

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

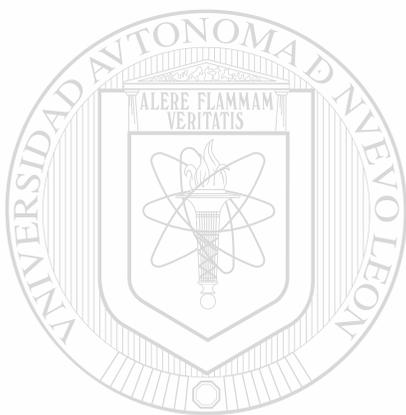


AISLAMIENTO DE RNA MENSAJEROS QUE
CODIFICAN ANTIGENOS RECOMBINANTES
DESPLEGADOS DIFERENCIALMENTE EN ESTADOS
VIRULENTO Y NO VIRULENTO POR
Entamoeba histolytica

POR
MC ISAIAS BALDERAS-RENTERIA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

SEPTIEMBRE, 2000



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

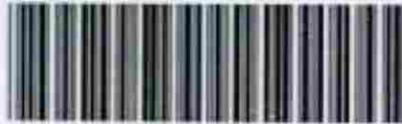
MC ISAIAS BALDERAS-RENTERIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

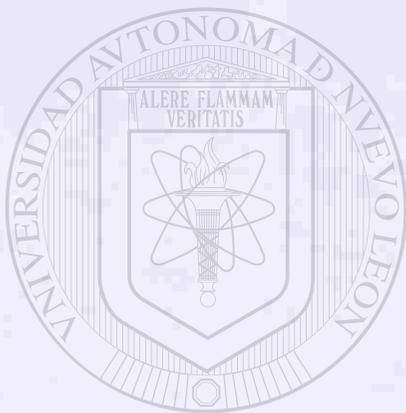
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
BIBLIOTECAS

®

TD
RC121
.A5
B3
2000
c.1



1080124482



UANL

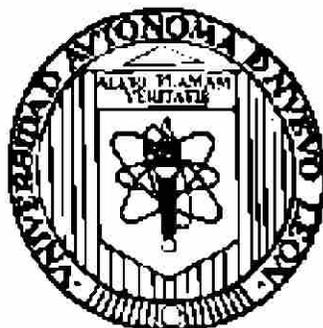
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO DE RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN
ANTÍGENOS RECOMBINANTES DESPLEGADOS
DIFERENCIALMENTE EN ESTADOS VIRULENTO Y NO
VIRULENTO POR *Entamoeba histolytica*.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POR

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
MC ISAÍAS BALDERAS-RENTERÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA.**

SEPTIEMBRE, 2000

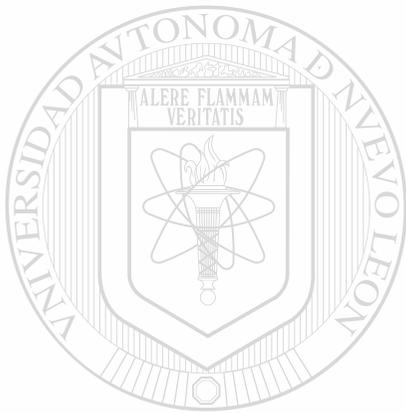
TD

RC121

.A5

B3

2000



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AISLAMIENTO DE RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN ANTÍGENOS RECOMBINANTES DESPLEGADOS DIFERENCIALMENTE EN ESTADOS VIRULENTO Y NO VIRULENTO POR *Entamoeba histolytica*.

Aprobación por Comité de Tesis.



**Dra. Lina H. Morales Ramos.
Presidente**



**Dra. Linda E. Muñoz Espinosa.
Secretario**



**Dr. Luis J. Galán Wong.
1er Vocal**

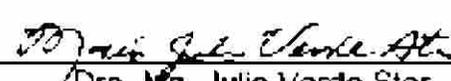


Dr. Mario R. Morales Vallarta.

2do Vocal

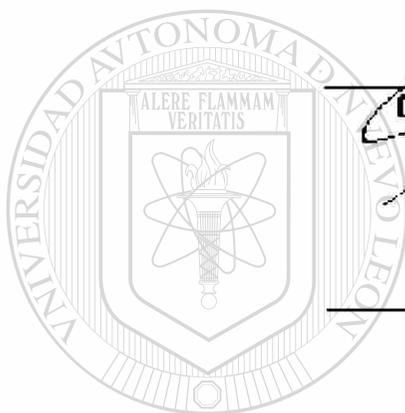


**Dr. Benito Pereyra Alferez.
3er Vocal**



Dra. Ma. Julia Verde Star.

Jefa de la División de Estudios de Postgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Hígado del Hospital Universitario "Dr. J. E. González", y en el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de las Dras. Linda E. Muñoz Espinosa y Lilia H. Morales Ramos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A DIOS

Has guiado mi vida

A MI MADRE

LIDIA RENTERIA ORTEGA

Has protegido mi vida

A LA MEMORIA DE MI PADRE

CESAR E. BALDERAS ALEJANDRO

Me has mostrado lo duro de la vida

A MIS HERMANAS

DALILA, ESTHER Y CLAUDIA

Le han dado felicidad a mi vida

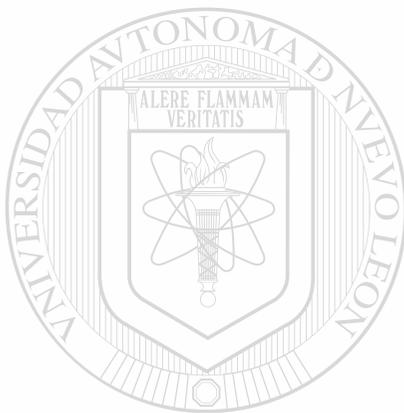
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A MI SOBRINA ANAKAREN

Has venido a iluminar mi vida

A JUAN FRANCISCO

*Me has retado a conseguir cualquier cosa
en mi vida*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

AGRADECIMIENTOS

A las Instituciones:

Agradezco a la Unidad de Hígado del Hospital Universitario por las facilidades otorgadas para el trabajo experimental.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca acreditada para la realización de la presente tesis.

Agradezco al Hospital Civil de Belén y Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara, Jal., por las facilidades y el material necesitado en su momento.

Agradezco al Departamento de Microbiología de la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANL por la total disposición para ayudarnos en el trabajo experimental.

Agradezco al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por brindarme el tiempo y espacio necesarios para mi formación inicial.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A las Personas:

Α ΨΗΦΩΝ. ΕΡΩ ΔΕΧΛΑΡΩΜ, ΤΟ ΠΕΡΙΤΕΥΟ ΙΕΣΟΥ ΧΗΡΙΣΤΟΥ ΤΕΟ ΟΙ ΟΣΤΕΡΙΟΥΝ. ®

A la Dra. Linda Muñoz por brindarme la oportunidad de descubrir mi propia capacidad.

A la Dra. Lily Morales por creer en mi, por su paciencia y comprensión.

Al Dr. Luis Galán por su ejemplo, su apoyo y sus consejos en los momentos críticos.

A los Dres. Mario Morales y Benito Pereyra por sus valiosas aportaciones desde el planteamiento del anteproyecto hasta la revisión de la tesis.

Al Dr. Jesús Ancer por los apoyos y permisos necesarios para la exposición de los resultados de la tesis.

A mi madre, mis hermanas, mis abuelos, mis tíos y mis primos y a mi "otra familia" por soportar mi vida personal cuando la vida laboral estaba difícil.

A mis maestras Emilia Vasquez, Ivonne Camacho y Martha Suarez, porque mucho de lo que yo pueda ser, es parte de la formación que ustedes me dieron, y por la oportunidad que me han brindado de regresar a mi escuela un poco de lo mucho que me ha dado.

A mis compañeros de trabajo, Paula Cordero, Lupita Rodríguez, Letty Hernández, Lupita Pérez, Alma, Don Manuel y Celina pues gracias a la grata convivencia diaria y la ayuda mutua también se consigue avanzar en la ciencia.

A mi amigo Luis, por compartir los buenos y los no tan buenos momentos de nuestra formación académica. Por ser además, como un hermano para mí.

A Juan, porque sobrellevaste conmigo la parte más difícil de todo esto: la parte final.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

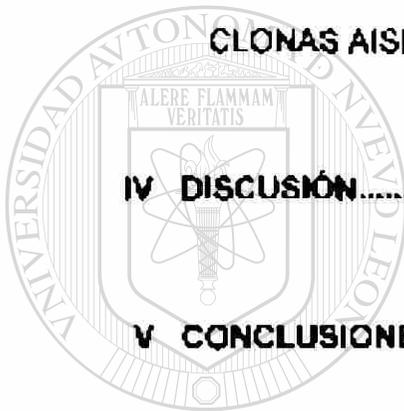
Capítulo	Página
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.1 La amibiasis.....	1
1.1.2 El parásito <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.2 ANTECEDENTES.....	3
1.2.1 <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i>	3
1.2.2 Patogenicidad de <i>E. histolytica</i>	4
1.2.3 Citotoxicidad de <i>E. histolytica</i>	6
1.3 AVANCES EN EL DESARROLLO DE PRUEBAS	
DIAGNÓSTICAS PARA AMIBIASIS POR <i>E. histolytica</i>.....	7
1.3.1 Diagnóstico clásico de amibiasis por <i>E. histolytica</i>	7
1.3.2 Métodos comunes de diagnóstico clínico de amibiasis.....	7
1.3.3 Diagnóstico Molecular.....	8
1.3.4 Serodiagnóstico con Antígenos Recombinantes.....	10
1.4 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS CONTRA LA AMIBIASIS.....	11
1.4.1 Vacuna contra la amibiasis por <i>E. histolytica</i>	12
1.5 APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA	
INVESTIGACIÓN SOBRE AMIBIASIS Y <i>E. histolytica</i>.....	13
1.6 IDENTIFICACIÓN DE GENES.....	13

1.6.1 Bibliotecas de DNA complementario.....	14
1.6.2 Identificación de clonas de cDNA.....	15
1.6.3 Clonación de genes expresados diferencialmente por una misma especie.....	16
1.6.4 Bibliotecas de cDNA construidas en el vector SurfZAP.....	16
1.6.5 Diseño de los insertos para el vector SurfZAP.....	21
1.7 IMPORTANCIA, JUSTIFICACIÓN Y ORIGINALIDAD.....	22
1.8 HIPÓTESIS.....	24
1.9 OBJETIVOS.....	25
1.9.1 Objetivo general.....	26
1.9.2 Objetivos específicos.....	26
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	28
2.2.1 Criterios de Inclusión.....	28
2.2.2 Criterios de Exclusión.....	28
2.3 ESTRATEGIA GENERAL.....	29
2.4 OBTENCIÓN DE CULTIVOS VIRULENTO Y NO VIRULENTO.....	30
2.4.1 Cultivo axénicos de <i>E. histolytica</i>	30
2.4.2 Inducción del absceso hepático amibiano en hámster.....	31
2.4.3 Cosecha de amibas a partir del absceso hepático de hámster.....	31
2.5 EXTRACCIÓN DE DNA AMIBIANO.....	32

2.6 PCR PARA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES.....	33
2.6.1 Amplificación.....	33
2.6.2 Los iniciadores.....	34
2.6.3 Análisis electroforético de los productos amplificados.....	34
2.7 DETECCIÓN DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR....	35
2.8 DETECCIÓN DE mRNA DESPLEGADOS DIFERENCIALMENTE...36	
2.8.1 Extracción de RNA.....	36
2.8.2 Retrotranscripción.....	37
2.8.3 Corrimiento de la Electroforesis.....	38
2.9 DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA	
DE <i>E. histolytica</i>	41
2.9.1 Determinación de la actividad hemolítica.....	41
2.9.2 Determinación de la tasa de entrofagocitosis.....	42
2.9.3 Determinación de la citotoxicidad sobre células MDCK.....	42
2.9.3.1 Siembra de microplaca.....	43
2.9.3.2 Ensayo Colorimétrico.....	43
2.10 SELECCIÓN DE mRNA DIFERENCIALES.....	44
2.10.1 Estrategia de Selección.....	44
2.10.2 Extracción de RNA total.....	46
2.10.3 Síntesis de cDNA.....	46
2.10.4 Hibridación mRNA-cDNA.....	46
2.10.5 Obtención de mRNA mediante Extracción con Columna Oligod(T).....	47
2.11 CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS.....	48

2.11.1 Alineación de Iniciadoras para formar los Adaptadores 3' y 5'.....	49
2.11.2 Unión del Adaptador 3' a los mRNA Diferenciales.....	52
2.11.3 Retrotranscripción.....	52
2.11.4 Síntesis de la Segunda Cadena.....	52
2.11.5 Unión del Adaptador 5'.....	53
2.11.6 Clonación de Insertos al Vector Fágico.....	53
2.11.7 Empaquetamiento del Vector.....	54
2.11.8 Preparación de Bacterias Hospedadoras.....	54
2.11.9 Titulación de la Biblioteca.....	55
2.12 TAMIZAJE INMUNOLÓGICO DE LAS BIBLIOTECAS.....	56
2.12.1 Preparación de los Filtros.....	56
2.12.2 Unión del Antisero.....	56
2.12.3 Unión del Anticuerpo Secundario Biotinilado	57
2.13 PRUEBA CON SUEROS.....	58
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS	
III RESULTADOS.....	59
3.1 OBTENCIÓN DEL CULTIVO VIRULENTO A PARTIR DEL ABSCESO.....	59
3.2 EXTRACCIÓN DE DNA Y RNA.....	60
3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA DIFERENCIAR ESPECIES EN LOS CULTIVOS.....	61
3.4 DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS AMPLIFICADOS AL AZAR.....	62

3.5 DESPLIEGUE DIFERENCIAL DE mRNA EN CV Y CNV.....	63
3.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FENOTÍPICOS.....	65
3.6.1 Entrofagocitosis.....	65
3.6.2 Actividad hemolítica.....	66
3.6.3 Citotoxicidad sobre células MDCK.....	66
3.7 TITULACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE cDNA.....	68
3.8 TAMIZAJE INMUNOLÓGICO.....	68
3.9 INMUNORREACTIVIDAD CRUZADA DE LAS CLONAS AISLADAS.....	69
IV DISCUSIÓN.....	74
V CONCLUSIONES.....	83
VI PERSPECTIVAS.....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÉNDICES.....	101



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....86

APÉNDICES.....101

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
I. Secuencias de los oligonucleótidos para PCR diferencial.....	34
II. Secuencia del iniciador OP-2 para detección de polimorfismos.....	36
III. Coctel de PCR para amplificación de cDNA de despliegue diferencial.....	40
IV. Secuencia de los iniciadores utilizados para PCR de despliegue diferencial.....	41
<hr/>	
V. Secuencias de los oligonucleótidos que forman los adaptadores.....	49
VI. Coctel de digestión para formar sitio cohesivo Spe I.....	52
VII. Reacción de ligación de los insertos al vector SurfZAP.....	54
VIII Parámetros fenotípicos asociados a virulencia en <i>E. histolytica</i>	65

**IX Clonas de CV retadas contra los sueros de pacientes
asintomáticos.....70**

**X Clonas de CV retadas contra los sueros de personas
sanas.....71**

**XI Clonas de CNY retadas contra los sueros de pacientes
con absceso hepático amibiano.....72**

**XII Clonas de CNY retadas contra los sueros de personas
sanas.....73**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. El vector SurfZAP.....	19
2. Proceso de expresión de las proteínas de fusión.....	20
3. Estrategia general.....	30
4. Despliegue diferencial de mRNA.....	40
5. Determinación de eritrofagocitosis y actividad hemolítica.....	42
6. Determinación de citotoxicidad.....	44
7. Estrategia de selección de mRNA diferenciales.....	45
8. Preparación de insertos para clonación a vector.....	50
9. Características de adaptadores para insertos.....	51
10. Aspecto microscópico de las lesiones hepáticas por <i>E. histolytica</i>.....	60

11. Aspecto del RNA amibiano en gel de agarosa.....61

**12. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% mostrando los productos
amplificados a partir de DNA genómico amibiano.....62**

13. Polimorfismo en el genoma de *E. histolytica* de CV y CNV.....63

14. Despliegue diferencial de mRNA en *Entamoeba histolytica*.....64

15. Curva del % de Eritrofagocitosis contra tiempo de CV y CNV.....65

**16. Microplaca mostrando la citotoxicidad de CV y CNV
sobre células MDCK.67**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

17. Gráfica de la citotoxicidad de CV y CNV sobre células MDCK.....67

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

18. Aspecto de uno de los Filtros de Nitrocelulosa con clones positivas..69

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ag-Rec	Antígeno Recombinante
°C	Grados Centígrados
cDNA	DNA complementario a la cadena de mRNA
CNV	Cultivo No Virulento
CV	Cultivo Virulento
DEPC	Diétil Pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos Trifosfatados
DO	Densidad Óptica
g	Gramos
h	Horas
HRP	Peroxidasa de Rábano

IPTG Isopropil tio- β -D-galactósido Piranosa

KDa **Kilodaltones**

Kg **Kilogramo**

l **Litro**

M **Concentración Molar**

min **Minutos**

ml **Mililitros**

mM **Concentración Milimolar**

mosmol **Miliosmoles**

mRNA	RNA mensajeros
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración Micromolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NP-40	Nonidet P-40
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
pH	Logaritmo negativo de la Concentración de Iones Hidrógeno
PMS	Formazán
RAPD-PCR	Detección de Polimorfismos mediante Amplificación al Azar

RNA **Ácido Ribonucleico**

rpm **Revoluciones por Minuto**

Seg **Segundos**

U **Unidades**

UFP **Unidades Formadoras de Placa**

UH **Unidades Hemolíticas**

V **Voltios**

X **Número de Veces la Concentración de la Solución**

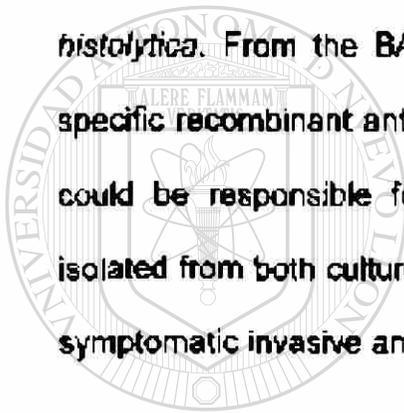
xg **Número de Veces la Fuerza de Gravedad**

ABSTRACT

Isolation of mRNA Encoding Recombinant Specific Antigen Differentially Displayed by *E. histolytica* Virulent and Non-virulent Strains.

The study of cloned populations and genetically related organisms is important to understand the molecular basis of variability in *Entamoeba histolytica*. In this study we present the results from the analysis of molecular events triggered by the *E. histolytica* trophozoites throughout passage by hamster's liver in order to produce experimental amebic liver abscess (ALA) and consequently to reactivate its virulence. And the isolation of the mRNA differentially displayed in such conditions by means of the immunological screening of subtractive cDNA libraries. We evaluated phenotypic variability related to virulence *in vitro* by means of the rate of erytrophagocytosis, hemolytic activity and the cytotoxic effects on cell cultured MDCK monolayers. Genotypic variability was determined by genetic polymorphism using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, and to study differential gene expression we used differential mRNA display to identify differences in subsets of transcripts levels. Construction of subtractive cDNA libraries was performed using both kind of cultures: Cultures studied before (BALA) and after (AALA) inoculation in hamster peritoneal cavity. Our results demonstrate that both cultures exhibited variability in their virulence *in vitro*. The rate of erytrophagocytosis of the BALA was 43% ingested red blood cells (RBC), while AALA ingested 97% of RBC. Trophozoites of BALA destroyed 37% of the cell culture monolayers in comparison with 93% destroyed by the

trophozoites of AALA. About absolute hemolytic activity, BALA presented 29.50 hemolytic Units/ 10^8 trophozoites/90 min (hU), while AALA presented 70.30 hU. RAPD technique allowed us to observe different number and intensity of marker bands in both cultures suggesting genetic polymorphic markers detected in *E. histolytica*. Respect to differential display our results showed an increase in level of several mRNA too. These results allow us to use this mRNAs to construct the cDNA subtractive libraries. From the AALA library we can to isolate 17 clones that they may be associated with a biological function related to virulence of *E. histolytica*. From the BALA library we can to isolate 9 clones that encoding specific recombinant antigens. This study allow us to suggest that this parasite could be responsible for an asymptomatic and invasive infection. Antigens isolated from both cultures may help to improve diagnosis of asymptomatic and symptomatic invasive amebiasis.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Resumen

Isaias Balderas Renteria

Fecha de Graduación: Septiembre del 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio AISLAMIENTO DE RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN ANTÍGENOS RECOMBINANTES DESPLEGADOS DIFERENCIALMENTE EN ESTADOS VIRULENTO Y NO VIRULENTO POR *Entamoeba histolytica*.

Número de páginas: 105

Candidato para el grado de Doctorado en
Ciencias con especialidad en Biotecnología

Propósito y Método del Estudio: Se ha sugerido que *E. histolytica* posee una enorme variabilidad en su expresión genética al someter los cultivos amibianos clonales a diversas condiciones medioambientales estrechamente relacionadas con la virulencia de las amibas. Esta propuesta ha hecho resurgir el concepto de un estado virulento y un estado no virulento en una sola especie, sin descartar el concepto oficialmente aceptado de la existencia de dos especies. Lo anterior plantea la necesidad, reconocida oficialmente por la OMS de "desarrollar urgentemente nuevos métodos capaces de distinguir entre amibiasis virulenta y no virulenta, así como amibiasis debidas a *E. histolytica* o *E. dispar* tan sensibles y específicos y a la vez tan sencillos y económicos que permitan ser aplicados tanto en estudios de determinación de las tasas de parasitosis reales debidas a *E. histolytica* y/o *E. dispar* así como a estudios de diagnóstico en campo como trabajo de rutina. Esto ha abierto la posibilidad y la necesidad implícita de identificar y producir nuevos antígenos recombinantes específicos de *E. histolytica* en estado virulento y no virulento que sean capaces de superar a los ya existentes en cuanto a sensibilidad, especificidad, y número, por la gran variabilidad antigénica que presentan los protozoarios y que de hecho exhibe *E. histolytica*. Nosotros nos propusimos aislar tales antígenos recombinantes y para ello, fue necesario identificar y establecer primeramente la variabilidad genética y fenotípica de *E. histolytica* al ser expuesta a distintas

condiciones medioambientales relacionados con su virulencia como sería el cultivo axénico *in vitro* por largos periodos de tiempo o la inducción de cultivos al inocularlos en hígado de hámster para la producción experimental de absceso. Nuestros objetivos fueron establecer la variabilidad de *E. histolytica*, y posteriormente diseñar una estrategia que a partir de los mRNA expresados diferencialmente, nos permitiera aislar los que corresponden a antígenos específicos del estado virulento y no virulento de la especie. Se utilizó la cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica* la cual fue cultivada axénicamente en medio TYI-S33. La misma cepa fue inducida mediante la inoculación en hígado de hamster para la producción de absceso experimental. Una vez extraído el material genético de sendos cultivos, se determinó la identidad de la especie mediante PCR con oligonucleótidos específicos para confirmar que efectivamente en todos los cultivos tuvimos solamente *E. histolytica* sin contaminación con *E. dispar*. Enseguida se extrajo el RNA de sendos cultivos y se realizó RT-PCR con hexámeros al azar para obtener el cDNA. La variabilidad fenotípica fue evaluada por la virulencia del cultivo *in vitro* y el cultivo inducido midiendo los parámetros de eritrofagocitosis, citotoxicidad sobre células MDCK y actividad hemolítica. El despliegue diferencial de mRNA fue observado utilizando las técnicas de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) y la técnica de "Differential display" que es una poderosa herramienta que sirve para aislar genes que son diferencialmente expresados en dos diferentes estados de la célula, en respuesta a un tratamiento o combinación de tratamientos. Finalmente, la selección de mensajeros específicos se realizó mediante la construcción de bibliotecas sustractivas tamizadas con sueros de pacientes en estado asintomático y con absceso hepático amibiano.

Contribuciones y Conclusiones: Con el presente trabajo establecimos a nivel fenotípico, genético y transcripcional la variabilidad de *Entamoeba histolytica* en presencia de factores medioambientales distintos relacionados a la virulencia del parásito. Observamos una marcada variabilidad fenotípica en cuanto a eritrofagocitosis con un 97% de ingestión de eritrocitos para el cultivo

virulento (CV) y un 43% para el cultivo no virulento (CNV). La actividad hemolítica fue de 70.30 para CV mientras que CNV presentó 29.50 unidades hemolíticas/10⁶ trofozoitos/90 min. En cuanto a la citotoxicidad, CV presentó un 90% de células destruidas y CNV sólo el 45%. Los experimentos de la variabilidad genética mostraron lo siguiente: La técnica de RAPD nos permitió observar una diferente intensidad y número de bandas obtenidas al correr una electroforesis en gel de los productos obtenidos del RAPD. La técnica de "Differential display" mostró también y finalmente confirmó la existencia de un despliegue diferencial de mRNA en sendos cultivos. De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que: *Entamoeba histolytica* presenta un aumento en la expresión fenotípica de su virulencia al inducir los cultivos clonales mediante inoculación experimental en hígado de Hámsters lo cual se observó al incrementarse la tasa de entrofagocitosis, la actividad hemolítica y la citotoxicidad sobre cultivos de monocapas de células MDCK. Este parásito también muestra gran cantidad de polimorfismos en su genoma al inducir el estado virulento y expresa potenciadamente algunos transcritos en su estado virulento, en comparación con su estado no virulento. Diseñamos una estrategia de selección de mRNA expresados diferencialmente en estados virulento y no virulento por *E. histolytica*, a partir de la cual, se construyó una biblioteca sustractiva de cultivos virulentos de *E. histolytica* tamizada con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, logrando aislar 17 clones que codifican antígenos específicos. Y a partir de una biblioteca sustractiva de cultivos no virulentos de *E. histolytica* tamizada con sueros de pacientes con amibiasis asintomática, aislamos 9 clones que codifican antígenos específicos.

FIRMA DEL ASESOR:



CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 LA AMIBIASIS

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis, (WHO/PAHO/UNESCO, 1997) la cual se caracteriza por la destrucción de tejido en las zonas invadidas por las amibas (Walsh JA., 1988). Las formas clínicas de mayor incidencia son el absceso hepático amibiano y la disentería amibiana (Joyce MP., 1988). Los amebomas tienen importancia médica diagnóstica porque pueden ser confundidos con procesos neoplásicos (Yiotsas ZD., et al. 1973). Actualmente se considera que en el mundo existen 500 millones de personas infectadas por *E. histolytica* (Sepúlveda B., 1982), que por causa de esta enfermedad mueren más de 50,000 personas al año (Godbold GD., 1998), y que solo una de cada 10 muestran síntomas de la enfermedad (Walsh JA., 1988).

1.1.2 EL PARÁSITO *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica podría considerarse como un eucariote arquetípico primitivo cuya morfología celular se caracteriza por la ausencia de mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, citoesqueleto organizado (Müller M., 1988) y la presencia de numerosas vacuolas y vesículas (Saavedra-Lira E. et al, 1996).

Bioquímicamente, poseen un metabolismo en el cual se encuentran ausentes los citocromos, el ciclo de ácidos tricarbóxicos, la vía de las pentosas fosfato, la vía biosintética de glutatión, y la presencia de actinas y ubiquitinas altamente divergentes (Mertens E., 1993). Posee además enzimas digestivas unidas a membrana y una bomba de protones vacuolar muy característica en membrana plasmática (Montalvo FE. et al, 1971).

A nivel cromosómico, no ha sido posible identificar la típica estructura nucleosomal eucariótica, aunque se han identificado la mayoría de los genes de histonas (Bhattacharya A. et al, 2000). Se han realizado determinaciones de DNA total que indican que cada trofozoito contiene entre 0.4-1.5 pg (Torres-Guerrero H., 1991). Se ha observado también que el genoma de *E. histolytica* tiene un bajo nivel de G+C (22.4%) (Byers TJ., 1986), y un tamaño de alrededor de 4×10^8 pares de bases con aproximadamente 38,400 genes transcripcionalmente activos (Carrero JC., et al. 1996); Lo cual es 8 veces

mayor que el número de genes activos en *Drosophila melanogaster*. La mayoría de los genes ambianos son fuertemente empaquetados, carecen de intrones, y tienen regiones 5' y 3' no traducidas muy cortas (Sengal D., et al. 1994).

A la fecha, sigue siendo importante la identificación y estudio de moléculas involucradas en las rutas bioquímicas, mecanismos de transducción de señales y funciones organelares a fin de poder mejorar las aportaciones actuales en cuanto a diagnóstico, terapia, profilaxis y estudio de la patogenicidad del parásito.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 *Entamoeba histolytica* Y *Entamoeba dispar*.

La existencia de *E. dispar*, una especie no patógena, fue propuesta por primera vez por Brumpt en 1925 (Petithory JC. et al, 1994). No obstante, durante 5 décadas, dicho concepto permaneció ignorado por la mayoría de los investigadores. Fue alrededor de 1970, cuando las evidencias de la presencia de *E. dispar* empezaron a resurgir y acumularse, sugiriendo que Brumpt estaba en lo correcto.

E. histolytica y *E. dispar* son especies de protozoarios genéticamente distintas pero cercanamente relacionadas. Ambas son morfológicamente indistinguibles, colonizan el intestino humano, pero solo *E. histolytica* es capaz de invadir tejidos y causar enfermedad (Tannich E., 1998).

E. histolytica y *E. dispar* poseen patrones enzimáticos característicos que originalmente permitieron identificarlas y agruparlas en zimodemos patógenos y no patógenos (Sargeant P., 1988). También poseen proteínas de superficie y estructura del material genético que son característicos de cada especie (Petithory JC., 1994).

Acerca de las implicaciones diagnósticas de la aceptación oficial por la OMS de dos especies (WHO/PAHO/UNESCO, 1997), es conocido que las especies mencionadas producen reacciones serológicas cruzadas con las técnicas clásicas de laboratorio, y un importante problema en cuanto a la evidencia o ausencia de sintomatología de la enfermedad, para definir el parásito infectante,

lo cual se explica hoy en día, parcialmente, con la presencia de ambas especies.

El impacto de la presencia de *E. dispar* en el posible desarrollo de una vacuna ha desembocado en la identificación de una numerosa cantidad de antígenos superficiales de trofozoitos que pudieran representar importantes componentes de la interacción hospedero-parásito, pero que no obstante tales antígenos superficiales, están presentes en ambas especies.

1.2.2 PATOGENICIDAD DE *E. histolytica*.

Actualmente, permanece como controversia a nivel mundial, si también la infección por amibas en estado de portador es producida por *E. histolytica* de manera que el protozoario sea capaz de presentar estos dos fenotipos diferenciales como especie y en donde en todo caso, se trataría de amibiasis virulenta y avirulenta.

La variabilidad genética a través de diferentes clones de la misma especie y cepa de *E. histolytica*, la producción experimental de clones híbridas las cuales pueden diferir de su cepa paterna y la posibilidad de invasividad de *E. dispar*, son algunos de los fenómenos que pudieran indicar que la última palabra sobre la presencia y diferenciación de dos especies no ha sido dicha (Mehlotra RK., 1998).

Los factores que promueven la invasión más que la infección comensal no son todavía entendidos. Las líneas derivadas de un aislado único de *E. histolytica* exhiben diferentes niveles de virulencia (Ankri S. et al. 1998).

Por otro lado, se ha comprobado que *E. histolytica* posee enorme variabilidad en la expresión genética bajo distintas condiciones y la presencia de tal despliegue es observable en el laboratorio a través de polimorfismos genéticos y parámetros fenotípicos de cultivos clonales (De Menezes FL. et al, 1997). Otros experimentos han permitido observar directamente la producción de RNA mensajeros diferenciales al someter los cultivos amibianos a diversas condiciones medioambientales estrechamente relacionadas con la virulencia de las amibas, tales como el efecto del colágeno tipo I y calcio como inductores de secreción de gránulos electrodensos asociados a patogenicidad (Salazar I. et al, 1997). Estos hallazgos hacen resurgir el concepto de un estado virulento y un estado no virulento en una sola especie, sin descartar el concepto oficialmente aceptado de la existencia de dos especies (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

Las diferencias en la virulencia son efectuadas principalmente por expresión alterada de los genes de *E. histolytica*. Hay muy poco conocimiento acerca de la regulación y el control de la expresión de genes en este patógeno. Por lo tanto, el estudio de la regulación transcripcional de los genes de *E. histolytica* es importante para el entendimiento del fenotipo virulento.

Lo anteriormente expuesto plantea la necesidad, reconocida oficialmente por la OMS, de "desarrollar urgentemente nuevos métodos capaces de distinguir entre amibiasis virulenta y no virulenta, así como amibiasis debidas a *E. histolytica* o *E. dispar* tan sensibles y específicos y a la vez tan sencillos y económicos que permitan ser aplicados tanto en estudios de determinación de las tasas de

parasitosis reales debidas a *E. histolytica* y/o *E. dispar* así como a estudios de diagnóstico en campo como trabajo de rutina." (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

Estos avances permitirán además un entendimiento mas profundo de la patogenidad del parásito y la futura posibilidad de encontrar una molécula factible para el desarrollo de una vacuna o alternativa terapéutica contra la amibiasis mas efectiva y menos agresiva para el humano.

1.2.3 CITOTOXICIDAD DE *E. histolytica*

A nivel celular y molecular, la patogenia de la amibiasis es un mecanismo multifactorial, en el cual se encuentran involucrados procesos como la quimiotaxis, la adhesión a células blanco, citólisis por contacto, fagocitosis y degradación intracelular (Balderas RI., 1997).

Se han descrito algunas moléculas involucradas en tales procesos, de tal forma que se sabe que mutaciones en la lectina superficial que se une a galactosa afectan la adhesión y la citólisis mientras que las mutaciones en meromiosina afectan las funciones del citoesqueleto, y por ende, la fagocitosis (Abd-Alla MD, et al, 1993). Se han detallado también otros factores involucrados en la citólisis como las fosfolipasas A, el péptido formador de poros y las cistein proteasas (Balderas RI., 1997; Gilchrist CA. et al, 1999).

Estas últimas, las cistein proteasas, son codificados por al menos 7 genes varios de los cuales se encuentran solo en *E. histolytica* y estan ausentes en *E. dispar* (Gilchrist CA. et al, 1999).

1.3 AVANCES EN EL DESARROLLO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA AMIBIASIS POR *E. histolytica*

Varias asociaciones internacionales respaldadas por la OMS, han recomendado recientemente el desarrollo de nuevos métodos, usando tecnologías apropiadas para países en vías de desarrollo para el diagnóstico específico de la infección por *E. histolytica* (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

1.3.1 Diagnóstico de amibiasis por *Entamoeba histolytica*

Para llegar a un diagnóstico de amibiasis, es importante reunir datos sobre los signos y síntomas, la identificación de lesiones características, las imágenes diagnósticas y el análisis de laboratorio (Sepúlveda B. et al, 1980). Sin embargo, las tres primeras fases pueden ser frecuentemente confundidas con otras enfermedades, como cáncer hepático o intestinal según sea el tipo de

lesión. Esto remarca la importancia de identificar al parásito mediante métodos específicos (Said-Fernández S. et al, 1992).

1.3.2 Métodos de laboratorio para el diagnóstico clínico de amibiasis

Dentro de las técnicas comúnmente utilizadas en el diagnóstico de esta enfermedad podemos citar las siguientes:

- A) La observación directa por microscopía, de los quistes o trofozoitos en heces o de estos últimos en los tejidos invadidos
- B) Métodos de inmunoprecipitación que permiten detectar ya sea anticuerpos anti-*E. histolytica* o antígenos de estos parásitos, sobre todo en heces.

La identificación y diferenciación de *E. histolytica* y *E. dispar* en heces por microscopía es imprecisa, pues ambos organismos son idénticos en apariencia al microscopio. Este método tiene una sensibilidad del 60% y además puede presentar muchos falsos positivos debido al error de confundirlos con macrófagos y/o especies no patógenas de *Entamoeba*. El cultivo es más sensible que la microscopía y el análisis de Isoenzimas provee la diferenciación de especies. Sin embargo, se tardan una semana y en muchas muestras positivas por microscopía dan negativas por cultivo y análisis de isoenzimas.

Dentro de los métodos de inmunoprecipitación podemos englobar la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia directa e indirecta, el ELISA, y el radioinmunoensayo (Said-Fernández S. et al, 1992). Todos ellos ofrecen una buena utilidad cuando se utilizan antígenos puros aislados directamente de las amibas (Merino EW. et al, 1990), anticuerpos monoclonales (Said-Fernández S. et al, 1992) o proteínas recombinantes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.3.3 Diagnóstico Molecular

Las herramientas de la biología molecular han servido también de apoyo en el diagnóstico diferencial de la amibiasis patógena, y dentro de ellas, se ha socorrido al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (Acuña-Soto R. et al, 1993; Garfinkel LI. et al, 1989; Tachibana H. et al, 1991) la electroinmunotransferencia, (Ruiz-Palacios GM. et al, 1992) y el serodiagnóstico con antígenos recombinantes (Ag-Rec) (Ruiz-Palacios GM. et al, 1992; Edman V. et al, 1990; Lotter H. et al, 1992; Myung K. et al, 1992 & Stanley SL. et al, 1991).

La PCR ha sido utilizada con éxito a nivel de campo en la diferenciación entre especies patógena y no patógena, y se han desarrollado varios juegos de oligonucleótidos por varios grupos de trabajo (Aguirre A. et al, 1995; Clark CG. et al, 1992; Romero JL. et al, 1992), sin embargo se requiere de un equipo que no se encuentra disponible en la mayoría de los laboratorios de los países en vías de desarrollo que se dedican a ofrecer este servicio. Además, los insumos utilizados para realizar PCR con fines diagnósticos tienen un precio demasiado elevado para la capacidad económica de estos países, los cuales, paradójicamente son los de mayor prevalencia de amibiasis (Walsh JA., 1988).

Por ello, la OMS recomienda que los métodos que se desarrollen para el diagnóstico diferencial sean económicos, sencillos y fáciles de realizar por profesionales de la salud de nivel académico promedio, en los países en desarrollo (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

Por otro lado, la electroinmunotransferencia demanda el manejo de elementos de naturaleza protéica que comparados con los ácidos nucleicos son mucho más lábiles y difíciles de manipular al momento de la determinación de su estructura primaria así como de su producción y manejo.

Alternativamente, la identificación de proteínas antigénicas específicas que puedan producirse a gran escala podrían usarse para implementar todos los métodos clásicos de diagnóstico, pero ahora con la ventaja agregada de la capacidad para distinguir entre amibiasis virulenta o no virulenta producida por *E. histolytica*. Existen antecedentes importantes sobre el desarrollo de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales para la identificación de *E. histolytica*, por ejemplo, se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra

epitopes específicos de la lectina de 170 kDa que se une a galactosa (Petri Jr. et al, 1995; Petri WA. et al, 1990). De esta proteína también se ha patentado un método para inmunoensayo (Petri, Jr. et al, 1995). Por otro lado, también se patentó un método que permite identificar mediante "immunoblot" una serie de antígenos que sólo son reconocidos por sueros de pacientes con amibiasis hepática o disentería amibiana (Flores-Castañeda MS., 1995). Recientemente apareció en el mercado un producto para identificar, con alta especificidad, *E. histolytica* en heces, utilizando un anticuerpo monoclonal contra epitopes específicos de la lectina de 170 kDa (Petri Jr. et al, 1995).

1.3.4 Serodiagnóstico con Antígenos Recombinantes

Está bien documentada la utilidad de los métodos de ingeniería genética para identificar, caracterizar y producir Ag-Rec.

Las proteínas recombinantes utilizadas como inmunoreactivos ofrecen resultados más confiables que los obtenidos con los extractos crudos de trofozoítos de *E. histolytica*. Por otro lado, los Ag-Rec pueden producirse en grandes cantidades sin necesidad de cultivar a los parásitos, que generalmente producen *in vitro* menos biomasa y requieren más tiempo para crecer que las bacterias o las levaduras utilizados como sus vehículos de expresión (Said-Fernández S. et al, 1992).

Algunos Ag-Rec para diferenciar entre amibas patógenas y no patógenas son los siguientes: la recM17 (Ruiz-Palacios GM. et al, 1992; Edman V. et al, 1990) de 125 kDa y que presenta un 12% de divergencias entre zimodemas patógenos y no patógenos, la recSREHP (Myung K. et al, 1992 & Stanley SL. et

al, 1991) que exhibe un 79% de sensibilidad y un 87% de especificidad y la recEHP1 (Lotter H. et al, 1992) de 125 kDa. De dichas proteínas, el común denominador inconveniente encontrado es la propiedad de una sensibilidad y especificidad regulares, además de que distinguen amibiasis patogénica y no patogénica tratándolas como dos especies distintas (*E. histolytica* y *E. dispar*) y sin manejar el concepto de grado de virulencia, lo cual las vuelve promisoriamente susceptibles a ser mejoradas por otras proteínas.

1.4 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS CONTRA LA AMIBIASIS

La elección de una droga para el tratamiento de amibiasis depende de la localización de la infección, de tal forma que las drogas usadas son divididas en las de acción luminal, sistémica y acción mezclada. En cuanto a las de acción luminal, su principal propiedad es la baja absorción intestinal. Incluyen el

Furoato de Dioxanida (Furamida), hidroxiquinolonas, Iodoquinol, y Clloquinol. Las sistémicas actúan bloqueando la síntesis de proteínas en los trofozoitos inhibiendo la translocación de la peptidil tRNA transferasa en el ribosoma desde el sitio aminoacil al peptidil. Un ejemplo es la Dehidroemetina (Norris SM. et al, 1968), aunque los de primera elección son el metronidazol y sus derivados.

Ambos tipos de drogas son eficientes en el tratamiento oportuno de la amibiasis intestinal o invasiva, no obstante, presentan serios efectos indeseables.

Esto plantea la necesidad de diseñar racionalmente nuevos tratamientos, lo cual puede ser posible, gracias al reciente incremento en el conocimiento de la bioquímica del parásito y de las interacciones entre el parásito y la célula

hospedera. Aunado a ello, el desarrollo de tecnologías bioquímicas para la purificación de proteínas, ensayos enzimáticos, conocimiento de las funciones enzimáticas y la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas ha permitido el entendimiento de los detalles de las moléculas blanco y sus probables ligandos. En suma, la tecnología de DNA recombinante ha favorecido la determinación de secuencias primarias de proteínas, su expresión y mutagénesis, lo cual en algunos casos ha contribuido a la caracterización funcional de enzimas. Todos estos avances acelerarán el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra la amibiasis.

1.4.1 Vacuna contra la Amibiasis por *E. histolytica*

Debido a que la amibiasis solo afecta a los humanos y algunos primates superiores no humanos, una vacuna anti-amibiana podría teóricamente erradicar al organismo. Estudios epidemiológicos indican que la inmunidad adquirida a la

infección amibiana probablemente ocurre y que tal vacuna puede ser factible.

Aunque la inmunidad celular y humoral sistémica y de mucosas parecen jugar un rol importante en la protección contra *E. histolytica*, la importancia relativa de cada uno en la respuesta inmune humana no ha sido aclarada aun. No existen actualmente modelos animales de amibiasis intestinal, además, ha sido imposible evaluar la protección contra colonización y colitis. Futuras investigaciones de los mecanismos fundamentales por los cuales *E. histolytica* causa enfermedad y de la respuesta inmune humana a infecciones amibianas podrían asegurar la verdadera factibilidad de una vacuna anti-amibiana (Hunston CD. et al, 1998).

1.5 APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA INVESTIGACIÓN SOBRE AMIBIASIS Y *E. histolytica*

Podríamos definir a la nueva Biotecnología como la ciencia que emplea microorganismos reprogramados por ingeniería genética para producir proteínas recombinantes, de importancia biomédica, industrial, pecuaria y agrícola. Hoy en día se ofrecen en el mercado Internacional y en el ámbito científico toda una variedad de proteínas de origen recombinante, desde factores de crecimiento hasta anticoagulantes (Escamilla-Treviño L, 1998). La lista de estos productos crece día a día, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado bio-industrial y a la vez ha impulsado la investigación en este campo. En esta revolución científica, el campo de investigación sobre la amibiasis y *E. histolytica* no queda exento. Estas nuevas herramientas nos han permitido conocer mas a fondo, como se ha descrito anteriormente, las estructuras y mecanismos moleculares responsables de procesos como la división y el crecimiento celular, el metabolismo, la diferenciación y el desarrollo de este parásito. Conocimiento que ha sido ampliamente aprovechado para el desarrollo e implementación de nueva metodología diagnóstica, posibles candidatos terapéuticos y profilácticos y un mejor entendimiento de la biología celular y patogénesis de *E. histolytica* (Bakderas RI, 1997).

1.6 IDENTIFICACION DE GENES

La clonación molecular se considera una rama muy importante de la tecnología del DNA recombinante y consiste en la introducción de un fragmento de DNA

específico dentro de un vector, el cual es introducido en un organismo hospedero para obtener poblaciones en masa de una sola secuencia de interés con el objeto de manipularla y realizar estudios específicos directamente relacionados a dicha molécula. De esta forma es posible identificar cada uno de los genes responsables del funcionamiento de un organismo vivo (Balderas RI., 1997).

1.6.1 Bibliotecas de DNA complementario (cDNA)

La construcción de bibliotecas de cDNA es uno de los procesos por los cuales puede llevarse a cabo la clonación molecular. Una biblioteca de cDNA, consiste en una colección de secuencias de cDNA que representan la mayoría de los RNA mensajeros (mRNA), los cuales a su vez, corresponden a genes que se expresan en el tipo celular del que se extrajeron los mensajeros. Las secuencias de cDNA se insertan en diversos vehículos moleculares, principalmente bacteriófagos (como λ), plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), etc.

Las bibliotecas de cDNA se construyen a partir de mRNA total, el cual debe ser de buena calidad. Este material se incuba con una enzima transcriptasa reversa, que en presencia de los substratos adecuados y bajo condiciones favorables sintetiza cDNA de una cadena. La cadena de RNA original se elimina con una enzima ribonucleasa y la segunda cadena de cDNA se sintetiza usando como molde la primera cadena. Para su síntesis son necesarios oligonucleótidos (como iniciadores) apareados en sitios al azar a la primera

cadena de DNA. Entonces, la DNA polimerasa I de *E. coli* actúa produciendo la segunda cadena de cDNA y finalmente, se unen intramolecularmente los fragmentos producidos de la segunda cadena por acción de una ligasa (Sambrook J. et al, 1989).

1.6.2 Identificación de clonas de cDNA

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

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

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

anticuerpos y/o sondas moleculares.

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

La hibridación de ácidos nucleicos es un método confiable y muy usado para la clonación molecular, usando bancos de datos como fuente para el diseño de sondas (Sambrook J. et al, 1989). Sin embargo, este método es aplicado cuando la proteína a buscar tiene una secuencia genética parcial perfectamente conocida.

1.6.3 Clonación de Genes Expresados Diferencialmente por una misma Especie

Una modalidad de las bibliotecas de cDNA son las bibliotecas sustractivas, las cuales son útiles en la clonación de genes expresados diferencialmente por especies muy cercanas o una misma especie sometida a dos condiciones distintas tal como sería el caso de un tejido normal y uno canceroso de la misma especie. Las células eucarióticas expresan mRNA específicos en condiciones externas distintas, de tal forma que los genes así expresados pudieran estar involucrados en ese proceso de diferenciación. La tecnología de sustracción es usada para eliminar secuencias en común entre dos tejidos cercanamente relacionados enriqueciéndose con las secuencias diferenciales. El proceso básico consiste en hibridar los mRNA de uno de los cultivos, con los cDNA del otro, de tal forma que quedasen libres los mRNA expresados diferencialmente. Estos últimos pueden ser separados del resto mediante procesos cromatográficos por columna de afinidad como la columna oligo(dT) o una columna con avidina si es que previamente se marcan los mRNA con biotina (Balderas I. et al, 2000).

1.6.4 Bibliotecas de cDNA conatruídas en el vector SurfZAP (Stratagene, 1999)

El vector SurfZap (Figura 1) es derivado del vector lambda Zap II. Existen muchas ventajas para usar fagos lambda para construir bibliotecas de expresión. La alta eficiencia de ligazón y empaquetamiento de lambda se traduce en la producción de bibliotecas primarias muy grandes. Es posible

construir bibliotecas de expresión conteniendo más de 1 millón de clonas a partir de 1 µg de brazos de lambda. Debido a que el fago lambda crece líticamente, las proteínas expresadas son fácilmente detectables con una variedad de métodos de tamizaje. Finalmente, SurfZAP ha sido diseñado para permitir la excisión *in vivo* a DNA plasmídico desde el vector fago lambda.

Un fago cooperador silvestre proporcionado en el estuche comercial, expresa alrededor de 5 copias de la proteína pequeña de envoltura, *cpIII*, la cual juega un rol importante en la mediación de la fusión con el *pili F'* de *E. coli*. En el vector SurfZAP (Figura 2) las proteínas expresadas como fusión con los aminoácidos 198-406 de *cpIII*, contienen un dominio de anclaje a membrana y una secuencia espaciadora flexible de 5 aminoácidos (GGGS) entre los dos dominios proteicos para minimizar cualquier interacción. Las secuencias codificantes de las proteínas de fusión son transcritas del promotor *lacZ* dentro del plásmido escindible componente del vector lambda. El vector también codifica el sitio de unión al ribosoma (RBS) y la secuencia líder *pelB* que dirige la proteína de fusión a través de la membrana bacteriana interna mediante la porción *cpIII* con la proteína expresada orientada en el espacio periplásmico. La secuencia líder es removida durante este proceso produciendo un extremo amino terminal iniciando con el residuo N-terminal de la proteína expresada.

La figura 2 ilustra el proceso de preparación de partículas fagemidas. Cuando las bacterias *E. coli* de la cepa SOLR conteniendo la biblioteca fagemida amplificada son infectadas con fago cooperador M13, el genoma fagemido es replicado como DNA de cadena sencilla y empaquetado en partículas M13.

Como fago, es extruido de las células, la proteína de fusión en la membrana interna es incorporada a la capa del fago, con alrededor de 3 a 5 copias de la proteína cpIII silvestre. El resultado es una mezcla de fagos cooperadores silvestres y partículas fagemidas recombinantes que expresan la proteína de fusión sobre su superficie y portan el DNA codificante de los insertos clonados.

Se estima que aproximadamente 10% de las partículas fágicas portan el genoma fagemido expresando la proteína de fusión en su superficie y la mayoría, despliega una copia única. Por lo tanto, las partículas fagemidas recombinantes retienen la infectividad y se unen predominantemente a ligandos en una forma monovalente.

Para obtener altos niveles de la proteínas de fusión cpIII puede utilizarse la inducción del promotor lacZ con IPTG, pero se ha observado que el IPTG aun a concentraciones regulares resulta tóxico para la cepa hospedera. En ausencia de IPTG, la expresión a bajo nivel de la proteína de fusión cpIII es suficiente para incorporación en las partículas fagemidas M13.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

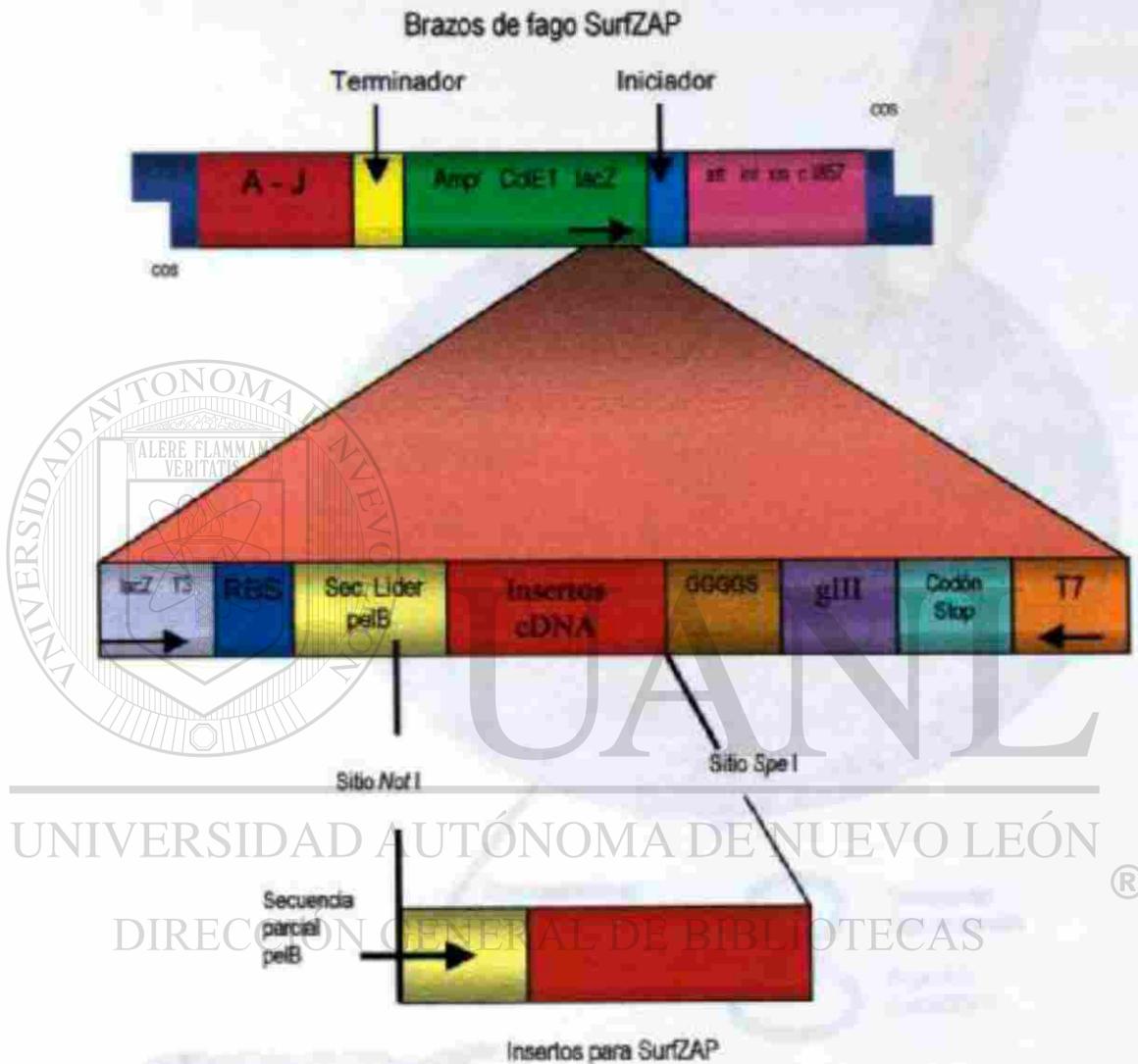


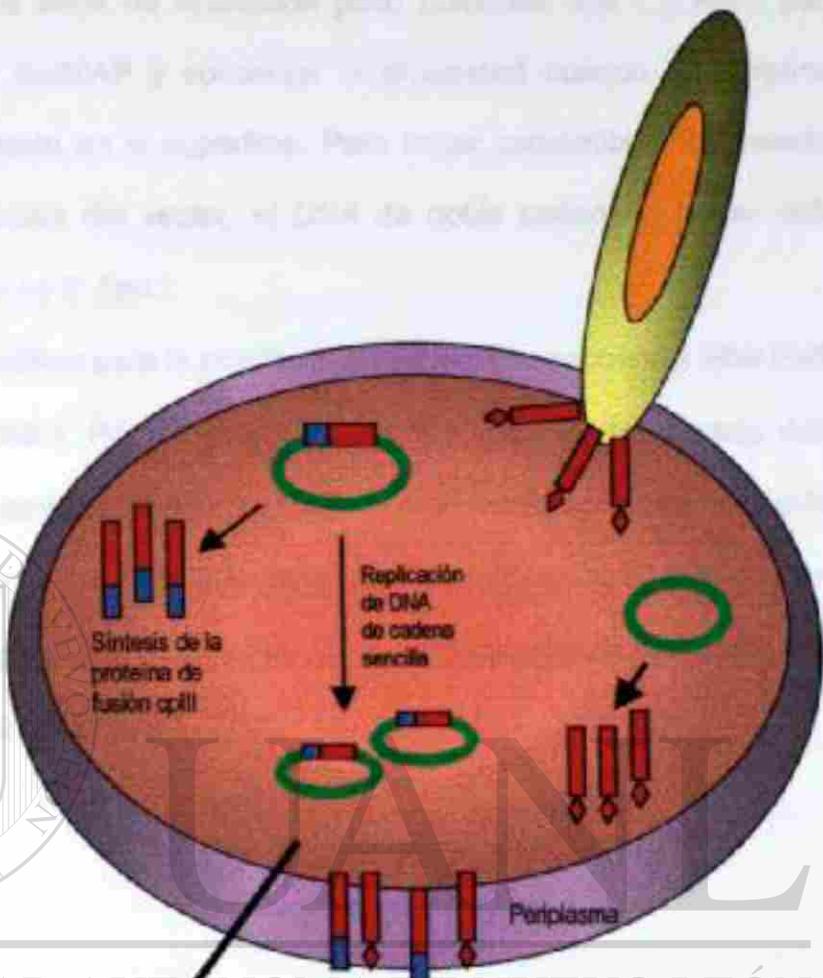
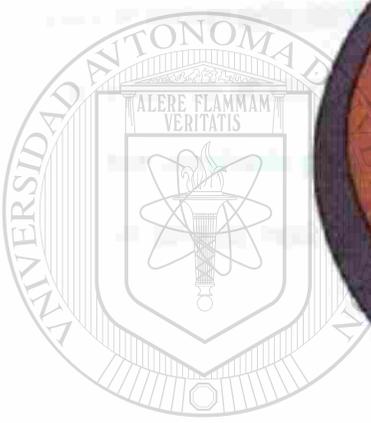
Figura 1. El Vector SurfZAP

Figura 2. Proceso de Espinación de las Proteínas de Fusión

2.2.4. Clonaje de los fragmentos de ADN de interés

El objetivo principal de estos procedimientos para introducir los genes de interés en el vector surfSCRIPT y replicarlo en el sistema bacteriano es la producción de copias de los fragmentos de ADN de interés. Para lograr esto se debe utilizar una enzima que corte el ADN de origen con enzimas de restricción que generen extremos compatibles con los del vector surfSCRIPT.

Una vez que se ha obtenido el ADN de interés con los extremos compatibles con los del vector surfSCRIPT, se debe introducir en el sistema bacteriano.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

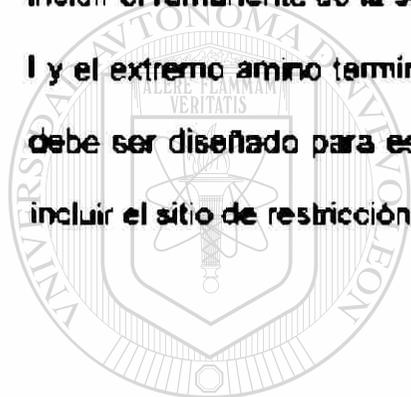


Figura 2. Proceso de Expresión de las Proteínas de Fusión

1.6.5 Diseño de los Insertos para el Vector SurfZAP.

El sistema posee los sitios de restricción poco comunes *Spe* I y *Not* I para clonar en el vector SurfZAP y conservar la diversidad cuando se preparan bibliotecas de expresión en la superficie. Para hacer compatibles los insertos con los brazos cortados del vector, el DNA de doble cadena a clonar debe contener sitios 5' *Not* I y 3' *Spe* I.

El vector SurfZAP codifica para la porción N terminal de la secuencia líder PelB, río arriba del sitio *Not* I. Por lo tanto el extremo 5' del inserto clonado debe incluir el remanente de la secuencia de DNA de pelB localizado entre el sitio *Not* I y el extremo amino terminal de la proteína de fusión. El extremo 3' del inserto debe ser diseñado para estar en marco con el gen espaciador III (*gIII*) y debe incluir el sitio de restricción *Spe* I.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.7 IMPORTANCIA, JUSTIFICACIÓN Y ORIGINALIDAD:

Actualmente, las instituciones de salud pública Mexicanas o de otros países no usan rutinariamente métodos de diagnóstico para diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, o cepas invasivas de comensales. Una de las razones, es por la falta de pruebas comerciales accesibles a los laboratorios clínicos en países como el nuestro, en vías de desarrollo. Como se mencionó anteriormente en la sección 1.3.4, existen antecedentes importantes que han dado resultados alentadores, e incluso ya existe un producto comercial para identificar específicamente *E. histolytica* en heces humanas. Sin embargo, es importante identificar el mayor número posible de antígenos o anticuerpos específicos con fines diagnósticos, para disponer de suficiente variedad para seleccionar a los mejores inmunoreactivos. El constante cambio de determinantes antigénicos en la superficie de los protozoarios (Borst P. et al, 1996), podría afectar la sensibilidad de los métodos de diagnóstico fundamentados en una sola proteína o epítipo de tal especie amibiana. En este trabajo nos propusimos identificar algunos antígenos de *E. histolytica* que fuesen reconocidos selectivamente por anticuerpos de pacientes en estado asintomático y antígenos que fuesen reconocidos selectivamente por anticuerpos de pacientes con absceso hepático amibiano. Dichos antígenos podrían servir como base para el desarrollo de una prueba clínica comercial de serodiagnóstico capaz de distinguir *E. histolytica* en estado virulento de *E. histolytica* en estado no virulento.

Por otro lado, una mezcla de antígenos recombinantes de *E. histolytica* en estado virulento y otra de *E. histolytica* en estado no virulento permitirá disminuir la probabilidad de falsos negativos debidos a la variabilidad antigénica

de las cepas silvestres así como ejecutar pruebas en suero, con técnicas tan sencillas como la aglutinación en látex, o tan modernas y sofisticadas como el ELISA. No se requerirán otras muestras de fluidos biológicos, como el estuche mencionado antes, que está diseñado para pruebas en heces.

La mezcla de antígenos recombinantes permitiría también realizar estudios epidemiológicos en forma limpia, y congelar los sueros por tiempo indefinido.

La constante variabilidad de los determinantes antigénicos en la superficie de los protozoarios (Said-Fernández S. et al, 1995; Borst P. et al, 1996), ha obstaculizado el desarrollo de vacunas contra estos parásitos; Y el encontrar proteínas antigénicas que tuvieran una relación directa con la virulencia de las amibas podría sugerir candidatos idóneos para tal objetivo, pues estaríamos aislando proteínas esenciales del parásito que al menos en teoría deberían mantenerse constantes en su superficie. Finalmente, una vez secuenciado cada uno de los mRNA correspondientes a cada antígeno identificado, permitirán ahondar un poco más en el conocimiento de los mecanismos de virulencia de *E. histolytica*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.8 HIPÓTESIS:

***E. histolytica* presenta un despliegue diferencial de RNA mensajeros que codifican proteínas con propiedades antigénicas, y cuya expresión genética está regulada por factores externos relacionados al estado virulento y no virulento de la especie.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.9 OBJETIVOS



1.9.1 Objetivo General:

Clonar mRNA's expresados como proteínas recombinantes que codifican antígenos de *E. histolytica* específicos del estado virulento y específicos del estado no virulento.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.9.2 Objetivos Específicos

- 1.- Cultivo y producción de biomasa de *E. histolytica* en medio TYI-S33 en condiciones normales y después de producir absceso hepático experimental en hámsters.
- 2.- Análisis de parámetros fenotípicos y polimorfismo genético en ambas poblaciones clonales, así como PCR para descartar contaminación con *E. dispar*.
- 3.- Extracción de RNA mensajeros de ambos cultivos.
- 4.- Ejecución de la técnica "*Differential Display*" para confirmar la producción de RNA mensajeros específicos en las amibas cultivadas en condiciones normales y obtenidas de absceso.

- 5.- Construcción de bibliotecas por sustracción de ambos cultivos con objeto de obtener solo los RNA mensajeros diferenciales
- 6.- Tamizaje de cada biblioteca de cDNA, usando sueros de pacientes con diagnóstico de amibiasis asintomática para la biblioteca de *E. histolytica* en cultivo normal y con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano para la biblioteca de *E. histolytica* obtenidas de absceso.
- 7.- Pruebas de reactividad con sueros de pacientes y descartar los posibles antígenos de ambas bibliotecas que presenten reacción cruzada.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 Amibas

Se utilizaron amibas de la especie *Entamoeba histolytica* cepa HM1:IMSS cultivada en medio TYI-S33 en condiciones normales, así como obtenidas de absceso hepático experimental en hámsters.

2.1.2 Suero de pacientes con amibiasis invasora

Se utilizaron 15 muestras de suero de pacientes que tuvieron absceso hepático amibiano, comprobado por análisis clínico, imagen diagnóstica y/o títulos anti-*E. histolytica* mayores a 1:1024, con aislamiento de *E. histolytica* (Medina de la Garza CE. et al, 1997).

2.1.3 Suero de pacientes asintomáticos

Se emplearon 20 sueros de pacientes asintomáticos portadores de quistes de *E. histolytica* en las heces, con títulos anti-*E. histolytica* de 1:512 o mayores (Sanchez-Guillen MC. et al, 1997).

2.1.4 Suero de sujetos sanos

Se utilizaron 10 sueros de sujetos sanos, personas asintomáticas sin quistes en heces, con títulos anti-*E. histolytica* iguales o menores a 1:512.

2.1.6 Animales para reactivar la virulencia de las amibas

Se usaron 3 hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) adultos machos de 2 meses con un peso aproximado de 100 g.

2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

2.2.1 Criterios de Inclusión

- **Pacientes con amibiasis invasora:** Que tengan absceso hepático amibiano, comprobado por análisis clínico, imagen diagnóstica y/o títulos anti-*E. histolytica* mayores a 1:1024, con aislamiento de *E. histolytica*.
- **Pacientes asintomáticos portadores de quistes:** Pacientes con quistes de *E. histolytica* en las heces, sin síntomas, con títulos anti-*E. histolytica* de 1:512 o mayores por hemaglutinación indirecta.
- **Sujetos sanos:** Personas asintomáticas sin quistes en heces, con títulos anti-*E. histolytica* iguales o menores a 1:512.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

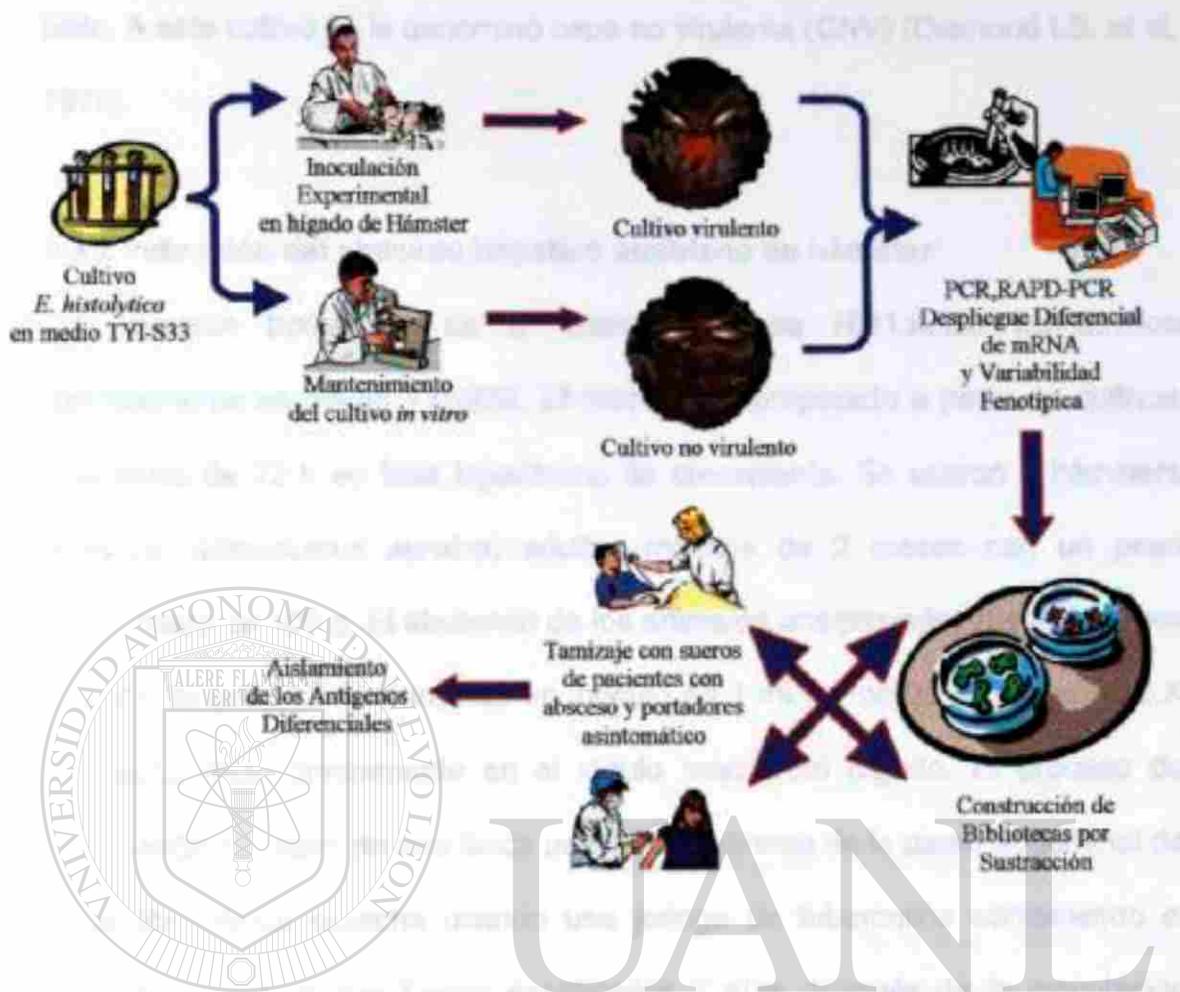
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.2 Criterios de Exclusión

- Ausencia de alguno de los criterios de inclusión
- Presencia de cualquier otra patología

2.3 ESTRATEGIA GENERAL

El diseño de la estrategia general a seguir comenzó con la producción de biomasa a partir de ambos cultivos amibianos, los que se cultivaron en condiciones normales, a los que se denominó cepa no virulenta (CNV) y los que fueron inoculados en hígado de hámster para producir absceso experimental y de esta forma reactivar su virulencia; Los cuales fueron denominados como cepa virulenta (CV). Con el objeto de corroborar la variabilidad intraespecie, se procedió a medir el polimorfismo genético por amplificación al azar (RAPD-PCR), la variabilidad fenotípica con parámetros establecidos y el despliegue diferencial de mRNA en sendos cultivos. Enseguida se realizó la construcción de las bibliotecas sustractivas de ambas poblaciones clonales produciendo cDNA solamente de los mensajeros específicos de cada estado diferencial. Posteriormente se hizo el tamizaje inmunológico de la biblioteca de cada población retando las proteínas expresadas contra una mezcla de sueros de pacientes con diagnóstico de absceso hepático amibiano, para la biblioteca de CV, y poder aislar las clonas portadoras de cDNA's que codificaran para antígenos que fuesen reconocidos por pacientes con amibiasis invasora, y de portadores asintomáticos para la biblioteca de CNV, y aislar de esta forma los cDNA que codificaran para antígenos reconocidos por pacientes con amibiasis no invasiva. A continuación, los grupos de clonas provenientes de ambas bibliotecas fueron tamizadas por segunda ocasión, ésta vez con la mezcla de sueros contraria, es decir se realizó un tamizaje en forma cruzada. Con este procedimiento aislamos solo aquellos Antígenos Recombinantes (Ag-Rec) que no presentaron reacción cruzada (Figura 3).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 3. Estrategia General

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4 OBTENCIÓN DE CULTIVOS VIRULENTO Y NO VIRULENTO

2.4.1 Cultivo axénico de *E. histolytica*

Trofozoítos de la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S33 en la fase logarítmica, cada 72 h, y cosechados después de enfiados en hielo por 10 min, sedimentados a 430 x g por 3 min a 4°C, y lavados por 3 veces en amortiguador PBS-A enfiado en

helo. A este cultivo se le denominó cepa no virulenta (CNV) (Diamond LS. et al. 1978).

2.4.2 Inducción del absceso hepático amibiano en hámster

Se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS mantenidos axénicamente en medio TYI-S33. El inóculo fue preparado a partir de cultivos amibianos de 72 h en fase logarítmica de crecimiento. Se usaron 3 hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) adultos machos de 2 meses con un peso aproximado de 100 g. El abdomen de los animales anestesiados fue abierto por incisión longitudinal y se inyectó un inóculo de 1 ml de medio conteniendo 2×10^6 trofozoitos directamente en el lóbulo medio del hígado. El proceso de inoculación consistió de una única penetración directa de la pared abdominal de la región inferior derecha usando una jeringa de tuberculina conteniendo el inóculo. Los animales fueron sacrificados 7 días después de la inoculación intrahepática (Tsutsumi V. et al. 1984).

2.4.3 Cosecha de amibas a partir del absceso hepático de hámster

Una vez sacrificados los animales se reabrió su abdomen para cosechar las amibas por succión con pipeta pasteur e inoculados en tubo con medio TYI-S33 conteniendo 0.02% de estreptomomicina y ampicilina respectivamente. Se continuó el cultivo en un par de resiembras hasta confirmar la ausencia de otros microorganismos y la obtención de un cultivo axénico. Este cultivo fue denominada como cepa virulenta (CV). Posteriormente se procedió a realizar la extracción de ácidos nucleicos de CNV y CV.

2.5 EXTRACCIÓN DE DNA AMIBIANO

Ambas obtenidas de cultivo axénico normal (CNV) así como aquellas obtenidas del hígado de hámster con absceso (CV), fueron cosechadas dejándolas enfriar 5 min en hielo y por centrifugación; Enseguida se transfirió el sedimento en un tubo de polipropileno de 1.5 ml y se mezcló con 250 μ l de amortiguador de lisis (0.25% SDS en 0.1M EDTA, pH 8.0). Se añadió Proteinasa K a una concentración de 100 μ g/ml y se incubó a 55°C por 1 h. Posteriormente se añadieron 75 μ l de NaCl 3.5 M, se mezcló fuertemente y entonces se añadieron 42 μ l de CTAB 10%/NaCl 0.7 M (calentado a 55°C), se mezcló e incubó a 65°C por 20 min. A temperatura ambiente se añadieron 400 μ l de cloroformo, se mezcló perfectamente por inversión y se sedimentó por centrifugación a alta velocidad por 10 min. Enseguida se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadieron 400 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (200:192:8), se mezcló perfectamente por inversión y se sedimentó una vez mas. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100%, se mezcló por inversión y finalmente se mantuvo a temperatura ambiente por al menos 5 min para después sedimentar por centrifugación por 15 min igual que en las ocasiones anteriores. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el sedimento con 200 μ l de etanol al 70%, sedimentando por 5 min de la misma forma que antes. Se secó el sedimento al aire y se resuspendió en 50 μ l de agua ultrapura y estéril (Entamoeba homepage, 2000).

2.6 PCR PARA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES

Se procedió a realizar un par de amplificaciones por PCR; Una que produce un fragmento de 145 pares de bases con un par de iniciadores P1 y P2 en cepas patógenas, y otra que produce un fragmento de 133 pares de bases con el par de iniciadores NP1 y NP2 en cepas no patógenas (Acuña-Soto R. et al, 1993; Tannich E. et al, 1989). El objetivo en este caso fue establecer la presencia de *E. histolytica* únicamente y la ausencia de *E. dispar* en nuestros cultivos.

2.6.1 Amplificación

La amplificación del DNA fue realizada en un volumen total de 50 µl en tubos de polipropileno de 0.2 ml. Se prepararon 4 cocteles para amplificación, 2 con el par de iniciadores P1 y P2, y 2 mas con el par de iniciadores NP1 y NP2. Las mezclas de reacción contenían (concentración final) 70mM Tris pH 8.8, 4 mM MgCl₂, 20 mM sulfato de amonio, 1mM dilitreitol, 0.1% Tritón X-100, 50 µg de seroalbúmina bovina, 300 mM de cada iniciador, 200 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTP), y 5 U de Ampli Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). Además se añadieron 100 ng de DNA amibiano CV a 2 reacciones (Una con los iniciadores P1, P2 y otra con los iniciadores NP1 y NP2), así como 100 ng de DNA amibiano CNV a otro par de reacciones iguales que las de la cepa anterior. Las reacciones fueron cubiertas con una gota de aceite de parafina y amplificadas en un termociclador automatizado (MJ Research, Cambridge, MA). El programa consistió en un ciclo Inicial de 1 min a

94°C seguido por 35 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 94°C. El alineamiento de iniciadores se realizó por 1 min a 55°C y la elongación por 2 min a 72°C.

2.6.2 Los iniciadores

Se prepararon los oligonucleótidos seleccionados a partir de secuencias repetitivas de DNA blanco únicas de la especie patogénica y no patogénica previamente descritos. La tabla 1 expone la secuencia de los cuatro iniciadores utilizados (Garfinkel LI. et al, 1989; Samuelson J. et al, 1989).

Tabla 1. Secuencias de los Oligonucleótidos para PCR diferencial

Nombre	Secuencia	# nucleótidos
P1	TCA AAA ATG GTC GTC GTC TAG GC	23
P2	CAG TTA GAA ATT ATT GTA CTT TGT A	25
NP1	GGA TCC TCC AAA AAA TAA AGT TT	23
NP2	ATG ATC CAT AGG TTA TAG CAA GAC A	25

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.6.3 Análisis electroforético de los productos amplificados

El análisis de los productos de PCR fue realizado usando una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Se tomaron 10 µl del volumen total de reacción y se pasaron a tubos de polipropileno de 1.5 ml, rotulados apropiadamente. Se añadió 1 µl de jugo azul 10X (azul de bromofenol y xilencianol) y se mezcló perfectamente. Enseguida se depositó todo el

contenido de cada uno de los tubos en los pozos del gel, colocando además un marcador de peso molecular. La electroforesis se corrió a 100V hasta que la banda del azul de bromofenol llegó hasta la mitad del gel. Finalmente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio de 10 µg/ml durante 10 min, para posteriormente observar los resultados en el transiluminador de luz ultravioleta.

2.7 DETECCIÓN DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR

Utilizamos la tecnología de PCR nuevamente con el iniciador OP-2 para observar el polimorfismo genético por amplificación al azar (RAPD-PCR) en sendos cultivos ⁽²¹⁾. Para el RAPD-PCR se usó DNA templado obtenido de lisados de 6×10^6 trofozoitos/ml de un amortiguador conteniendo 4.3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM TrisHCL pH 8.4, 0.1 mg gelatina, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20 y 1 mg de Proteinasa K. La reacción se realizó en un volumen total de 30 µl conteniendo 3 µl de amortiguador PCR 10X (43 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 8.4 y 1 mg gelatina/ml), 200 µM de cada dNTP, 5 U de Taq DNA polimerasa, 50 pM del iniciador OP-2 y 4 µl de lisado de trofozoitos, todo ello en un par de reacciones; Una con DNA de amibas CV y otra con DNA de amibas CNV. La amplificación fue realizada en 45 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 36°C por 1 min y extensión por 2 min a 72°C usando un termociclador automatizado (MJ Research, Cambridge, MA). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Cada PCR fue realizado al menos por duplicado para corroborar la reproducibilidad de las bandas

obtenidas. El polimorfismo de DNA fue identificado cuando una banda estaba presente en uno de los cultivos pero en el otro no. La tabla 2 expone la secuencia del iniciador OP-2 utilizado para la amplificación.

Tabla 2. Secuencia del Iniciador OP-2 para Detección de Polimorfismos

Nombre	Secuencia	# de nucleótidos
OP-2	TGG ATT GGT C	10

2.8 DETECCIÓN DE mRNA DESPLEGADOS DIFERENCIALMENTE ⁽⁶⁰⁾

2.8.1 Extracción de RNA

El proceso se realizó entre 15-30°C. En un tubo de 1.5 ml se añadieron 750 µl de reactivo TRIZOL frío a 4°C y 300 µl de suspensión de trofozoitos. Se agitó por 5 seg y se incubó la muestra homogeneizada por 5 min a 4°C. Se añadieron 300 µl de cloroformo. Se taparon los tubos adecuadamente y se agitaron vigorosamente con la mano por 5 seg para posteriormente incubarlos a 4°C por 5 min. Se homogeneizó levemente y se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. Después de centrifugar, la fase acuosa fue transferida un tubo limpio, al cual se le añadieron 20 µl de glucógeno frío a 4°C como acarreador de ácidos nucleicos. Se precipitó el RNA de la fase acuosa mezclando con alcohol isopropílico. Se usaron 600 µl de alcohol por cada 750 µl de TRIZOL utilizados en el inicio. Se incubaron las muestras 1 h a -20°C, se homogeneizaron suavemente y se centrifugaron a 14,000 rpm por 25 min a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento en una gasa estéril con el tubo boca abajo por 10-15 min. Finalmente se disolvió en 90 μ l de agua libre de ribonucleasas y se calentó por 10 minutos a 55-65°C.

2.8.2 Retrotranscripción

Se incubaron 9 μ l del RNA obtenido en el proceso anterior con 1 μ l de hexámeros al azar por 15 min a temperatura ambiente. Enseguida se preparó una mezcla de reacción de síntesis de cDNA en un volumen total de 20 μ l conteniendo 4 μ l de amortiguador de retrotranscripción 5X, 200 μ M de cada dNTP, 1 μ l de hexámeros al azar, 1.2 μ l de inhibidor de ribonucleasa, 0.8 μ l de DTT, y los 10 μ l de la solución de RNA. Se incubó la mezcla de 19 μ l a 65°C por 5 min y enseguida a 37°C por 10 min. Añadiendo a continuación 1 μ l de enzima transcriptasa reversa e incubando a 37°C por 50 min. Al final de la reacción, se calentó a 95°C por 5 min y se aplicó un choque térmico en hielo. La mezcla se procesó mediante PCR en un codiel con los componentes listados en la tabla 3 bajo un programa que consistió en 40 ciclos de 94°C, 30 seg; 40°C, 2 min y 72°C, 30 seg. Los productos amplificados fueron analizados en un gel de poliacrilamida para secuenciación. La tabla 4 presenta las secuencias de los iniciadores utilizados, y la figura 4, un esquema general del proceso.

2.8.3 Corrimiento de la Electroforesis

Preparación del gel

Solución de poliacrilamida -urea al 6%	120 ml
Persulfato de amonio al 10%	800 μ l
N,N,N',N' tetrametilendiamina (TEMED)	80 μ l

Se mezclaron los reactivos, evitando la formación de burbujas.

Se ensamblaron los vidrios con los separadores y se pegó cinta adhesiva en los lados de los vidrios, sujetando en cada lado con dos pinzas. Se preparó la solución de poliacrilamida en un matraz erlenmeyer de 200 ml y se mezcló todo suavemente. Se selló con cinta adhesiva los bordes superiores de los vidrios para evitar que se derramara la solución de poliacrilamida al vaciarla. Se vació la poliacrilamida poniendo los vidrios en una inclinación de 10-15 grados, y una vez lleno, se colocó el peine tipo "diente de tiburón" invertido (con los dientes hacia arriba). El peine se introdujo 7-8 mm en el gel, teniendo la precaución de que éste no quedara flojo, colocando una o dos pinzas en la parte superior. Se dejó polimerizar con la misma inclinación por 20 min y se retiró la cinta inferior del gel y el peine, se retiraron también los restos de poliacrilamida y urea y se reintrodujo el peine pero con los dientes hacia abajo hasta pinchar ligeramente el gel. Después de montarlo en la cámara de secuenciación y llenar los depósitos con amortiguador TBE 1X, se llevó a cabo una precorrida a 40-80 watts, por 80 min y después se lavaron los carriles con una jeringa con solución de comida para eliminar el exceso de urea. Se corrió el gel a 70 watts por 6 h.

Después de correr la electroforesis el tiempo necesario, se retiró de la cámara de electroforesis los vidrios con el gel y se despegó el vidrio grande haciendo palanca entre los dos vidrios suavemente y se quitó enseguida los separadores de plástico. Se sumergió el vidrio con el gel adherido en la cara superior en una charola del mismo tamaño con solución de lavado, introduciendo primero un extremo y después el otro, bajándolo lentamente (de lo contrario, se forman burbujas). Se dejó en la solución por 30 min sacando posteriormente el vidrio con el gel levantándolo de un extremo lentamente y se puso a escurrir en un ángulo de 60-70°C sobre servilletas, por 10 min. Se colocó el vidrio horizontalmente (con el gel en la cara superior) y sobre él se colocó una hoja de papel filtro Whatman 3MM, empezando del centro de uno de los extremos y avanzando gradualmente hasta cubrir todo el gel. Se extendió muy bien el papel filtro, rodando una pipeta sobre él. Después se volteó todo el conjunto, de modo que el papel quedó abajo. Se levantó suavemente el vidrio siguiendo el movimiento con una mano abajo de la hoja de papel hasta despegar completamente el gel del vidrio. Se cubrió todo el gel con plástico autoadherible. Se ensambló el sistema de secado del gel en el aparato utilizado para este propósito. Después se conectó a una bomba de vacío. Una vez secado el gel, se retiró el papel portador del gel, se eliminó el plástico autoadherible y se colocó el gel en el cartucho para exposición con película para rayos X. Se dejó exponer con una película ultrasensible para radiografía de KODAK Co., a temperatura ambiente por 48 h. Finalmente se reveló la película y se determinó visualmente la presencia de bandas diferenciales.

Tabla 4. Procedimiento de los indicadores colorimétricos para PCR de Despliegue

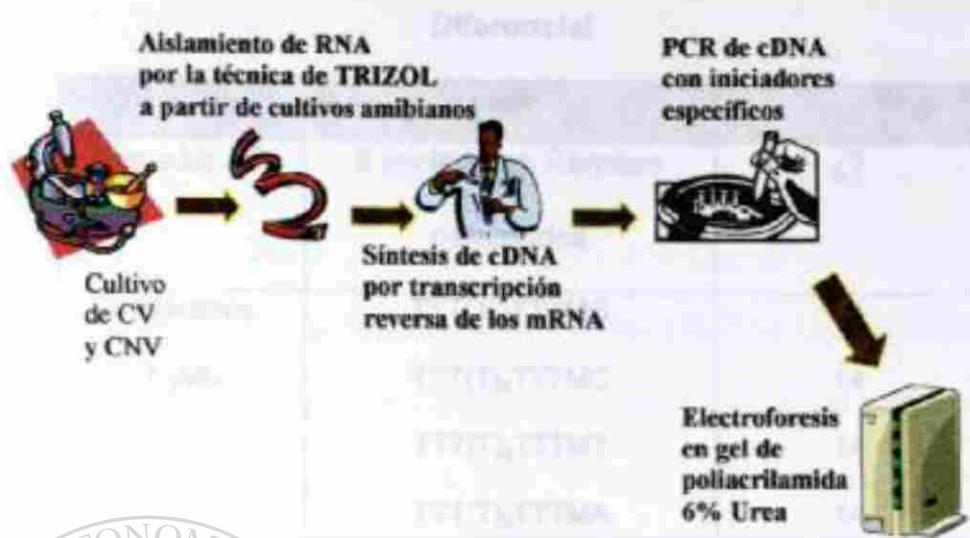


Figura 4. Despliegue Diferencial de mRNA

Tabla 3. Coctel de PCR para amplificación de cDNA de Despliegue Diferencial

Reactivo	Cantidad (μ l)
Amortiguador PCR 10X	2.0
dNTP (25 μ M)	1.6
Iniciador AP (2 μ M)	2.0
Iniciadores T ₁₂ MN (10 μ M)	2.0
Mezcla de la Retrotranscripción	2.0
dATP marcado con biotina	1.0
Taq DNA polimerasa	0.2
Agua	9.2
TOTAL	20.0

Tabla 4. Secuencia de los Iniciadores utilizados para PCR de Despliegue

Diferencial		
Nombre	Secuencia	# de nucleótidos
Iniciador AP	5 Iniciadores Random patentados	¿?
Iniciadores	TTT(T) ₆ TTTMC	14
T ₁₂ MN	TTT(T) ₆ TTTMC	14
	TTT(T) ₆ TTTMT	14
	TTT(T) ₆ TTTMA	14

2.9 DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA DE *E. histolytica*

También demostramos la variabilidad fenotípica de los cultivos en estudio, determinando parámetros ampliamente conocidos de variabilidad fenotípica como serían la actividad hemolítica, eritrofagocitosis y citotoxicidad.

2.9.1 Determinación de la Actividad Hemolítica

El ensayo se realizó mediante la estimación de la liberación porcentual de hemoglobina (Said-Fernández S. et al, 1982). En tubos de polipropileno de 1.5 ml con 25 µl de una solución de eritrocitos de rata al 3%, se agregaron 25 µl de una suspensión de 1×10^4 trofozoitos en amortiguador SSB o sólo de amortiguador SSB (testigo negativo) y un tercer grupo al que se agregó 0.5 ml de agua (testigo positivo) y se incubaron a 37°C en un baño de agua por 90 min al cabo de los cuales se añadió 1 ml de amortiguador PBS para detener la reacción (Diamond LS., 1968). Se centrifugaron los tubos por 9 min a 600 x g y

se midió la DO de los sobrenadantes a 415 nm y a 700 nm (Said-Fernández S. et al, 1983) (Figura 5).

2.9.2 Determinación de la tasa de Eritrofagocitosis (Rabinovich M. et al, 1971).

Eritrocitos y amibas fueron mezclados en una relación 100:1 e incubados por 15 min a 37°C. La fagocitosis fue detenida por adición de agua destilada, y los trofozoitos fueron centrifugados a baja velocidad. El número de eritrocitos dentro de las amibas fue cuantificado leyendo la DO a 397 nm del sedimento resuspendido de parásitos pretratados con ácido fórmico (Figura 5).



Figura 5. Determinación de Eritrofagocitosis y Actividad Hemolítica

2.9.3 Determinación de la citotoxicidad sobre células MDCK

Se utilizó el método colorimétrico con MTT descrito por Mosman para medir viabilidad celular e indirectamente citotoxicidad amibiana (Mosman T. et al, 1983).

2.9.3.1 Siembra de microplaca

A una caja de cultivo con monocapa confluyente se retiró el medio por succión con vacío y se agregaron 2 ml de tripsina al 0.25%. Se incubó por 10 min a 37°C hasta que las células se despegaron de la caja. Se agregaron 5 ml de medio de cultivo completo y se resuspendieron suavemente. Se pasó toda la suspensión celular a un tubo cónico graduado de vidrio de 12 ml con tapón de rosca estéril y se lavó 2 veces centrifugando a 600 x g por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo completo. Se contó el número de células en un hematocitómetro y se preparó una suspensión de 1.5×10^5 células/ml. Se sembraron 3×10^4 células en 200 μ l de medio de cultivo completo por pozo en microplacas de poliestireno de 96 pozos (Corning Glass Works, Corning, New York 14831). Se incubó por 24 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ para que se formara la monocapa confluyente.

2.9.3.2 Ensayo Colorimétrico

Se lavaron 2 veces cada pozo de microplaca con 200 μ l de amortiguador SSB. Se agregaron 25 μ l de una mezcla de 3×10^4 células y 1×10^4 trofozoitos y se incubaron por 1 h a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de la incubación se lavó cada pozo 2 veces con 200 μ l de amortiguador SSB y se agregó 50 μ l de MTT 4.82 mM (0.1 mg en SSB) y 10 μ l de PMS 1.89 mM (0.035 mg en H₂O desionizada) por pozo. Se incubó por 75 min a 36°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se lavó como en el paso anterior y se agregaron 210 μ l de alcohol isopropílico acidificado (HCl 0.04 M en isopropanol). Se dejó

reposar aproximadamente 10 min y se resuspendió con pipeta de repetición. Se pasó el sobrenadante a una microplaca nueva y se leyó la DO a 545 nm con un filtro diferencial de 630 nm en un lector de microplacas (EIA multiwell reader, Sigma Diagnostics). Para determinar el porcentaje de muerte celular se utilizó el análisis de regresión y análisis de correlación (Zar JH., 1974) (Figura 6).

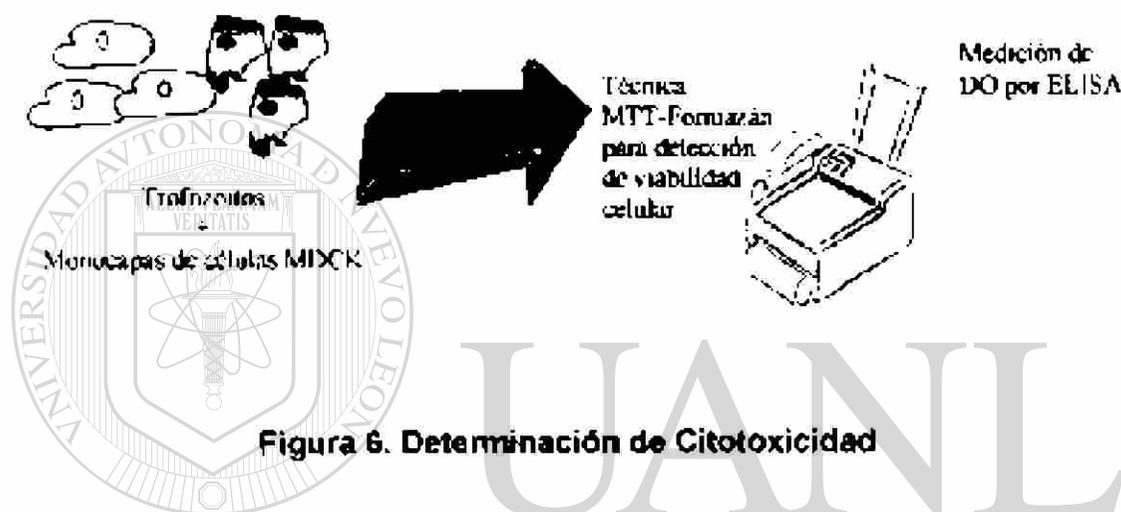


Figura 6. Determinación de Citotoxicidad

2.10 SELECCIÓN DE mRNA DIFERENCIALES

2.10.1 Estrategia de Selección

La estrategia para seleccionar los mRNA diferenciales fue diseñada de la siguiente manera: A partir de ambos cultivos ambientales CV y CNV, se extrajo el RNA total, del cual, por un lado se obtuvo el cDNA correspondiente a los mRNA por retrotranscripción, y por otro lado, se aislaron también los mRNA por la técnica con columna oligod(T). Posteriormente se mezclaron los cDNA de CV con los mRNA de CNV y viceversa; manteniendo hibridados los mRNA a sus respectivos cDNA y dejando libres sólo los mRNA diferenciales en ambos casos. Enseguida se pasó la mezcla por una segunda columna oligod(T) para

separar los mRNA diferenciales y a partir de ellos se procedió a construir las bibliotecas sustractivas con sólo los mRNA específicos de CV y de CNV (Figura 7).

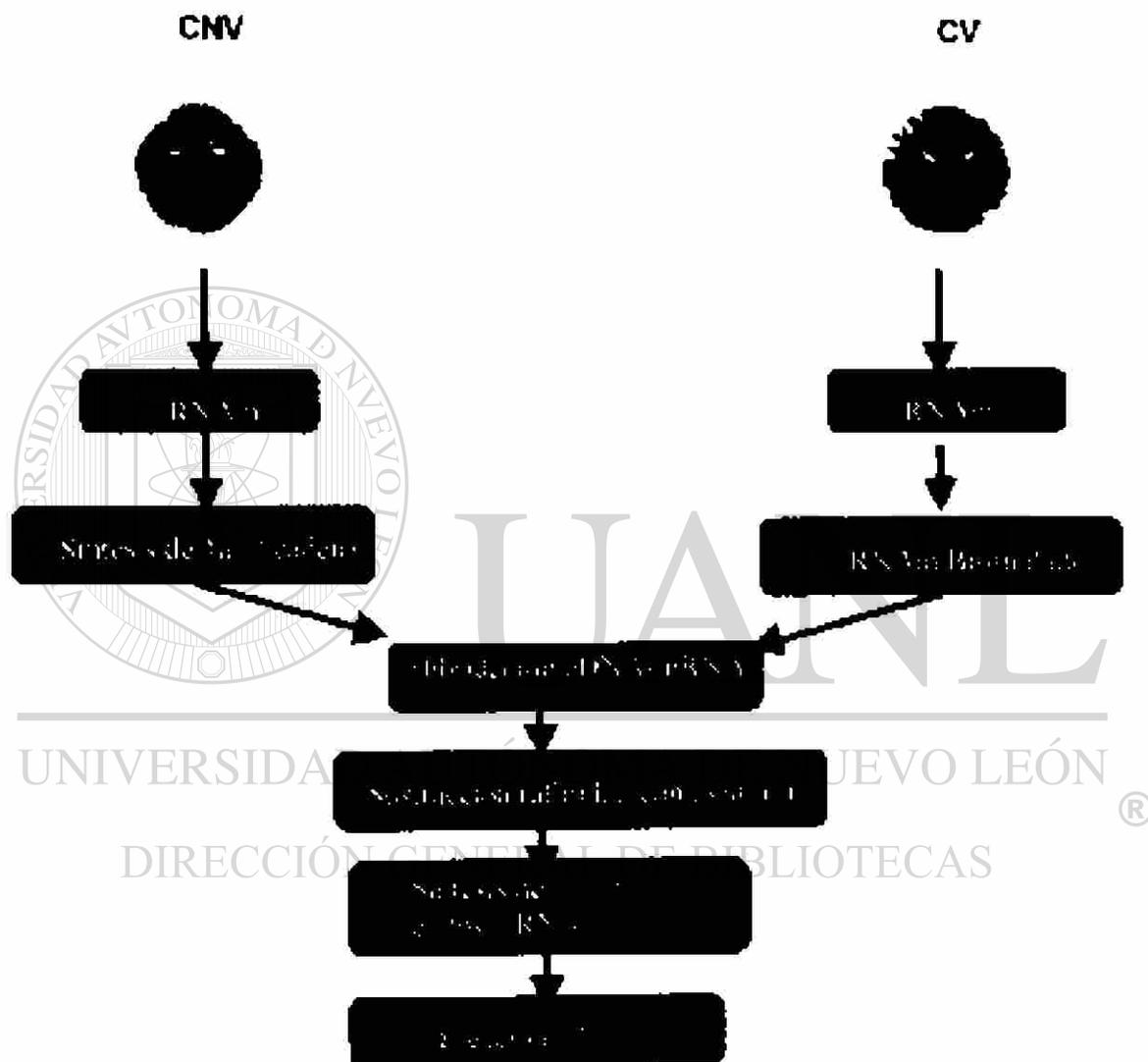


Figura 7. Estrategia de Selección de mRNA Diferenciales

2.10.2 Extracción de RNA Total

El proceso se realizó por la técnica de TRIZOL como se ha descrito previamente (Sección 2.11.1).

2.10.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA total se incubaron primero 9 μ l del RNA obtenido en el proceso anterior con 1 μ l de hexámeros al azar por 15 min a temperatura ambiente. Enseguida se preparó una mezcla de reacción de síntesis de cDNA en un volumen total de 20 μ l conteniendo 4 μ l de Amortiguador de retrotranscripción 5X, 200 μ M de cada dNTP, 1 μ l de hexámeros al azar, 1.2 μ l de inhibidor de ribonucleasa, 0.8 μ l de DTT, y los 10 μ l de la solución de RNA. Se incubó la mezcla de 19 μ l a 65°C por 5 min y enseguida a 37°C por 10 min. Añadiendo a continuación 1 μ l de enzima transcriptasa reversa e incubando a 37°C por 50 min. Al final de la reacción, se calentó a 95°C por 5 min y se aplicó un choque térmico en hielo. La mezcla se incubó con 2 μ l de ribonucleasa por 1 h a 37°C y se calentó a 70°C por 10 min. Finalmente se precipitó el cDNA con 2 volúmenes y medio de etanol absoluto, centrifugando a 14,000 rpm por 10 min y secando el precipitado para disolverlo en agua ultrapura estéril a una concentración de 30 ng/ μ l.

2.10.4 Hibridación mRNA-cDNA (Lifetechnologies, 1999)

Se incubaron 80 μ g del RNA de CV con 25 μ l de amortiguador de hibridación en un tubo de polipropileno de 1.5 ml. Enseguida se calentó la mezcla a 65°C por

10 min y se aplicó un choque térmico en hielo para añadir el cDNA de CNV precalentado a 65°C. Se añadieron 2 µl de NaCl 5 M y se ajustó el volumen total a 50 µl con agua ultrapura estéril. Posteriormente se incubó la mezcla a 42°C con agitación a 200 rpm por 24 h. Finalmente se extrajo el RNA por la técnica de TRIZOL previamente descrita.

El mismo protocolo fue utilizado para hibridar el RNA de CNV con el cDNA de CV.

2.10.5 Obtención de mRNA mediante Extracción con Columna Oligo d(T) (Lifetechnologies, 1999)

Para separar los mRNA desplegados diferencialmente por cada cultivo de los hibridados con sus respectivos cDNA, se utilizó la técnica de aislamiento por columna oligod(T), logrando obtener solo los mRNA específicos.

Se sujetó la columna en un anillo de soporte y se cargó 1 ml de NaOH 0.1M a la columna dejándolo drenar completamente. Enseguida se equilibró la columna con 4 ml de amortiguador de unión (BU) (Tris HCl 10 mM ph 7.5, EDTA 1mM, NaCl 0.3M, SDS 0.1% peso/volumen)

Se cargó 1 ml de BU a la columna y se dejó pasar alrededor de 0.5 ml. Se añadieron 3 ml de BU al sedimento de RNA total aislado en el paso anterior y se disolvió por trituración usando una pipeta estéril. Se calentó la solución de RNA en un baño de agua a 70°C por 5 min y se puso en hielo por 5 min. Se cargó el RNA disuelto a la columna bajo flujo de gravedad y se lavó con 4 ml de BU para eluir los RNA no mensajeros. Se eluyeron los mRNA con 1.5 ml de

amortiguador de elución (BE) (Tris HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM, SDS 0.1% peso/volumen) y se colectó el eluato como una fracción única en un tubo de centrifuga desechable de 15 ml estéril. Se reequilibró la columna con 4 ml de BU. Los mRNA obtenidos se calentaron en un baño de agua de 70°C por 5 min y enseguida se puso en un baño de agua con hielo por 5 min. Se dejó la solución de RNA a temperatura ambiente por 20 minutos, y entonces se añadieron 90 µl de NaCl 5M. Inmediatamente se cargó el RNA a la columna y se lavó con 4 ml de BU. Se eluyó el mRNA con 1.5 ml de BE y se colectó el eluato como una sola fracción en un tubo centrifuga estéril desechable de 15 ml. Finalmente se añadieron 90 µl de NaCl 5M y 3 ml de etanol al RNA. Se centrifugaron las muestras a 7,000 x g por 20 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se añadió cuidadosamente 1 ml de etanol al 75% al tubo y se centrifugó a 7,000 x g por 2 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento a temperatura ambiente hasta que el etanol se hubo evaporado completamente. Finalmente se disolvió el sedimento en 20 µl de EDTA 1mM tratado con DEPC (pH 7.5).

2.11 CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS

La estrategia de cómo fueron preparados los insertos consistentes de los mRNA diferenciales con los adaptadores respectivos y las secuencias 5' y 3' necesarias es descrita en la Figura B.

2.11.1 Alineación de Iniciadores para formar los Adaptadores 3' y 5' (Operon, 1999)

Para preparar los adaptadores que serían utilizados en la construcción de las bibliotecas se utilizó un par de oligonucleótidos para cada adaptador. La figura 9 muestra las características de cada adaptador y la tabla 5 presenta sus secuencias. Tales oligonucleótidos fueron alineados de la siguiente forma:

Se resuspendieron los oligonucleótidos en Tris-HCl 10mM. Se tomaron alícuotas de 32.5 pmoles de cada oligonucleótido y se llevó a un volumen total de 15 μ l con agua ultrapura estéril. Enseguida se añadieron 5 μ l de amortiguador L 10X y se calentó a 90°C por 5 min y se enfrió a temperatura ambiente por 45 min.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tabla 5. Secuencias de los Oligonucleótidos que forman los Adaptadores[®]

Nombre	Secuencia	# nucleótidos
<i>Spe</i> I 5'	G ggc gca ggt ctc ctc ctc tta gca gca caa cca gca atc gcc	43
<i>Spe</i> I 3'	Cgt cca gag gag gag aat cgt cgt gtt ggt cgt tac cgg	39
<i>Not</i> I 5'	ttt ttt ttt act agt gat gct	21
<i>Not</i> I 3'	tga tca cta cga	12

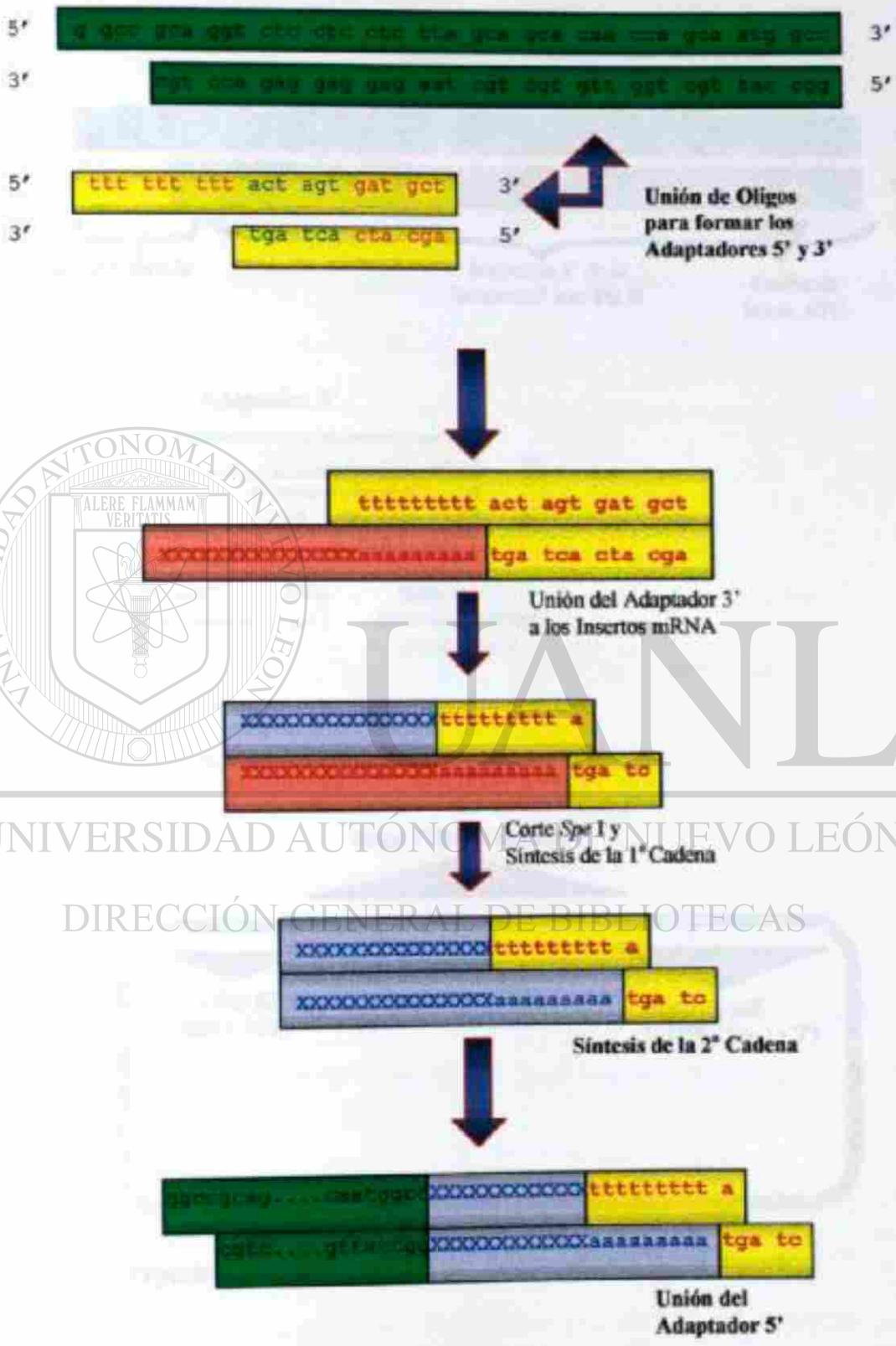


Figura 8. Preparación de Insertos para clonación a vector.

2.11.2 Unión del Adaptador 3' a los mRNA Diferenciales

Se añadieron aproximadamente 50 ng de RNA obtenido de la sección 2.13.5 a 16 μl de agua ultrapura estéril y 2 μl de amortiguador de T4 DNA ligasa. Enseguida se añadió 1 μl del adaptador 3' obtenido en la sección anterior y 1 μl de T4 DNA ligasa para posteriormente incubar la reacción por 5 h a 15°C. Una vez realizada la reacción, se procedió a digerir el mRNA-Adaptador 3' con la enzima *Spe I* para dejar listo uno de los extremos del inserto para unir al vector. La tabla 6 expone las condiciones de la digestión que fue realizada a 37°C por 12 h.

Tabla 6. Coctel de Digestión para formar sitio cohesivo *Spe I*

Reactivo	Cantidad (μl)
DNA inserto (500 ng/ μl)	5
Enzima <i>Spe I</i>	1
Amortiguador 10 X	1
Agua	3

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.11.3 Retrotranscripción

Una vez listos los mRNA-Adaptador 3', se procedió a sintetizar el cDNA por retrotranscripción. Este proceso se realizó igual que el descrito en la Sección 2.13.3.

2.11.4 Síntesis de la Segunda Cadena

Para sintetizar la segunda cadena se preparó una mezcla de reacción de un volumen total de 50 μl conteniendo lo siguiente: 5 μl de amortiguador PCR 10X

(43 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 8.4 y 1 mg gelatina/ml), 200 μM de cada dNTP, 5 U de Taq DNA polimerasa, y 3 μg de hexámeros al azar. La reacción fue amplificada en 30 ciclos con desnaturalización a 92°C por 1 min, alineamiento a 40°C por 1 min y extensión por 2 min a 72°C usando un termociclador automatizado (MJ Research, Cambridge, MA).

2.11.5 Unión del Adaptador 5'

El siguiente paso fue unir el adaptador 5' a los Insertos mediante reacción con enzima ligasa. Previamente se repurificaron los ácidos nucleicos del paso anterior con una mezcla de 200 μl de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (100:96:4) y reprecipitados con 2 volúmenes y medio de etanol. La reacción con la ligasa, del adaptador 5' se realizó igual que la Sección 2.14.2.

2.11.6 Clonación de Insertos al Vector Fágico (Young RA, et al, 1983)

Una vez terminada la amplificación, se purificaron los ácidos nucleicos como se describe en la Sección 2.14.4 y se procedió a clonar los insertos al vector. Se preparó una reacción de ligación como se muestra en la tabla 7 con sus respectivos controles positivo y negativo. Se procedió a incubar las mezclas a 4°C por la noche y enseguida se empaquetaron los vectores recombinantes.

Tabla 7. Reacción de ligazón de los Insertos al Vector SurfZAP

	Negativo (μ l)	Positivo (μ l)	Muestra (μ l)
Vector SurfZAP (1 μ g/ μ l)	1	1	1
Inserto testigo + (0.25 μ g/ μ l)	-	1	-
Insertos Muestra	-	-	2
Amortiguador de	0.5	0.5	0.5
DATP 10 mM	0.5	0.5	0.5
Agua	2.5	2.5	0.5
DNA T4 Ligasa (2U/ μ l)	0.5	0.5	0.5

2.11.7 Empaquetamiento del Vector (Young RA. et al, 1983)

Se tomó del ultracongelador de -80°C dos extractos de proteínas de empaquetamiento de fagos. (Uno para cada biblioteca diferencial). Enseguida

se dejaron entre los dedos hasta que apenas empezaron a derretirse e inmediatamente se añadieron 4 μ l de DNA a una cantidad de 1 μ g de ligación.

Se mezcló con una pipeta y se centrifugó el tubo rápidamente por 4 seg. A continuación se incubó a 22°C por 2 h y después se añadieron 500 μ l de amortiguador SM al tubo. Se añadieron 20 μ l de cloroformo y se mezcló el tubo para finalmente centrifugar brevemente para sedimentar.

2.11.8 Preparación de Bacterias Hospederas (Sambrook J. et al, 1989)

Para preparar *Escherichia coli* XL1-Blue para placas de petri y para el stock de glicerol se preparó LB con tetraciclina a una concentración de 12.5 μ g/ml,

mientras que para crecer en cultivo se preparó LB con maltosa 0.2% volumen/volumen y 10mM de $MgSO_4$.

La preparación de células bacterianas fue realizado de la siguiente manera: Se tomó una asada del cultivo original y se sembró en una caja de medio LB con tetraciclina dejándola incubar a 37°C por 12 h. A partir de este cultivo se utilizaron las bacterias para realizar la titulación y propagación de las bibliotecas, así como para el tamizaje inmunológico.

2.11.9 Titulación de la Biblioteca (Sambrook J. et al, 1989)

Para determinar el título de la biblioteca, se mezclaron 200 μ l de bacterias *E. coli* de la cepa XL1-Blue con alícuotas de 0.1 a 10 μ l de la biblioteca. Se incubaron las suspensiones por 20 min a 37°C. Se mezclaron las preparaciones con 4 ml de medio LB con maltosa y $MgSO_4$ en agar suave fundido a 60°C. Se agitó suavemente cada tubo con ayuda de un vortex e inmediatamente se vació el contenido completo del tubo al centro de una caja de petri preincubada a 37°C por 8 h, que contenía 35 ml de LB en agar al 1.5%. Se giraron suavemente las placas para asegurar una distribución uniforme de las bacterias infectadas y el medio sólido fundido de superficie. Se repitió la operación descrita con cada uno de los otros tubos. Se taparon las cajas y se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente, para permitir que solidificara el medio de la superficie. Se invirtieron las cajas y se incubaron a 37°C. Después de 7h de incubación, se contaron el número de Unidades Formadoras de Placa (UFP) obtenidas de cada caja. El título se expresó como UFP/ μ l

2.12 TAMIZAJE INMUNOLÓGICO DE LAS BIBLIOTECAS (Sambrook J. et al, 1989; Young RA. et al, 1983)

2.12.1 Preparación de los Filtros

Se tomó una colonia de bacterias y se creció el cultivo a saturación en 15 ml de LB + 10 mM de $MgSO_4$ + 0.2% de Maltosa a 37°C y 250 rpm de agitación. Se mezclaron 0.2 ml del cultivo con 0.1 ml de amortiguador de dilución de λ 1X estéril conteniendo 10^4 UFP de la biblioteca. Se permitió la adsorción de fagos a las células a 37°C por 15 min (10^3 placas/caja de petri). Se añadieron 3 ml de LB agarosa suave mas 10 mM de $MgSO_4$ para cada caja de Petri. Se mezcló y se vació a la caja. Se mezclaron e incubaron a 42°C por 3.5 h para permitir el crecimiento de fagos líticos. Usando pinzas, se dejó un filtro de nitrocelulosa (NC) seco previamente saturado con 10 mM de IPTG sobre la superficie de la agarosa, evitando la formación de burbujas. Se marcaron los filtros en 3 lugares asimétricos con jeringa y aguja con tinta indeleble. Se incubaron las placas conteniendo los filtros a 37°C por 3.5 h. Enseguida se removieron y lavaron los filtros en amortiguador TBST. Se incubaron los filtros en TBST + 20% de suero fetal bovino por 30 min. Posteriormente se removieron y lavaron los filtros en TBST nuevamente.

2.12.2 Unión del Antisuero

Se incubaron los filtros en 5 ml de TBST con la mezcla de sueros a temperatura ambiente por 1 h. Se añadieron 2 μ l de mezcla de antisuero por cada 10 ml de

solución usada en el paso anterior. Se lavaron los filtros en 3 cambios de TBST, dejando 3 min por cambio.

2.12.3 Unión del Anticuerpo Secundario Biotinilado

Se añadieron 20 μ l del anticuerpo secundario (Anti-humano) por cada 10 ml de TBST. Se incubaron a temperatura ambiente por 30 min con agitación vigorosa. Se dejaron los filtros en TBST con el anticuerpo secundario. Enseguida se lavaron los filtros en 3 cambios de TBST dejando 3 min por cada cambio. Posteriormente se transfirieron los filtros a TBST conteniendo el complejo Avidina-HRP (40 μ l de Avidina y 40 μ l de HRP en 10 ml de TBST). Se incubaron a temperatura ambiente 30 min con agitación vigorosa. Se lavaron los filtros 3 veces en TBST dejando 3 min por cambio. Después se incubaron los filtros de NC en solución de sustrato de peroxidasa. Se dejó desarrollar el color 30 min usando 5 ml de solución de sustrato peroxidasa por cada filtro. Las placas positivas aparecieron de color azul. Finalmente se lavaron los filtros en 3 cambios de agua destilada y se dejaron secar al aire, para después alinear los filtros con las placas para seleccionar las placas positivas, y en casos donde no pudo ser picada una sola colonia, se separó un fragmento de agarosa con varias colonias y se repitió el plaqueo para obtener 200-1000 placas en una caja de 150 mm y se retamizó para obtener una placa única.

2.13 PRUEBA CON SUEROS

Se procedió a probar las proteínas recombinantes de cada clona aislada, expresadas en la superficie de la bacteria, con sueros de pacientes en estado de portador para las clonas de CV y sueros de pacientes con amibiasis invasiva para las clonas de CNV. De la misma forma se probaron ambos grupos de clonas con una mezcla de sueros de sujetos sanos.

El objeto de tal prueba fue determinar si existía inmunoreactividad cruzada de alguna de las clonas aisladas con los sueros contrarios, es decir que las clonas de la biblioteca del cultivo virulento no fueran reconocidas también por anticuerpos desarrollados por pacientes asintomáticos y viceversa. Igualmente, descartar clonas que presentasen inmunoreacción en sujetos sanos.

Se incubaron 50 μ l del sobrenadante obtenido después de centrifugar a 14000 rpm por 30 seg el cultivo obtenido de cada clona propagada en *E. coli*, con 50 μ l de sueros. Se dejaron incubar a 37°C por 15 min en cámara húmeda y se observó la presencia o ausencia de aglutinación al microscopio. Se probaron los 15 sueros de pacientes con amibiasis invasiva, 20 sueros de pacientes portadores asintomáticos y 10 sueros de sujetos sanos.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DEL CULTIVO VIRULENTO A PARTIR DEL ABSCESO

Después de 7 días de la inoculación intrahepática de los cultivos de *E. histolytica* en los Hamsters, se observaron lesiones macroscópicas, de aspecto blanco cremoso en áreas redondas a través de todo el tejido hepático, que bajo el microscopio pudieron definirse como granulomas característicos de diversos tamaños con un centro necrótico rodeado por abundantes trofozoitos, células epiteliales y fibrosis. Las amibas cosechadas del absceso fueron exitosamente mantenidas en cultivo por un par de resiembras con antibiótico para establecer el cultivo axénico y entonces extraer sus ácidos nucleicos, así como los de las amibas no inducidas. La figura 10 muestra el aspecto microscópico de las lesiones hepáticas.

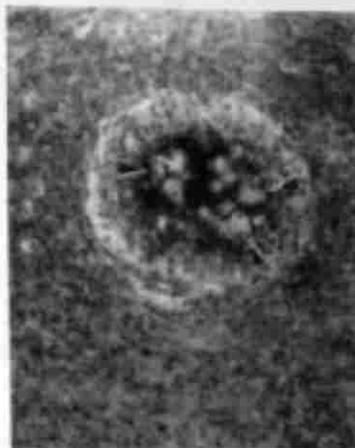


Figura 10. Aspecto microscópico de las lesiones hepáticas por *E. histolytica*. En la figura se puede observar un centro necrótico de tejido hepático rodeado por abundantes trofozoitos, células epiteliales y fibrosis.

3.2 Extracción de DNA y RNA

Se extrajo el DNA total de los cultivos virulento (CV) y no virulento (CNV), por la técnica descrita por Petri (Entamoeba homepage, 2000). Se obtuvieron alrededor de 25 μ g de DNA de buena calidad, sin degradación ni contaminantes de acuerdo al análisis espectrofotométrico (Sambrook J. et al, 1989).

El RNA fue aislado por la técnica comercial TRIZOL (Lifetechnologies 1999) y fue analizada su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, obteniendo 20 μ g de RNA total integro. La Figura 11 permite observar la integridad del RNA obtenido.

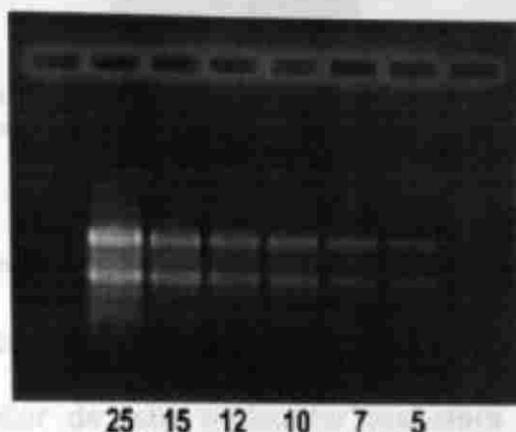


Figura 11. Aspecto del RNA amibiano en gel de agarosa. Se puede observar la integridad y pureza del RNA extraído para los análisis posteriores. Cada carril corresponde a una cantidad de RNA añadida en μ l.

3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA DIFERENCIAR ESPECIES EN LOS CULTIVOS

El DNA genómico de CV así como el de CNV fueron sometidos a un par de PCR para confirmar molecularmente la presencia exclusiva de la especie *E. histolytica* en nuestros cultivos originales y la ausencia de *E. dispar*. El PCR realizado con los iniciadores P1 y P2 tanto a CV como a CNV expuso mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio la presencia de la banda de 146 pares de bases correspondiente a la confirmación de la presencia de *E. histolytica* en los cultivos; Mientras que el segundo par de PCR con los iniciadores NP1 y NP2, no revelaron ninguna banda en el gel. Esto descarta la posible presencia de *E. dispar* como contaminante en nuestros cultivos originales. La Figura 12 muestra el gel con los resultados mencionados.

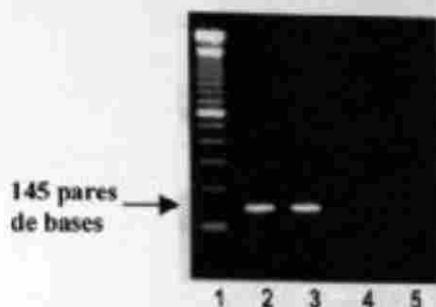


Figura 12. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% mostrando los productos amplificados a partir de DNA genómico amibiano. En el carril 1 se observa el marcador de talla molecular (escalera de 100 pares de bases), en los carriles 2 y 3 se presenta la banda de 145 pares de bases correspondiente al producto de la cepa patógena en CV y CNV. Mientras que en los carriles 4 y 5 se presentan las muestras sometidas a amplificación con los iniciadores de la cepa no patógena en los mismos DNA (CV y CNV respectivamente). Es evidente la ausencia de dichas bandas de 133 pares de bases.

3.4 DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS AMPLIFICADOS AL AZAR

A partir de los cultivos originales CV y CNV se procedió a preparar una muestra especial de DNA genómico tal y como se describe en la metodología, la cual fue utilizada para detectar polimorfismos genéticos mediante amplificación al azar con la técnica conocida como RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphism Detection-PCR). Con esta metodología se pudo confirmar la presencia de una evidente y considerable cantidad de bandas polimórficas diferentes en los cultivos CV y CNV. La figura 13 permite observar dicho polimorfismo presente en ambos cultivos.

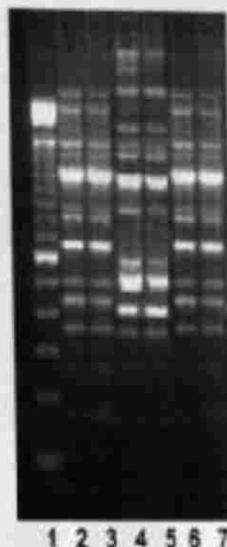


Figura 13. Polimorfismo en el genoma de *E. histolytica* de CV y CNV. En el carril 1 se muestra el marcador de talla molecular (escalera de 100 pares de bases). Los carriles 2 y 3 muestran el bandeo obtenido por el DNA de CNV por duplicado, y los carriles 4 y 5 muestran el bandeo de CV. Los últimos dos carriles (6 y 7) muestran el bandeo del CNV después de 4 meses de mantenerlo en cultivo *in vitro*.

3.5 DESPLIEGUE DIFERENCIAL DE mRNA EN CV Y CNV

Utilizando RNA total, se realizaron ampliificaciones de los mRNA de CV y CNV mediante RT-PCR con iniciadores específicos para observar despliegue diferencial de mRNA. El gel de secuenciación en el que se analizaron los productos amplificados permite observar la presencia de algunas bandas que están mas intensas en el cultivo CV que en el CNV, lo cual demuestra la sobreexpresión de algunos transcritos al someter los cultivos ambientales a condiciones ambientales distintas como sería la inoculación experimental hepática en hámsters. La figura 14 muestra tal sobreexpresión.

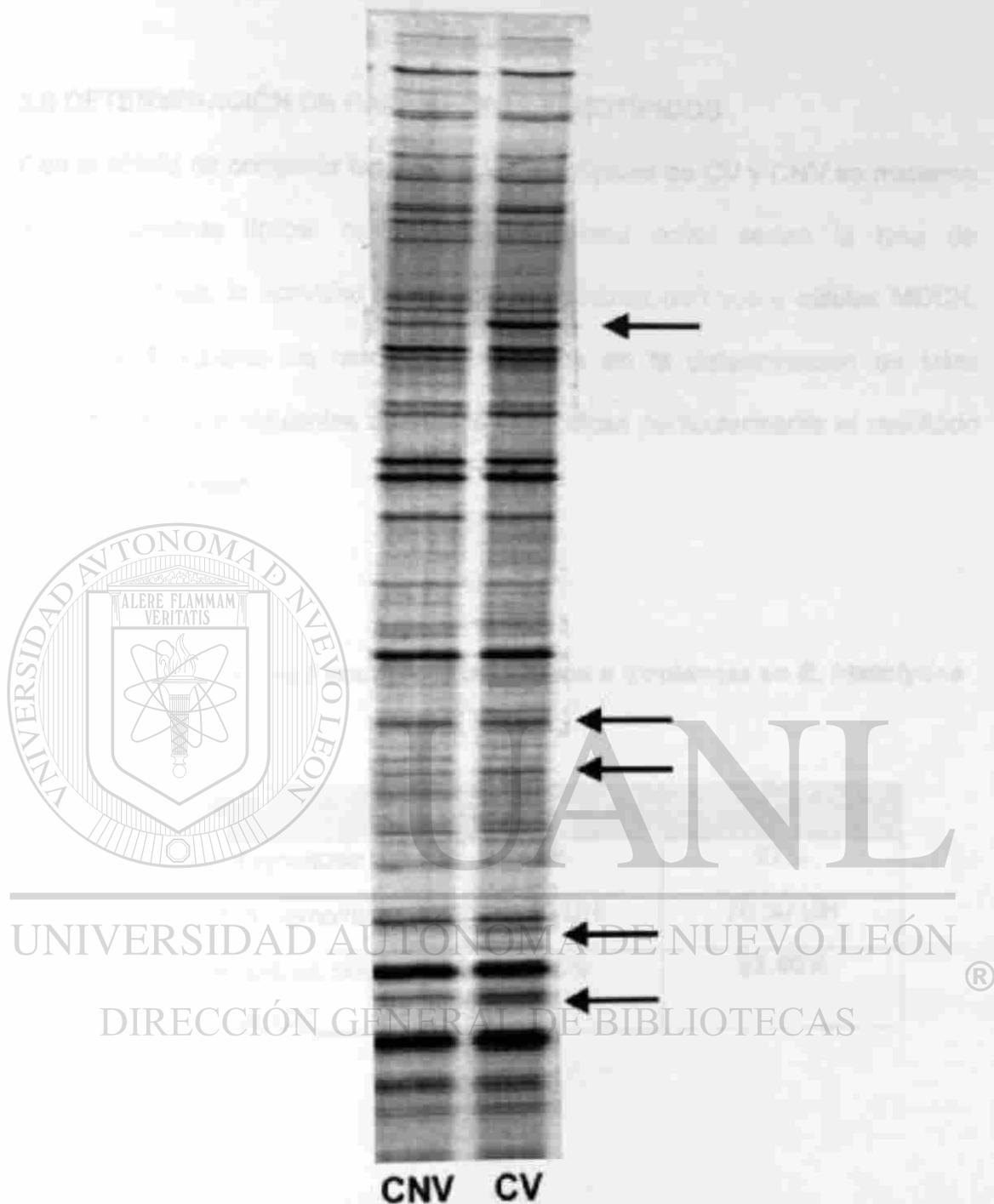


Figura 14. Despliegue diferencial de mRNA en *Entamoeba histolytica*. En la figura se muestra la autoradiografía del despliegue diferencial de mensajeros en CNV y CV. Se pueden observar algunos transcritos sobreexpresados en CV, indicados por las flechas.

3.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FENOTÍPICOS

Con el objeto de comparar las diferencias fenotípicas de CV y CNV se midieron tres parámetros típicos de virulencia amibiana como serían la tasa de eritrofagocitosis, la actividad hemolítica y la citotoxicidad sobre células MDCK. La tabla 8 resume los resultados obtenidos en la determinación de tales parámetros y los siguientes apartados especifican particularmente el resultado de cada parámetro.

Tabla 8. Parámetros Fenotípicos asociados a Virulencia en *E. histolytica*

Parámetro	CNV	CV
Eritrofagocitosis	43%	97%
Actividad Hemolítica	29.50 UH	70.30 UH
Citotoxicidad en células MDCK	37.25%	93.40%

3.6.1 Eritrofagocitosis

Se observó el porcentaje de eritrofagocitosis de los cultivos originales CV y CNV mediante un método previamente descrito. La figura 15 muestra la gráfica del porcentaje de eritrofagocitosis máximo obtenido por CV y CNV.

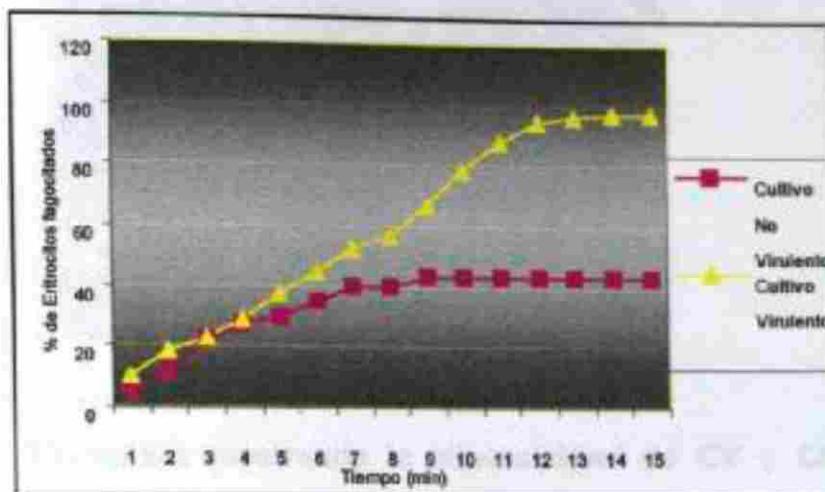


Figura 15. Curva del % de Eritrofagocitosis contra tiempo de CV y CNV. Se puede observar en la gráfica que aproximadamente a los 10 min de incubación, el % de eritrofagocitosis para ambas cepas se mantiene prácticamente constante.

3.6.2 Actividad Hemolítica

Se determinó la actividad hemolítica de CV y CNV, encontrando que la actividad hemolítica absoluta expresada como Unidades Hemolíticas/mg/90 min de reacción (UH) fue de 29.50 UH para CNV y 89.30 UH para CV.

3.6.3 Citotoxicidad sobre Células MDCK

La citotoxicidad de los cultivos sobre células MDCK fue determinada por el porcentaje de muerte celular mediante un ensayo colorimétrico. Las figuras 16 y 17 muestran los resultados obtenidos en este experimento.

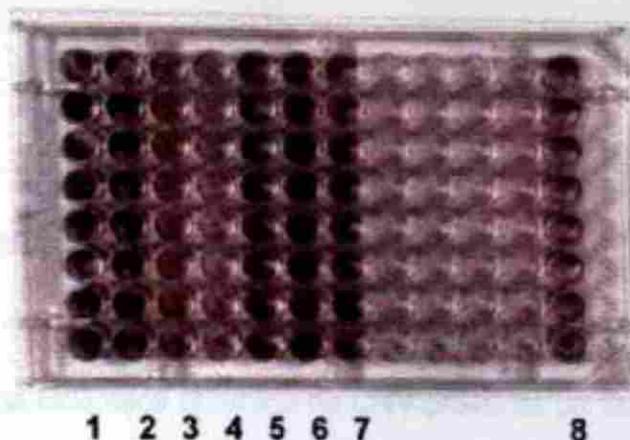


Figura 16. Microplaca mostrando la citotoxicidad de CV y CNV sobre células MDCK. Las líneas 1 y 2 muestran células MDCK solas. Las líneas 3 y 4 muestran células MDCK + CV, las líneas 5, 6 y 7 muestran células MDCK + CNV y la línea 8, el control negativo (MDCK + solución fisiológica).

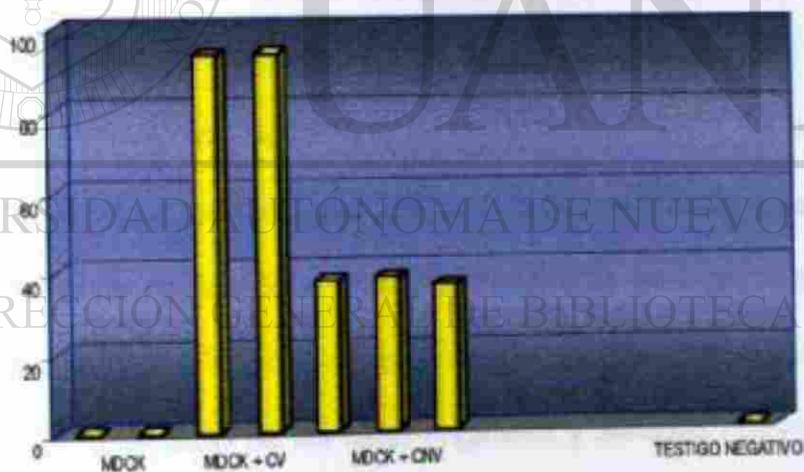


Figura 17. Gráfica de la citotoxicidad de CV y CNV sobre células MDCK. Las primeras dos columnas muestran células MDCK solas. Las siguientes dos muestran células MDCK + CV, las siguientes tres muestran células MDCK + CNV y la última línea del lado derecho el control negativo (MDCK + solución fisiológica).

3.7 TITULACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE cDNA

El título promedio de la biblioteca obtenida de CV fue de 7.8×10^9 UFP/ μ l, mientras que la biblioteca obtenida de CNV presentó un título promedio de 6.8×10^9 UFP/ μ l. Los cálculos realizados se basaron en la determinación por cuenta en placa de la cantidad de UFP en cada una de las diluciones hechas de las bibliotecas originales.

3.8 TAMIZAJE INMUNOLÓGICO

Para cada biblioteca, se analizaron 30 cajas por duplicado con medio de cultivo y el césped bacteriano infectado con cada biblioteca, con un título de 5×10^9 UFP por caja. Una vez incubadas con los sueros, las réplicas de nitrocelulosa obtenidas de las cajas, se detectaron 30 UFP que presentaron una coloración azul en el filtro de nitrocelulosa previamente tratado para el tamizaje de la biblioteca de CV y 28 UFP positivas para el tamizaje de la biblioteca de CNV. Estas UFP fueron tomadas de las cajas originales y aisladas nuevamente para asegurar que fuesen colonias únicas. La Figura 18 muestra un aspecto de los filtros con UFP positivas.

Tabla 8. Tamizaje de clones para su uso en los ensayos de inmunización.



Figura 18. Aspecto de uno de los Filtros de Nitrocelulosa con clonas positivas al realizar el tamizaje inmunológico.

3.9 INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA DE LAS CLONAS AISLADAS

Cada una de las 30 clonas obtenidas de la biblioteca del cultivo virulento, fueron retadas contra cada uno de los 20 sueros de pacientes asintomáticos y los 10 sueros de sujetos sanos. Logramos identificar 13 clonas que presentaron

reacción cruzada con alguno o algunos de los sueros (Ver tablas 9 y 10).

De la misma forma, cada una de las 26 clonas obtenidas de la biblioteca del cultivo no virulento, fueron retadas con cada uno de los 15 sueros de pacientes con amibiasis invasiva, y los 10 sueros de sujetos sanos, observando inmunoreactividad en 17 clonas (Ver tablas 11 y 12).

Así, se obtuvieron 17 clonas de la biblioteca de CV que codifican antígenos recombinantes específicos de *E. histolytica* en estado virulento y 9 clonas de la biblioteca de CNV que codifican antígenos recombinantes específicos de *E. histolytica* en estado no virulento.

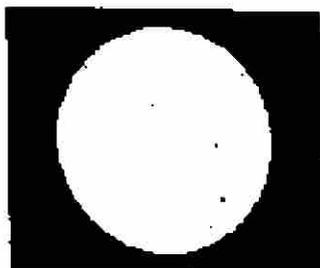


Figura 18. Aspecto de uno de los Filtros de Nitrocelulosa con clonas positivas al realizar el tamizaje inmunológico.

3.9 INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA DE LAS CLONAS AISLADAS

Cada una de las 30 clonas obtenidas de la biblioteca del cultivo virulento, fueron retadas contra cada uno de los 20 sueros de pacientes asintomáticos y los 10 sueros de sujetos sanos. Logramos identificar 13 clonas que presentaron reacción cruzada con alguno o algunos de los sueros (Ver tablas 9 y 10).

De la misma forma, cada una de las 26 clonas obtenidas de la biblioteca del cultivo no virulento, fueron retadas con cada uno de los 15 sueros de pacientes con amibiasis invasiva, y los 10 sueros de sujetos sanos, observando inmunoreactividad en 17 clonas (Ver tablas 11 y 12).

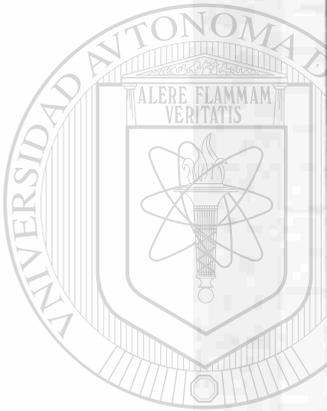
Así, se obtuvieron 17 clonas de la biblioteca de CV que codifican antígenos recombinantes específicos de *E. histolytica* en estado virulento y 9 clonas de la biblioteca de CNV que codifican antígenos recombinantes específicos de *E. histolytica* en estado no virulento.

Tabla 10. Clonas de CV retadas contra los sueros de personas sanas.

(* significa que presentó inmunoreacción).

Las clonas en negrillas corresponden a las que fueron seleccionadas como antígenos específicos, puesto que presentaron reacción solo con los sueros de pacientes con absceso y no con los asintomáticos ni personas sanas.

Suero/ Clona	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
CV01										
CV02										
CV03										
CV04										
CV05										
CV06							*			
CV07										
CV08										
CV09										
CV10										
CV11										
CV12										
CV13										
CV14										
CV15										
CV16										
CV17										
CV18										
CV19										
CV20										
CV21										
CV22										
CV23										
CV24										
CV25										
CV26	*							*		
CV27										
CV28										
CV29										
CV30										



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

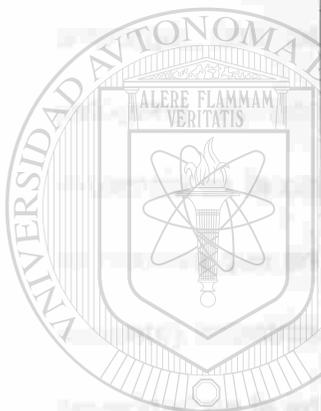
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Tabla 12. Clonas de CNV retadas contra los sueros de personas sanas. (* significa que presentó inmunoreacción).

Las clonas en negrillas corresponden a las que fueron seleccionadas como antígenos específicos, puesto que presentaron reacción solo con los sueros de pacientes asintomáticos y no con los pacientes con absceso ni personas sanas.

Suero/ Clona	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
CNV01										
CNV02										
CNV03										
CNV04		*						*		
CNV05										
CNV06			*	*			*			*
CNV07						*				
CNV08										
CNV09										
CNV10										
CNV11										
CNV12										
CNV13										
CNV14				*				*		
CNV15										
CNV16										
CNV17										
CNV18										
CNV19										
CNV20										
CNV21										
CNV22										
CNV23										
CNV24	*	*							*	
CNV25										
CNV26										



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Patogenicidad y virulencia son dos términos frecuentemente usados de manera indiscriminada como sinónimos (Edman U. et al, 1987; Mattem CFT. et al, 1978; Garfinkel U. et al, 1989; Tannich E. et al, 1989 & Tannich E. et al, 1991). Sin embargo, una definición mas precisa para ambos sería la siguiente: Un patógeno es un organismo capaz de causar enfermedad, mientras que virulencia es la capacidad relativa de un patógeno para causar enfermedad. De tal manera que en principio, patogenicidad es un termino dual, (está presente o ausente) mientras que la virulencia puede exhibir rangos dependiendo de la severidad de la enfermedad resultante (Galdstone GP. et al, 1970).

Está claramente definido que *Entamoeba histolytica* es un patógeno, pero la proporción o grado de virulencia de los diversos aislados varía de manera notoria, determinándose originalmente mediante el establecimiento fenotípico del parásito.

La observación de parámetros fenotípicos en cultivos, está bien documentada y es una metodología que permite definir de manera contundente la expresión de proteínas asociadas a la virulencia en los organismos. Es sabido que los organismos eucarióticos sufren constantes procesos de diferenciación que se reflejan en un aspecto morfológico, metabólico o molecular distinto al original no

solamente como parte de su ciclo vital, sino también cuando las condiciones desarrolladas en su medio ambiente son alteradas de su status normal.

Este fenómeno no está ausente en *Entamoeba histolytica*, y de hecho, es la evidencia clásica que ha permitido a través de las décadas de estudio de la amibiasis, años antes de la revolución de la Ingeniería Genética, establecer la dualidad mortal de este parásito.

Con los hallazgos de Martínez-Palomo en la década de los 70's sobre la variable aglutinación de los cultivos amibianos con Concanavalina A de acuerdo a la virulencia y patogenicidad de los mismos, (Martínez-Palomo A., 1982) avanzó el desarrollo de estos estudios fenotípicos que iban desde la observación de patrones electroforéticos de proteínas diferenciales en una misma especie, tal y como fue el caso del reporte de Sargeant con la clasificación de más de 6000 muestras de distintas partes del mundo, (Sargeant P., 1988) hasta los sofisticados métodos de purificación de

proteínas citotóxicas, citopáticas y/o citolíticas, que permitieron establecer los principios de la elucidación de los mecanismos patogénicos del parásito (González-Ruiz A. et al, 1992; Mirelman D. et al, 1992 & Lotter H. et al, 1992).

En nuestro estudio, elegimos tres de tales parámetros para establecer la expresión diferencial de proteínas asociadas a la virulencia en nuestros cultivos CV y CNV: La entrofagocitosis, la actividad hemolítica y la citotoxicidad sobre monocapas celulares.

El primero de ellos es indispensable para determinar la virulencia del parásito, ya que además de la citólisis por contacto, la fagocitosis es la segunda arma más poderosa con que las amibas atacan. De tal manera que conocer la tasa

de fagocitosis, en este caso entrocitaria, nos permitió determinar un parámetro fenotípico de virulencia contundente. La fagocitosis como parámetro de virulencia ha sido reportado anteriormente, y siempre ha sido definido como fagocitosis entrocitaria o de fragmentos de células lisadas (Martínez-Palomo A. et al, 1985). Es interesante observar, que aún en las amibas de CNV fue posible detectar también una tasa basal de fagocitosis, lo cual habla de su potente agresividad natural como patógeno definido.

La actividad hemolítica nos permitió determinar el otro mecanismo patogénico de las amibas: la citólisis. La determinación está basada en la medición espectrofotométrica en la región visible de la liberación de hemoglobina lo cual expone indirectamente la actividad citolítica sobre eritrocitos del parásito. Nuevamente el CNV presentó una hemólisis basal, mientras que el CV expuso la actividad hemolítica de las amibas en su máxima expresión.

El último parámetro medido es muy parecido al anterior con la diferencia de usar monocapas de líneas celulares en lugar de glóbulos rojos. La única diferencia entre unos y otros es la ausencia de núcleo en estos últimos, por lo cual decidimos utilizar también células MDCK para medir la citólisis. Martínez Palomo y cols., han empleado monocapas de células MDCK con el objeto de determinar los eventos citolíticos mediante microcinematografía. Las monocapas de células MDCK constituyen un modelo adecuado para nuestros estudios, ya que consisten de una sola capa de células adherentes que forman una barrera continua semejando la barrera epitelial *in vivo*. En los reportes del Dr. Martínez Palomo, después de 1 hora de incubación se dio el máximo nivel

de destrucción, por lo que nosotros utilizamos este mismo tiempo de incubación (Martínez-Palomo A. et al, 1985).

La medición de estos parámetros en nuestros cultivos permiten confirmar que *E. histolytica* se transforma en un ente biológico mas peligroso cuando encuentra las condiciones propicias para ello. Condiciones que, en nuestro caso, se traducen en lo que sería el tejido hepático del hámster. El hígado es un órgano multifuncional y multiestructural molecularmente hablando. Es posible que tales propiedades que pudieran mimetizar un medio sumamente enriquecido para el parásito, le faciliten la sobreexpresión de las citolisinas y las proteínas y macromoléculas asociadas a la fagocitosis y degradación intracelular. Por otro lado, el proceso de axenización envuelve una intensa y prolongada presión de selección (Diamond LS., 1983), lo cual de acuerdo a estudios realizados por Ackers, Sargeaunt y Bhattacharya, afecta los niveles de proteinasas, la expresión de epitopes y la virulencia *in vitro* (Spice WM. et al, 1992; Prasad R. et al, 1992 & Blakely P. et al, 1990).

Fue entonces indispensable para nuestro trabajo establecer dichas condiciones fenotípicas alteradas para continuar buscando a un nivel mas fino: El genoma del parásito.

La determinación de polimorfismos genómicos en las especies eucarióticas ha sido de mucha utilidad en los estudios de identificación. De hecho, forman parte de la nueva metodología en la investigación forense, permitiendo la exitosa identificación a nivel molecular de individuos. Este aprovechamiento fue

también explotado en nuestro estudio, permitiéndonos definir la marcada plasticidad genómica de *E. histolytica*.

Consideramos de relevancia medir el polimorfismo genético ambiental pues anteriormente se ha reportado por la Dra. Orozco, que el parásito presenta ciertas secuencias de DNA llamadas regiones variables las cuales exhiben cambios en su secuencia nucleotídica aún en cultivos clonales, (De Menezes FL et al, 1997) y se ha propuesto que uno de los eventos moleculares que producen dicha variabilidad pudiera ser la recombinación no específica (Orozco E. et al, 1993). Tales aportaciones, nos dieron la pauta para ejecutar nuestro experimento. El bandeo obtenido, nos permite observar la contundente presencia de bandas específicas que pudieran servir como marcadores genéticos de caracterización de poblaciones ambientales. Una alternativa para ello sería probar la misma metodología en cultivos con gradual aumento de la virulencia y poder definir las bandas presentes o ausentes de manera

diferencial, que funcionarían como marcadores genéticos. En nuestro caso, no permitió concluir que a nivel genómico efectivamente *E. histolytica* exhibe variaciones provocadas por un cambio en su hábitat. Se ha reportado en un par de trabajos el uso de polimorfismos genómicos en *E. histolytica*, uno de los cuales propone la diferenciación y estudios de divergencia y evolución de la especie mediante esta técnica y el otro enfocado a definir los orígenes de infecciones (De Menezes FL. et al. 1997 & Gomes MA. et al, 2000).

Una vez que se encuentra, identifica y clona un gen encendido en una especie patógenicamente activada, y apagado en su estado no virulento, se vuelve un

promisorio candidato para el bloqueo de la función biológica, en este caso la virulencia. Ya sea por recombinación homóloga, sondas antisentido o sobreexpresión autotóxica, el objetivo al final será desarmar al contrario.

Para llegar a tal meta, encontrar e identificar tales genes, era anteriormente muy complicado. Sin embargo, con la metodología del despliegue diferencial de mRNA esta dificultad ha sido resuelta. La técnica se basa en una simple RT-PCR seguida por una electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución. La novedad del proceso radica en los iniciadores utilizados para amplificar los mRNA. Las secuencias de los iniciadores de retrotranscripción son oligonucleótidos d(T) con diversas combinaciones de terminaciones en adenina, guanina, timidina y citosina que aseguran estadísticamente junto con los hexámeros para la amplificación, la producción de cDNA de prácticamente todos los mRNA de una especie. Si aunado a ello, la especie a probar ha sido sometida a dos condiciones ambientales distintas, una de las cuales, favorece

la activación de la virulencia de tal especie, forman los ingredientes óptimos para encontrar esos genes tan apreciados: los genes de la virulencia. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La Dra. Lourdes Muñoz ha reportado el uso de esta herramienta en la búsqueda de cepas ambientales productoras de gránulos electrodensos activados por la presencia de calcio en los cultivos (Salazar I. et al, 1997). En nuestro caso, aprovechamos tal tecnología para confirmar, que existía en *E. histolytica* un despliegue diferencial de mRNA en condiciones asociadas a su virulencia comparado con el cultivo *in vitro* normal. Lo que pudimos observar más que la presencia o ausencia de genes fue la sobreexpresión de ellos, pues se incrementó la intensidad de algunas de las bandas, lo cual se traduce en la

promoción transcripcional selectiva. Es posible en este caso descartar falsos positivos o el efecto contaminante de las cantidades y concentraciones al observar la similitud en el resto de las bandas y ejecutar el protocolo con concentraciones iniciales similares para ambos cultivos.

Una vez confirmada la variabilidad intraespecie de *E. histolytica* con parámetros fenotípicos, genéticos y moleculares, procedimos a ejecutar la segunda parte del trabajo, que fue construir bibliotecas de cDNA con mRNA expresados exclusivamente en CV y CNV, lo que se conoce como bibliotecas sustractivas.

A partir de las cuales se realizaron tamizajes con mezclas de sueros de pacientes con absceso y asintomáticos para aislar antígenos expresados exclusivamente en CV y CNV.

La parte crucial de esta metodología fue el diseño de la estrategia de selección de los mRNA diferenciales, la cual se basó en hibridación y sustracción por afinidad con columna oligod(T). Teóricamente aislamos aquellos mRNA que se encienden exclusivamente cuando el patrón virulento de la especie se encuentra en funciones

Con aproximadamente 38,400 genes transcripcionalmente activos, las bibliotecas de *Entamoeba histolytica* requerían ser tamizadas con una cantidad de UFP de por lo menos 3 veces más que esa cantidad para asegurar la presencia de todos los genes en el tamizaje. Nosotros tamizamos 30 cajas por duplicado con 5000 UFP cada una, lo cual arroja un total de 300,000 posibles genes analizados, cubriendo sobradamente la cantidad de genes a estudiar.

Muchos grupos de investigación sobre amibiasis han buscado durante años la molécula ideal en la elucidación de los mecanismos de virulencia de este parásito, o bien, moléculas idóneas para aplicaciones terapéuticas, diagnósticas o inmunoprolácticas. Dentro de todos ellos, destacan los esfuerzos de los doctores Tannich y Mirelman quienes recientemente han intensificado sus reportes en los cuales sugieren diversas moléculas como candidatos ideales para los propósitos mencionados antes (Tannich E. et al, 1988; Tannich E., 1998; Tannich E. et al, 1991; Mirelman D. et al, 1992; Lotter H. et al, 1992; Bracha R. et al, 1995; Tannich E., 1992; Hamann L. et al, 1997; Moshitch MS. et al, 1997 & Alon RN. et al, 1997). No obstante, la mayoría de ellos, terminan discutidos por un segundo reporte en el cual la misma molécula o alguna parecida es encontrada en cultivos no virulentos de *E. histolytica* e incluso en la misma *E. dispar*.

Tal vez el principal obstáculo a vencer era encontrar la manera de seleccionar molecularmente solo los mensajeros que se expresaran diferencialmente en uno de los dos estados, en la especie *E. histolytica*. Obstáculo que de acuerdo a nuestros resultados, ha sido superado con la estrategia que hemos propuesto.

Con esta metodología, será posible aislar cada uno de los genes asociados a la virulencia del parásito

Consideramos esta estrategia de mucha utilidad porque cada uno de los mRNA que forman parte de estas bibliotecas guardan dentro de sí, la futura elucidación del mecanismo patogénico multifactorial amibiano.

Por lo pronto, iniciamos separando de ellos los que despiertan una respuesta inmunológica en el paciente al tamizar las bibliotecas con las mezclas de sueros

de pacientes en ambos estados. Al ejecutar este protocolo, pudimos encontrar no sólo mRNA específicos de los estados virulento o no virulento, sino además logramos subseleccionar de ahí a los que poseen propiedades antigénicas para el humano.

Mucho se ha sugerido e investigado acerca de la existencia de *Entamoeba dispar*. Las evidencias aportadas hasta el momento, solo nos permiten concluir que la última palabra acerca de este tema no ha sido dicha.

Además del estudio molecular y los aprovechamientos biotecnológicos que el presente trabajo están aportando, pretendemos también poner un pilar más en la edificación de evidencias sobre dicho debate; Pues aunque no hemos trabajado con tal especie, nuestros resultados permiten sugerir que *E. histolytica* pudiera ser la única especie existente, o al menos que esta especie *per se* puede infectar como comensal o en forma invasiva.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1.- *Entamoeba histolytica* presenta un aumento en la expresión fenotípica de su virulencia al inducir los cultivos clonales mediante inoculación experimental en hígado de Hámsters.

2.- El aumento en la expresión fenotípica de la virulencia de *E. histolytica* se observó al incrementarse la tasa de eritrofagocitosis, la actividad hemolítica y la citotoxicidad sobre cultivos de monocapas de células MDCK.

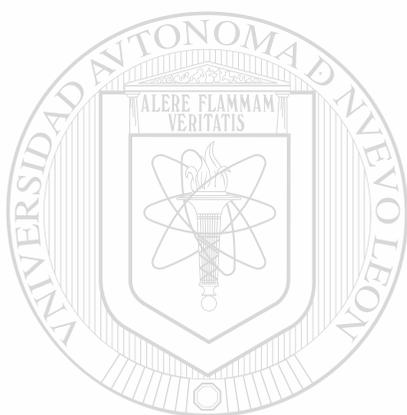
3.- Este parásito también muestra gran cantidad de polimorfismos en su genoma al inducir el estado virulento.

4.- *Entamoeba histolytica* expresa potenciadamente algunos transcritos en su estado virulento, en comparación con su estado no virulento.

5.- Diseñamos una estrategia de selección de mRNA expresados diferencialmente en estados virulento y no virulento por *E. histolytica*.

6.- A partir de una biblioteca sustractiva de cultivos virulentos de *E. histolytica* tamizada con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, aislamos 17 clonas que codifican antígenos específicos.

7.- A partir de una biblioteca sustractiva de cultivos no virulentos de *E. histolytica* tamizada con sueros de pacientes con amibiasis asintomática, aislamos 9 clonas que codifican antígenos específicos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

El presente trabajo posee una alta probabilidad de ser explotado no sólo desde el punto de vista biotecnológico, sino que además se pueden aprovechar los conocimientos generados de él, en el área de la investigación básica tratando de establecer o sugerir los mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*.

El siguiente paso inmediato será secuenciar las clonas de sendas bibliotecas, para determinar la naturaleza proteica de ellas y poder discutir más a profundidad sobre su función biológica y las implicaciones de la misma en la virulencia del parásito.

Además, es necesario probar métodos rápidos de purificación de las proteínas recombinantes a partir de los cultivos bacterianos de las clonas aisladas para probar específicamente las proteínas expresadas sobre su utilidad diagnóstica; Desarrollando metodologías adecuadas para la correcta instauración de su sensibilidad y especificidad y el posible desarrollo de un estuche comercial que se adapte a las condiciones expuestas por la OMS.

Finalmente, buscar entre todos los antígenos al candidato o candidatos idóneos para empezar a probar su antigenicidad con miras al desarrollo de una vacuna efectiva contra la amibiasis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla M. D., Jackson T. F., Gathiram V., al-Hawey A. M. & Raydin J. I. (1993) Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from non pathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J Clin Microbiol* 31: 2845-50.
- Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P y col. (1993). Applications of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg.* 48:58-70.
- Aguirre A., Warhurst D. C., Guhl F. & Frame I. A. (1995). Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 187-188.
- Alon RN, Bracha R, Mirelman D. (1997). Transfection of *Entamoeba dispar*. Inhibition of expression of the Lysine-rich 30 kDa surface antigen by the transcription of its antisense RNA. *Arch Med Res.* 28:52-5.
- Anki S, Stolarsky T, Mirelman D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol.* 28(4):777-85.

- Balderas I, Morales L, Muñoz LE. (2000). Phenotype variability, genetic polymorphism and differential display of mRNA in *Entamoeba histolytica* during its virulence activation. *J Gastroenterol Hepatol*. 15:F114.

 - Balderas RI. (1997). Clonación del DNAc de una hemolisina de *Entamoeba histolytica* dependiente de actividad de fosfolipasa A₂. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. México.

 - Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol*. 10:30(4):401-10.

 - Blakely P, Sargeant PG, Reed SL. (1990). An immunogenic 30-kDa surface antigen of pathogenic clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*. 162:949-54
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- Borst P, Rudenko G, Taylor MC, Blundell PA, Leeuwen FV, Bitter W, Crossa M, McCulloch R. (1996). Antigenic variation in trypanosomes. *Arch. Med Res*. 27(3):379-88.

 - Bracha R, Nuchamowitz Y, Mirelman D. (1995). Molecular cloning of a 30-Kilodalton Lysine-Rich surface antigen from a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* strain and its expression in a pathogenic strain. *Inf Imm*. 63(3):917-25.

- Byers TJ. (1986). Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba* y *Naegleria*. *Int Rev Cytol.* 99:311.

 - Carrero JC, Lacleste JP. (1996). Molecular Biology of *Entamoeba histolytica*: A review. *Arch Med Res.* 27(3):403-12.

 - Clark C. G. & Diamond L. S. (1992). Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. *Arch Med Res* 23: 15-6.

 - De Menezes FL, Salgado LM, Rodríguez MA, Vargas MA, Orozco E. (1997). Phenotype variability and genetic polymorphism in *Entamoeba histolytica* clonal populations. *Arch Med Res.* 28:S27-9.
-
- Diamond LS, Harlow D, Cunnick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 27:431.

 - Diamond LS. (1983). Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, *Trichomonads* and *Giardia*. In: Jensen JB, ed. *In vitro* cultivation of protozoan parasites. Boca Raton, FL: CRC Press. 65-109.

- Diamond LS. (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba histolytica*-like amebae. *J Protozoology*. 54:1047-1058.

 - Edman U, Meza I, Agabian N. (1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:3024-28.

 - Edman V, Meraz MA, Rauser S y col. (1990). Characterization of an immunodominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Exptl Med*. 172:879-888.

 - Escamilla-Treviño L.L (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL México.
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- Galdstone GP. (1970). In: Florey HW, ed *General pathology*, 4th edn. London Lloyd Luke (Medical Books). 823-34.

 - Garfinkel LI, Giladi M, Huber M y col. (1989). DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun*. 57:926-931.

- GeneHunter Corporation. (1999). Manual de Instrucciones y guía de referencia del kit RNAmapping.

- Gilchrist CA, Petri WA. (1999). Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Curr Opin Microbiol.* 2(4):433-7.

- Godbold GD, Mann BJ. (1998). Involvement of the actin cytoskeleton and p21rho-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Braz J Med Biol Res.* 31(8):1049-58.

- Gomes MA, Melo MN, Macedo AM, Furst C, Silva EF. (2000). RAPD in the analysis of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Acta Trop.* 75(1):71-7.

- Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Rehman T, Aguirre A, Castañón A, Hall A, et al. (1992). Further diagnostic use of an invasive-specific monoclonal antibody against *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 23(2):281-3.

- Hamann L, Tannich E. (1997). Inducible gene expression in *Entamoeba histolytica* mediated by a tetracycline responsive prokaryotic repressor. *Arch Med Res.* 28:32-3.

- <http://www.lshtm.ac.uk/mp/bcu/enta/home.htm> . Entamoeba Homepage.

- **Huston CD, Petri WA Jr. (1998). Host-pathogen interaction in amebiasis and progress in vaccine development. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 17(9):801-14.**

 - **Life Technologies. (1999). Manual de Instrucciones y guía de referencia del kit pSPORT.**

 - **Lifetechnologies (1999). Manual de Instrucciones y guía de referencia del uso de Columnas Oligod(T).**

 - **Lotter H, Mannweiler E, Schreiber M, Tannich E. (1992). Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Clin Microb. 30(12):3163-7.**
-
- **Martínez-Palomo A, González-Robles A, Chavez B, Orozco E, Fernández CS, Cervantes A. (1985). Structural bases of cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. J Protozool. 32(1):166-75.**

 - **Martínez Palomo A. (1982). The Biology of "*Entamoeba histolytica*", Research Studies Press/John Wiley, Chichester.**

 - **Mattem CFT, Keister DR, Caspar PA. (1978). A rapid *in vitro* assay for virulence of *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg. 27(5):882-7.**

- Medina de la Garza CE, Cordero PP, Caballero ME, Torres LE, Muñoz Espinosa LE. (1997). Serum cytokines of acute phase response in the amebic liver abscess. *Arch Med Res.* 28:S250-52.

 - Mehlotra RK. (1998). Differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: has the question been answered?. *Indian J Gastroenterol.* 17(2):58-60.

 - Merino EW, Glender R, del Muro R, Ortiz-Ortiz L. (1990). Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *T Clin Lab Analysis.* 4:38-42.

 - Mertens E. (1993). ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitol Today.* 9(4):122.
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- Mirelman D, Bracha R. (1992). Cloning and partial characterization of an antigen detected on membrane surfaces of non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 23(2):49-53.

 - Montalvo FE, Reeves RE, Warren LG. (1971). Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.* 30:249.

- Moshitch MS, Stolarsky T, Petter R, Mirelman D. (1997). Upstream regions of rp L21 genes play a role in regulation of expression at the post-transcriptional level in *E. histolytica* and *E. dispar* Arch Med Res. 28:36-8.
- Mossman T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and Cytotoxicity Assay. J Immunol Meth. 65:55.
- Müller M. (1988). Energy metabolism of protozoa without mitochondria. Annu Rev Microbiol. 42:465.
- Myung K, Burch D, Jackson TFHG, Stanley SL Jr. (1992). Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen-based ELISA. Arch Med Res. 23:285-288.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

- Norris SM, Ravdin JJ. (1988). The pharmacology of antiamebic drugs.® In Ravdin JJ, Eds. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons. 734.
- OPERON. (1989). Manual de Instrucciones y guía de referencia del uso de Oligonucleótidos sintéticos.
- Orozco E, Lazard D, Sanchez T, Sanchez MA, Hernandez R, Silva EF. (1993). A variable DNA region of *Entamoeba histolytica* is expressed in

several transcripts which differ in genetically related clones. *Mol Gen Genet* 241:271.

➤ Petithory JC, Brumpt LC, Poujade F. (1994). *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903) and *Entamoeba dispar* (E. Brumpt 1925) are 2 different species. *Bull Soc Pathol Exot.* 87:231-237.

➤ Petri Jr. et. al. (1995). Diagnostic methods for *E. histolytica*. Patent No. 5405748. University of Virginia Patents Foundation (Charlottesville, VA). Patent & Trademark Office of United States of America.

➤ Petri Jr. et. al. (1995). Monoclonal antibodies for differentiating pathogenic and nonpathogenic *E. histolytica*. Patent No. 5401831. University of Virginia Patents Foundation (Charlottesville, VA). Patent & Trademark Office of

United States of America.

➤ Petri W. A., Snodgrass T.L., Jackson T. F., Gathiram V., Simjee A.E., Chadee K. & Chapman M.D. (1990). Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J Immunol* 144: 4903-9

➤ Prasad R, Tola M, Battacharya S, Sharma MP, Battacharya A. (1992). Recognition of *Entamoeba histolytica* lipophosphoglycan by a strain-specific

monoclonal antibody and human immune sera. *Mol Biochem Parasitol.* 58:279-87.

- Rabinovich M, De Stefano MJ. (1971). Phagocytosis of erythrocytes by *Acanthamoeba* sp. *Exp Cell Res.* 64:275.
- Romero J. L., Descoteaux S., Reed S., Orozco E., Santos J. & Samuelson J. (1992). Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. *Arch Med Res* 23: 277-9
- Ruiz-Palacios GM, Castañon G, Bojalil R. y col. (1992). Low risk of invasive amebiasis in cyst carriers. A longitudinal molecular seroepidemiological study. *Arch Med Res.* 23:280-291.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

- Saavedra-Lira E, Perez-Montfort R. (1996). Energy production in *Entamoeba histolytica*: New perspectives in rational drug design. *Arch Med Res.* 27(3):257-64.
- Said-Fernández S, López-Revilla R. (1983). Latency and heterogeneity of *Entamoeba histolytica* hemolysins. *Z Parasitenk.* 89:435-8.
- Said-Fernández S, Martínez-Rodríguez H, Sánchez-Guillén MC. (1995). El desarrollo de la biotecnología biomédica en parasitología. Diagnóstico

molecular, vacunas de nueva generación y perspectivas. *Gac Méd Mex*. 131:4:423-432.

- Said-Fernández S, López-Revilla R. (1982). Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Z. Parasitenkd.* 67:248-54.

- Said-Fernández S, Martínez-Rodríguez H. (1992). Técnicas y Biorreactivos para el diagnóstico de la amibiasis. En: Álvarez-de la Cuadra J. ed. *Biotechnología Hoy*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México D. F. 99-110.

- Salazar I, Ortega A, Das P, Sanchez-Salas JL, Muñoz ML. (1997). Differential Display of mRNAs from *Entamoeba histolytica* during electron dense granules secretion. *Arch Med Res.* 28:S190-2.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

- Samuelson J, Acuña-Soto R, Reed S, Biagi F, Wirth D. (1989). DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol.* 27:671-6.

- Sánchez-Guillén MC., Merino-Guzmán G., Pérez-Fuentes R., Rosales-Encina JL., Talamas-Rohana P. (1997). Serologic characterization of *Entamoeba histolytica* asymptomatic carriers from a community of Puebla state, México. Arch. Med. Res. 28:S322-S324.

 - Sargeant P. (1988). Zymodemes of *Entamoeba histolytica*. En: Ravdin JI. ed. Amebiasis, Human Infection By *Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. New York. 370-387.

 - Sehgal D., Mittal V., Ramachandran S., Dhar SK, Bhattacharya A, Bhattacharya S. (1994). Nucleotide sequence organization and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 67:205.
-
- Sepúlveda B. (1982). Amebiasis. Host pathogen Biology. Rev Infect Dis, 4:836-842.

 - Sepúlveda B. y N. Treviño-García-Manzo. (1980). Clinical Manifestations and Diagnosis of Amebiasis. Amebiasis, A. Martínez-Palomo, ed. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), The Netherlands. 5:169-188.

 - Spice WA, Ackers JP. (1992). The effect of axenic versus xenic culture conditions on the total and secreted proteolytic activity of *Entamoeba histolytica* strains. Arch Med Res. 23:91-3.

- Stanley SL Jr, Jackson TFHG, Reed SL y col. (1991). Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA*. 266:1984-1986.

- Stratagena. (1999). Manual de Instrucciones y guía de referencia del kit SurfZAP.

- Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S y col. (1991). Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 29:2234-2239.

- Tannich E, Burchard GD. (1991). Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *J Clin Microb*. 29(2):250-55).

- Tannich E, Horstmann RD. (1992). Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Mol Evol*. 34:272-3.

- Tannich E, Horstmann D, Knobloch J, Arnolf HH. (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 86:5118-5122.

- Tannich E. (1998). Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic Disease. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92(6):593-6.

- Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I. (1991). Chromatin organization of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 45:121.

- Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol.* 117:81.

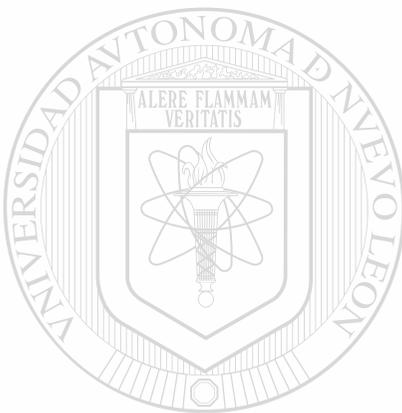
- Walsh JA. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: Ravdin JI, ed. *Amebiasis, Human Infection by Entamoeba histolytica*. G John Wiley & Sons. New York. 370-387.

- WHO/PAHO/UNESCO. (1997). Report of a consultation of experts on amoebiasis. XIII Seminario sobre Amibiasis. Cd. de México, México.

- Yiotsas ZD., Aranoutis P., Dadinakis A., Doxiadis T. (1973). Ameboma of the Colon. *Am. J. Gastroenterol.* 59(4)348-352.

- Young RA, Davis RW. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc Natl Acad Sci USA. 80:1194-8.

- Zar JH. (1974). Biostatistical Analysis. USA: Ed. Prentice-Hall, Inc. 198-251.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE 1

ORIGEN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos utilizados se adquirieron a las siguientes compañías:

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

SDS, glucosa, seroalbúmina bovina, trisma base, ácido bórico, extracto de levadura, tritón X-100, EDTA, fenol, IPTG, ampicilina, tetraciclina, estreptomycin, azul de bromofenol, xilencianol.

De Merck de México:

NaCl, MgSO₄, DTT, Triptona, MgCl₂, MTT y PMS.

De Reactivos Monterrey:

NaOH, HCl, CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄, glucógeno y maltosa.

De Técnica Química de México:

KCl.

De J. T. Baker de México:

Alcohol etílico absoluto, alcohol isoamílico, hidrocloreto de cisteína, ácido ascórbico y citrato de amonio férrico.

De Control Técnico y Representaciones de México:

Cloroformo e Isopropanol.

De Bethesda Research Laboratories Inc. (Gaithersburg, MD, USA)

Endonucleasa de restricción Spe I, Taq DNA polimerasa, Transcriptasa reversa, dNTP, iniciadores, T4 DNA ligasa, columnas Oligod(T), DEPC, Inhibidor de ribonucleasa, hexámeros al azar, TRIZOL, avidina y HRP.

APÉNDICE 2

EQUIPO

El equipo utilizado en la fase experimental comprende un termociclador MiniCycler™ de MJ Research, USA, una incubadora GCA/Precision Scientific de THELCO, una centrifuga de marca Eppendorf (Hamburg Germany) modelo 5402, así como marca Sorvall Instruments, modelo RC-3B y marca DAMON/IEC modelo IEC B-20A; un horno de microondas marca Goldstar Co. Ltd. (Seúl, Corea) modelo MA-857M, un lector de microplacas (EIA multiwell reader, Sigma Diagnostics), una cámara de electroforesis y fuente de poder BioRad (Richmond, CA. USA) modelo 200/2.0, un agitador de tubos Maxi-Mix marca Termolyne (Bubuque, IO., USA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning (N.Y. USA) modelo PC320, un ultracongelador marca So-Low (Cincinnati, OH. USA), una campana de flujo laminar marca Labconco (Kansas City, MI, USA). También se utilizó una báscula digital marca Sartorius (Göttingen, Germany) modelo 1206MP, un transiluminador de luz UV marca Fotodyne (New Berlin, WI, USA) modelo Photo/Phoresis I, un espectrofotómetro de luz UV marca Zeiss (Zeiss, West Germany) modelo PMQ 3, una incubadora con agitación marca New Brunswick Schientifico (New Brunswick, N.J. USA) modelo G-25 y una cámara de electroforesis vertical, fuente de poder BioRad (Richmond, CA. USA) modelo 4000/2.0, aparato para hibridación marca Gibco BRL (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A), una

cámara de electroforesis vertical y un secador de geles BIO-RAD Dual temperature slab gel dryer, modelo 1125B.

El análisis computacional se realizó en varios microcomputadores, incluyendo de Apple Computer, Inc. (Cupertino, CA. USA) una Macintosh Classic II, y PC de ACER modelo AcerView 34e con procesador Pentium a 300 MHz. Las aplicaciones utilizadas como ayuda para la elaboración de este trabajo fueron las siguientes: *MicrosoftWord* versión 97 (© 1983-1997 Microsoft Corporation), *Microsoft PowerPoint* versión 97 (© 1987-1997 Microsoft Corporation), *Adobe Photodeluxe* versión 1.0 Limited Edition 2.5.1 (© 1985-1993 Adobe Systems Incorporated) y *ViewStation AS6e Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.). Los programas tanto locales como utilizados via INTERNET en un servidor remoto para analizar secuencias de DNA de los insertos y los oligonucleótidos, fueron *Oligo*, *DNA Strider™* 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A. 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *Findseq* (Intelligenetics, Trieste, It.), *Gene Align* (Intelligenetics, Trieste, It.), *Clustal W* (Thompson, J.D.; Higgins, D.G. 1994), *Blast* y *Retrieve* (National Center for Biotechnology Information).

APÉNDICE 3

PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Amortiguador PBS-A

Se preparó con 4.5 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 147 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.4, 320 mosmol/kg.

Amortiguador TBE 5X

Se disolvieron 54 g de trizma base y 37 mg de EDTA en 1 l de agua, se ajustó el pH a 8.3 con HCl 1N.

Amortiguador SSB

Se aforaron a 1 l de agua, 0.07 g de CaCl_2 , 1 g de glucosa, 7.2 g de NaCl, 0.4 g de KCl, 0.2 g de MgSO_4 y 0.12 g de Trizma base; Se ajustó el pH a 8.0 con HCl 1N y su osmolaridad a 300 mosmol/kg con NaCl. Se esterilizó por filtración.

Amortiguador PBS

Se disolvieron 6.5 g de NaCl, 2.8 g de K_2HPO_4 , y 0.4 g de KH_2PO_4 en 1 l de agua y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 10N, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

Amortiguador SM

Se preparó disolviendo 5.8 g de NaCl, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 50 ml de Tris-HCl (pH 7.5) en 1 l de agua y se esterilizó en autoclave.

Amortiguador TBST

Se preparó con Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM.

Amortiguador L 10X

Se preparó disolviendo los siguientes reactivos en agua quedando en las concentraciones especificadas: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$ y 10 mM DTT.

Medio de Cultivo LB

Se aforaron a 1 l con agua 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y

10 g de NaCl. Se esterilizó por autoclave.

Medio de Cultivo TYI-S33

Se disolvieron en 600 ml de agua destilada en este orden 1 g de fosfato dibásico de potasio, 0.8 g de fosfato monobásico de potasio, 2 g de NaCl, 20 g de peptona de caseína, 10 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 1 g de hidrocloreuro de L-cisteína, 0.2 g de ácido ascórbico y 1 ml de citrato de amonio férmico (22.8 mg/ml). Se aforó a un volumen final de 880 ml y se ajustó el pH a 6.8 usando NaOH 1N. Se esterilizó por autoclave por 15 minutos a 121°C.

RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO



Isaias Balderas Rentería

Candidato para el Grado de


 Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis:

AISLAMIENTO DE RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN ANTÍGENOS RECOMBINANTES DESPLEGADOS DIFERENCIALMENTE EN ESTADOS VIRULENTO Y NO VIRULENTO POR *Entamoeba histolytica*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

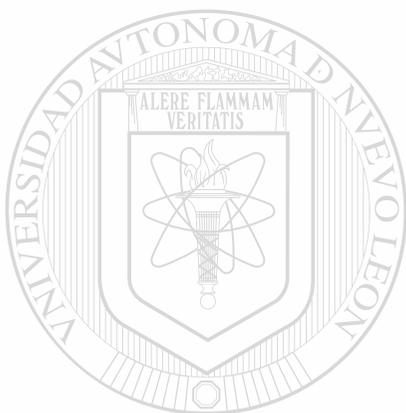
Campo de Estudio: Ciencias Básicas y Desarrollo Tecnológico. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Biografía:

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

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grados obtenidos: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 1993, Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología en 1997.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



