3 Aislamiento de las Proteínas de Peso Molecular Relativo de 8 KDa a Partir de la Fracción IC:MC.	43
4.3.1 Lectura Espectrofotométrica de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC en Gel de poliacrilamida al 20 % T / 2.67 % C.	44
4.3.2 Análisis de las Fracciones 1 a la 21 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC	45
4.3.3 Análisis de las Fracciones 22 a la 41 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.	48
4.3.4 Análisis de las Fracciones 42 a la 61 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.	51
4.3.5 Análisis de las Fracciones 62 a la 81 de la	

Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.	54
4.3.6 Análisis Integral de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC Teñidas con Azul de Coomassie.	57
4.3.7 Análisis Integral por Western Blot de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.	59
4.4 Evaluación de Resultados.	60
4.4.1 Comparación de la Reacción entre un Suero Control Positivo y un Suero Control Negativo Frente a la Fracción IC:MC y las Proteínas de 8 KDa Aisladas.	61
4.4.2 Comportamiento de los Sueros de Distintos Orígenes Frente a las Proteínas de 8 KDa Aisladas a Partir de la Fracción IC:MC.	62
5. DISCUSIÓN.	64
6. CONCLUSIONES.	75
7. PERSPECTIVAS.	76
8. BIBLIOGRAFÍA.	77
APÉNDICE A	84

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.- Preparación de Gel de Separación de Poliacrilamida 12 % T/2.67 % C.	28
2.- Preparación de Gel de Separación de Poliacrilamida en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C.	28
3.- Preparación de Gel de Empaquetamiento de Poliacrilamida 5 % T/2.67 % C.	29
4.- Preparación de los Geles de Separación de Poliacrilamida del Prep Cell 491.	32
5.- Preparación de los Geles de Empaquetamiento de Poliacrilamida del prep. Cell 491.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC.	37
2.- Western Blot de la Fracción IC:MC, revelado con suero de un paciente con amibiasis invasiva.	38
3.- Gráfica de las lecturas de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas al correr marcadores de peso molecular en una electroforesis preparativa con un gel de empaquetamiento del 4 % T/ 2.67 % C y un gel de separación del 6 % T/ 2.67 % C.	39
4.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 % T/2.67 % C de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 6 % T de Marcadores de Peso Molecular de Amplio Rango.	40
5.- Gráfica de las lecturas de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas al correr la fracción IC:MC en una electroforesis preparativa con un gel de empaquetamiento del 4 % T/ 2.67 % C y un gel de separación del 6 % T/ 2.67 % C.	42
6.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 % T/2.67 % C de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 6 % T de la Fracción IC:MC.	43
7.- Lecturas de absorbancia a 280 nm de las 95 fracciones obtenidas al realizar el corrimiento de la fracción IC:MC, en electroforesis preparativa por electroelución continua en gel de poliacrilamida al 20 % T/2.67 % C.	45
8.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de las Fracciones 1-21 Obtenidas en la Electroforesis	

Preparativa al 20 % T de la Fracción IC:MC, teñido con azul de Coomassie al 0.1 %.	47
9.- Western Blot de las Fracciones 1-21 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva.	48
10.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de las Fracciones 22-41 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T de la Fracción IC:MC, teñido con azul de Coomassie al 0.1 %.	49
11.- Western Blot de las Fracciones 22-41 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva.	50
12.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de las Fracciones 42-61 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T de la Fracción IC:MC, teñido con azul de Coomassie al 0.1 %.	52
13.- Western Blot de las Fracciones 42-61 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva.	54
14.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de las Fracciones 62-81 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T de la Fracción IC:MC, teñido con azul de Coomassie al 0.1 %.	55
15.- Western Blot de las Fracciones 62-81 Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva.	56
16.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T de la Fracción IC:MC.	58

- 17.- Western Blot de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 20 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva. 60
- 18.- Western Blot de la Fracción IC:MC Frente a un Suero de Paciente con Amibiasis Invasiva y un Suero de Sujeto Sano de Zona Endémica Amibiasis. 62
- 19.- Western Blot de las Proteínas de 8 KDa Aisladas, Frente a Sueros de Distintos Orígenes. 63

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
% C	Concentración de agente polimerizante
% T	Concentración de monómero
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
AHA	Absceso hepático amibiano
ASB	Albúmina sérica bovina
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
bp	Pares de bases
c.b.p.	Cantidad bastante para
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CPS	Coproparasitoscópico
CRD	Dominio de reconocimiento del carbohidrato
CHO	Células de ovario de hamster chino
DA	Disentería amibiana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas
Fracción IC:MC	Fracción insoluble cloroformo metanol calentada
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IFN-γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A

IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IHA	Hemaglutinación indirecta
KDa	Kilodaltones
lb	Libra
LPPG	Lipopeptidofosfoglicana
LPS	Lipopolisacárido
M	Concentración molar
MCDK	Células de riñón canino
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
N	Concentración normal
NANA	Ácido N-acetil neruramínico
nm	Nanómetros
P M	Peso molecular
p/v	Relación peso volumen
PBS	Solución salina fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
pl	Punto isoeléctrico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SREHP	Proteína de <i>Entamoeba histolytica</i> rica en serina
Temed	Tetrametiletildiamina

TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris-Base	Hidroximetil aminometano
UV	Radiación ultravioleta
v/v	Relación volumen volumen
WB	Western Blot

UN ANÁLISIS DE BANDAS ELECTROFORÉTICAS DE UN EXTRACTO DE *Leishmania panamensis* EN ELECTROFÓRESIS ISOTÉRMICA

Nombre de página: 16
 Ciudad: Panamá, Panamá, República de Panamá
 Autor: [Illegible]

[Illegible text, likely the start of an abstract or introduction]

[Illegible signature and text]

RESUMEN

Julio Henoc Monjardín Heráldez

Fecha de Graduación: Febrero 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: AISLAMIENTO DE BANDAS ELECTROFORÉTICAS DE UN EXTRACTO DE *Entamoeba histolytica* POR ELECTROFORESIS EN ELECTROELUCIÓN CONTINUA.

Número de páginas: 86

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica

Área de Estudio: Microbiología Médica.

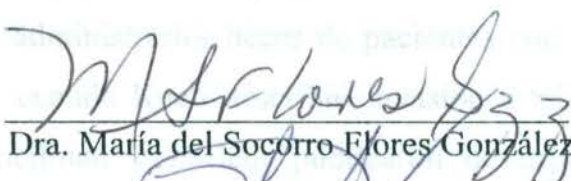
Propósito y Método de Estudio: El diagnóstico de amibiasis invasiva en la actualidad se realiza utilizando principalmente las pruebas de IHA y ELISA, las cuales se basan en el uso de antígenos amibianos preservados con inhibidores enzimáticos, los cuales no son totalmente efectivos, siendo susceptibles de degradación proteolítica. Flores-Castañeda, emplea un método de preservación de antígenos amibianos, en el cual se evita el uso de inhibidores. Utilizando este método es posible preservar los extractos amibianos por períodos prolongados de tiempo sin degradación. A partir de este método de preservación se diseñó una prueba de Western Blot para el diagnóstico de amibiasis invasiva, utilizando el extracto como antígeno de reacción. Con la utilización de esta prueba se encontró un patrón de reconocimiento característico de proteínas por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes con amibiasis invasiva, dentro de este patrón se encuentran las proteínas de 8 KDa que son reconocidas por el 99 % de los pacientes con amibiasis invasiva.

En el presente estudio se aislaron las proteínas de 8 KDa por medio de electroforesis preparativa con electroelución continua, después del aislamiento, las fracciones obtenidas fueron dializadas, concentradas, sometidas a electroforesis analítica y Western Blot, probándose contra sueros de distintos orígenes.

Contribuciones y Conclusiones: El método de electroforesis preparativa con electroelución continua, es un método muy útil para el aislamiento de proteínas a partir de extractos crudos o muestras ya manipuladas, con una gran capacidad de resolución para la separación de proteínas basados en diferencias de peso molecular o punto isoeléctrico

Las Fracciones obtenidas fueron probadas frente a sueros de pacientes con amibiasis invasiva por WB y se logró demostrar la presencia de las proteínas de 8 KDa en forma aislada. Las proteínas aisladas al ser probadas reaccionaron solamente con sueros de pacientes con amibiasis invasiva, pero no reaccionaron con sueros de sujetos con diversas hepatopatías, sujetos sanos con CPS positivo para quistes de *E. histolytica* y sujetos sanos de zonas endémicas.

FIRMA DEL DIRECTOR:



Dra. María del Socorro Flores González

FIRMA DEL CODIRECTOR:



Dr. Med. Rolando Tijerina Menchaca

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Amibiasis

La amibiasis se define como la infección con o sin síntomas clínicos ocasionada por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica* (Guerrant 1986). Esta enfermedad se presenta principalmente en poblaciones cuyas condiciones higiénico-dietéticas son deficientes y con mayor frecuencia en países tropicales y subtropicales, aunque también se puede encontrar en regiones de clima frío (Walsh 1986, Trissl 1982).

1.2 Antecedentes Históricos

Entamoeba histolytica fue identificado por Lewis en 1869 en muestras de heces, sin embargo, Lösh en 1875 fue el primero en describir una disentería amibiana en un paciente de San Petersburgo, Rusia. Posteriormente, reprodujo la enfermedad en perros al administrarles heces de pacientes con colitis amibiana. No fue sino hasta 1887, cuando Koch describió invasión a tejidos causada por amibas. En 1891, Councilman y Lafleur publicaron descripciones anatómo-patológicas de hígado y tejidos infectados por amibas. Quinke y Roos en 1893 identificaron por primera vez los quistes del parásito y en 1903, Schaudinn

denominó a este parásito *Entamoeba histolytica*, por su aparente habilidad para lisis los tejidos (Guerrant 1986).

1.3 Organización Celular

E. histolytica es uno de los eucariotes más simples que existe estructuralmente hablando, ya que carece de peroxisomas, aparato de Golgi y mitocondrias (Bakker 1993), aun así se ha demostrado que este parásito es capaz de llevar a cabo un activo metabolismo respiratorio (Weinbach 1974), aunque no se han encontrado citocromos, ni proteínas con grupos heme, si se han logrado encontrar proteínas que contienen centros hierro azufre y flavoproteínas, sin embargo, el aceptor final de electrones no se ha logrado elucidar (Weinbach, 1978,1980).

1.4 Clasificación

Según Levine *Entamoeba histolytica* se clasifica dentro del Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Sarcodina, Superclase Rhizopoda, Clase Lobosea, Subclase Gymnamoebia, Orden Amoebida, Familia Endamoebidae, Género *Entamoeba* y Especie *E. histolytica* (Levine 1980).

Debido a la gran gama de características clínicas que se presentan en la amibiasis, desde principios de siglo se pensó que el padecimiento era causado por dos distintos parásitos. Emile Brumpt en 1925 propuso la existencia de dos especies distintas: *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* con características morfológicas idénticas pero que solamente una de ellas era capaz de ocasionar daño (Brumpt 1925). En las décadas de los setentas y ochentas con la ayuda de métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares se trató de resolver esta interrogante. Peter Sargeant en 1979, realizó los patrones electroforéticos de las enzimas fosfoglucomutasa y hexoquinasa de 6,000 aislamientos de amibas

procedentes de todo el mundo, encontrando patrones distintos en los perfiles electroforéticos de las cepas invasivas y no invasivas, a este método se le llamó análisis de zimodemos (Sargeant 1979). Posteriormente, Strachan en 1988, Petri y Tachibana en 1990, desarrollaron anticuerpos monoclonales, los cuales reconocían específicamente zimodemos patógenos, los cuales eran capaces de diferenciar entre ambas especies (Strachan 1988, Petri 1990, Tachibana 1990). En 1993, se formalizó la separación de *E. histolytica* y *E. dispar* en dos especies distintas (Diamond 1993). En investigaciones posteriores se han evidenciado diferencias entre estas dos especies, una de las cuales es la diferencia en los niveles de expresión de los genes de proteasas de cisteína, que es un factor importante de patogenicidad, encontrándose *E. histolytica* con mayor actividad que *E. dispar* (Bruchhaus 1996).

1.5 Ciclo de Vida

El ciclo de vida se inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes, que son las formas infectantes. Posteriormente se inicia el proceso de desenquistamiento en el colon, liberándose los trofozoítos que son la forma invasiva. Se ha propuesto que cuando las condiciones del medio no son propicias, se inicia el proceso de enquistamiento y el trofozoíto se convierte en quiste. Los quistes son eliminados con las heces, completándose de esta manera el ciclo biológico de *E. histolytica* (Martínez-Palomo 1986, Martínez-Palomo 1987).

1.6 Padecimientos Ocasionados por *Entamoeba histolytica*

La enfermedad puede presentarse como diarrea leve con pocos síntomas generales y en los casos más agresivos, con disentería amibiana, dolor abdominal, fiebre y diarrea mucosanguinolenta, principalmente por el efecto que ocasiona en el epitelio de la mucosa intestinal. Puede haber complicaciones como la

perforación del intestino, peritonitis y con mayor frecuencia ameboma o colitis ulcerativa post-disentérica. En la mayoría de los casos de amibiasis extraintestinal, el órgano comúnmente afectado es el hígado, en el cual produce el absceso hepático amibiano (AHA) (Martínez-Palomo 1989).

1.7 Epidemiología

De acuerdo con las condiciones del hospedero y del parásito, la infección puede presentarse como amibiasis intestinal sintomática, amibiasis extraintestinal o como infección asintomática donde la amiba permanece como comensal inocuo del colon. Se ha estimado que sólo el 10% de las personas infectadas presentan síntomas clínicos (Guerrant 1986), y que mundialmente causa una morbilidad de 50 000 000 casos por año y de 50 000 a 100 000 muertes anuales (Walsh 1986). En México, ocupa el sexto lugar entre las causas más frecuentes de muerte.

1.8 Inmunidad Contra el Parásito

No se conoce hasta que grado, la inmunidad mediada por células de la mucosa, interviene en el proceso de protección contra la amibiasis extraintestinal o la amibiasis intestinal recurrente (Trissl 1982).

Se ha reportado que los macrófagos activados con interferón gamma (IFN γ) y lipopolisacárido bacteriano (LPS) son altamente citotóxicos para *E. histolytica*. Al realizarse estos experimentos, se observó que la muerte de *E. histolytica*, siempre se correlacionaba con la presencia de nitritos en el sobrenadante de los medios de cultivo, posteriormente se demostró que la adición de hierro en exceso o el agente reductor ditionato de sodio a los macrófagos activados detenía su capacidad para matar al parásito; finalmente esto sugiere que la muerte de *E. histolytica* por los macrófagos activados, depende de la

producción de reactivos intermedios de nitrógeno, lo que conduce a la pérdida crítica de hierro y a la muerte del protozooario (Denis 1992).

Por otro lado, en la respuesta inmune humoral en pacientes con amibiasis invasiva, se han detectado, por técnicas serológicas, altos títulos de IgG dirigidos específicamente contra amibas en un 95 % de los pacientes con amibiasis invasiva, aunque también se han encontrado elevados los niveles de IgM, IgA e IgE dirigidos contra antígenos amibianos (Tran 1988, Krestchmer 1986). Cabe mencionar que se ha demostrado que la IgA dirigida contra las amibas remueven en forma rápida y activa los antígenos amibianos presentes en el torrente circulatorio.

La saliva de pacientes con amibiasis intestinal analizada por Western blot (WB), indicó que la saliva de los pacientes contiene anticuerpos IgA dirigidos contra antígenos con pesos moleculares que van de 170 a 24 KDa, algunos de los cuales también son reconocidos por los anticuerpos presentes en la saliva de sujetos sanos. Sin embargo, los antígenos de 170, 125, 46 y 37 KDa fueron reconocidos, con una frecuencia del 90 % por la IgA secretoria de pacientes con amibiasis intestinal, a diferencia de una frecuencia de reconocimiento del 10 % por parte de anticuerpos de sujetos sanos (Ortíz-Ortíz 1998). Además, se ha demostrado que anticuerpos del tipo IgA secretorios provenientes de portadores sanos y pacientes sintomáticos tienen un fuerte efecto inhibitor *in vitro* contra las proteasas de cisteína, por otro lado, se observó que cuando se ponían en contacto muestras de saliva con y sin anticuerpos contra *E. histolytica* en una prueba de WB contra una proteasa de cisteína de 70 KDa de origen amibiano, el 84 % de las muestras de saliva la reconocían (Guerrero-Manríquez 1998).

1.9 Determinantes de Patogenicidad

Entamoeba histolytica es un patógeno con una amplia variedad de determinantes de patogenicidad, de las cuales podemos mencionar proteasas,

colagenasas, fosfolipasas, adhesinas, proteínas formadoras de poro entre otras.

Se ha observado que las cepas patógenas de *E. histolytica* son capaces de aglutinarse con Concanalina A, mientras que la aglutinación observada en las cepas aisladas de pacientes asintomáticos es mucho menor (Trissl 1977), logrando con ello diferenciar la cepas patógenas de las no patógenas. Aley en 1980 logró demostrar que al preincubar los trofozoítos de *E. histolytica* con concanavalina A estabilizaba la membrana plasmática y la separó de los demás componentes celulares utilizando gradientes de sacarosa, logrando purificar 12 glucoproteínas con pesos moleculares que iban de los 12 a los 200 KDa (Aley 1980). Kobiler y Mirelman demostraron, que la adherencia de las amibas a las células hospedero estaba mediada por proteínas que se unen a carbohidratos (lectinas), descritas previamente en trofozoítos y que su mecanismo de acción puede ser inhibido por galactosa o N-acetilglucosamina (Kobiler 1981).

Se ha probado que las cepas de amibas patógenas, al inocularse en hígado de hamster llegan a producir abscesos, con lo cual se demuestra su capacidad para invadir tejidos y formar úlceras a nivel intestinal (Martínez-Palomo 1986).

Se han sugerido dos mecanismos de daño mediante los cuales *E. histolytica* causa degeneración de células epiteliales durante la invasión: uno directo, el cual requiere contacto entre el trofozoíto y la célula blanco, denominado "citólisis por contacto", en el cual están implicados varios factores como fosfolipasas A1 y A2, ácidos grasos libres, un factor anfipático que potencia la acción de los ácidos grasos libres y una proteína formadora de poro (Sargeant 1982, Talamas 1988, Leippe 1994). Por otro lado se han descrito varias enzimas que intervienen en daño celular indirecto como la β -N-acetilglucosaminidasa que ocasiona la ruptura de las uniones glucoproteicas entre las células epiteliales adherentes de las mucosas. Además, se han identificado citotoxinas como la histolisina que tiene actividad de proteinasa, una de ellas aislada por Lashbaugh (proteinasa histolítica dependiente de cisteína), así como citolisinas que son dependientes del potencial de óxido-reducción y de grupos sulfhidrilo (Luaces 1988, Lashbaugh 1984).

1.10 Antígenos de Superficie

Se conoce una amplia gama de proteínas que son identificadas como los principales antígenos hacia los cuales se dirige la respuesta inmune, éstos se localizan principalmente en la superficie del parásito en su fase de trofozoíto (Espinosa-Cantellano 1991).

Una lipopetidofosfoglicana (LPPG), purificada de la cepas HM1:IMSS, (Isibasi 1982, Stanley 1991), RAHMAN, NIH 200 y HK-9 (Stanley 1991). Su localización superficial ha sido demostrada por inmunofluorescencia y es reconocida por anticuerpos de pacientes con AHA, además en un estudio realizado por Acosta, se encontró que el 44 % de las muestras de calostro humano contenían IgA específica contra el LPPG (Acosta-Altamirano 1986); este compuesto consiste de 89 % carbohidratos, 8 % aminoácidos, 2.5 % lípidos y 1 % fosfatos y los azúcares dominantes son la glucosa (51,34 %), galactosa (43.9 %) y xilosa (4.69 %) y ellas le confieren principalmente la capacidad antigénica a esta molécula.

Una proteína de superficie de 96 KDa fue identificada por la producción de anticuerpos monoclonales contra componentes de la superficie de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (Torian 1987), su localización superficial también fue demostrada por inmunofluorescencia, además de aglutinación y iodización de la superficie. El antígeno ha sido identificado principalmente en aislados patogénicos tanto en cultivos axénicos como polixénicos. En estudios serológicos, se ha encontrado una respuesta serológica del 68 % en pacientes con amibiasis invasiva (Torian 1989).

En un estudio serológico, se encontró que un antígeno de 125 KDa, era reconocido por el 73 % de 108 sueros de pacientes con AHA y su localización superficial también fue demostrada por inmunofluorescencia (Edman 1990).

Un antígeno de 30 KDa fue identificado gracias a una biblioteca de DNA complementario (cDNA) con anticuerpos policlonales de sueros anti-amiba (Torian 1990). Un inserto de 700 pares de bases (bp) de cDNA fue aislado y al realizar la secuenciación, ésta reveló que se trataba de una proteína rica en unidades de cisteína. Anticuerpos mono y policlonales, producidos contra la proteína expresada reconocen un péptido de 29 KDa en lisados completos de trofozoítos de *E. histolytica*. La localización superficial se demostró por inmunoprecipitación de trofozoítos iodados y por inmunofluorescencia. Tachibana y cols. produjeron otro anticuerpo monoclonal contra una proteína de 30 KDa que era capaz de reconocer la proteína en aislados patogénicos, pero no en aislados no patogénicos (Tachibana 1990).

1.11 Adhesinas

El primer evento en el efecto citopático de *E. histolytica* es la adherencia a la célula blanco (Martinez-Palomo 1990). Se han reportado proteínas de varios pesos moleculares que están involucradas en el proceso de adhesión de los trofozoítos a células blanco.

Al realizar estudios de biología molecular de *E. histolytica*, fue aislada una clona con cDNA, que contenía un marco de lectura que codificaba para una proteína rica en unidades de serina, la cual, fue denominada SREHP (Serine-rich *E. histolytica* protein). Esta proteína, contiene un extremo amino terminal hidrofóbico, seguida por una región abundante de aminoácidos cargados, después de los cuales, existen aminoácidos repetidos en fila y termina con una región hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal. Al tratar de predecir su estructura se encontró que era similar a algunos antígenos repetitivos de *Plasmodium*. Anticuerpos producidos contra la proteína recombinante de fusión, identificaron dos bandas de pesos moleculares aparentes de 45 y 52 KDa en un extracto crudo de membranas amibianas (Stanley 1990). Al poner a reaccionar 108 sueros de

pacientes, los resultados mostraron que un 82 % de reconocimiento en los pacientes con amibiasis invasiva y un 5 % de falsos positivos. Es posible que esta molécula juegue un papel importante en la adherencia del parásito a las células blanco, esto se observó, cuando, un antisuero producido contra la proteína de fusión inhibía un 30 % la adhesión de los trofozoítos a células de ovario de hámster chino (CHO), en comparación con los controles (Stanley 1990). En estudios recientes, un docapéptido inmunogénico derivado de la SREHP ha sido genéticamente fusionado a la subunidad B de la toxina del cólera, con el fin de crear una proteína recombinante capaz de inducir anticuerpos tanto antiamebícos como contra la toxina cuando es administrada por vía oral (Faisal 1998).

Trofozoítos de *E. histolytica* HMI:IMSS sujetos a mutagénesis química, dieron lugar a clonas mutantes deficientes en adhesión (Arroyo 1987, Orozco 1987). Un polipéptido de 112 KDa fue reconocido en lisados totales de las cepas salvajes, el cual aparentemente estaba ausente o modificado en las cepas mutantes. Estudios sobre los mecanismos patogénicos del parásito, mostraron que la preincubación de trofozoítos virulentos de *E. histolytica* con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la molécula de 112 KDa inhibía parcialmente la adherencia, fagocitosis y efecto citopático en células MDCK, adicionalmente, la destrucción de la monocapa celular causada por trofozoítos fue inhibida un 61 % cuando se bloqueo la adhesina con anticuerpos específicos (Rodríguez 1989).

Todas la cepas de *E. histolytica* expresan una lectina de superficie de 260 KDa que puede ser inhibida por galactosa o galactosamina, es inmunogénica y altamente conservada. La lectina bajo condiciones reductoras se separa en dos subunidades de aparente peso molecular de 170 y 35 KDa (Petri 1989). La información obtenida acerca de esta molécula se refiere básicamente a la subunidad pesada de 170 KDa, de la cual, se ha reportado que anticuerpos dirigidos contra la subunidad de 170 KDa en una dilución 1:100 inhiben un 100 % la adherencia amibiana a células CHO (Petri 1989). Aunadas a la adherencia se han encontrado al menos dos funciones adicionales a esta molécula; usando

anticuerpos monoclonales, han sido identificados fragmentos de la lectina que están involucrados en la resistencia amibiana al complemento (Braga 1992) y la estimulación de la producción de Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) por los macrófagos (Séguin 1995). Cuando se examinó la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con disentería amibiana (DA) y AHA a una proteína recombinante que contenía una porción de la subunidad de 170 KDa (170CR), se observó que en un número significativo de pacientes con DA y AHA existía proliferación celular cuando se ponían en contacto con la molécula 170CR y contrariamente, individuos de regiones no endémicas para amibiasis no respondían a la molécula 170CR. Lotter y cols. obtuvieron fragmentos que codificaban las secuencias de aminoácidos de 1-436, 436-624, 799-939 y 939-1,053 de la proteína de 170 KDa, estos fragmentos fueron producidos, purificados y administrados a conejos y gerbos, encontrando que el fragmento con la secuencia de 939-1053 aminoácidos presentaba un mayor grado de protección, con lo que sugieren que este fragmento debe ser parte de una vacuna que prevendría la enfermedad amibiana, más que prevenir la colonización amibiana del intestino (Lotter 1997). El dominio de reconocimiento del carbohidrato (CRD) de esta lectina, fue identificado por clonación dentro de la región rica en cisteína de la cadena pesada, este dominio tiene una secuencia de identidad al dominio del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y compitió con el HGF por la unión a su receptor en un modelo animal de enfermedad invasiva, la inmunización con el CRD inhibió la formación de abscesos en el hígado (Dodson 1999).

Una proteína de 220 KDa con propiedades de lectina, que contiene un 9 % del peso en carbohidratos y es rica en residuos hidrofóbicos fue purificada, esta proteína tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos y esta aglutinación es inhibida por concentraciones micromolares de ácido hialurónico, quitina y productos derivados de la quitina (Rosales-Encina 1987)

1.12 Enzimas

Diversas enzimas han sido identificadas en *E. histolytica*. Dentro de las enzimas principalmente asociadas a patogenicidad encontramos a las colagenasas, las cuales aparentemente se encuentran localizadas en la membrana plasmática del parásito, estas enzimas son capaces de digerir la colágena nativa de los tipos I y III, aunque son más activas contra las tipo I (Muñoz 1984). Observaciones llevadas a cabo por microscopía electrónica, han mostrado la formación y liberación de cuerpos densos provenientes de la membrana plasmática en forma simultánea con la acumulación intracelular y liberación extracelular de colagenasas, además, se ha observado una correlación entre la virulencia y la actividad colagenolítica, reportándose una actividad enzimática superior en las cepas virulentas, comparadas con las menos virulentas (Martínez-Palomo 1987).

Entamoeba histolytica muestra una elevada actividad en cuanto a las ATPasas. Estas enzimas están fuertemente unidas a la membrana amibiana y tienen una actividad máxima a un pH de 8.8, son dependientes de concentraciones micromolares de calcio y no requieren magnesio en contraste con la mayoría de las ATPasas (Aley 1980).

La actividad de fosfolipasa A de las preparaciones amibianas solubles, ha sido medida por la cuantificación de la producción de ácidos grasos a partir de fosfolípidos. Se han identificado dos enzimas con actividad de fosfolipasa A, una está unida a la membrana y es calcio-dependiente, con una actividad máxima a un pH 8.5. La otra enzima es calcio-independiente y tiene una actividad óptima a un pH de 4.5 (Long-Krug 1985).

Se ha reportado que una neuraminidasa de superficie de *E. histolytica* es capaz de liberar ácido N-acetil neuramínico (NANA) de N-acetilneuramilactosa o mucina al medio, se encontró que más del 50 % de la actividad se encuentra en la membrana plasmática, la cual tiene seis veces más actividad que la neuraminidasa que se encuentra en las membranas internas. La citocalasina D que es una droga

que afecta la organización de los microfilamentos, es capaz de afectar la distribución celular de la enzima, al aumentar su concentración en las membranas internas y ocasionar la pérdida de actividad en la membrana plasmática (Udezulu 1987).

1.13 Proteasas

El principal factor de virulencia que diferencia a *E. histolytica* de *E. dispar*, son las proteasas neutras de cisteína. Los aislados clínicos de *E. histolytica* presentan significativamente más actividad de proteasas de cisteína y contienen genes únicos para la proteasas de cisteína (Reed 1993). Las proteasas de cisteína, son las proteasas más abundantes en *E. histolytica*. Aunque se han descrito una amplia variedad de proteasas con diferentes movilidades electroforéticas, son tres las más frecuentemente descritas con pesos moleculares de 16, 26-29 y 56 KDa respectivamente y su capacidad proteolítica puede ser aumentada por la presencia de reactivos que ocasionan la formación de grupos sulfhidrilo libres como el SDS, β -Mercaptoetanol, 1,4 ditiotreitól y cisteína (Pérez-Monfort 1987). Los principales sustratos sobre los que actúan estas proteasas son: colágenos tipo I, IV y V, laminina, fibronectina, azocaseína y hemoglobina (Keene 1986). Se ha descrito una correlación entre la virulencia y la actividad proteolítica, debido a que se ha encontrado mayor actividad proteolítica en las cepas virulentas que en las cepas menos virulentas (Keene 1986).

Recientemente se ha demostrado que estas proteasas neutras de cisteína, son capaces de degradar la matriz extracelular incluyendo el colágeno y la elastina y algunos componentes del complemento, como lo son el C3a y el C5a, además de activar el complemento al provocar la escisión del C3 (Keene 1986, Reed 1995), por otro lado las proteasas que se encuentran en los lisados amibianos tienen la capacidad de degradar la IgA (Kelsall 1986). Otro punto extremadamente importante a resaltar con respecto a estas proteasas, es que se

demonstró que también son capaces de degradar a la IgG, previniendo su unión a los antígenos amibianos de superficie, propiedad que puede explicarnos de cierta manera la poca efectividad de la respuesta humoral contra la amibiasis (Tran 1998).

1.14 Proteínas Formadoras de Poro

Se ha observado proteínas asociadas a la membrana de *E. histolytica*, que se incorporan espontáneamente a la bicapa lipídica e inducen cambios de conductividad en las membranas blanco (Leippe 1994). Cuando estas proteínas se incorporan en la bicapa lipídica, forman un canal con un diámetro interno de 2 nm. Los cambios en la permeabilidad iónica pueden ser reproducidos en vesículas de doble capa lipídica libre de proteínas, indicando la capacidad que tienen estas moléculas de lisar las células blanco sin necesidad de receptores protéicos (Ojcius 1990).

1.15 Otros Determinantes de Patogenicidad

Entre otros factores que confieren patogenicidad al parásito se encuentran enterotoxinas, sustancias semejantes a neurotransmisores y receptores como el de la fibronectina (Martínez-Palomo 1987, Said-Fernández 1986, Talamas-Rohana 1988). También la capacidad de adherencia a las células blanco y los mecanismos para evadir las defensas del hospedero contribuyen a la patogenicidad de las amibas (Petri 1994).

1.16 Cultivo de *E. histolytica*

En 1904 Musgrave y Clegg, lograron cultivar algunas amibas de vida libre, posteriormente, Boeck y Drbohlav en 1924 lograron desarrollar un medio donde las amibas podían crecer fácilmente, con el inconveniente de que deberían ser cultivadas en presencia de bacterias; fue hasta 1961, cuando Diamond elaboró un medio axénico denominado TPS-1, el cual permitía el cultivo del parásito sin necesidad de asociarlo con ningún otro organismo (Martínez-Palomo 1989), posteriormente, Diamond logró el diseño de un nuevo medio, el cual denominó TYI-S-33, el cual reunía las características de mayor producción de trofozoítos (Diamond 1978). En 1988 Said-Fernández y cols. lograron diseñar un medio de cultivo axénico el cual llamaron PEHPS, que tiene las ventajas de resistir largos periodos de almacenamiento y se podía obtener una mayor cantidad de microorganismo y que por otro lado favorece el enquistamiento de las amibas (Said-Fernández, 1988).

A partir del aislamiento axénico de *E. histolytica*, se iniciaron una serie de estudios para conocer aspectos bioquímicos, fisiológicos, de interacción huésped-parásito y la estandarización de pruebas diagnósticas para amibiasis invasiva.

En el estudio de la amibiasis se han analizado diferentes aspectos, en México, desde el haber encontrado una proteína que media la adhesión de las amibas a las células, denominada adhemiba, los cambios que sufre la membrana amibiana ante la acción de los anticuerpos, así como la respuesta inmune a la infección por este protozoario, la capacidad de las proteasas amibianas para degradar sus propias proteínas al encontrarse en condiciones adversas, además de aspectos importantes como el estudio del establecimiento experimental de la infección en distintos animales de laboratorio (Martínez-Palomo 1987, Arroyo 1986, Calderón 1980, Campos 1986, Perez-Monfort 1987, Tanimoto-Weki 1986, Pérez-Tamayo 1994,).

1.17 Diagnóstico de Amibiasis Intestinal

La principal dificultad para establecer la presencia de *E. histolytica*, se debe a que los métodos de diagnóstico empleados para su detección, por el análisis microscópico de las heces, poseen poco valor práctico (Parelkar 1987), son tardados y tediosos, dependen de la experiencia del técnico que las realiza ya que los quistes de *E. histolytica* pueden ser confundidos con otros parásitos o con detritus, además, existen sustancias que pueden interferir con los exámenes, por ejemplo: Drogas antiparasitarias, preparaciones antidiarréicas y antibióticos (Walsh 1986).

1.18 Diagnóstico de Amibiasis Invasiva

Los primeros intentos para establecer la presencia de anticuerpos específicos en el suero de pacientes con amibiasis, fueron hechos por Dopter en 1905 y por Izar en 1914, ambos emplearon la técnica de fijación del complemento utilizando como antígenos, extractos acuosos de materia fecal o de pus de AHA (Ruiloba 1972). Desde entonces, innumerables investigadores han tratado de encontrar el método más específico y práctico en el diagnóstico de la amibiasis, mediante pruebas serológicas como las de aglutinación en látex, precipitación por difusión en gel, floculación con bentonita, inhibición de la hemaglutinación, contrainmunolectroforesis, inmunofluorescencia y ELISA (Alper 1976, Bos 1976, Krupp 1977, Monroe 1972).

Los resultados obtenidos han sido variables y algunas veces contradictorios, debido a la procedencia y composición del antígeno así como a la técnica empleada, la mayor parte de las pruebas serológicas diagnostican AHA, pero en etapas tempranas de la enfermedad no tienen un 100 % de confiabilidad. Algunas de estas pruebas de diagnóstico no son positivas en el caso de disentería amibiana, a menos que la enfermedad sea extremadamente severa, por lo cual, el

examen directo de heces, con todo y sus desventajas permanece como el estándar de oro para el diagnóstico de amibiasis intestinal (Healy 1986, Muñoz 1989). Una dificultad importante, la constituye la degradación de los extractos amibianos por las propias proteasas amibianas (Pérez-Monfort 1986, Ávila 1985) lo cual dificulta estandarizar técnicas de diagnóstico altamente reproducibles. Para disminuir la actividad proteolítica de las proteasas amibianas se usan inhibidores enzimáticos que no son totalmente efectivos. Flores-Castañeda encontró un método para preservar las moléculas antigénicas presentes en extractos de trofozoítos y eliminar la actividad de las proteasas amibianas sin usar inhibidores enzimáticos, este método, permite preservar los antígenos amibianos por periodos prolongados de tiempo sin degradación proteolítica (Flores-Castañeda 1995).

1.19 Diagnóstico de Amibiasis Invasiva por Western Blot

En México, la técnica de hemaglutinación indirecta (IHA), es muy utilizada para diagnosticar la amibiasis invasiva. Sin embargo, presenta la desventaja de que, en ocasiones cuando los pacientes ingresan al hospital con un AHA esta prueba da resultados falsos negativos. Flores-Castañeda diseñó una técnica de alta resolución y sensibilidad para diagnosticar amibiasis invasiva por W B usando los antígenos preservados sin inhibidores enzimáticos (Flores-Castañeda 1995). La estrategia fundamental para la implementación de la prueba de W B, fue la búsqueda e identificación de las moléculas amibianas inmunodominantes, reconocidas exclusivamente por los anticuerpos de pacientes con amibiasis extraintestinal. El patrón está constituido por seis bandas antigénicas de pesos moleculares relativos determinados por SDS-PAGE de 8, 9, 10, 11, 23, 25 y 37 KDa, dicho patrón, no es reconocido por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes sin amibiasis que habitan en una zona endémica, ni por los de sujetos con amibiasis intestinal asintomática, sin antecedentes de haber padecido amibiasis invasiva, pero con coproparasitoscópico

positivo para quistes de *E. histolytica*/*E. dispar*. El patrón exclusivo de amibiasis invasiva ha demostrado ser mejor que la tradicional IHA ya que en estudios previos donde se analizaron sueros de pacientes ingresados al Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con síntomas de AHA, con ecografía para AHA y que respondieron al tratamiento con antiamebianos, se encontraron positivos por las dos técnicas, pero en aquellos sueros de pacientes con AHA y títulos considerados como negativos en IHA (menores a 1:512), se encontró el patrón característico de amibiasis invasiva. Actualmente, este método ha permitido diagnosticar más de 300 pacientes con AHA provenientes del Hospital Universitario.

1.20 Moléculas Inmunodominantes de *E. histolytica* Diagnosticadas por Western Blot

En las moléculas detectadas en el patrón antigénico específico para amibiasis invasiva, se encontró una de peso molecular relativo de 8 KDa que es reconocida exclusivamente por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva, en un 99% de los casos y no es reconocida por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis intestinal asintomática, ni por los de sujetos sanos que habitan en zonas endémicas (Flores-Castañeda 1995, Said-Fernández 1996).

Esta proteína se trató de aislar mediante cromatografía de exclusión molecular, intercambio iónico y precipitación con diferentes sales. A pesar de haber utilizado dichas técnicas no se logró separar esta molécula del resto de las proteínas. Rangel-Orozco realizó el aislamiento del antígeno de 8 KDa a partir de un extracto de *E. histolytica* utilizando isoelectroenfoque en fase líquida (Rangel-Orozco 1994, 1996.) con el cual encontró tres isoformas de la proteína de 8 KDa que fueron separadas a pH de 4.7, 5.9 y 6.7, después de ser aisladas y purificadas se demostró que conservaban su antigenicidad al ser probadas con sueros de

conejos tratados con extractos crudos de *E. histolytica* y por anticuerpos en sueros de pacientes con amibiasis invasiva. A pesar de utilizar el isoelectroenfoque para el aislamiento de estas proteínas, no se lograron obtener cantidades suficientes para realizar investigaciones posteriores.

1.21 Técnicas para el Aislamiento de Proteínas

Por otro lado, se han desarrollado variantes de las técnicas electroforéticas clásicas para procedimientos de electroforesis preparativa, como sistemas de isoelectroenfoque, los cuales tienen la capacidad de aislar rápidamente proteínas a partir de mezclas complejas de proteínas o incluso a partir de extractos crudos en base a la diferencia que existe en los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas a separar, además existe la posibilidad de colectar las proteínas separadas en fracciones individuales.

Otro método de electroforesis preparativa que ha sido recientemente desarrollado, es el método de electroforesis por electroelución continua, el cual tiene la capacidad de aislar componentes de extractos crudos o parcialmente purificados, además, que en el sistema se pueden desarrollar separaciones, tanto en condiciones nativas como condiciones desnaturalizantes y pueden ser separaciones de proteínas en geles de poliacrilamida o de ácidos nucleicos con geles de agarosa. En el caso de purificación de proteínas, se han logrado aislar desde nanogramos hasta miligramos de una molécula en particular. Cuando se usa SDS-PAGE se pueden aislar moléculas que tan solo difieren en un 2 % en cuanto a su peso molecular y en condiciones nativas, se pueden separar moléculas que difieren en su punto isoeléctrico hasta en 0.1 unidades de pH.

Las moléculas aisladas son colectadas en fracciones individuales y están inmediatamente disponibles para cualquier esquema de tratamiento o estudio requerido.

La utilidad de la electroforesis por electroelución continua ha sido demostrada al realizar esquemas de purificación de proteínas de distinto origen y tamaño, ya que mediante este sistema se han aislado proteínas con un peso molecular de 2000 KDa, como es el caso del aislamiento de cantidades en miligramos de la cadena pesada de la miosina provenientes de muestras de tejido muscular humano (Balagopal 1994). Por otro lado también se han logrado aislar proteínas de muy bajo peso molecular, llegando a aislar proteínas de 6 KDa a partir de la expresión en *Escherichia coli* de una proteína de corazón de cerdo (Yao, 1996).

En el caso específico de la utilización de este sistema en la investigación que se desarrolla alrededor de *E. histolytica*, se han logrado aislar péptidos de una de las lectinas que interviene en la adhesión del parásito al las superficies celulares, este péptido fue obtenido a partir de la clonación y posterior expresión en células de *E. coli* con excelentes resultados (Lotter 1997).

1.22 Propósito del Estudio

Por lo anterior, se puede inferir que es factible el aislamiento de la proteína de peso molecular relativo de 8 KDa a partir de la fracción IC:MC obtenida de trofozoítos liofilizados de *E. histolytica*, ya que es de vital importancia la obtención de esta proteína en forma aislada, para utilizarse en investigaciones posteriores que permitirían conocer mas acerca del papel que juega esta molécula en la infección y posterior invasión de tejidos causados por *E. histolytica*.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Aislar bandas electroforéticas de un extracto de *E. histolytica*, en electroforesis por electroeleución continua.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Obtener la fracción IC:MC a partir de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.
- 2.2.2 Aislar proteínas amibianas a partir de la fracción IC:MC mediante electroforesis por electroeleución continua, en geles de poliacrilamida.
- 2.2.3 Comprobar la presencia de las proteínas aisladas mediante SDS-PAGE y Western Blot.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Origen de los Reactivos

Los reactivos utilizados en presente trabajo de investigación fueron adquiridos de distintas fuentes.

Acrilamida, persulfato de amonio, temed, 2-mercaptoetanol, azul de Coomassie R-250 y G-250, Papel de nitrocelulosa fueron adquiridos de la casa comercial Bio-Rad (Hercules, Ca. USA).

Cajas de plástico para cultivo celular de los modelos Nunclon delta y Nunclon delta triple flask (Roskilde, Dinamarca).

Las gamaglobulinas anti-humanas producidas en cabra y conjugadas con peroxidasa, albúmina sérica bovina, tris (hidroximetil) aminometano, SDS y N-N'-metilen-bisacrilamida, Tween 20, Tetraclorhidrato de 3'3' diaminobencidina, Marcadores de peso molecular de amplio rango de SIGMA-Aldrich (St, Louis Mo. USA).

De la compañía Merck (México) fueron el glicerol, etanol, metanol, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio y peróxido de hidrógeno.

La glicina provino de ICN Pharmaceuticals (Costa Mesa, Ca. USA), el azul de bromofenol de MCIB (Norwood, Oh. USA), la gelatina de pescado de Norland Products (New Brunswick NJ USA), el ácido fosfórico de analytika (México), el fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio de Analit reactivo

(México) y la leche descremada de Nestlé (México). El suero bovino de adulto y la mezcla vitamínica de Microlab (México, D.F.), el nitrógeno de Praxair (México).

3.2 Equipo

Cámaras de electroforesis Protean xi II cell, Mini-protean, Prep cell 491, bomba de recirculación de buffer, Fuentes de poder Power Pac 200 y Power Pac 1000 y Cámara de electrotransferencia Trans blot cell de Bio-Rad (Hercules Ca. USA), agitador horizontal red rocker Hoefer, Fuente de poder EPS 500/400, Bomba peristáltica P-1 y Colector de fracciones Fracc 100 de Pharmacia (Uppsala, Suecia), Agitadores magnéticos Corning (Corning, NY. USA), Termoagitador Magnético Pyro-magnestir Lab-line, Incubadora Water Jacketed CI-46, congelador y ultracongelador Cryo Fridge y agitador modelo super mixer II de American Scientific Products (Macgaw Il. USA), Campana de bioseguridad clase II y liofilizadora Lyph Lock 4.5 Labconco (Kansas City, Mo. USA), Balanza digital modelo AC 120 S Sartorius (Camibh Göttingen, Alemania), Micropipetas Pipetman Gilson de Rainin instruments Co. (Emerville, Ca. USA) y micropipetas Eppendorf (Alemania), microscopio invertido Carl Zeiss (Alemania), fabricante comercial de hielo Ross Temp (Mason City, IA. USA), potenciómetro modelo 611 Orion Research (Cambridge, Mass. USA), centrífuga refrigerada, celda de ultrafiltración a presión modelo 8003 y sistema de conducción de nitrógeno para celda de ultrafiltración de Amicon (Bedford, Ma. USA), espectrofotómetro UV-Visible modelo Milton Roy (USA), fotocolorímetro modelo Sequoia Turner (USA).

3.3 Origen de la Cepa de *E. histolytica*

Los trofozoítos fueron cultivados en nuestro laboratorio y originalmente provenían de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1:IMSS, proporcionados por el Dr. Armando Isibasi Araujo de la Unidad de Investigación en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

3.4 Cultivo de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* se cultivaron en medio axénico TYI-S-33 de Diamond (Diamond 1978).

3.4.1 Preparación de la base del medio TYI.

Para preparar la base TYI, se pesaron las siguientes sustancias: 1.0 g de fosfato dibásico de potasio, 0.6 g de fosfato monobásico de potasio, 2.0 g de cloruro de sodio, 20.0 g de peptona de caseína digerida, 10.0 g de extracto de levadura, 10.0 g de glucosa, 1.0 g de clorhidrato de L-cisteína, 0.2 g de ácido ascórbico y 22.8 mg de citrato de amonio férrico. Posteriormente, se disolvieron en un volumen final de 800 mL de agua destilada o desionizada y se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio 1N.

Se colocaron 11 mL de la base TYI en tubos de borosilicato de 16 x 125 mm con tapón de rosca y fondo redondo, después se procedió a esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min.

3.4.2 Preparación de la Mezcla Vitamínica # 18.

Para la mezcla vitamínica #18, se deben preparar las siguientes soluciones:

- A. Pesar 45.0 mg de niacinamida, 4.0 mg de clorhidrato de piridoxal, 23.0 mg de pantotenato de calcio, 5.0 mg de clorhidrato de tiamina y 1.2 mg de vitamina B12. Se disuelven y se llevan a un volumen final de 25 mL con agua destilada.
- B. Disolver 7.0 mg de Riboflavina en agua utilizando la mínima cantidad de Hidróxido de sodio 0.1 N y llevar a un volumen final de 45 mL con agua destilada.
- C. Disolver 5.5 mg de Ácido fólico en agua utilizando la mínima cantidad de Hidróxido de sodio 0.1 N y llevar a un volumen final de 45 mL con agua destilada.
- D. Disolver 2.0 mg de D-Biotina en agua y llevar a un volumen final de 45 mL con agua destilada.
- E. Disolver 1.0 mg de DL-6-8 Ácido tióctico en 5 mL de etanol al 95 %, agregar 500 mg de Tween 80 y llevar a un volumen final de 30 mL con agua destilada.

Mezclar las soluciones A, B, C y D, homogenizar, posteriormente agregar la solución E y llevar a un volumen final de 200 mL con agua destilada. La mezcla vitamínica obtenida debe ser esterilizada utilizando filtro de 0.22 μm .

3.4.3 Preparación del Medio de Cultivo TYI-S-33.

Para la preparación del medio de cultivo TYI-S-33, se agregaron 0.25 mL de la mezcla vitamínica # 18 y 1.0 mL de suero bovino adulto a cada uno de los tubos de borosilicato de 16 x 125 mm y fondo redondo conteniendo la base TYI.

3.4.4 Resiembra de Trofozoítos de *E. histolytica*

1. Colocar en baño de hielo durante 5 minutos, los tubos conteniendo el cultivo de *E. histolytica* en fase logarítmica.
2. Invertir los tubos varias veces y homogenizar el contenido.

3. Inocular asépticamente los medios con TYI-S-33, agregándoles 2 mL del medio de cultivo de *E. histolytica*.
4. Incubar los tubos a 36.6 °C de temperatura y con una inclinación de 5° con respecto al eje horizontal, durante 72-96 horas.

3.4.5 Obtención de Trofozoítos de *E. histolytica*.

1. Los tubos y botellas conteniendo el cultivo de amibas se sometieron a un baño de hielo por un lapso de 5 min.
2. Homogenizar por inversión el contenido de los tubos y botellas y vaciarlos en tubos cónicos de 50 mL para centrifuga.
3. Centrifugar en frío 10 min. a 1500 r.p.m.
4. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento.

3.4.6 Liofilización de Trofozoítos de *E. histolytica* Congelados.

1. Encender la liofilizadora y esperar a que la cantidad de vacío formada sea la adecuada.
2. Colocar con mucha precaución, los viales conteniendo los trofozoítos de *E. histolytica* congelados.
3. Permitir que el proceso de secado se realice hasta que la muestra haya sido correctamente liofilizada.
4. Sellar correctamente los viales conteniendo el material de *E. histolytica* hasta que la preservación de los antígenos amibianos se realice.

3.4.7 Lavado de Material Utilizado en el Cultivo de *E. histolytica*.

1. Lavar con extrán las pipetas, tubos y botellas de vidrio a utilizar en el cultivo de *E. histolytica*.

2. Enjuagar con agua corriente y escurrir.
3. Colocar el material en una solución de cloro al 1 % durante 12-24 horas.
4. Enjuagar con agua corriente y escurrir.
5. Colocar el material en una solución de ácido clorhídrico al 1 % durante 12-24 horas.
6. Lavar con abundante agua corriente y posteriormente con agua destilada.
7. Secar los tubos en el horno a 180 °C de temperatura durante 1 hora.

3.5 Preservación de Antígenos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* se preservaron antigénicamente para evitar la degradación proteolítica de acuerdo a la patente de Flores-Castañeda, obteniéndose la fracción IC:MC, que se caracteriza por poseer baja actividad proteolítica y antígenos estables por periodos de tiempo prolongados (Flores-Castañeda 1995).

3.6 Determinación de la Concentración de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método descrito por Bradford en 1976. Este método emplea como colorante el azul brillante de Coomassie G-250 (CBB G-250) cuya unión con las proteínas puede ser medida espectrofotométricamente determinando su absorbancia a 595 nm.

Este procedimiento es muy sensible trabajando en el rango de 0.2 - 1.4 mg de proteína por mL para el ensayo estándar y de 5 - 100 mg de proteína por mL en el microensayo.

3.6.1 Procedimiento Estándar.

1. Preparar un stock de albúmina sérica bovina (ASB stock) a una concentración de 1 mg/mL de proteína.
2. Preparar una serie de estándares de albúmina de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL de proteína para realizar una curva de calibración.
3. Colocar 100 μ L de los estándares de albúmina preparados anteriormente y de la muestra problema (conteniendo de μ g/mL de proteína) en tubos de vidrio de 13 x 100 mm.
4. Agregar 5.0 mL de reactivo de Bradford a cada uno de los tubos incluidos en el ensayo.
5. Homogenizar correctamente.
6. Dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.
7. Medir la absorbancia a 595 nm contra un blanco preparado con 0.1 mL de PBS y 5.0 mL de reactivo de Bradford.

3.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las electroforesis de la fracción IC:MC se realizó en geles de poliacrilamida en gradiente lineal de 12 a 18 %T con modificaciones a la técnica de Maizel (Maizel 1971), se usaron geles de empaquetamiento y separación.

3.7.1 Preparación de Geles.

Tabla 1

Preparación de Gel de Separación de Poliacrilamida 12 % T/2.67 % C.

Reactivos	12%
Solución Acrilamida/bisacrilamida 30 % T/ 2.67 % C.	2.8 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8.	1.32 mL
Glicerol al 50 %.	480 μ L
Agua MilliQ.	2.272 mL
SDS al 20 %.	34 μ L
Persulfato de amonio al 10 %.	12.5 μ L
Temed.	5 μ L

Tabla 2

Preparación de Gel de Poliacrilamida en Gradiente Lineal 12 - 18 % T/ 2.67 % C.

Reactivos	12%	18 %
Solución Acrilamida/bisacrilamida 30 % T/ 2.67 % C.	2.8 mL	4.197 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8.	1.32 mL	1.32 mL
Glicerol al 50 %.	480 μ L	740 μ L
Agua MilliQ.	2.272 mL	657 μ L
SDS al 20 %.	34 μ L	34 μ L
Persulfato de amonio al 10 %.	12.5 μ L	12.5 μ L
Temed.	5 μ L	5 μ L

Tabla 3

Preparación de Gel de Empaquetamiento de Poliacrilamida 5 % T/2.67 % C.

Reactivos	Cantidad
Solución Acrilamida/bisacrilamida 30 % T/ 2.67 % C.	3.4 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.08 mL
Agua MilliQ	14.4 mL
SDS al 20 %	100 μ L
Persulfato de amonio al 10 %	50 μ L
Temed	20 μ L

3.7.2 Corrimiento de la Electroforesis.

1. Se aplicó la fracción IC:MC amortiguador de muestra 2X conteniendo Tris-HCl 1.5 M pH 8.3, glicerol , SDS, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol.
2. Se hirvió en un baño de agua por un lapso de tiempo de acuerdo a condiciones estandarizadas.
3. Se colocó en concentración determinada en el gel de empaquetamiento.
4. Se aplicó la corriente necesaria de acuerdo a las condiciones estandarizadas.

3.8 Tinción de Geles con Azul de Coomassie

De los geles preparados una sección de cada gel fue teñida con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0.1% en metanol, ácido acético y agua bidestilada.

1. Se colocó el gel a teñir en un recipiente con la solución de tinción por un lapso mínimo de 3 horas o toda la noche.

2. Se destiñó el gel con varios lavados con una solución de metanol, ácido acético y agua bidestilada hasta que se observaron visualmente las bandas.

3.9 Inmunoelectrotransferencia o Western Blot

Las muestras para WB se sometieron a un proceso de SDS-PAGE y posteriormente transferidos a papel de nitrocelulosa en una cámara de electrotransferencia Trans-Blot[®] de Bio-Rad.

3.9.1 Electrotransferencia.

1. Los geles en los cuales se llevó a cabo el corrimiento electroforético se colocaron en un sandwich con el papel de nitrocelulosa y papel filtro.
2. Se colocó el sandwich en la cámara de electrotransferencia con la cantidad adecuada de buffer de transferencia Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM (Metanol al 20 %).
3. Se aplicó la corriente necesaria para llevar a cabo la transferencia de las proteínas de los geles de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa.
4. Se dejó correr el tiempo necesario para que se llevara a cabo la transferencia de las proteínas.
5. Transcurrido el tiempo se desconectó el sistema y se sacaron los papeles de nitrocelulosa y se dejaron secar al aire sobre un papel filtro.

3.9.2 Western Blot.

1. Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó en una solución bloqueadora de PBS 0.15 M pH 7.2-7.4 con albúmina sérica bovina y leche descremada al 1 %.

2. Se realizaron 3 lavados con una solución de PBS, Tween 20 1:1000 y gelatina de pescado al 0.5 % (solución de lavado).
3. El papel de nitrocelulosa ya bloqueado se puso a reaccionar con los sueros a analizar diluidos en una solución de PBS, tween 20 1:1000 y gelatina de pescado al 1.5 %.
4. Se incubaron los papeles de nitrocelulosa por el tiempo y a las condiciones estandarizadas.
5. Se realizaron 3 lavados con la solución de lavado.
6. Se añadió un conjugado polivalente de anti-inmunoglobulinas humanas, desarrollados en cabra conjugadas con peroxidasa, el cual fue diluido en una solución de PBS, tween 20, y gelatina de pescado al 1.5 %.
7. Se incubaron los papeles de nitrocelulosa por el tiempo y a las condiciones estandarizadas.
8. Se realizaron 3 lavados con la solución de lavado.
9. Se hizo reaccionar con la solución de revelado que contenía PBS, el sustrato peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3-diaminobencidina. De acuerdo a Flores-Castañeda (Flores-Castañeda 1995).

3.10 Aislamiento de la Proteína de 8 KDa

3.10.1 Preparación de Geles.

Como primer paso en el aislamiento de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, era indispensable la preparación de los geles a utilizar, los cálculos se prepararon de la siguiente manera:

Tabla 4

Preparación del Geles de Separación del de Poliacrilamida Prep Cell 491.

REACTIVO	6 % T	20 % T
Solución Acrilamida/bisacrilamida 30 % T/ 2.67 % C.	4 mL	13.333 mL
Tris-HCL 1.5 M pH 8.8	5 mL	5 mL
Agua MilliQ	10.945 mL	1.612 mL
Persulfato de Amonio 10 %	50 μ L	50 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L

Tabla 5

Preparación del Geles de Empaquetamiento de poliacrilamida del Prep Cell 491.

REACTIVO	4 % T	6 % T
Solución Acrilamida/bisacrilamida 30 % T/ 2.67 % C.	650 μ L	975 μ L
Tris-HCL 0.5 M pH 6.8	1250 μ L	1250 μ L
Agua MilliQ	3100 μ L	2775 μ L
Persulfato de Amonio 10 %	50 μ L	50 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

El aislamiento de la proteína de 8 KDa de *E. histolytica*, se realizó utilizando el método de electroforesis preparativa por electroelución continua, con un gel de empaquetamiento al 6 % T/2.67 % C y gel de separación al 20 % T/2.67 % C por medio del sistema 491 Prep Cell de Bio Rad, basado en la técnica de Laemli (Laemli 1970, Bio-Rad 1685, 1686).

3.10.2 Electroforesis Preparativa.

1. La fracción IC:MC se sometió a reducción con buffer de muestra conteniendo Tris-HCl, glicerol, SDS, β -mercaptoetanol y azul de bromofenol.
2. Se colocó la muestra a purificar en el gel de empaquetamiento.
3. Se aplicó la corriente adecuada para realizar el aislamiento de la proteína de interés.
4. Al llegar el frente de corrimiento al final del gel se procedió a coleccionar fracciones con la ayuda de una bomba peristáltica, con un volumen de 2,5 mL cada una a una velocidad de elución de 1 mL/min.
5. Al obtener el número de fracciones adecuadas, con éstas se hicieron mezclas, las cuales se dializaron y concentraron para posteriormente verificar los resultados de la electroforesis por SDS-PAGE y WB.

3.10.3 Lectura Espectrofotométrica de las Fracciones Obtenidas.

Después de haber realizado el corrimiento de la fracción IC:MC en electroforesis preparativa en electroelución continua, todas las fracciones eluidas fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Milton Roy (USA). Las absorbancias obtenidas fueron graficadas con el propósito de conocer como se llevó a cabo la elución de las proteínas.

3.10.4 Concentración de las Fracciones Obtenidas.

Para llevar a cabo la concentración de las fracciones obtenidas en la electroforesis preparativa, se procedió de la siguiente manera:

3.11 Evaluación de Resultados

1. Con las fracciones obtenidas se hicieron mezclas, las cuales fueron colocadas en viales de liofilización, con el propósito de llevar a cabo el proceso de liofilización.
2. Las mezclas se congelaron a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Ya congeladas los viales se sometieron a liofilización hasta obtener sequedad total en los mezclas.
4. Después de liofilizados los viales, se resuspendió el polvo en la mínima cantidad de agua bidestilada.
5. Las mezclas resuspendidas se aplicaron en una celda de diálisis y concentración modelo 80003 de Amicon® con una membrana con poro de 3 KDa.
6. Se aplicó la presión necesaria por medio de nitrógeno, para lograr la filtración de la muestra a través de la membrana, hasta tener en la celda un volumen entre 0.5 y 1.0 mL.
7. Después de llevar a cabo la concentración, se añadió agua bidestilada para realizar de nuevo el proceso de concentración.
8. Después de realizar de nuevo la concentración se obtuvieron entre 0.5 y 1.0 mL de muestra, a los cuales nuevamente les fué añadida agua bidestilada y se procedieron a concentrar.
9. Después de llevar a cabo el tercer proceso de concentración y llevarse a un volumen de alrededor de 1 mL, las muestras fueron llevadas a sequedad por medio del proceso de centrifugación al vacío.
10. Después de llevar a cabo la centrifugación al vacío, las muestras estaban listas para ser probadas por SDS-PAGE y WB.

3.11 Evaluación de Resultados

Para evaluar la presencia de la proteína de 8 KDa, se procedió a probar las fracciones en que se encontraba la proteína aislada contra sueros de pacientes con amibiasis invasiva, diversas hepatopatías, sujetos parasitados por *E. histolytica/E. dispar* analizados por exámenes coproparasitoscópicos (Rodríguez-Pérez, 1999) y contra el sueros de sujetos sanos de zona endémica con resultado negativo para la prueba confirmatoria de W B para amibiasis invasiva.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Cultivo de *Entamoeba histolytica* y Obtención de la Fracción IC:MC

En el presente trabajo se cultivó *E. histolytica* axénicamente en el medio TYI-S-33 de Diamond (Diamond 1978) y se obtuvo la fracción IC:MC. La fracción IC:MC fué sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para observar la calidad de los preparados amibianos y descartar que existiera degradación proteolítica.

Como se ha mencionado anteriormente, el método desarrollado por Flores-Castañeda tiene como resultado que los preparados amibianos sometidos a este proceso no presentan degradación proteolítica. Como se puede observar en la figura 1, las bandas proteicas revelan que las fracciones 1, 2 y 3 obtenidas en diferentes tiempos, son de la calidad deseada.

PM KDa

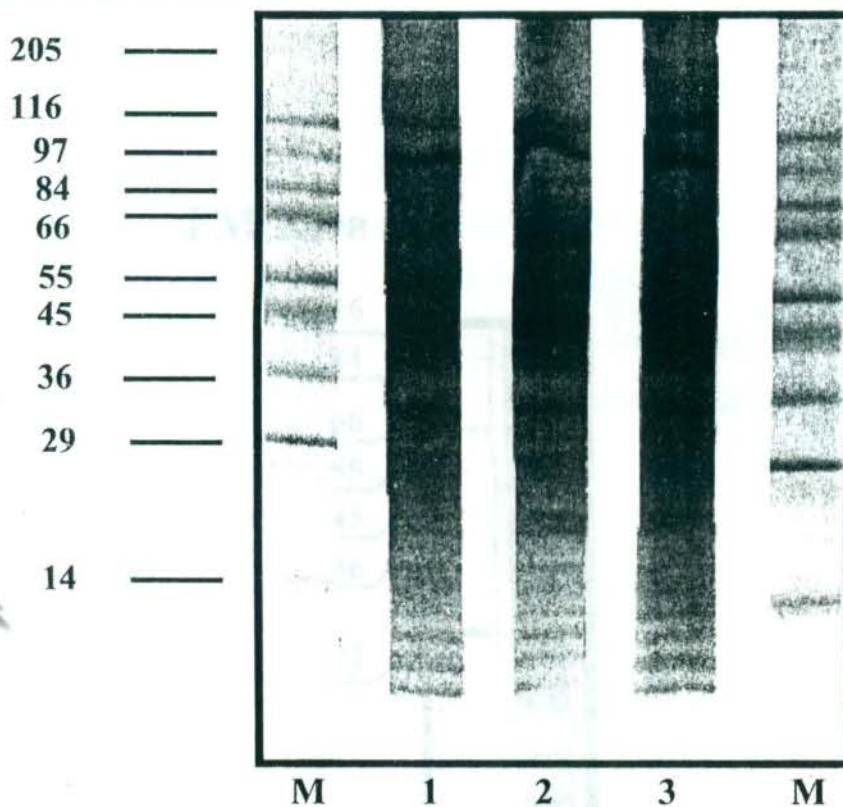


Figura 1.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) en Gradiente Lineal 12-18 % T/2.67 % C de la Fracción IC:MC, teñido con Azul de Coomassie 0.1 %. M, marcadores de peso molecular de amplio rango, Carriles 1, 2, 3 fracción IC:MC obtenidas en diferentes tiempos.

Después de observar que las bandas de proteínas de las fracciones obtenidas se encontraban en condiciones apropiadas para desarrollar el trabajo de investigación, se procedió a realizar el WB para verificar si las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa estaban presentes en las fracciones obtenidas. En la figura 2, se muestra un ejemplo de un WB realizado con una de las fracciones IC:MC de la figura 1. Podemos observar que las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa si estaban presentes en los extractos y con esto se demostró que las fracciones IC:MC obtenidas, son apropiadas para el proceso en el cual se

obtendrá en forma aislada las moléculas de 8 KDa por el método de electroforesis por electroelución continua.

PM KDa

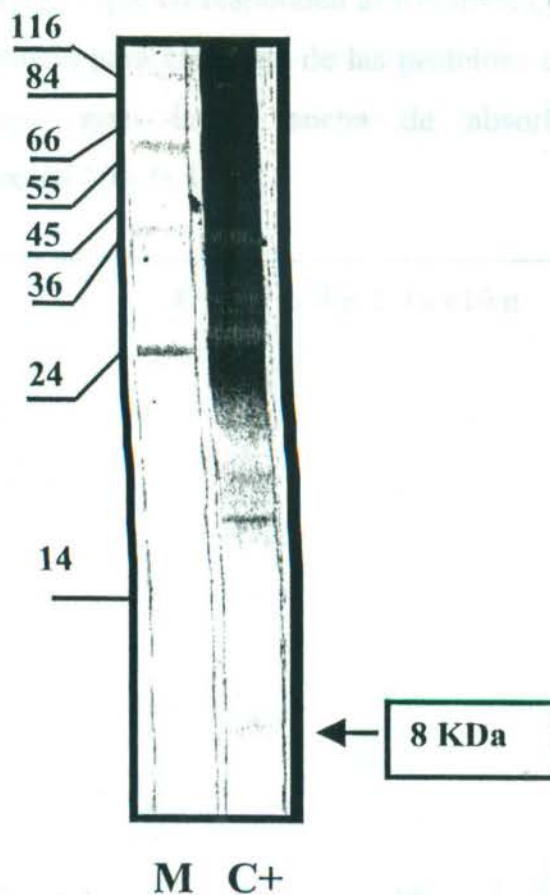


Figura 2.-Western Blot de la fracción IC:MC, revelado con suero de un paciente con amibiasis invasiva. M, marcadores de peso molecular, C+ fracción IC:MC.

4.2. Establecimiento de Tiempos de Elución.

4.2.1 Electroforesis con Marcadores de Peso Molecular Conocido.

Para conocer los tiempos a los cuales eran eluidas las distintas proteínas,

primeramente se procedió a hacer un corrimiento en la celda de electroforesis preparativa, con marcadores de peso molecular conocido, sometidos a un gel de empaquetamiento del 4 % T / 2.67 % C y un gel de separación del 6 % T / 2.67 % C. Se obtuvieron 500 fracciones de 2.5 mL, las cuales fueron leídas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm, obteniéndose la gráfica de la figura 3, en la que se observa que existe un gran pico de absorbancia situado entre las fracciones 2 y 7 que corresponden al frente de corrimiento y que no existen picos de absorbancia para cada una de las proteínas eluidas, sino que solamente se observa una gran banda ancha de absorbancia que va aproximadamente de la fracción 10 a la 110.

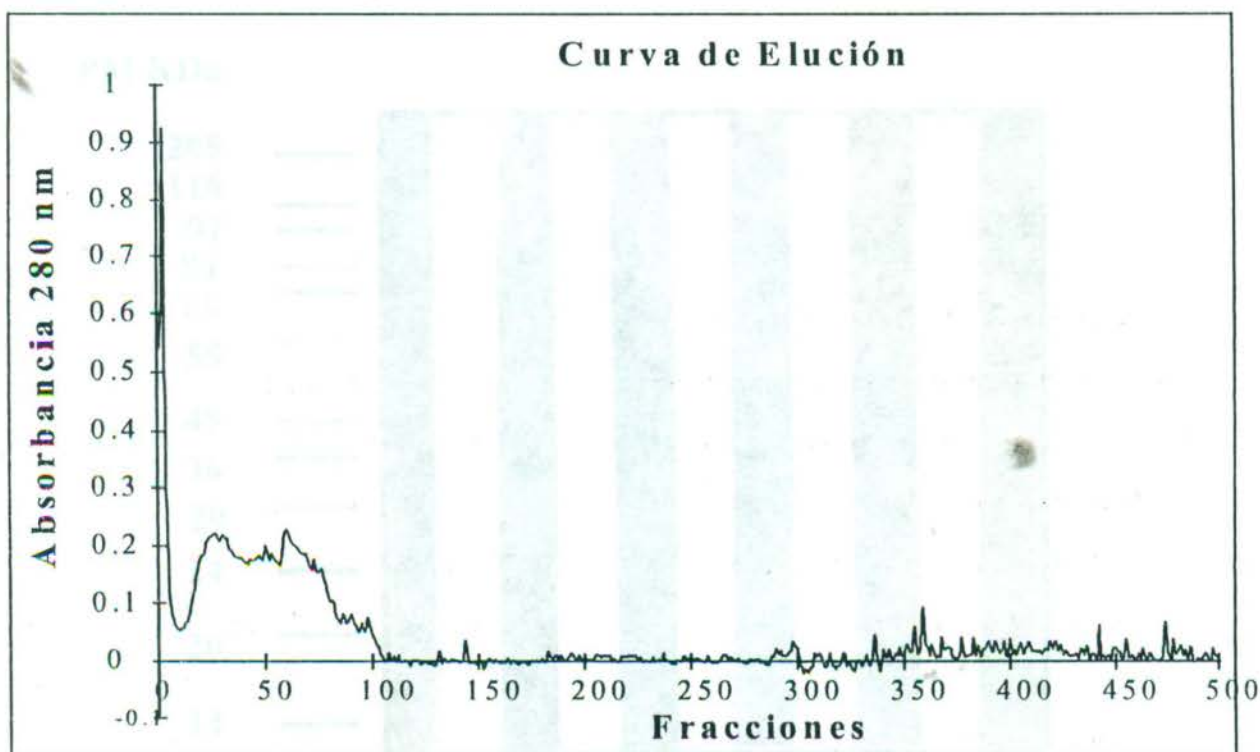


Figura 3.-Gráfica de las lecturas de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas al correr marcadores de peso molecular en una electroforesis preparativa con un gel de empaquetamiento del 4 % T / 2.67 % C y un gel de separación del 6 % T / 2.67 % C.

Después de haber realizado la electroforesis de los marcadores de peso molecular se hicieron mezclas de cada 5 fracciones, posteriormente estas mezclas se dializaron y concentraron a un volumen de 100 μ L, de los cuales se tomó y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida a una concentración del 12 % T / 2.67 % C. Los resultados se muestran en la figura 4. Las concentraciones de los geles de poliacrilamida empleados son muy bajas para realizar la separación de proteínas de bajo peso molecular, y además las mezclas que se hicieron contienen varias bandas proteicas con valores de peso molecular muy separados, lo cual nos hizo pensar en la posibilidad de realizar una electroforesis y analizar cada una de las fracciones por separado sin hacer mezclas.

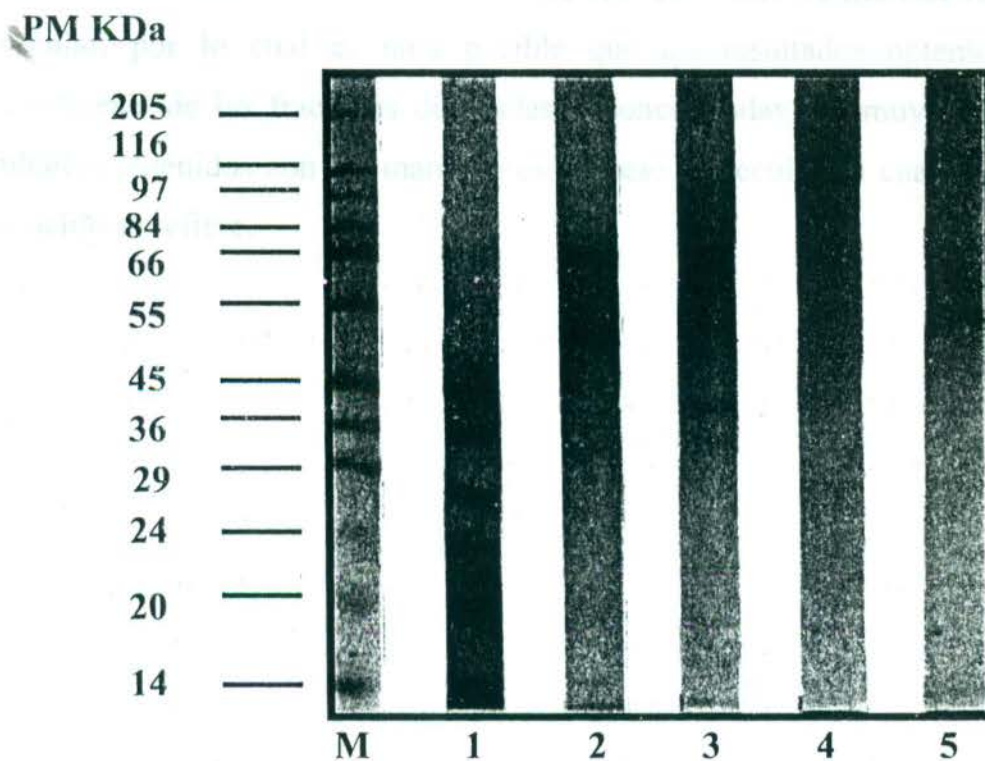


Figura 4.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 % T/2.67 % C de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 6 % T de Marcadores de Peso Molecular de Amplio Rango, teñida con azul de Coomassie 0.1 %. M, marcadores de peso molecular, carril 1 fracciones 1-5, carril 2 fracciones 6-10, carril 3 fracciones 11-15, Carril 4 fracciones 16-20 y carril 5 fracciones 21-25.

4.2.2 Electroforesis de la fracción IC:MC.

Como era de gran importancia conocer en qué fracciones eluían las proteínas de la fracción IC:MC que deberían ser aisladas, se procedió a realizar una electroforesis bajo las mismas condiciones de los marcadores de peso molecular, es decir 4 % T/ 2.67 % C para el gel de empaquetamiento y 6 % T/ 2.67 % C para el gel de separación, pero ahora utilizando la fracción IC:MC.

La gráfica de las lecturas espectrofotométricas de las fracciones se muestran en la figura 5, en donde se aprecia que los resultados de las lecturas de las fracciones obtenidas al correr la electroforesis de la fracción IC:MC son similares a las obtenidas en el experimento realizado con los marcadores de peso molecular, por lo cual es muy posible que los resultados obtenidos en la electroforesis de las fracciones dializadas y concentradas sea muy similar a los resultados obtenidos con los marcadores de peso molecular en cuanto a tiempos de elución se refiere.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

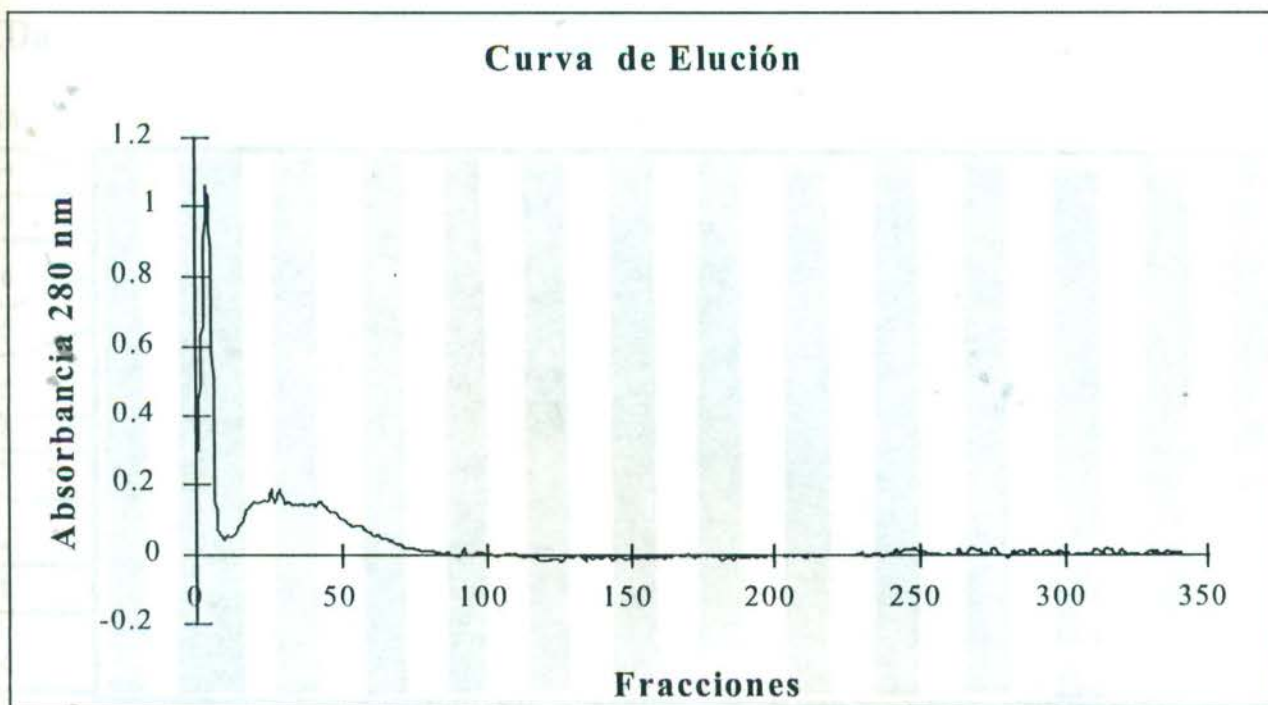


Figura 5.- Gráfica de las lecturas de absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas al correr la fracción IC:MC en una electroforesis preparativa con un gel de empaquetamiento del 4 % T/ 2.67 % C y un gel de separación del 6 % T/ 2.67 % C.

La electroforesis de las fracciones obtenidas del corrimiento de la fracción IC:MC, dializadas y concentradas en un gel de poliacrilamida con una concentración del 12 % T/ 2.67 % C se observa en la figura 6 que aunque sean probadas individualmente, no existe separación de bandas de proteínas del extracto amibiano y aún se encuentran juntas varias bandas en una misma fracción, con lo cual se observan resultados similares a los obtenidos en el corrimiento con marcadores de peso molecular. Con estos resultados se comprueba la imperiosa necesidad de utilizar un gel de electroforesis preparativa con una mayor concentración de acrilamida para lograr el aislamiento de forma óptima de las proteínas de interés para este trabajo.

PM KDa

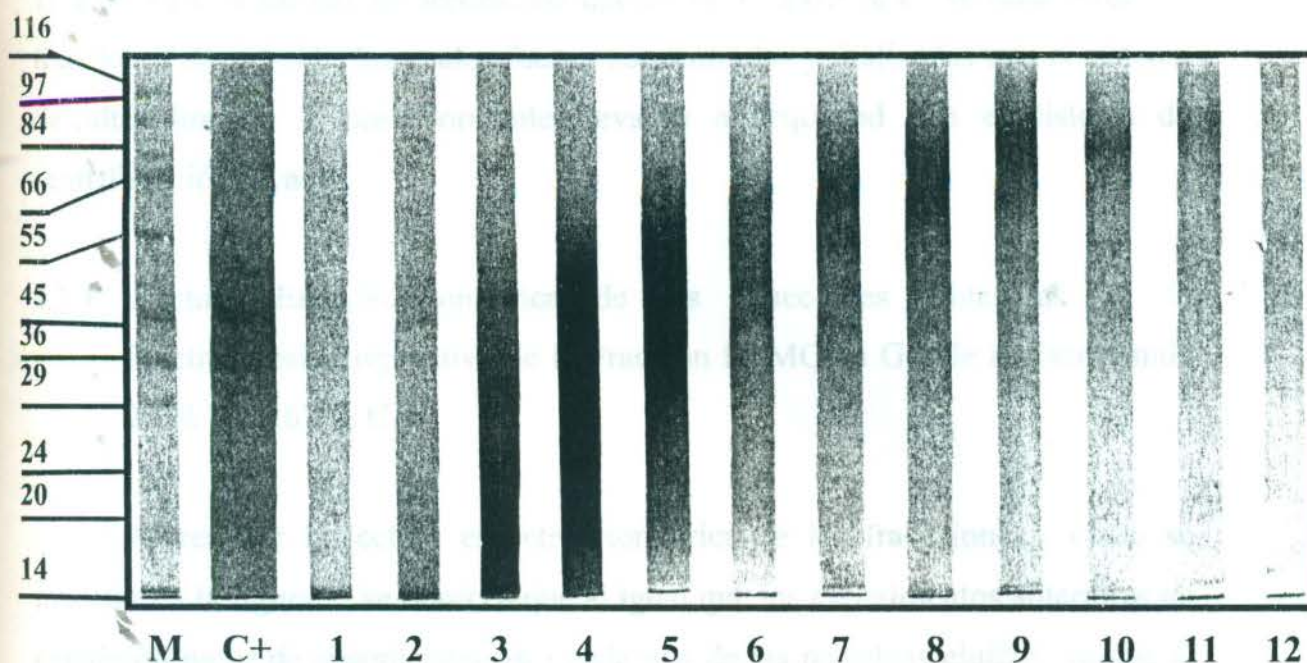


Figura 6.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Bajo Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 % T/2.67 % C de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa al 6 % T de la Fracción IC:MC, teñida con azul de Coomassie 0.1 %. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ antígeno amibiano inicial, carril 1 fracción 1, carril 2 fracción 2, carril 3 fracción 3, carril 4 fracción 4, carril 5 fracción 5, carril 6 fracción 6-7, carril 7 fracción 8-9, carril 8 fracción 10-13, carril 9 fracción 14-17, carril 10 fracción 18-25, carril 11 fracción 26-30 y carril 12 fracción 31-35.

4.3 Aislamiento de las Proteínas de Peso Molecular Relativo de 8 KDa a Partir de la Fracción IC:MC.

Para el aislamiento de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, basándose en el antecedente que existía en el laboratorio de que las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, eran separadas en un gel de poliacrilamida con gradiente lineal de 12 - 18 % T / 2.67 % C, se procedió a utilizar un gel de poliacrilamida con una concentración del 20 % T / 2.67 % C, para llevar a cabo el aislamiento de las proteínas que nos interesaban.

Al ser sometida la fracción IC:MC a un gel de empaquetamiento del 4 % T/ 2.67 % C y un gel de separación del 20 % T/ 2.67 % C, se obtuvieron 95 fracciones de 2.5 mL, las cuales fueron concentradas y dializadas con el sistema de ultrafiltración y posteriormente llevadas a sequedad con el sistema de centrifugación y vacío.

4.3.1 Lectura Espectrofotométrica de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preperativa de la Fracción IC:MC en Gel de Poliacrilamida 20 % T / 2.67 % C.

Al realizar la lectura espectrofotométrica de las fracciones, como se muestra en la figura 7, se observó que al igual que los experimentos anteriores no existieron picos de absorbancia para cada una de las proteínas eluidas, ya que el único pico que se observa es el del frente de corrimiento, que presenta una alta absorbancia. Las proteínas aisladas empezaron a eluir a partir de la fracción 16 en adelante y en la gráfica no se observa que sobresalga en ningún pico de absorbancia.

Curva de Elución

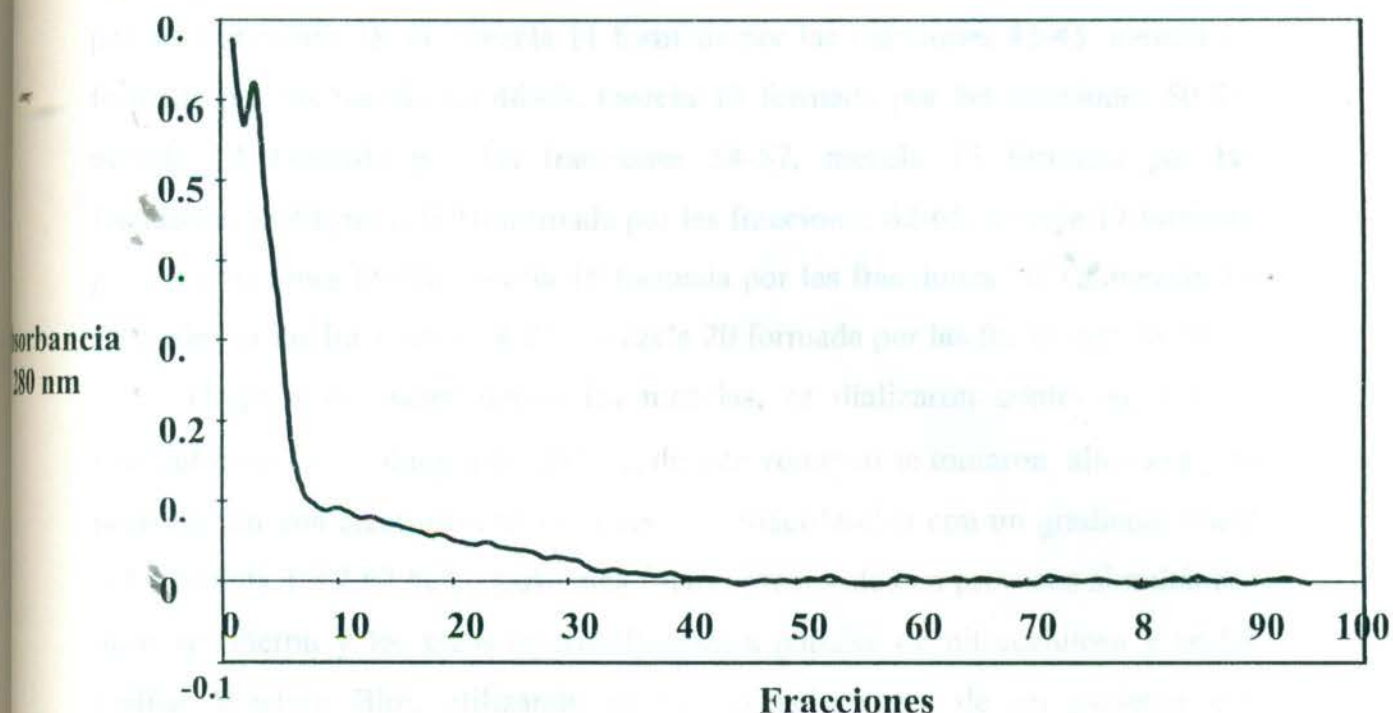


Figura 7.- Lecturas de absorbancia a 280 nm de las 95 fracciones obtenidas al realizar el corrimiento de la fracción IC:MC, en electroforesis preparativa por electroelución continua en gel de poliacrilamida al 20 % T/2.67 % C.

4.3.2 Análisis de las Fracciones 1 a la 21 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.

Las fracciones obtenidas en la electroforesis preparativa de la fracción IC:MC, se colectaron en volúmenes de 2.5 mL y de cada 4 fracciones se hizo una mezcla pool, es decir se hicieron mezclas de 10 mL, a excepción de la mezcla 1 la cual estaba formada por 5 fracciones, en las que era visible la presencia del frente de corrimiento. Al seguir este procedimiento se obtuvieron las mezclas 1 formada por las fracciones 1-5, mezcla 2 formada por las fracciones 6-9, mezcla 3 formada por las fracciones 10-13, mezcla 4 formada por las fracciones 14-17, mezcla 5 formada por las fracciones 18-21, mezcla 6 formada por las fracciones

22-25, mezcla 7 formada por las fracciones 26-29, mezcla 8 formada por las fracciones 30-33, mezcla 9 formada por las fracciones 34-37, mezcla 10 formada por las fracciones 38-41, mezcla 11 formada por las fracciones 42-45, mezcla 12 formada por las fracciones 46-49, mezcla 13 formada por las fracciones 50-53, mezcla 14 formada por las fracciones 54-57, mezcla 15 formada por las fracciones 58-61, mezcla 16 formada por las fracciones 62-65, mezcla 17 formada por las fracciones 66-69, mezcla 18 formada por las fracciones 70-73, mezcla 19 formada por las fracciones 74-77 y mezcla 20 formada por las fracciones 78-81.

Después de haber hecho las mezclas, se dializaron contra agua y se concentraron a un volumen de 100 μ L, de este volumen se tomaron alícuotas y se probaron en una electroforesis en geles de poliacrilamida con un gradiente lineal del 12-18 % T / 2.67 % C. Los geles fueron procesados en procesos simultáneos unos se tiñeron y los otros se transfirieron a papeles de nitrocelulosa y se les realizó Western Blot, utilizando en su revelado suero de un paciente con amibiasis invasiva.

Al someter a SDS-PAGE en gradiente 12-18 % T/2.67 % C la primeras 21 fracciones como se puede observar en la figura 8, en el gel teñido con azul de Coomassie no se encontraron bandas proteicas aisladas en las mezclas probadas, lo que nos demuestra que no hay presencia de proteínas o que se encuentran en concentraciones tan bajas que no puede ser evidenciada su presencia con la tinción de azul de Coomassie, la cual es útil cuando existen concentraciones del orden de microgramos de proteína.

PM KDa

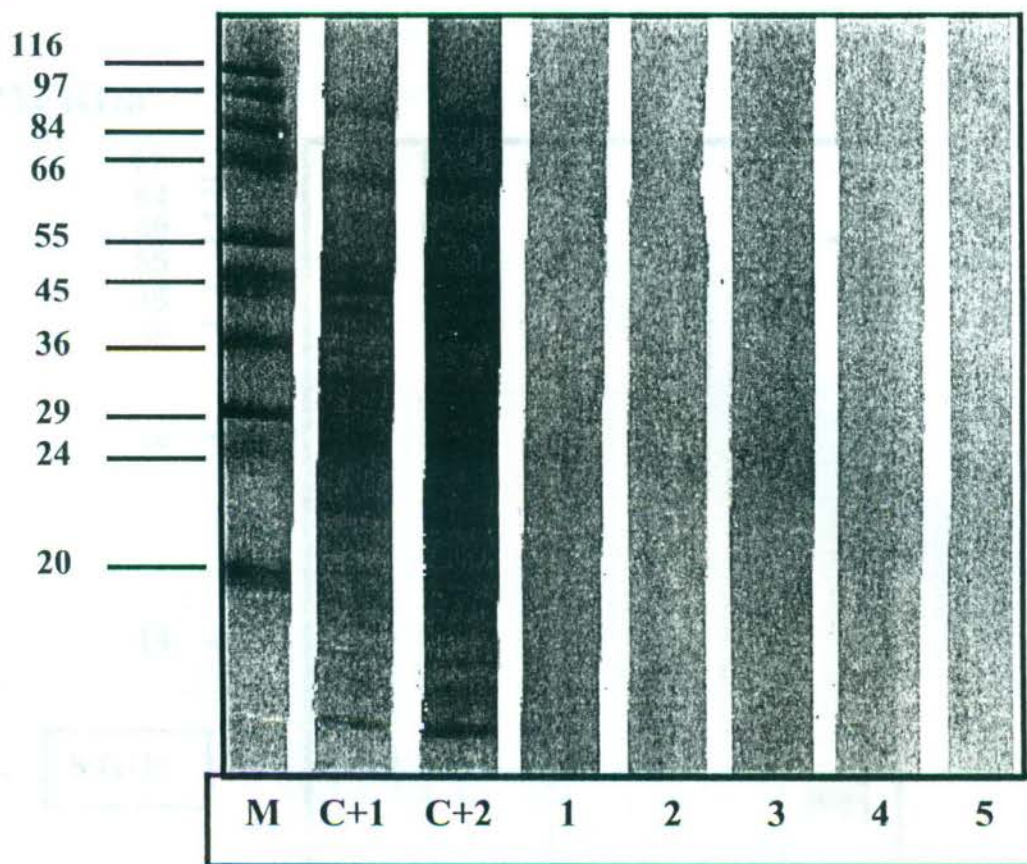


Figura 8- Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en gradiente lineal 12-18 % T/2.67 % C de las fracciones 1-21 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC teñido con azul de Coomassie al 0.1 %. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+1 y C+2 fracción IC:MC a diferentes concentraciones, carril 1 mezcla 1 (fracciones 1-5), carril 2 mezcla 2 (fracciones 6-9), carril 3 mezcla 3 (fracciones 10-13), carril 4 mezcla 4 (fracciones 14-17) y carril 5 mezcla 5 (fracciones 18-21).

Cuando las mezclas de la 1 a la 5 fueron probadas por Western Blot, como se muestra en la figura 9, se demostró la presencia de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa en baja concentración en la mezcla 4 (Fracciones 14-17) y en una concentración superior en la mezcla 5. Estos resultados nos demuestran que las proteínas de nuestro interés eluyeron en las fracciones de la 14 a la 21, además, la concentración a la cual se encuentran aunque no es detectable por el método de tinción de azul de Coomassie, es detectable por

métodos inmunoenzimáticos, los cuales como sabemos, tienen una sensibilidad apreciablemente mayor.

PM KDa

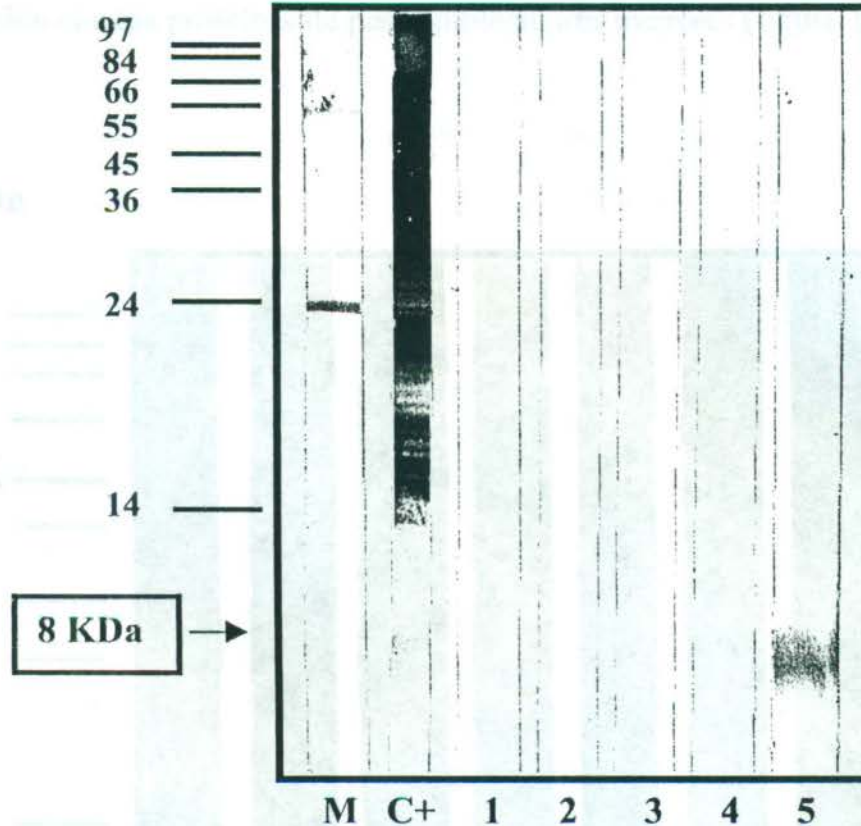


Figura 9- Western Blot de las fracciones 1-21 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, tirilla 1 mezcla 1 (fracciones 1-5), tirilla 2 mezcla 2 (fracciones 6-9), tirilla 3 mezcla 3 (fracciones 10-13), tirilla 4 mezcla 4 (fracciones 14-17) y tirilla 5 mezcla 5 (fracciones 18-21).

4.3.3 Análisis de las Fracciones 22 a la 41 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.

En el SDS-PAGE en gradiente de la mezcla 6 (fracciones 22-25), mezcla 7 (fracciones 26-29), mezcla 8 (fracciones 30-33), mezcla 9 (fracciones 34-37) y mezcla 10 (fracciones 38-41), se observa la presencia de proteínas teñidas por el

método de azul de Coomassie en todas las mezclas, en concentraciones relativamente altas y con pesos moleculares comprendidos entre 9 a 14 KDa. De acuerdo a la movilidad de las bandas, aparentemente se encontraron en mayor concentración las proteínas con pesos moleculares alrededor de 14 KDa en comparación con las proteínas de pesos moleculares menores (figura 10).

PM KDa

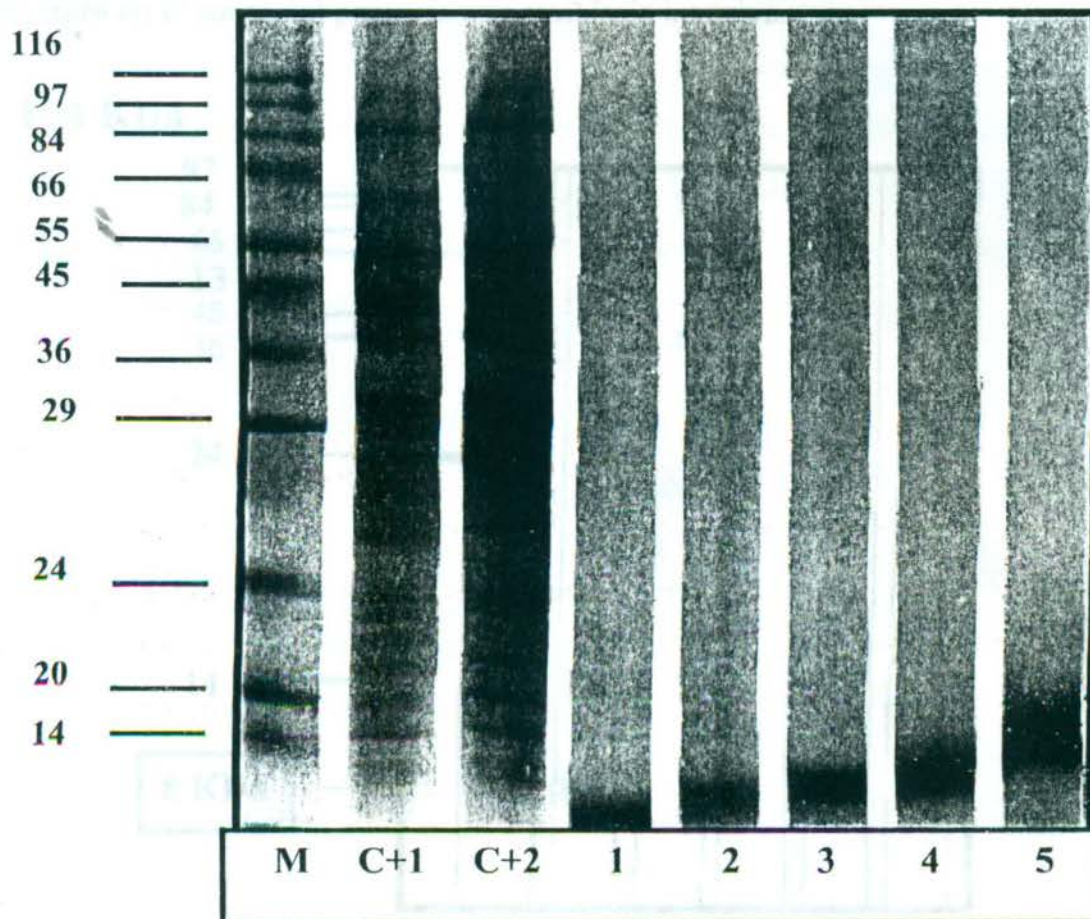


Figura 10- Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en gradiente lineal 12-18 % T/2.67 % C de las mezclas 6-10 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC teñido con azul de Coomassie al 0.1 %. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+1 y C+2 fracción IC:MC a diferentes concentraciones, carril 1 mezcla 6 fracciones 22-25, carril 2 mezcla 7 fracciones 26-29, carril 3 mezcla 8 fracciones 30-33, carril 4 mezcla 9 fracciones 34-37 y carril 5 mezcla 10 fracciones 38-41.

En el Western Blot mostrado en la figura 11 se observa que en las mezclas 6 y 7 aún se encuentran en baja concentración las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, por lo cual se puede inferir que fracciones se encuentran mezcladas con proteínas de pesos moleculares de alrededor de 9 a 11 KDa en las fracciones 22-29. Otro hecho a resaltar es que las proteínas presentes en las mezclas 7, 8 y 9 como se demuestra en la figura 10, se encuentran en grandes concentraciones y no son reconocidas de la misma manera por los anticuerpos presentes en el suero del paciente con amibiasis invasiva.

PM KDa

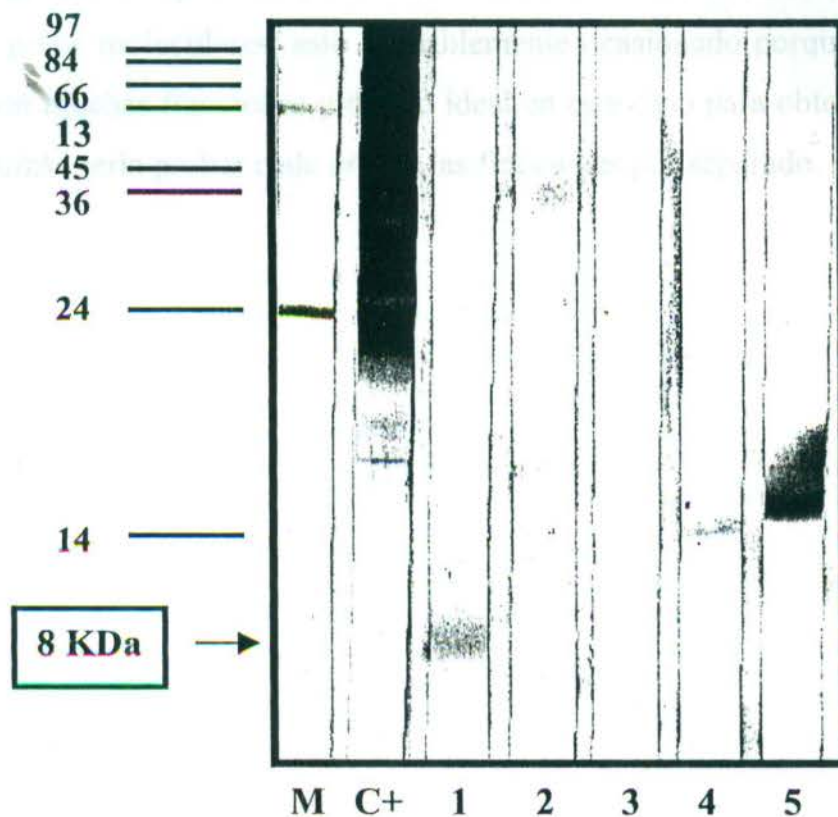


Figura 11- Western Blot de las fracciones 22-41 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, tirilla 1 mezcla 6 fracciones 22-25, tirilla 2 mezcla 7 fracciones 26-29, tirilla 3 mezcla 8 fracciones 30-33, tirilla 4 mezcla 9 fracciones 34-37 y tirilla 5 mezcla 10 fracciones 38-41.

4.3.4 Análisis de las Fracciones 42 a la 61 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.

Como se puede observar en la figura 12, en la mezcla 11 (fracciones 42-45), mezcla 12 (fracciones 46-49), mezcla 13 (fracciones 50-53) mezcla 14 (fracciones 54-57) y mezcla 15 (Fracciones 58-61) obtenidas en la electroforesis preparativa de la fracción IC:MC, se encuentran bandas teñidas intensamente con el azul de Coomassie, lo que indica indirectamente que las proteínas con pesos moleculares relativos que van de alrededor de 14 a 20 KDa, se encuentran en concentraciones relativamente altas. Es importante resaltar que aún cuando se utilizó un gel con un poro muy cerrado se obtuvieron mezclas de proteínas con diferentes pesos moleculares, esto probablemente ocasionado porque se hicieron mezclas con muchas fracciones y que lo ideal en este caso para obtener proteínas aisladas quizás sería probar cada una de las fracciones por separado.

contaminación previa con estas proteínas en alguno de los pasos de la metodología seguida en la realización de estos experimentos o por la presencia de pequeñas proteínas polimerizadas después de haber estado expuestas a un pH cercano a la neutralidad al ser concentradas y dializadas. Además, la presencia de múltiples bandas en las tirillas de las mezclas 13, 14 y 15, todo esto probablemente por la presencia de una gran concentración de proteínas, las cuales al encontrarse en presencia de un pH adecuado y una baja concentración de sales al dializarse, pudieron formar polímeros de altos pesos moleculares que migraron en forma más retardada que los monómeros de los cuales estaban formados. Estos polímeros se presentaron en mayor cantidad en las mezclas 14 y 15, probablemente por la elevada concentración de proteínas que se encontraba en estas mezclas, como anteriormente se puntualizó.

Figura 10. Autorradiografía de una tira de papel Whatman No. 31, desarrollada en la solución de autorradiografía de 20% de ^{35}S -metionina, ^{35}S -metionina con una actividad específica de 1000 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, buffer de autorradiografía de 0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M NaCl, 0.1M Na₂S₂O₄, 0.1M Na₂S₂O₅, 0.1M Na₂S₂O₃, 0.1M Na₂S₂O₆, 0.1M Na₂S₂O₇, 0.1M Na₂S₂O₈, 0.1M Na₂S₂O₉, 0.1M Na₂S₂O₁₀, 0.1M Na₂S₂O₁₁, 0.1M Na₂S₂O₁₂, 0.1M Na₂S₂O₁₃, 0.1M Na₂S₂O₁₄, 0.1M Na₂S₂O₁₅, 0.1M Na₂S₂O₁₆, 0.1M Na₂S₂O₁₇, 0.1M Na₂S₂O₁₈, 0.1M Na₂S₂O₁₉, 0.1M Na₂S₂O₂₀, 0.1M Na₂S₂O₂₁, 0.1M Na₂S₂O₂₂, 0.1M Na₂S₂O₂₃, 0.1M Na₂S₂O₂₄, 0.1M Na₂S₂O₂₅, 0.1M Na₂S₂O₂₆, 0.1M Na₂S₂O₂₇, 0.1M Na₂S₂O₂₈, 0.1M Na₂S₂O₂₉, 0.1M Na₂S₂O₃₀, 0.1M Na₂S₂O₃₁, 0.1M Na₂S₂O₃₂, 0.1M Na₂S₂O₃₃, 0.1M Na₂S₂O₃₄, 0.1M Na₂S₂O₃₅, 0.1M Na₂S₂O₃₆, 0.1M Na₂S₂O₃₇, 0.1M Na₂S₂O₃₈, 0.1M Na₂S₂O₃₉, 0.1M Na₂S₂O₄₀, 0.1M Na₂S₂O₄₁, 0.1M Na₂S₂O₄₂, 0.1M Na₂S₂O₄₃, 0.1M Na₂S₂O₄₄, 0.1M Na₂S₂O₄₅, 0.1M Na₂S₂O₄₆, 0.1M Na₂S₂O₄₇, 0.1M Na₂S₂O₄₈, 0.1M Na₂S₂O₄₉, 0.1M Na₂S₂O₅₀, 0.1M Na₂S₂O₅₁, 0.1M Na₂S₂O₅₂, 0.1M Na₂S₂O₅₃, 0.1M Na₂S₂O₅₄, 0.1M Na₂S₂O₅₅, 0.1M Na₂S₂O₅₆, 0.1M Na₂S₂O₅₇, 0.1M Na₂S₂O₅₈, 0.1M Na₂S₂O₅₉, 0.1M Na₂S₂O₆₀, 0.1M Na₂S₂O₆₁, 0.1M Na₂S₂O₆₂, 0.1M Na₂S₂O₆₃, 0.1M Na₂S₂O₆₄, 0.1M Na₂S₂O₆₅, 0.1M Na₂S₂O₆₆, 0.1M Na₂S₂O₆₇, 0.1M Na₂S₂O₆₈, 0.1M Na₂S₂O₆₉, 0.1M Na₂S₂O₇₀, 0.1M Na₂S₂O₇₁, 0.1M Na₂S₂O₇₂, 0.1M Na₂S₂O₇₃, 0.1M Na₂S₂O₇₄, 0.1M Na₂S₂O₇₅, 0.1M Na₂S₂O₇₆, 0.1M Na₂S₂O₇₇, 0.1M Na₂S₂O₇₈, 0.1M Na₂S₂O₇₉, 0.1M Na₂S₂O₈₀, 0.1M Na₂S₂O₈₁, 0.1M Na₂S₂O₈₂, 0.1M Na₂S₂O₈₃, 0.1M Na₂S₂O₈₄, 0.1M Na₂S₂O₈₅, 0.1M Na₂S₂O₈₆, 0.1M Na₂S₂O₈₇, 0.1M Na₂S₂O₈₈, 0.1M Na₂S₂O₈₉, 0.1M Na₂S₂O₉₀, 0.1M Na₂S₂O₉₁, 0.1M Na₂S₂O₉₂, 0.1M Na₂S₂O₉₃, 0.1M Na₂S₂O₉₄, 0.1M Na₂S₂O₉₅, 0.1M Na₂S₂O₉₆, 0.1M Na₂S₂O₉₇, 0.1M Na₂S₂O₉₈, 0.1M Na₂S₂O₉₉, 0.1M Na₂S₂O₁₀₀.

Figura 11. Autorradiografía de una tira de papel Whatman No. 31, desarrollada en la solución de autorradiografía de 20% de ^{35}S -metionina, ^{35}S -metionina con una actividad específica de 1000 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, buffer de autorradiografía de 0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M NaCl, 0.1M Na₂S₂O₄, 0.1M Na₂S₂O₅, 0.1M Na₂S₂O₃, 0.1M Na₂S₂O₆, 0.1M Na₂S₂O₇, 0.1M Na₂S₂O₈, 0.1M Na₂S₂O₉, 0.1M Na₂S₂O₁₀, 0.1M Na₂S₂O₁₁, 0.1M Na₂S₂O₁₂, 0.1M Na₂S₂O₁₃, 0.1M Na₂S₂O₁₄, 0.1M Na₂S₂O₁₅, 0.1M Na₂S₂O₁₆, 0.1M Na₂S₂O₁₇, 0.1M Na₂S₂O₁₈, 0.1M Na₂S₂O₁₉, 0.1M Na₂S₂O₂₀, 0.1M Na₂S₂O₂₁, 0.1M Na₂S₂O₂₂, 0.1M Na₂S₂O₂₃, 0.1M Na₂S₂O₂₄, 0.1M Na₂S₂O₂₅, 0.1M Na₂S₂O₂₆, 0.1M Na₂S₂O₂₇, 0.1M Na₂S₂O₂₈, 0.1M Na₂S₂O₂₉, 0.1M Na₂S₂O₃₀, 0.1M Na₂S₂O₃₁, 0.1M Na₂S₂O₃₂, 0.1M Na₂S₂O₃₃, 0.1M Na₂S₂O₃₄, 0.1M Na₂S₂O₃₅, 0.1M Na₂S₂O₃₆, 0.1M Na₂S₂O₃₇, 0.1M Na₂S₂O₃₈, 0.1M Na₂S₂O₃₉, 0.1M Na₂S₂O₄₀, 0.1M Na₂S₂O₄₁, 0.1M Na₂S₂O₄₂, 0.1M Na₂S₂O₄₃, 0.1M Na₂S₂O₄₄, 0.1M Na₂S₂O₄₅, 0.1M Na₂S₂O₄₆, 0.1M Na₂S₂O₄₇, 0.1M Na₂S₂O₄₈, 0.1M Na₂S₂O₄₉, 0.1M Na₂S₂O₅₀, 0.1M Na₂S₂O₅₁, 0.1M Na₂S₂O₅₂, 0.1M Na₂S₂O₅₃, 0.1M Na₂S₂O₅₄, 0.1M Na₂S₂O₅₅, 0.1M Na₂S₂O₅₆, 0.1M Na₂S₂O₅₇, 0.1M Na₂S₂O₅₈, 0.1M Na₂S₂O₅₉, 0.1M Na₂S₂O₆₀, 0.1M Na₂S₂O₆₁, 0.1M Na₂S₂O₆₂, 0.1M Na₂S₂O₆₃, 0.1M Na₂S₂O₆₄, 0.1M Na₂S₂O₆₅, 0.1M Na₂S₂O₆₆, 0.1M Na₂S₂O₆₇, 0.1M Na₂S₂O₆₈, 0.1M Na₂S₂O₆₉, 0.1M Na₂S₂O₇₀, 0.1M Na₂S₂O₇₁, 0.1M Na₂S₂O₇₂, 0.1M Na₂S₂O₇₃, 0.1M Na₂S₂O₇₄, 0.1M Na₂S₂O₇₅, 0.1M Na₂S₂O₇₆, 0.1M Na₂S₂O₇₇, 0.1M Na₂S₂O₇₈, 0.1M Na₂S₂O₇₉, 0.1M Na₂S₂O₈₀, 0.1M Na₂S₂O₈₁, 0.1M Na₂S₂O₈₂, 0.1M Na₂S₂O₈₃, 0.1M Na₂S₂O₈₄, 0.1M Na₂S₂O₈₅, 0.1M Na₂S₂O₈₆, 0.1M Na₂S₂O₈₇, 0.1M Na₂S₂O₈₈, 0.1M Na₂S₂O₈₉, 0.1M Na₂S₂O₉₀, 0.1M Na₂S₂O₉₁, 0.1M Na₂S₂O₉₂, 0.1M Na₂S₂O₉₃, 0.1M Na₂S₂O₉₄, 0.1M Na₂S₂O₉₅, 0.1M Na₂S₂O₉₆, 0.1M Na₂S₂O₉₇, 0.1M Na₂S₂O₉₈, 0.1M Na₂S₂O₉₉, 0.1M Na₂S₂O₁₀₀.

Figura 12. Autorradiografía de una tira de papel Whatman No. 31, desarrollada en la solución de autorradiografía de 20% de ^{35}S -metionina, ^{35}S -metionina con una actividad específica de 1000 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, buffer de autorradiografía de 0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M NaCl, 0.1M Na₂S₂O₄, 0.1M Na₂S₂O₅, 0.1M Na₂S₂O₃, 0.1M Na₂S₂O₆, 0.1M Na₂S₂O₇, 0.1M Na₂S₂O₈, 0.1M Na₂S₂O₉, 0.1M Na₂S₂O₁₀, 0.1M Na₂S₂O₁₁, 0.1M Na₂S₂O₁₂, 0.1M Na₂S₂O₁₃, 0.1M Na₂S₂O₁₄, 0.1M Na₂S₂O₁₅, 0.1M Na₂S₂O₁₆, 0.1M Na₂S₂O₁₇, 0.1M Na₂S₂O₁₈, 0.1M Na₂S₂O₁₉, 0.1M Na₂S₂O₂₀, 0.1M Na₂S₂O₂₁, 0.1M Na₂S₂O₂₂, 0.1M Na₂S₂O₂₃, 0.1M Na₂S₂O₂₄, 0.1M Na₂S₂O₂₅, 0.1M Na₂S₂O₂₆, 0.1M Na₂S₂O₂₇, 0.1M Na₂S₂O₂₈, 0.1M Na₂S₂O₂₉, 0.1M Na₂S₂O₃₀, 0.1M Na₂S₂O₃₁, 0.1M Na₂S₂O₃₂, 0.1M Na₂S₂O₃₃, 0.1M Na₂S₂O₃₄, 0.1M Na₂S₂O₃₅, 0.1M Na₂S₂O₃₆, 0.1M Na₂S₂O₃₇, 0.1M Na₂S₂O₃₈, 0.1M Na₂S₂O₃₉, 0.1M Na₂S₂O₄₀, 0.1M Na₂S₂O₄₁, 0.1M Na₂S₂O₄₂, 0.1M Na₂S₂O₄₃, 0.1M Na₂S₂O₄₄, 0.1M Na₂S₂O₄₅, 0.1M Na₂S₂O₄₆, 0.1M Na₂S₂O₄₇, 0.1M Na₂S₂O₄₈, 0.1M Na₂S₂O₄₉, 0.1M Na₂S₂O₅₀, 0.1M Na₂S₂O₅₁, 0.1M Na₂S₂O₅₂, 0.1M Na₂S₂O₅₃, 0.1M Na₂S₂O₅₄, 0.1M Na₂S₂O₅₅, 0.1M Na₂S₂O₅₆, 0.1M Na₂S₂O₅₇, 0.1M Na₂S₂O₅₈, 0.1M Na₂S₂O₅₉, 0.1M Na₂S₂O₆₀, 0.1M Na₂S₂O₆₁, 0.1M Na₂S₂O₆₂, 0.1M Na₂S₂O₆₃, 0.1M Na₂S₂O₆₄, 0.1M Na₂S₂O₆₅, 0.1M Na₂S₂O₆₆, 0.1M Na₂S₂O₆₇, 0.1M Na₂S₂O₆₈, 0.1M Na₂S₂O₆₉, 0.1M Na₂S₂O₇₀, 0.1M Na₂S₂O₇₁, 0.1M Na₂S₂O₇₂, 0.1M Na₂S₂O₇₃, 0.1M Na₂S₂O₇₄, 0.1M Na₂S₂O₇₅, 0.1M Na₂S₂O₇₆, 0.1M Na₂S₂O₇₇, 0.1M Na₂S₂O₇₈, 0.1M Na₂S₂O₇₉, 0.1M Na₂S₂O₈₀, 0.1M Na₂S₂O₈₁, 0.1M Na₂S₂O₈₂, 0.1M Na₂S₂O₈₃, 0.1M Na₂S₂O₈₄, 0.1M Na₂S₂O₈₅, 0.1M Na₂S₂O₈₆, 0.1M Na₂S₂O₈₇, 0.1M Na₂S₂O₈₈, 0.1M Na₂S₂O₈₉, 0.1M Na₂S₂O₉₀, 0.1M Na₂S₂O₉₁, 0.1M Na₂S₂O₉₂, 0.1M Na₂S₂O₉₃, 0.1M Na₂S₂O₉₄, 0.1M Na₂S₂O₉₅, 0.1M Na₂S₂O₉₆, 0.1M Na₂S₂O₉₇, 0.1M Na₂S₂O₉₈, 0.1M Na₂S₂O₉₉, 0.1M Na₂S₂O₁₀₀.

PM KDa

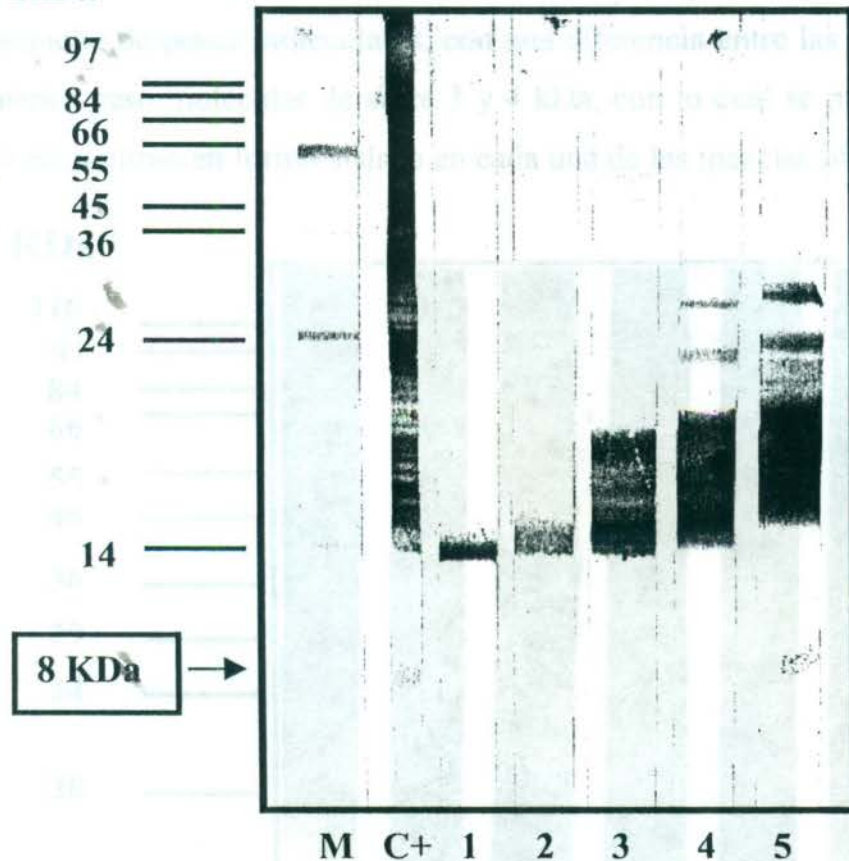


Figura 13- Western Blot de las fracciones 42-61 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, tirilla 1 mezcla 11 fracciones 42-45, tirilla 2 mezcla 12 fracciones 46-49, tirilla 3 mezcla 13 fracciones 50-53, tirilla 4 mezcla 14 fracciones 54-57 y tirilla 5 mezcla 15 fracciones 58-61.

4.3.5 Análisis de las Fracciones 62 a la 81 de la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC.

Al analizar la figura 14, en la cual se muestran los resultados obtenidos en la tinción del gel de poliacrilamida con azul de Coomassie de la mezcla 16 (fracciones 62-65), mezcla 17 (fracciones 66-69), mezcla 18 (fracciones 70-73), mezcla 19 (fracciones 74-77) y mezcla 20 (fracciones 78-81), nos encontramos con la presencia de proteínas de pesos moleculares de alrededor de 14 a 20 kDa,

en este caso, las proteínas que eluyeron en estas mezclas están dentro de un rango pequeño de pesos moleculares, con una diferencia entre las proteínas de mayor y menor peso molecular de entre 3 y 4 kDa, con lo cual se puede inferir que éstas se encuentran en forma aislada en cada una de las mezclas obtenidas.

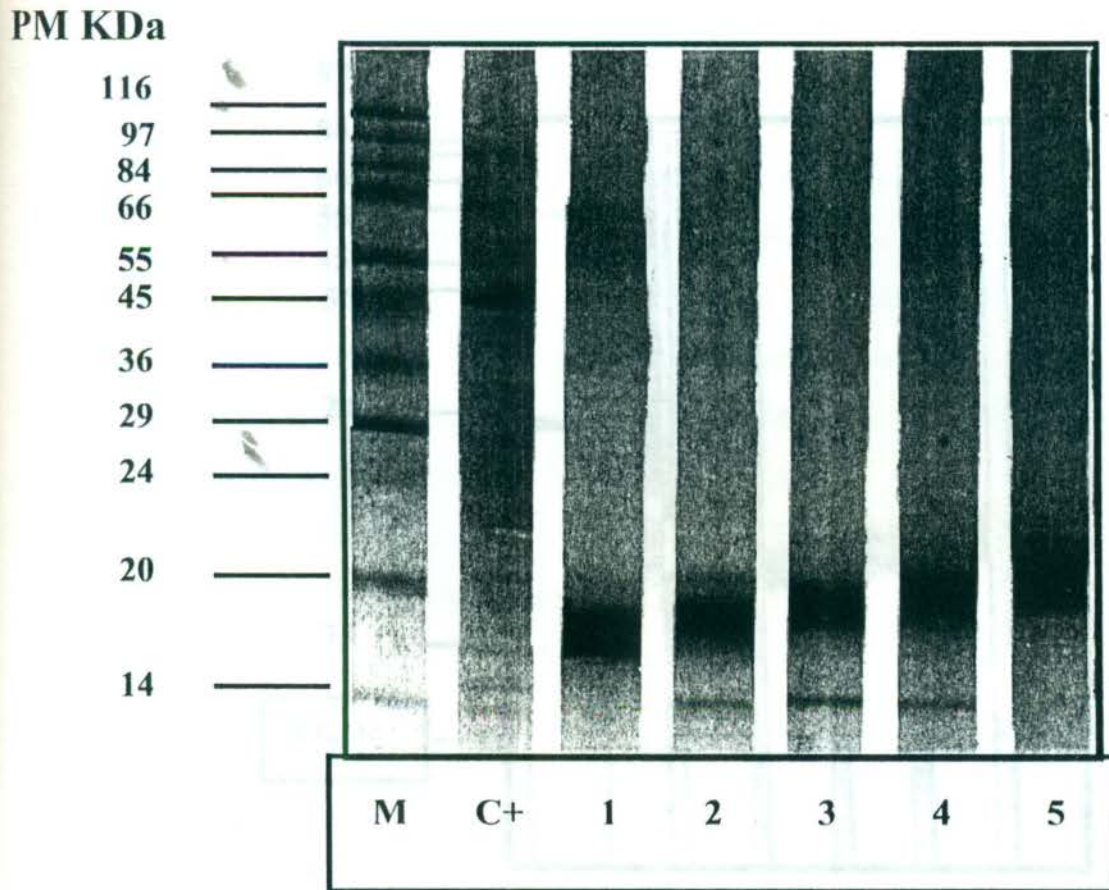


Figura 14- Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en gradiente lineal 12-18 % T/2.67 % C de las mezclas 16-20 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC teñido con azul de Coomassie al 0.1 %. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, carril 1 mezcla 16 fracciones 62-65, carril 2 mezcla 17 fracciones 66-69, carril 3 mezcla 18 fracciones 70-73, carril 4 mezcla 19 fracciones 74-77 y carril 5 mezcla 20 fracciones 78-81.

Un hecho importante a resaltar con el Western Blot de las mezclas 16 a la 20 (Fig. 15) es que aunque las proteínas aisladas en estas mezclas se encuentran en concentraciones relativamente altas como se muestra en la figura 14, su reconocimiento por parte de los anticuerpos presentes en el suero del paciente con

amibiasis invasiva se presenta en forma pobre y que una proteína de alrededor de 20 KDa es la que presenta un mayor reconocimiento comparada con las proteínas presentes en estas mezclas.

P M KDa

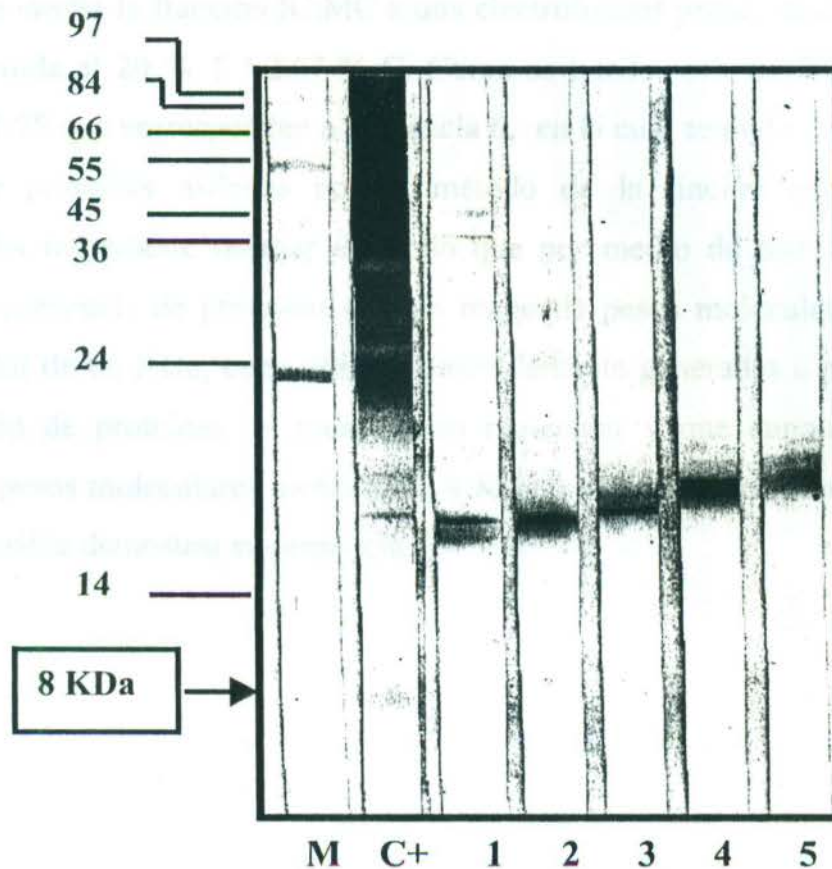


Figura 15- Western Blot de las fracciones 62-81 obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, tirilla 1 mezcla 16 fracciones 62-65, tirilla 2 mezcla 17 fracciones 66-69, tirilla 3 mezcla 18 fracciones 70-73, tirilla 4 mezcla 19 fracciones 74-77 y tirilla 5 mezcla 20 fracciones 78-81.

4.3.6 Análisis Integral de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC Teñidas con Azul de Coomassie.

En la figura 16 se muestra el perfil de elución de las distintas proteínas obtenidas al someter la fracción IC:MC a una electroforesis preparativa en un gel de poliacrilamida al 20 % T / 2.67 % C. Como se puede apreciar fué hasta las fracciones 22-25 que corresponden a la mezcla 6, en la cual se pudo demostrar la presencia de proteínas aisladas por el método de la tinción con azul de Coomassie. Es importante resaltar el hecho que por medio de este método se evidenció la presencia de proteínas con un rango de pesos moleculares de 9 y hasta alrededor de 66 KDa, estas últimas probablemente generadas a partir de la polimerización de proteínas de menor peso molecular y que aunque existían proteínas de pesos moleculares menores de 9 KDa, su concentración era tan baja que no era posible demostrar su presencia.

kDa

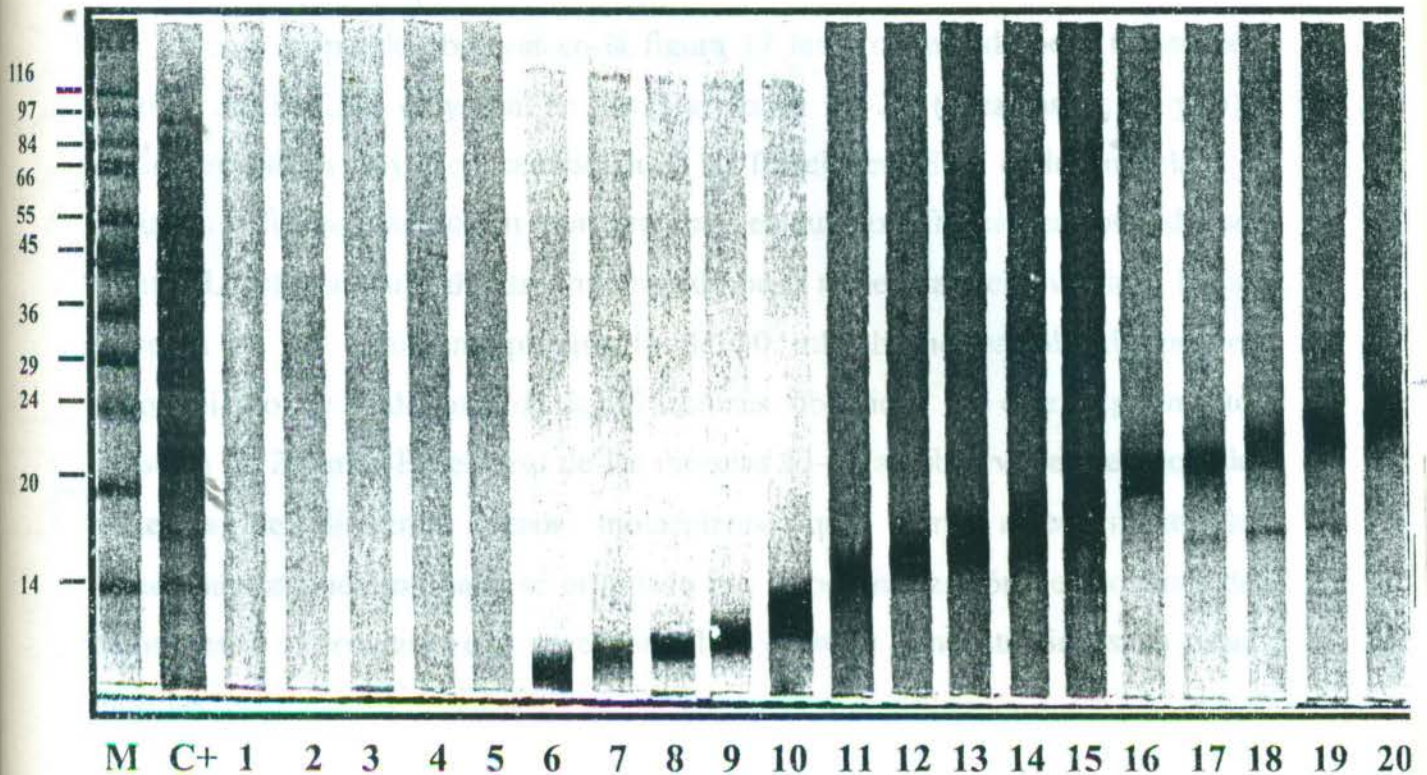


Figura 16- Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en gradiente lineal 12-18 % T/2.67 % C de las fracciones obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC teñido con azul de Coomassie al 0.1 %. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, carril 1 mezcla 1 fracciones 1-5, carril 2 mezcla 2 fracciones 6-9, carril 3 mezcla 3 fracciones 10-13, carril 4 mezcla 4 fracciones 14-17, carril 5 mezcla 5 fracciones 18-21, carril 6 mezcla 6 fracciones 22-25, carril 7 mezcla 7 fracciones 26-29, carril 8 mezcla 8 fracciones 30-33, carril 9 mezcla 9 fracciones 34-37, carril 10 mezcla 10 fracciones 37-41, carril 11 mezcla 11 fracciones 42-45, carril 12 mezcla 12 fracciones 46-49, carril 13 mezcla 13 fracciones 50-53, carril 14 mezcla 14 fracciones 54-57, carril 15 mezcla 15 fracciones 58-61, carril 16 mezcla 16 fracciones 62-65, carril 17 mezcla 17 fracciones 66-69, carril 18 mezcla 18 fracciones 70-73, carril 19 mezcla 19 fracciones 74-77 y carril 20 mezcla 20 fracciones 78-81.

4.3.7. Análisis Integral de las Fracciones Obtenidas en la Electroforesis Preparativa de la Fracción IC:MC por Medio de Western Blot.

Como se puede observar en la figura 17 las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa eluyeron en las fracciones 14-25 (Mezclas 4, 5 y 6), encontrándose en mayor concentración en las fracciones 18-25 de las mezcla 5 y 6, que es la fuente más rica en estas proteínas en cuanto a fracciones obtenidas se refiere. La mayor parte de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, eluyeron en un volumen aproximado de 30 mL, hecho establecido por el conocimiento de cada una de las fracciones obtenidas en este experimento constaba de 2.5 mL. En el caso de las mezclas 13-15 se observa la presencia de proteínas de diferentes pesos moleculares, que como anteriormente lo mencionamos pudieron haberse originado por la polimerización de proteínas de bajos pesos moleculares que se encontraban en altas concentraciones en estas mezclas.

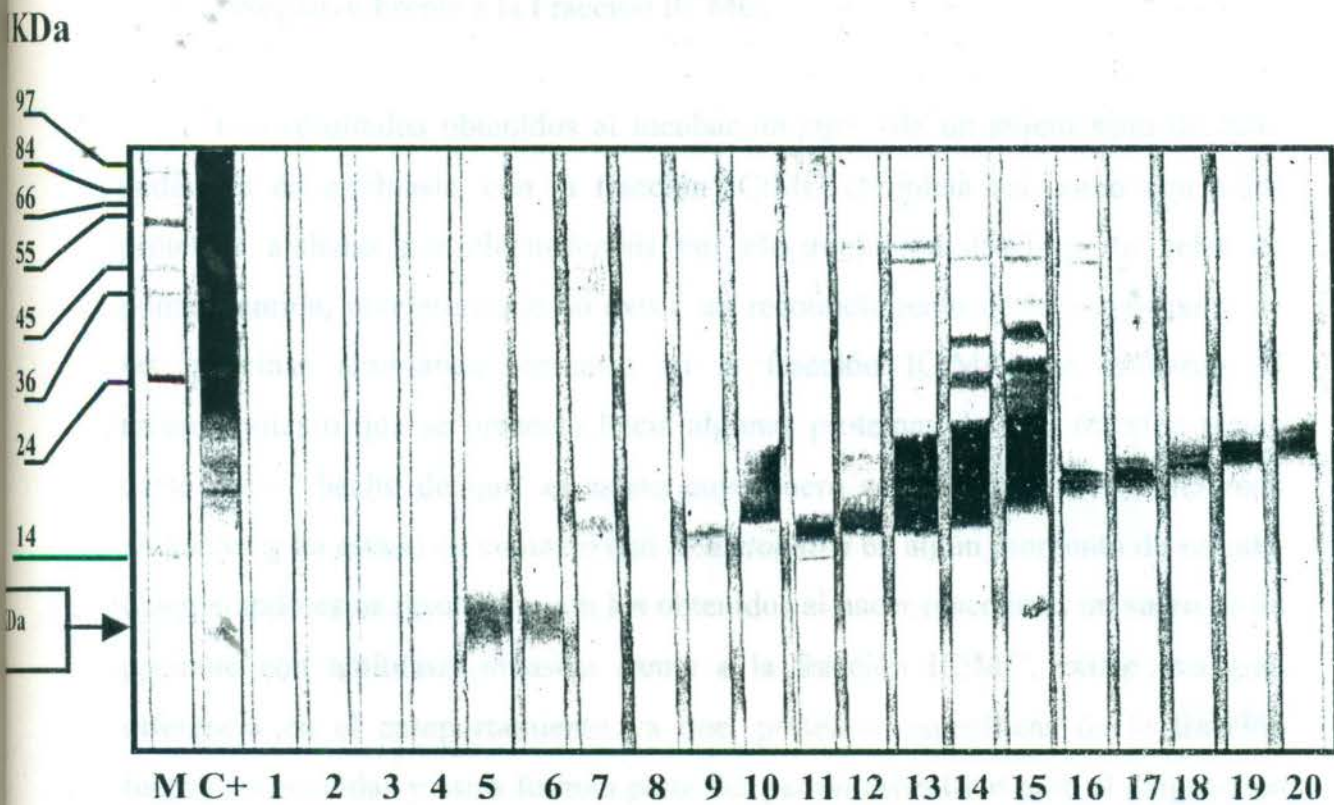


Figura 17.- Western Blot de las fracciones obtenidas en la electroforesis preparativa al 20 % T de la fracción IC:MC, revelado con un suero de un paciente con amibiasis invasiva. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, tirilla 1 mezcla 1 fracciones 1-5 , tirilla 2 mezcla 2 fracciones 6-9, tirilla 3 mezcla 3 fracciones 10-13, tirilla 4 mezcla 4 fracciones 14-17, tirilla 5 mezcla 5 fracciones 18-21, tirilla 6 mezcla 6 fracciones 22-25, tirilla 7 mezcla 7 fracciones 26-29, tirilla 8 mezcla 8 fracciones 30-33, tirilla 9 mezcla 9 fracciones 34-37, tirilla 10 mezcla 10 fracciones 38-41, tirilla 11 mezcla 11 fracciones 42-45, tirilla 12 mezcla 12 fracciones 46-49, tirilla 13 mezcla 13 fracciones 50-53, tirilla 14 mezcla 14 fracciones 54-57, tirilla 15 mezcla 15 fracciones 58-61, tirilla 16 mezcla 16 fracciones 62-65, tirilla 17 mezcla 17 fracciones 62-69, tirilla 18 mezcla 18 fracciones 70-73, tirilla 19 mezcla 19 fracciones 74-77, tirilla 20 mezcla 20 fracciones 78-81.

4.4 Evaluación de Resultados

Un punto importante después de haber obtenido en forma aislada las proteínas, era probarlas frente a sueros de distintas fuentes, por ello se probaron las proteínas aisladas contra sueros de pacientes con amibiasis invasiva, hepatopatías de diversa etiología, amibiasis intestinal asintomática y sujetos sanos de zona endémica como control negativo.

4.4.1 Comparación de la Reacción Entre un Suero Control Positivo y un Control Negativo Frente a la Fracción IC:MC.

Los resultados obtenidos al incubar un suero de un sujeto sano de zona endémica de amibiasis, con la fracción IC:MC completa así como con a las proteínas aisladas por electroforesis por electroelución continua en geles de poliacrilamida, revelaron que no existe un reconocimiento de la mayor parte de las proteínas amibianas presentes en la fracción IC:MC, sin embargo, el reconocimiento que se presentó hacia algunas proteínas de esta fracción puede darse por el hecho de que, el sujeto cuyo suero se analizó vive en una zona endémica y ha estado en contacto con *E. histolytica* en algún momento de su vida. Comparando estos resultados con los obtenidos al hacer reaccionar un suero de un paciente con amibiasis invasiva frente a la fracción IC:MC, existe una gran diferencia en el comportamiento ya que, proteínas específicas de la fracción fueron reconocidas y estas forman parte del patrón específico para el diagnóstico de amibiasis invasiva. En cuanto a las proteínas de 8 KDa, tampoco se evidenció el reconocimiento por parte del suero del sujeto sano, lo que es de gran importancia por el hecho de que con estas proteínas se pueden diseñar métodos de diagnóstico, con los cuales se puede diferenciar un AHA de algún otro padecimiento de tipo hepático.

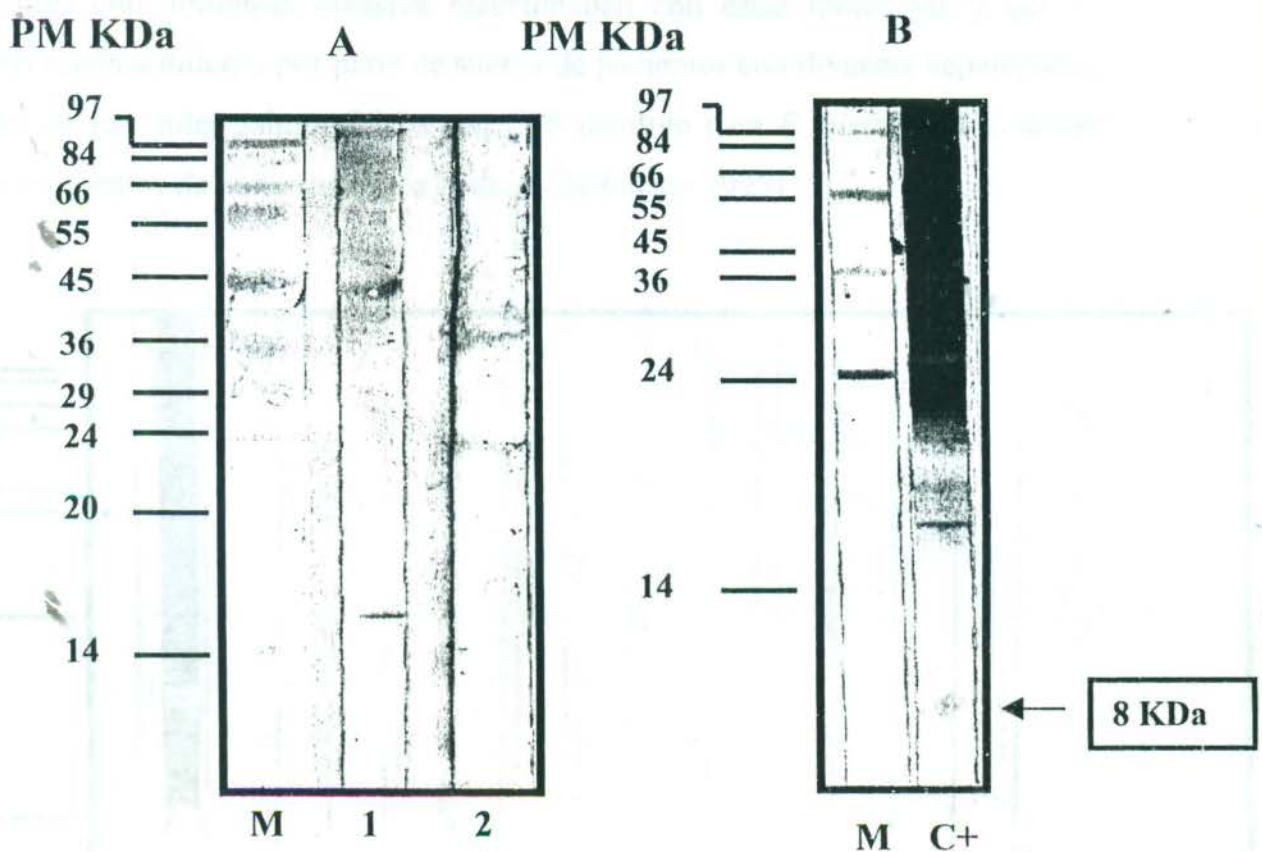


Figura 18.- Western Blot de la fracción IC:MC frente a un suero de sujeto sano de zona endémica y paciente con amibiasis invasiva. **A** Suero de sujeto sano de zona endémica; M marcadores de peso molecular de amplio rango, tirilla 1 fracción IC:MC, tirilla 2 proteínas de 8 KDa aisladas por electroforesis por electroelución continua. **B** Suero de paciente con amibiasis invasiva; M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC.

4.4.2 Comportamiento de Sueros de Distintos Orígenes Frente a Las Proteínas de 8 KDa Aisladas a Partir de la Fracción IC:MC.

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos al someter a reaccionar sueros de distintos orígenes con las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, aisladas a partir de la fracción IC:MC.

Es bastante halagador el hecho que solamente los anticuerpos presentes en los sueros con amibiasis invasiva reconocieron a las proteínas de 8 KDa, esto confirma los resultados obtenidos anteriormente en estudios previos realizados

por Flores-Castañeda, en los cuales se establecía que solamente los sueros de pacientes con amibiasis invasiva reaccionaban con estas moléculas y que no existía reconocimiento por parte de sueros de pacientes con diversas hepatopatías, sueros de pacientes asintomáticos con CPS positivo para *E. histolytica*/*E. dispar* ni sujetos sanos de zona endémica (Flores-Castañeda 1995).

DISCUSIÓN

PM KDa

97

84

66

55

45

36

24

14

8 KDa

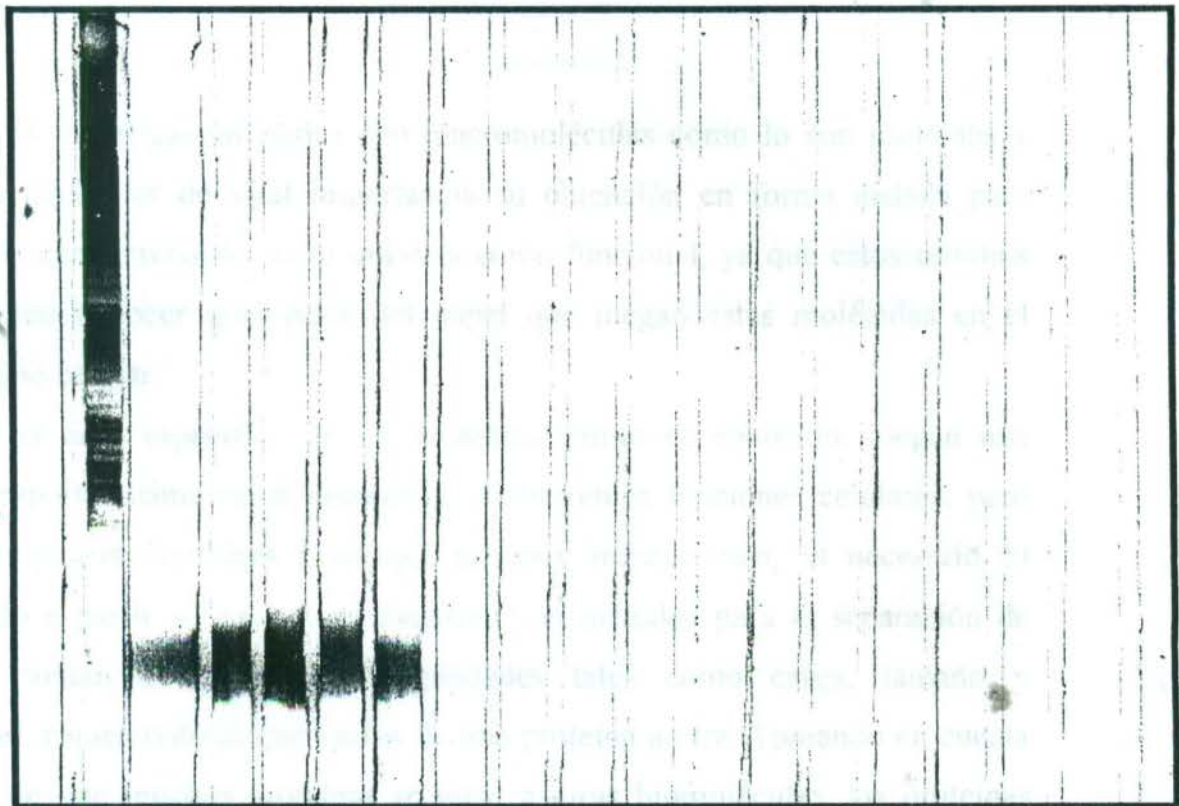


Figura 19.- Western Blot de la proteína de 8 KDa aisladas, frente a suero de distintos orígenes. M marcadores de peso molecular de amplio rango, C+ fracción IC:MC, tirillas 1, 2, 3, 4 y 5 sueros de pacientes con amibiasis invasiva, tirillas 6, 7, 8 y 9 sueros de pacientes con hepatopatías de diversa etiología, tirillas 10, 11, 12 y 13 sueros de sujetos asintomáticos con coproparasitoscópico positivo para *E. histolytica*/*E. dispar*, tirillas 14, 15, 16 y 17 sueros de sujetos sanos de zona endémica WB negativos.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

En la investigación básica con macromoléculas como lo son proteínas y ácidos nucleicos, es de vital importancia su obtención en forma aislada para estudios de caracterización tanto química como funcional, ya que estos estudios nos permiten conocer gran parte del papel que juegan estas moléculas en el metabolismo celular.

En el caso específico de las proteínas, como es conocido, juegan una función importantísima en el desarrollo de diferentes funciones celulares, pero para conocer sus funciones y en qué proceso interaccionan, es necesario su aislamiento a partir de extractos celulares. Los métodos para la separación de proteínas toman como ventaja propiedades tales como carga, tamaño y solubilidad, características que varían de una proteína a otra. Tomando en cuenta el hecho de que muchas proteínas se unen a otras biomoléculas, las proteínas pueden también ser separadas basándose en sus propiedades de unión. Existe una gran variedad de métodos disponibles para la separación de proteínas, entre ellos se encuentra la cromatografía de intercambio iónico que puede ser utilizada para separar proteínas con diferente carga iónica, de la misma forma que se separan aminoácidos. La cromatografía de exclusión molecular, también llamada filtración en gel, separa las proteínas en cuanto al tamaño por medio de pequeñas esferas porosas de un tamaño adecuado para cada aplicación y la cromatografía de afinidad separa las proteínas por sus propiedades de unión específicas, ya que las

proteínas retenidas en la columna son aquellas que se unen específicamente al ligando presente en las esferas de que está formada la columna.

Otros métodos no-cromatográficos incluyen la precipitación selectiva de las proteínas con sales, ácidos o altas temperaturas.

Para el aislamiento de una proteína que no ha sido previamente aislada, el proceso se guía tanto por precedentes establecidos como por sentido común. En la mayoría de los casos, varios métodos deben ser utilizados secuencialmente para completar el aislamiento de una proteína. El método de elección es algo empírico y muchos de los protocolos deben ser probados previamente antes de elegir uno. Los métodos de ensayo y error a menudo son minimizados por el uso de métodos de purificación desarrollados para proteínas similares como una guía. El sentido común dicta que los procesos baratos son usados primero cuando el volumen total y de contaminantes es grande, por lo que los procedimientos cromatográficos a menudo son imprácticos en las etapas tempranas, esto ocasionado ya que la cantidad de medio cromatográfico se incrementa con el tamaño de la muestra.

En adición a la cromatografía, otro importante grupo de métodos está disponible para el aislamiento de proteínas, estos son los métodos electroforéticos, basados en la migración de proteínas cargadas en un campo eléctrico. Estos procedimientos a menudo son utilizados para purificar proteínas en grandes cantidades, con la desventaja que a menudo estos métodos inactivan proteínas. Sin embargo, la electroforesis es especialmente útil como un método analítico; la ventaja que presenta esta técnica es que las proteínas pueden ser visualizadas al mismo tiempo que separadas, permitiendo al investigador estimar en forma rápida el número de proteínas o el grado de pureza de una preparación de proteínas en particular.

El isoelectroenfoco es un método electroforético utilizado para determinar el pI de una proteína en especial. Este proceso se lleva a cabo por el establecimiento de un gradiente de pH por una mezcla de bases y ácidos orgánicos de bajo peso molecular llamados anfólitos, los cuales al ser aplicados

en el gel de poliacrilamida se distribuyen al ser aplicado un campo eléctrico a través del gel.

Cuando se combinan la electroforesis bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con el isoelectroenfoque en geles bidimensionales, se permite la resolución de mezclas complejas de proteínas. Este método es más sensible que el electroenfoque y el SDS-PAGE solos. La electroforesis bidimensional separa proteínas de idéntico peso molecular con diferentes pI o proteínas con valores similares de pI pero de diferente peso molecular.

En el caso de la electroforesis preparativa, estos métodos han sido diseñados para que los procesos electroforéticos sean solo un paso más en el aislamiento de una proteína en especial, logrando con ello que en los resultados obtenidos, las proteínas separadas no hayan sido inactivadas o su inactividad pueda ser revertida al utilizar los métodos apropiados.

En el caso particular de proteínas de *E. histolytica* aisladas, se han logrado aislar proteínas con distintas funciones celulares de distintos pesos moleculares y por medio de distintas técnicas, varias de ellas utilizadas en secuencia para la obtención de la proteína aislada.

E. histolytica es un protozoario parásito, que es el agente causal de la amibiasis, enfermedad cosmopolita que afecta alrededor de 50 000 000 de personas en el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo con condiciones higiénico dietéticas deficientes. Este protozoario tiene una gran gama de características patogénicas que le permiten la invasión a tejidos después que se produce la infección por agua o alimentos contaminados por quistes del parásito.

Para lograr la invasión a tejidos, la amiba se vale de un arsenal de elementos, dentro de los que se encuentran adhesinas, proteasas, enzimas y otras macromoléculas, la mayoría de ellas de origen proteico, por lo tanto para investigar los mecanismos de patogenicidad se ha tenido que recurrir al aislamiento de las distintas proteínas que intervienen en el desarrollo de la amibiasis, algunas de ellas como lo son los antígenos de superficie, se han

identificado con métodos inmunológicos, desarrollando anticuerpos ya sea monoclonales o policlonales que se identifican con inmunofluorescencia (Isibasi 1982, Torian 1987), iodación (Edman 1990) e inmunoprecipitación (Torian 1987). Por otro lado se han logrado identificar antígenos a partir de bibliotecas de cDNA, las cuales al ser expresadas revelan la presencia de proteínas que intervienen en distintos procesos celulares (Torian 1990, Stanley 1990, Lotter 1997).

Para lograr el aislamiento de las distintas proteínas de *E. histolytica* se ha tenido que recurrir al uso de inhibidores enzimáticos que actúan impidiendo la degradación proteolítica de los preparados causado por las proteasas propias del parásito (Ávila 1985, Pérez-Monfort 1987). En 1995 Flores-Castañeda patentó un método con el cual se lograba abatir casi en un 100 % la actividad proteolítica de los preparados amibianos por medio de un tratamiento con solventes orgánicos y calor obteniendo una fracción a la que le denominó fracción IC:MC (Flores-Castañeda 1995), a partir de este método se diseñó una prueba diagnóstica de Western Blot con una alta sensibilidad y reproducibilidad, método que ha servido para diagnosticar amibiasis invasiva en los pacientes que ingresan al hospital universitario "Dr. José Eleuterio González".

Al realizar un análisis de las moléculas inmunodominantes se encontró que una molécula con un peso molecular relativo de 8 KDa era reconocida en un 99 % por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva. Al conocerse este hecho era de vital importancia el aislamiento de esta molécula, con este propósito, se aisló la molécula a partir de electroforesis preparativa utilizando geles de poliacrilamida en gradiente lineal 8-18 % T/2.67 % C, después de llevar a cabo la electroforesis, los geles eran seccionados y la proteína era extraída de los geles por el método de electroelución, ya realizada la electroelución, la proteína en solución era concentrada para posteriormente ser probada por isoelectroenfoque para determinar si existían isoformas y qué valores de pI

poseían, después de realizar estos procesos se obtuvieron 3 isoformas que se separaban a pH de 4.7, 5.9 y 6.7 (Rangel-Orozco 1994, 1996).

El proceso de electroforesis preparativa por electroelución continua ha demostrado ser un método accesible y rápido para el aislamiento de proteínas de distintos orígenes, tanto en condiciones nativas como en condiciones desnaturalizantes (Yamamoto 1994, Bagalopal 1994), logrando con ello realizar el aislamiento de proteínas a partir del extracto crudo y sin ningún otro proceso de aislamiento previo.

Cuando se probaron los marcadores de peso molecular de amplio rango en la columna de gel de separación de poliacrilamida al 6 % T, se encontró que esta concentración de poliacrilamida era demasiado baja para lograr conocer con exactitud los tiempos de elución de los distintos marcadores de peso molecular, y si se deseaba conocer los tiempos de elución de cada una de las proteínas era necesario utilizar otras concentraciones de poliacrilamida.

Al probar la fracción IC:MC bajo las mismas condiciones que los marcadores de peso molecular, pudimos observar que la concentración de los geles empleados en las dos separaciones, tenían un poro demasiado grande como para lograr la separación de las proteínas de bajos pesos moleculares.

En estudios previos se demostró que las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa podrían ser separadas del resto de las proteínas del extracto amibiano, fue por ello que se optó por utilizar un gel con una concentración de poliacrilamida del 20 % T/2.67 % C. Si bien al utilizar esta concentración de poliacrilamida, se iba a afectar la resolución de las bandas proteicas de mayor peso molecular que iban a ser electroeluidas en varias fracciones, también era de esperarse que el aislamiento de las bandas se llevaría a cabo con la certeza de que no existiese contaminación de las proteínas de 8 KDa con proteínas de pesos moleculares cercanos, es decir, se sacrificaría la resolución de las otras bandas por la obtención de las proteínas de 8 KDa en la forma mas pura posible.

Cuando se realizaron las lecturas espectrofotométricas de la separación realizada con el gel de poliacrilamida al 20 % T, se obtuvieron lecturas que variaban en gran forma con las lecturas obtenidas al utilizar geles al 6 % T. Después que se obtuvo el pico de absorbancia del frente de corrimiento, la absorbancia de las fracciones obtenidas del gel al 20 % T, descendió en forma paulatina hasta alrededor de la fracción 40 y después de ella la absorbancia que se presentó fue mínima o nula, hecho que difiere con las separaciones del gel al 6 % T, en las cuales se observa una zona de absorbancia que es continua hasta alrededor de las fracciones 100 a 110.

Un hecho importante de resaltar en el caso de la electroforesis preparativa con el gel al 20 % T, es que aunque se encontraban proteínas presentes en las fracciones obtenidas, no se generaron zonas o picos de absorbancia, esto probablemente causado por dos hechos importantes, como lo fueron la concentración de proteínas presentes en las fracciones probadas o por el bloqueo de la radiación UV por parte del SDS asociado a las proteínas separadas. Fue por ello que se realizó un análisis con SDS-PAGE par confirmar los resultados obtenidos.

Al someter la fracción IC:MC a la electroforesis preparativa por electroelución continua, se obtuvieron un total de 81 fracciones de 2.5 mL, las cuales fueron mezcladas en volúmenes de 10 mL, estas mezclas fueron probadas tanto en SDS-PAGE como en Western Blot, realizándose experimentos en los cuales se incluían marcadores de peso molecular, controles positivos y las mezclas a analizar. En el análisis de las primeras mezclas que estaban integradas por las fracciones 1-41, se observó que en la mezcla 5 (Fracciones 38-41) se encontraban las proteínas de 8 KDa que se deseaban aislar. En la mezcla 4 formada por las fracciones 34-37, también se demostró la presencia de las proteínas pero en una concentración muy baja.

Comparando estos resultados con los obtenidos en las electroforesis con geles de corrimiento del 6 % T, existe diferencia en los tiempos de elución de las

proteínas, ya que cuando se utilizó la concentración del 20 %T, los retardos de las proteínas fueron mayores.

Al realizar la tinción del SDS-PAGE analítico de las mezclas 6-10, se demostró la presencia de proteínas de bajo peso molecular en concentraciones suficientes para ser detectadas por este método. Los resultados del Western Blot de las mezclas 6-10, también demostraron la presencia de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, hecho patente por la reacción que presentaron los anticuerpos del suero del paciente con amibiasis invasiva. Estas proteínas también se encontraron en las mezclas 6 y 7, encontrándose en una mayor concentración en el mezcla 6 formada por las fracciones 42-45 (Fig 11).

Se observó que en la tinción del SDS-PAGE analítico de las mezcla 6-10 (Fig. 10), se demostró la presencia de proteínas de bajos pesos moleculares entre 9 y 11 KDa muy fuertemente teñidas. Al realizar el WB y compararlo con la tinción, se demostró que las proteínas que eluyeron en la mezcla 6 corresponden a una mezcla de proteínas de 8 KDa con otras de distinto peso molecular, pero que no son reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero del paciente con amibiasis invasiva, un fenómeno similar se encuentra en las mezclas 7, 8 y 9, en las cuales a pesar de haberse demostrado la presencia de altas concentraciones de proteínas, no son reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero con el que se hicieron reaccionar las proteínas, hecho que comprueba lo establecido en el laboratorio, en el cual se demuestra que las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa son de las proteínas más reconocidas por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes con amibiasis invasiva, cuando se utiliza la fracción IC:MC como antígeno ante el cual reaccionan los anticuerpos presentes en sueros de pacientes con amibiasis invasiva.

Los resultados obtenidos en el SDS-PAGE analítico de las mezclas 11-15 (Fig. 12), tanto en la tinción como en el W B se presentan algunas diferencias, las cuales son evidentes por la sensibilidad de la técnica del W B, en estas mezclas se presentan altas concentraciones de las proteínas separadas, que son observadas

principalmente en el W B con la presencia de múltiples proteínas de distintos pesos moleculares y con distintos perfiles de movilidad electroforética, hecho que no se observa en la tinción. Como se pudo observar, tanto en la tinción como en el W B se encuentran algunas bandas con un peso molecular aproximado al de la albúmina sérica bovina, el cual es de 66 KDa. Las bandas observadas cerca de los 66 KDa quizá sean agregados proteicos o polímeros de subunidades de proteínas con pesos moleculares más pequeños, puesto que se observaron en mezclas de fracciones del SDS-PAGE preparativo que contienen bandas de pesos moleculares entre 14 y 66 KDa. Este fenómeno pudo ser causado por el hecho de que al realizar la diálisis y la concentración de las mezclas así como por la alta concentración de proteínas presentes, se pudieron formar polímeros de estas proteínas al bajar la concentración de SDS asociado a las proteínas y el pH próximo a la neutralidad. Al ser probados estos polímeros en el SDS-PAGE analítico y al someter las mezclas concentradas a la reducción con SDS y 2-mercaptoetanol, la cantidad de SDS y 2-mercaptoetanol no fueron suficientes para lograr que todas las proteínas polimerizadas se separaran e hicieran el corrimiento correspondiente al peso molecular de las subunidades. La proporción adecuada en la asociación SDS-proteínas es de 1.4-1, y si este hecho no se presentó, las proteínas que permanecieron polimerizadas tuvieron retardo en la migración, logrando con ello verse como bandas individuales de pesos moleculares superiores a los que se presentarían como proteínas sin polimerizar.

Al probar las mezclas 16-20 en el W B (Fig. 15), en la mezcla 16 también se presentó el fenómeno antes mencionada, sin embargo en las mezclas 17-20, este fenómeno estuvo ausente, probablemente a causa de que la concentración a la que se encontraban estas proteínas posiblemente era baja, por lo cual la relación SDS-proteínas posiblemente permaneció dentro de las condiciones adecuadas para lograr una óptima separación, este hecho puede verificarse al observar tanto la tinción como el W B, en los cuales se observan bandas individuales separadas con pesos moleculares por alrededor de los 22 KDa.

Cuando se observan y se comparan los resultados obtenidos en la tinción y el W B, podemos observar dos hechos importantes, el primero en el cual las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa que fueron aisladas en las mezclas 4, 5 y 6 no fueron teñidas por el colorante azul de Coomassie, pero fueron perfectamente reveladas por los anticuerpos presentes en el suero del paciente con amibiasis invasiva (Fig. 8, 9, 10 y 11). El segundo hecho importante a mencionar es el que se presenta en las mezclas 7, 8 y 9, en los cuales a pesar de encontrarse una alta concentración de proteínas, éstas no fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero del paciente con amibiasis invasiva, ya que en este caso la respuesta inmune humoral del paciente fue dirigida contra otras proteínas (Fig. 11).

Al utilizar los controles positivo y negativo, para comparar los resultados con los resultados obtenidos al probar las proteínas separadas contra los sueros de pacientes con distintos padecimientos, nos permitieron establecer diferencias en los patrones de reconocimiento antigénico, que se presentan cuando se utilizan sueros de pacientes con amibiasis invasiva como control positivo y sueros de sujetos sanos de zonas endémicas como control negativo.

Cuando se probaron las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa aisladas en electroforesis por electroelución continua en geles de poliacrilamida, contra sueros de pacientes de distintos orígenes, se pudo comprobar el hecho anteriormente presentado en nuestro laboratorio, en el cual se establece que las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa solamente son reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva. Este hecho sienta un precedente, en el cual se establece que las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa pueden ser utilizadas para establecer un diagnóstico confirmatorio de amibiasis invasiva, por medio de una prueba serológica como lo sería el Dot blot o ELISA, ya que los sueros de pacientes con distintos padecimientos hepáticos y los sueros de sujetos sanos de zonas endémicas con CPS positivo para *E. histolytica*/*E. dispar*, que como se muestra en la figura 19 no

reaccionaron contra las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa al hacerse reaccionar estos sueros contra las proteínas aisladas presentes en las tirillas 10-13 de dicha figura, estos resultados nos permiten establecer que se podrá contar con una herramienta útil y de alta confiabilidad para el diagnóstico diferencial de un AHA frente a otros padecimientos hepáticos.

Al igual que en el presente trabajo, Rangel-Orozco logró el aislamiento de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa a partir de la fracción IC:MC. En dicho trabajo las proteínas eran separadas por isoelectroenfoque en fase líquida, logrando con ello la separación de tres isoformas en que se presentan las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa y obtenerlas en forma aislada. Sin embargo, en el presente trabajo la obtención de las proteínas de 8 KDa se realizó por medio del SDS-PAGE preparativo y la electroelución simultáneos, posteriormente diálisis y concentración. Al realizar el aislamiento de las proteínas en electroforesis por electroelución continua, se pueden trabajar mayores concentraciones de proteínas presentes en extractos aún mayores a los que anteriormente fueron utilizados por Rangel-Orozco.

En la investigación por obtener proteínas para utilizarlas en el diagnóstico serológico de amibiasis invasiva, se ha trabajado con distintas proteínas, por ejemplo cuando fueron probados los antígenos de 37, 46, 125 y 170 KDa de *E. histolytica*, éstos fueron reconocidos con una frecuencia del 90 % por la IgA secretoria de pacientes con amibiasis intestinal, a diferencia de un reconocimiento del 10 % por parte de sujetos sanos (Ortíz-Ortíz, 1998). Otra proteína sobre la cual se ha investigado es la SREHP, la cual al ponerla a reaccionar con anticuerpos presentes en 108 sueros de pacientes, se demostró que era reconocida por el 82 % de los sueros de pacientes con amibiasis invasiva y un 5 % dieron resultados falsos positivos (Stanley, 1990).

Por otro lado, en un estudio japonés en el cual se utilizó la clonación y expresión en *Escherichia coli* de la alcohol deshidrogenasa de *E. histolytica*, en el que se obtuvo una proteína recombinante con un peso molecular de 43.5 KDa,

al ser probada por ELISA usando sueros de un grupo de pacientes con amibiasis y un grupo control de individuos sanos, se encontró que reaccionaron 53 (88.3%) de los 60 sueros de pacientes con amibiasis en forma positiva para anticuerpos IgG contra la proteína recombinante, en contraste con 53 sueros (98.1%) de las muestras de sueros control fueron negativos (Kimura, 1996).

Los datos mostrados anteriormente, nos animan a reforzar el estudio serológico con la proteína de 8 KDa, ya que se ha demostrado que al utilizarla como antígeno en la prueba de W B en estudios previos y en el presente, se ha observado que solamente los anticuerpos de los pacientes con amibiasis invasiva reconocen esta proteína. Por lo tanto, sería útil diseñar un estudio en el cual se probaran una mayor cantidad de sueros de pacientes de distintos grupos para probar de manera concluyente la capacidad diagnóstica que se generaría en una prueba serológica diseñada con las proteínas de 8 KDa como antígenos, ya sea en una prueba de ELISA o de Dot Blot y con ello explotar al máximo, el conocimiento que se ha generado hasta este momento acerca del carácter inmunodominante de las proteínas de 8 KDa aisladas a partir de la fracción IC:MC obtenida de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. La electroforesis preparativa por electroelución continua en geles de poliacrilamida, es una técnica que permite el aislamiento de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa de *E. histolytica* a partir de la fracción IC:MC.
2. Las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa de *E. histolytica* aisladas por electroforesis por electroelución continua, fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, pero no por los de sueros de sujetos con hepatopatías de diversa etiología.
3. Las proteínas de 8 KDa aisladas pueden ser de gran utilidad para establecer un diagnóstico diferencial con otras hepatopatías.
4. Las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa aisladas, no son reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros de sujetos asintomáticos con exámenes coproparasitológicos positivos para *E. histolytica/E. dispar*, ni por los de sujetos sanos que habitan zonas endémicas de amibiasis.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS

1. Diseñar pruebas para el diagnóstico de amibiasis invasiva, utilizando las proteínas de peso molecular relativo de 8KDa de *E. histolytica* obtenidas en electroforesis por electroelución continua.
2. A partir de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa aisladas, obtener las tres isoformas por medio de isoelectroenfoque, secuenciarlas y clonarlas para hacer posible su producción a gran escala.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-Altamirano G, Torres-Sánchez E, Isibasi-Araujo A, Kumate-Rodríguez J. 1986. Detección de anticuerpos IgA dirigidos contra una lipopeptidofosfoglicana de *E. histolytica* en muestras de calostro humano. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 17 (suppl) 291-295.
2. Aley S. B., Sacoot W. A., Conh Z. A. 1980. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152:391-404.
3. Alper E. L., Littler C. and Monroe L. S. 1976. Counterelectrophoresis in the diagnosis of amebiasis. *Am. J. Gastroenterol.* 65:63.
4. Arellano J., Granados J., Pérez E., Félix C. y Kretschmer R. R. 1990. HLA haplotipos y absceso hepático amibiano en mestizos mexicanos. *Arch. Invest. Méd.* 21 (Supl. 1):11.
5. Arroyo R. y Orozco E. 1986. Localización e identificación de adhemiba I. Una proteína que participa en la adhesión de *Entamoeba histolytica* a eritrocitos humanos y células epiteliales. *Arch. Invest. Méd.* 17(Supl.):135.
6. Arroyo R., Orozo E., 1987. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23 151-158.
7. Avila E., Sanchez-Garza M. and Calderon J. 1985. *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*: sulfhydryl-dependent proteolytic activity. *J. Protozool.* 32:263.
8. Bagalopal P., Nair K. S., Stirewalt W. S. 1994. Isolation of myosin heavy chain from small skeletal muscle samples by preparative continuous elution gelelectrophoresis: application to measurement of synthesis rate in human and animal tissue. *Anal. Biochem.* 221(1): 72.77.
9. Bakker-Grunwald T., Wostam C. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eucariotic cell. *Parasitology Today.* 9:27-31.
10. Bos, H. J. and Van Den Eijk, A. 1976. A Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of amebiasis. *Memorias de la Conferencia Internacional sobre Amibiasis publicadas por el Instituto Mexicano del Seguro Social.* pp 5.
11. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-252.

12. Braga L. H., Ninomiya J. J., McCoy S., Eacker T., Wiedmer C., Pham S., Wood P., J. Sims and W. A. Petri. 1992. Inhibition of complement attack complex by galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **90**:1131-1137.
13. Bruchhaus I., Jacobs P., Leippe M., Tannich E. 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol.* **22**(2):255-263.
14. Brumpt E. 1925. Étude sommaire de l'"Entamoeba dispar" n sp. Amibe à kystes cuadrinucléés, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Méd. (Paris)*, **94**: 943-952.
15. Calderón L. 1980. Dynamic changes of the surface of *Entamoeba histolytica* induced by antibodies. *Arch. Invest. Méd.* **11**(Supl. 1):55.
16. Campos-Rodríguez R., Andrade P., Acosta G., Barranco C., Isibasi A. y Kumate J. 1986. Inducción de una respuesta inmune humoral local contra antígenos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* **17**(Supl.):277.
17. Denis M, Ghadirian E. (1992) Activated mouse macrophages kill *Entamoeba histolytica* trophozoites by releasing reactive nitrogen intermediates. *Microb. Pathog.* **12**(3):193-198.
18. Diamond L. S. 1978. A new medium for axenic cultivation for *Entamoeba histolytica* and other *Entamoebae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**:431.
19. Diamond L. S., Clark C. G. 1993. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 340-344.
20. Dodson M. J., Lenkowski P. W., Eubanks A. C., Jackson T. F., Napodano J, Lyerly D. M., Lochart L. A., Mann B. J., Petri W.A. 1999. Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *J. Infect. Dis.* **179**(2):460-466.
21. Edman U., Meraz M. A., Rausser S., Agabian N., Meza I. 1990. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **172**:879-888.
22. Espinosa-Cantellano M., Martínez-Palomo A. 1991. The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: Structure and dynamics. *Biol. Cell* **72**: 189-200.
23. Faisal S., Ling-Ling J., Jobling M. B., Holmes R. K., Stanley Jr. S. L. 1998. Mucosal immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* (SRHEP) fused to A₂ domain of cholera toxin. *Infection and immunity.* **66**(2):462-468.
24. Flores-Castañeda M. S. 1995. Procedure to preserve antigens of *E. histolytica* without enzymatic inhibitors. *The Commissioners of patents and Trademarks of United States of America.* U. S. Patent 5,459,042.
25. Flores-Castañeda M. S., Mena G. L. and Said-Fernandez S. 1995. Specific diagnosis of liver abscess using preserved *Entamoeba histolytica* antigens without enzymatic inhibitors. *Hepatology.* **22**(4):128.
26. Guerrant R. L. 1986. The global problem of amebiasis: current status, research needs and opportunities for progress. Introduction, current status and research questions. *Rev. Infect. Dis.* **8**:218.

27. Guerrero-Manríquez G. G., Sánchez-Ibarra F., Avila E. E. 1998. Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *A.P.M.I.S.* **106**(11):1088-1094.
28. Hager K. M., Wright E. M. 1994. Preparative SDS gel electrophoresis of sodium/glucose cotransporter fusion protein. Bio-Rad. Bulletin 1685. *Preparative electrophoresis applications notes*.
29. Healy G. R. 1986. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: Epidemiology in the United States. *Rev. Infect. Dis.* **8**: 239-246.
30. Isibasi A, Santa Cuz M, Ramírez A., Kumate J. 1982 Inmunoquímica de una lipopeptidofosfoglicana extraída de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HK-9 cultivadas en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua. *Arch. Invest. Med. (Mex)* **13** (suppl) 51-55.
31. Keene W. E., Pettit M.G., Allen S., McKerrow J. H. 1986. The major neutral proteinases of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **163**:536-539.
32. Kelsall B. L., Ravdin J. I. 1993. Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.*; **158**: 1319-1322.
33. Krestchmier R. R. 1986. Immunology of amebiasis. *Amebiasis. Ed. Elsevier.* pp. 128-129.
34. Kimura A., Hara Y., Kimoto T., Okonu Y., Minekawa Y., Nakabayashi T., Cloning and expression of a putative alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica* and its application to immunological examination. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **3**(3):270-274.
35. Krupp I. M. 1977. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**(3):387.
36. Laemli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
37. Leippe M., Andrae J., Nickel R., Tannich E. and Mueller-Eberhard H.J. 1994. Amebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic membranes. *Mol. Microbiol* **14**:895.
38. Leippe M., Muller-Eberhard H. J. 1994. The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology.* **87**:5-18.
39. Levine N. D., Corliss J. O. et al. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**: 37 - 58.
40. Long-Krug S. A., Fischer K. J., Hysmith R. M., Ravdin J. Y. 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* **152**:536-541.
41. Lotter H., Zhang T., Seybel K. B., Stanley S. L. and Tannich E. 1997 Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kDa lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J. Exp. Med.* **185**(10):1793-1801.
42. Maizel Jr., J. V. 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. In: *Methods in virology.* K. K. Maramorosch and H. Kaprowski eds. Vol. V p. 179-246, New York Academic Press.

43. Marquez-Monter H., Ochoa-Rivera E. and Olivos A. 1993. Genetic polymorphism of *Entamoeba histolytica*: variation in adhesion and phagocytosis in a virulent strain. *Patologia*. **31**:27.
44. Martínez-Palomo A. 1986. Biology of *Entamoeba histolytica* In Martínez-Palomo A. *Amebiasis*. Elsevier Biomedical, Amsterdam.
45. Martínez-Palomo A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today* **3**:111.
46. Martínez-Palomo A. 1989. *Amibiasis*. Ed. Panamericana, México, D.F. pp 12.
47. Martínez-Palomo A., Meza I., Chávez B., Rosales-Encina J. L., Muñoz M. L., González-Robles A., Rojkind M. 1987. *Entamoeba histolytica*: activation and release of membrane dense bodies. *Host parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections (Chang KP, Snary D, eds) Springer-Verlag, Berlin* 371-376.
48. Mirelman D. 1987. Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* **5**(2):272.
49. Monroe L. S., Errol R. and Fitzwilliams S. 1972. A comparative study of the latex agglutination diagnosis of amebic liver abscess. *Am. J. Gastroenterol.* **58**(1):52.
50. Montalvo F., E. Reeves R. E., Warren L. G. 1971. Aerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* **30**:249.
51. Muñoz Onofre. 1989. La tecnología de los ochentas, II. Estudios de materia fecal y serología para el diagnóstico de la amibiasis: ¿ Han contribuido a mejorar el diagnóstico del absceso amibiano hepático?. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **54**:177-180.
52. Muñoz M. L., Calderón J., Tanimoto M., Arias-Negrete S., Martínez-Palomo A. 1984. *Entamoeba histolytica*: Collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* **31**: 466-470.
53. Ojcius D. M., Young J. D. 1990. A role of pore-forming protein in the pathogenesis by parasites? *Parasitology Today* **6**:163-165.
54. Orozco E., Arroyo R., Rodríguez M. A., García-Rivera G. 1987 Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin using adhesion deficient mutants and monoclonal antibodies. *Molecular strategies of parasitic invasion (Agabian N, Goodman H, Nogueira N, eds) Alan R Liss, New York* 531-540.
55. Ortíz-Ortíz L., Mora N., Zambrano-Villa S.A., Carrero J.C., Sánchez-Zerpa M., Osuna A., Rosales-Borja D. M. 1998. Secretory immune response in patients with intestinal amoebiasis. *Parasite Immunol.* **20**(10):503-507.
56. Parelkar S. N. and Stamm W. P. 1973. Indirect immunofluorescent staining of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **67**:659.
57. Perez-Monfort R., Ostoa-Saloma P., Velázquez-Medina L., Monfort I. and Becker I. 1987. Catalytic class of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**:87-98.
58. Pérez-Tamayo R. 1994. Fenómeno inicial en amibiasis hepática experimental. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **59**:62.
59. Petri Jr. W. A., Clark C. G. and Diamond L. S. 1994. Host-parasite relationship in amebiasis: conference report. *J. Infect. Dis.* **169**:483.

60. Petri W. A. Jr., Jackson T. F. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies of the galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun.* **58**: 1802-1806.
61. Petri W. A., Chapman M. D., Snodgrass T., Mann B. J., Broman J., Ravdin J. I. 1989 Subunit structure of the galactose and D-acetyl-Dgalactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **264**:3007-3012.
62. Rangel-Orozco R., Tamez-Treviño E., Isibasi-Araujo A. y Flores-Castañeda M. S. 1994. Búsqueda en *E. histolytica* HM1:IMSS de una proteína de 8 kDa reconocida serológicamente por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **59**(4):81 S.
63. Rangel-Orozco R., Tamez-Treviño E., Castillo-Carranza M. J., Isibasi-Araujo A., Tijerina-Menchaca R. y Flores-Castañeda M. S. 1996. Obtención de proteínas inmunodominantes de *E. histolytica* útiles para el diagnóstico específico de amibiasis invasiva. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* **16**(5):95.
64. Ravdin J. I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* **8**:247.
65. Ravdin J. I. and Guerrant R. L. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved of the pathogenesis of the amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* **4**(6):1185.
66. Reed S. L., Ember J. A., Herdman D. S., DiScipio R. G., Hugli T. E., Gigli I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase degrades anaphylotoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* **155**:266-274.
67. Reed S. L., Bouvier J., Pollack A. S., et al. 1993. Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*: pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene. *J. Clin. Invest.* **91**:1532-1540.
68. Rodríguez M. A., Hernández F., Santos L., Valdéz A., Orozco E. 1989 *Entamoeba histolytica*-molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**:87-100.
69. Rodríguez-Pérez E. G., Salazar-Galván S., Tamez-Treviño E., Ávila M. R., Tijerina-Menchaca R., Flores-Castañeda M. S. Detección de protozosis y helmintiasis en una población marginal urbana de ciudad Benito Juárez, Nuevo León. Memorias del XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica.
70. Rosales-Encina J. L., Meza I., López de Leon A., Talamas-Rohana P., Rojkind M. 1987 Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**:790-797.
71. Ruiloba J. y Zavala B. 1972. Reacciones serológicas en el diagnóstico de la amibiasis. *Gaceta Médica de México.* **102**(4):321.
72. Said-Fernández S. y Flores-Castañeda M. S. 1996. Diagnóstico Molecular de Amibiasis. *Gaceta Médica de México.* **132**(3):314-317.
73. Said-Fernandez S., Mata-Cardenas B. D., Gonzalez-Garza M. T., Navarro-Marmolejo L., Rodriguez-Perez E. 1993 *Entamoeba histolytica* Cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol. Res.* **79**: 200-203.

74. Saíd-Fernández S., Vargas-Villarreal J. y Castro-Garza J. 1986. Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* **17**(Supl.):173.
75. Saíd-Fernández S., Vargas-Villarreal J., Castro-Garza J., Mata-Cardenas B.D., Navarro-Marmolejo L., Lozano-Garza G., Martínez-Rodríguez H. G. 1988 PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans. Soc. Trop. Med Hyg.* **82**:249-253.
76. Sargeant P. G., Williams J. E. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and nonpathogenic amoebae of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **73**: 225-7.
77. Séguin R., B. J. Mann, K. Kellerman, K. Chadee. 1995. Identification of the galactose adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor α production by macrophages. *Proc Nat. Acad. Scie. USA.* **92**: 12175-12179.
78. Stanley S. L., Becker A., Kunzjenkins C., Foster L., Li E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessin multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4976-4980.
79. Stanley S. L., Huizenga H., Foster L., Li E. 1991 Isolation and partial purification of phosphorylated, lipid-containing glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Clin. Res.* **39**:244 A.
80. Strachan W. D., Spice W. M. 1988. Immunological differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *E. histolytica*. *Lancet* **1**: 561-563.
81. Tachibana H., Kobayashi S. 1990. Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000 M_r antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **58**: 955-60.
82. Talamas-Rohana P., Meza I. 1988 Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrato degradation and en cytoskeleton organization. *J. Cell Biol.* **106**:1787-1794.
83. Tanimoto-Weki M., Aguirre-García M., Sánchez M. E. y Sepúlveda B. 1986. Inducción de inmunidad protectora antiamebiana en el hámster por medio de antígeno soluble deslipidizado. *Arch. Invest. Méd.* **17**(Supl.):233.
84. Torian B. E., Lukehart S. A., Stamm W. E. 1989. Use of monoclonal antibodies to indentify, characterize and purify a 96,000 Da surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**:334-343.
85. Torian B. E., Reed S. L., Flores B. M., Plorde J, Stamm W. E. 1989. Serologic responseto the 96,000 Da surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **159**: 794-797.
86. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from poliacylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350.
87. Trissl D. 1982. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. *Rev. Infect. Dis.* **4**(6):1154.

88. Trissl D., Matinez-Palomo A., Arguello C., de la Torre M., Hoz R. 1977 Surface properties related to concanavalina A induced agglutination. *J. Exp. Med.* **145**: 652-664.
89. Udezulu I. A., Leitch G. J., 1987. A membrane-associated neuraminidase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **55**:181-186.
90. Velazquez C., Valette I., Cruz M., Labra M. L., Montes J., Stanley S. L., Calderon J. 1995. Identification of immunogenic epitopes of the 170-kDa subunit adhesin of *Entamoeba histolytica* in patients with invasive amebiasis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**(5):636-641.
91. Vihn Q., Tran D., Scott Herdman Bruce, E. Torian and Sharon L. Reed. 1998. The neutral protein cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J. Infect. Dis.* **177**:508-511.
92. Walsh J. A. 1986. Problems on recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8**(2):228.
93. Weinbach E. C., Diamond L. S. 1974. *Entamoeba histolytica*: aerobic metabolism. *Exp. Parasitol.* **35**:232.
94. Weinbach E. C., Takeuchi T., Claggett C. E., Diamond L. S. 1978. Biological oxidations and flavoprotein catalysis in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* **9**(Supl.1):89.
95. Weinbach E. C., Takeuchi T., Claggett C. E., Inohue F., Kon H., Diamond L. S. 1980. Role of iron-sulfur proteins y the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* **11**(Supl. 1):75.
96. Yamanoto J., Munn R. J. 1994. Isolation of a FAIDS upregulated protein from infected feline lymphoid cell lysates by preparative SDS gel electrophoresis. Bio-Rad. Bulletin 1685. *Preparative electrophoresis application notes*.
97. Yao Q., Bevan J. L., Weaver R. F., Bigelow D. J. 1996. Purification of phospholamban expressed in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* **8**(4): 463-468.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

REACTIVO DE BRADFORD: Azul brillante de Coomassie G-250 100 mg, etanol al 96 % 50 mL, ácido fosfórico al 85 % p/v 100 mL, agua bidestilada c.b.p. 1000 mL. Se disolvió el colorante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol. Posteriormente la solución anterior se mezcló con 100 mL de ácido fosfórico al 85 % , el siguiente paso fue diluir esta solución a un litro con agua bidestilada y aforar, después de la aforación, el reactivo se filtró. Este reactivo es estable por un lapso de dos semanas a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN MADRE ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA (30 % T/ 2.67 % C): Acrilamida 146.0 g, N-N'-Metilen-bis-acrilamida 4.0 g, agua bidestilada, c.b.p. 500 mL. Se disolvieron en alrededor de 350 mL de agua bidestilada y se desgasó por agitación a 4 °C, posteriormente se ajustó a 500 mL, se filtró y almacenó a 4 °C.

BUFFER PARA GEL DE SEPARACIÓN (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8): Tris base 27.23 g, agua bidestilada c.b.p. 150.00 mL. Se disolvieron 27.23 g. de Tris base en aproximadamente 100 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl 6 N y se llevó a un volumen de 150 mL con agua bidestilada y se almacenó a 4 °C.

BUFFER PARA GEL DE EMPAQUETAMIENTO (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8): Tris base 6 g, agua bidestilada c.b.p. 100 mL. Se disolvió el Tris base en aproximadamente 60 mL de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl 6 N y se aforó a 100 mL con agua bidestilada y se almacenó a 4 °C.

BUFFER DE CORRIMIENTO (ELECTRODO) 10X pH 8.3 Prep Cell: Tris base 30.3 g, glicina 144.0 g, SDS 10.0 g, agua bidestilada c.b.p. 1000 mL. Se disolvieron en aproximadamente 700 mL. de agua bidestilada y se aforaron a 1000 mL. No se ajustó el pH con ácido o con base.

BUFFER DE CORRIMIENTO 5X PARA CÁMARA PROTEAN pH 8.3: Tris Base 9.0 g, glicina 43.2 g, SDS 3.0 g, agua bidestilada c.b.p. 600 mL. Se disolvieron las sales en aproximadamente 450 mL, posteriormente se ajustó a un volumen de 600 mL con agua bidestilada.

PERSULFATO DE AMONIO AL 10 %: Persulfato de amonio 100 mg, agua bidestilada 1 mL. Se disolvió el persulfato en el agua y se agitó suavemente para su disolución.

DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) AL 10 %: SDS 10.0 g, agua bidestilada c.b.p. 100 mL. Se disolvió el SDS en aproximadamente 70 mL. de agua bidestilada y se aforó a 100 mL. y se almacenó a temperatura ambiente.

GLICEROL AL 50 % v/v: Glicerol 50.0 mL, agua bidestilada c.b.p. 100 mL. Se disolvió el glicerol en aproximadamente 40 mL. de agua bidestilada y se aforó a 100 mL y se almacenó a temperatura ambiente.

AZUL DE BROMOFENOL AL 0.5 %: Azul de bromofenol 500 mg agua bidestilada c.b.p. 100 mL. Se disolvió el azul de bromofenol en aproximadamente 80 mL de agua bidestilada y se aforó a 100 mL.

BUFFER DE MUESTRA (BUFFER REDUCTOR DE SDS): Agua bidestilada 3.8 mL, tris-HCl 0.5 M pH 6.8 1.0 mL, glicerol 0.8 mL, SDS al 10 % 1.6 mL, azul de bromofenol al 0.5 % 0.4 mL, volumen total 7.6 mL. Por cada 950 μ L de muestra, añadir 50 μ L de β mercaptoetanol y hervir de acuerdo al tiempo estandarizado para cada una de las mezclas a analizar.

SOLUCIÓN DE AZUL DE COOMASSIE AL 0.1 % PARA TINCIÓN DE GELES: Azul brillante de Coomassie R-250 100 mg, metanol 40 mL, ácido acético 10 mL, agua bidestilada 50 mL. Se disolvió el colorante en la solución de agua bidestilada con metanol y ácido acético previamente homogenizada y se almacenó a temperatura ambiente.

SOLUCION DECOLORANTE DE GELES: Metanol 40 mL, ácido acético 10 mL, agua bidestilada 50 mL. Se disolvieron el metanol y el ácido acético en el agua y se homogenizaron por agitación y la solución se almacenó a temperatura ambiente.

BUFFER DE CORRIMIENTO PARA CÁMARA DE ELECTROFORESIS Mini Protean II y Protean xi II CELL 5X: Tris base 9.0 g, glicina 43.2 g, SDS 3.0 g, agua bidestilada c.b.p. 600 mL. Se disolvieron las sales en aproximadamente 400 mL y se llevaron a un volumen final de 600 mL.

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 0.15 M pH 7.2 - 7.4: Cloruro de sodio 8.0 g, fosfato dibásico de sodio 1.2 g, fosfato monobásico de potasio 0.2 g, cloruro de potasio 0.2 g, agua destilada c.b.p. 1000 mL. Se disolvieron las sales en aproximadamente 950 mL de agua bidestilada, se ajustó el pH y se aforó a 1000 mL.

BUFFER DE TRANSFERENCIA pH 8.3: Tris 3.03 g, glicina 14.4 g, metanol 200 mL, agua bidestilada c.b.p. 1000 mL. Se disolvió el tris y la glicina en agua bidestilada,

posteriormente se agregaron 200 mL de metanol y se ajustó el volumen a 1 L con agua bidestilada (Towbin 1979).

SOLUCIÓN BLOQUEADORA DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y LECHE DESCREMADA AL 1 % (Western-Blot): Albúmina sérica bovina 1.0 g, leche descremada 1.0 g, PBS 0.15 M pH 7.2 - 7.4 c.b.p. 100 mL. Se disolvieron la albúmina y la leche descremada en aproximadamente 80 mL de PBS y se ajustó el volumen a 100 mL.

SOLUCIÓN DE LAVADO (Western-Blot): Tween 20 0.1 mL, gelatina de pescado 0.5 mL, PBS 0.15 M pH 7.2 - 7.4 100.0 mL. Se disolvieron el tween y la gelatina en aproximadamente 80 mL de PBS y se ajustaron a 100 mL.

SOLUCIÓN DILUYENTE (Western-Blot): Tween 20 0.1 mL gelatina de pescado 1.5 mL, PBS 0.15 M pH 7.2 - 7.4 100.0 mL. Se disolvieron el tween y la gelatina en aproximadamente 80 mL de PBS y se ajustaron al 100 mL.

SOLUCIÓN DE REVELADO: Tetraclorhidrato de 3' 3'- Diaminobencidina 10 mg, peróxido de hidrógeno al 30 % 10 μ L, PBS 0.15 M pH 7.2 - 7.4 20 mL. Se disolvió la 3'3'- Diaminobencidina en el PBS, después de disolverse, se le agregó el peróxido de hidrógeno, después de agregar el peróxido la solución esta lista para el proceso de revelado.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Julio Henoc Monjardín Heráldez

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en
Microbiología Médica

Tesis: AISLAMIENTO DE BANDAS ELECTROFORÉTICAS DE UN
EXTRACTO DE *Entamoeba histolytica* POR ELECTROFORESIS EN
ELECTROELUCIÓN CONTINUA

Campo de Estudio: Microbiología Médica.

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Guamúchil, Sinaloa, el 28 de octubre de 1970,
hijo de José María Monjardín Castro y María del Carmen Heráldez Cuevas.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido
Químico Farmacéutico Biólogo.