

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



AISLAMIENTO POR ISOELECTROENFOQUE DE
PROTEINAS DE PESO MOLECULAR RELATIVO
DE 8 KDa DE *Entamoeba histolytica* Y COMPARACION
DE SU ANTIGENICIDAD CONTRA EXTRACTOS
CRUDOS AMIBIANOS

POR

Q.F.B. ROBERTO RANGEL OROZCO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INMUNOLOGIA

NOVIEMBRE, 1996



1020116801

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**AISLAMIENTO POR ISOELECTROENFOQUE DE PROTEINAS DE PESO
MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica Y
COMPARACION DE SU ANTIGENICIDAD CONTRA
EXTRACTOS CRUDOS AMIBIANOS**

POR

Q.F.B. ROBERTO RANGEL OROZCO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología**

Noviembre, 1996

TM
Z6658
FM
1996
R3

0118-39360

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE MEDICINA



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE PROBLEMAS DE SALUD
MOLECULAR RELATIVO DE LA DE ENFERMEDAD Y
COMPARACION DE SU ANTICUACION CONTRA
EXTRACTOS CRUOS ALERGENICOS

POR

DR. ROBERTO RAUDEL ORDOZ



FONDO TESIS

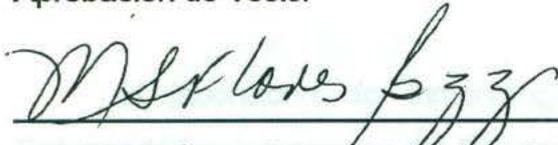
250998

Como requisito para optar al Grado de
Médico en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 1996

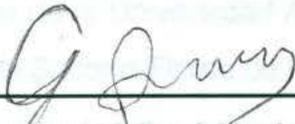
**AISLAMIENTO POR ISOELECTROENFOQUE DE PROTEINAS DE PESO
MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica Y
COMPARACION DE SU ANTIGENICIDAD CONTRA
EXTRACTOS CRUDOS AMIBIANOS**

Aprobación de Tesis:



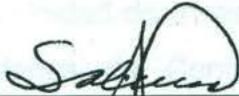
Dra. María del Socorro Flores de Castañeda

Asesor de tesis



Dr. Armando Isibasi Araujo

Co-asesor de tesis



Dr. Mario Cesar Salinas Carmona



Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza



Dra. Noemi Waksman de Torres



Dr. Roberto Mercado Longoria

Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A Dios

El presente trabajo de tesis se realizó en: *Aranda y sus familiares* *en esta etapa de su vida.*

El laboratorio de Inmunología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda.

La Unidad de Investigación Biomédica en Inmunoquímica, del Hospital de Especialidades, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la co-asesoría del Dr. Armando Isibasi Araujo.

El Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

A Dios

A mi padre Juan Manuel Rangel Avila por su amor, sus grandes consejos de seguir adelante, con su estimulación y apoyo que me brindo en todo momento y de ser mi mejor amigo, a mi madre por cuidarme, amarme y sus bendiciones, que me fortalecieron en esta etapa de mi formación. Los amo.

A mis hermanas Iris y Elba Merary, por su gran cariño, apoyo y comprensión. Las quiero mucho.

A mi abuelo Juan Rangel Lozano por su gran sabiduría que me transmitió durante mi niñez, que siempre me acompaña para brindarme fortaleza y una meta que lograr en esta vida.

A mi abuela Sebastiana Avila de Rangel por sus grandes bendiciones que me fortalecieron, en los momentos más críticos de esta etapa.

A mis abuelos Felipe Orozco y Andrea Guerrero, por su cariño y apoyo que me han brindado siempre.

A la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda, por ser una gran amiga y que me apoyó durante todo momento y más en los momentos más críticos de mi formación profesional.

A mis tíos Juan Becerra y María de Jesus Rangel, por el gran apoyo incondicional que me brindaron cuando estuve en la ciudad de México, gracias a ellos realice una gran parte de este trabajo. Gracias por todo.

A mis primas Ivonee y Sandra, por la gran amistad y atención que me brindaron durante el tiempo que estuve su casa. Las quiero como si fueran mis hermanas.

A mis grandes amigas Eva Tamez Treviño, Silvia Magdalena Casillas Quintana, Angeles Castro Corona, Blanca Leticia García Mendez y a Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo, por su gran amistad, que jamas se quebranto en detalles insignificantes y eso nos permitió unirnos más. Las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco :

A mis padres por ser un gran ejemplo para mí. Nunca me dejaron solo, a pesar de momentos muy difíciles siempre me estuvieron apoyandome. A ellos les debo lo que soy. Gracias papá y mamá.

A todos mi familiares que contribuyeron en mi estimulación para superarme y contar con su gran apoyo.

A la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda, por brindarme la oportunidad de iniciar la carrera científica, gracias por su imagen, confianza, paciencia y cariño que me brindo durante este breve período de vida.

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por ser un gran amigo y brindarme la oportunidad de trabajar a su lado en su laboratorio, por sus consejos y gran confianza que deposito en mí y quen con su colaboración y sus sugerencias participó en la realización del este trabajo de investigación.

Al Dr. Antonio Ramírez por la gran paciencia que tuvo conmigo para transmitirme sus conocimientos, gracias amigo.

Al Dr. Vianey Ortíz , Dr. Cesar Gonzalez, Dr. Jorge Paniagua por la gran amistad y apoyo que me proporcionaron durante mi estancia en el Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Al Dr. Rolando Tijerina Menchaca por el apoyo y haber permitido realizar el trabajo experimental de esta tesis en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología.

TABLA DE CONTENIDO

Al Dr. Mario Cesar Salinas Carmona, al Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza, a la Dra. Angeles Castro Corona y a la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, maestros del Departamento de Inmunología, por sus enseñanzas apoyo y colaboración durante este tiempo y a quienes les debo gran parte de mi formación profesional.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Inmunología, a Eva, Judith, Nelly y Elsa, por su gran amistad que me brindaron al final de este trabajo.

A mis amigos de la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunoquímica a Mike, Marco, Constantino, Natalia, Patricia, Aracelly, Sara, Rosa, Laura, Penélope y muchos más amigos, gracias por su ayuda y amistad que me otorgaron durante mi estancia en sus laboratorios.

A mis amigos Angel, Luis, Ernesto, Silvia, Angeles, Irma, Isabel, Verónica, Velia y Alma Isabel por su leal ayuda y compañerismo que me mostraron durante mis estudios en el Departamento de Inmunología.

A mis compañeros de Bioquímica, Martín, Claudio, Ataulfo, Miguel Angel, Carmen, Luis Lauro, Gilberto, Ana, Felipa, Norma, Ramiro y Jorge por su desinteresada ayuda. Gracias por todo.

A mi amigo el Dr. Juan Antonio Luna por la elaboración del trabajo fotográfico que se incluye en esta tesis.

Al personal de la Sub-Dirección de estudios de Post-Grado por su amable disposición.

A CONACYT por la beca que me otorgó durante mis estudios de posgrado.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	Página
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. MATERIAL Y METODOS	11
3.1 Muestras biológicas	11
3.1.1 Animales	11
3.1.2 Sueros humanos	11
3.1.3 Suero bovino	12
3.1.4 Cepas amibianas	12
3.2 Obtención y preparación del extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	12
3.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	13
3.4 SDS-PAGE e EITB del extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	13
3.4.1 Preparación de geles de poliacrilamida en gradiente de concentración lineal con SDS	13
3.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes	15
3.4.3 Tinción con nitrato de plata	15
3.4.4 Inmunoelectrotransferencia	16

3.5 Electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes	17
3.6 Caracterización del punto isoeléctrico de la proteína inmunodominante de peso molecular relativo de 8 kDa de <u>Entamoeba histolytica</u>	18
3.6.1 Preparación de la muestra	18
3.6.2 Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida	19
3.6.3 Tinción con azul de Coomassie G-250	19
3.7 Isoelectroenfoque en fase líquida de un extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	20
3.7.1 Isoelectroenfoque en fase líquida con un rango de pH 3.0 - 10.0 del extraco IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	20
3.7.2 Refraccionamiento mediante IEF en fase líquida (Anfólitos de pH 4 - 6.5 y 6 - 8)	21
3.8 Inmunoelctrotransferencia de un Isoelectroenfoque, de las proteínas aisladas por isoelectroenfoque en fase líquida	21
3.9 Antigenicidad de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa de <u>Entamoeba histolytica</u> mediante SDS-PAGE e EITB	22
3.9.1 Protocolo de inmunización para los conejos nueva zelanda	22
3.9.2 Protocolo de inmunización de ratones BALB/c	22
4. RESULTADOS	24
4.1 Análisis mediante SDS-PAGE e EITB de un extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u> HK-9	24
4.2 Aislamiento de la proteína de peso molecular relativo de	

8 kDa de <u>Entamoeba histolytica</u> HK-9, mediante electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes	27
4.3 Caracterización del punto isoeléctrico de las proteínas inmunodominantes de peso molecular relativo de 8 kDa de <u>Entamoeba histolytica</u>	32
4.4 Aislamiento de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa de <u>Entamoeba histolytica</u> mediante IEF en fase líquida	34
4.4.1 IEF en fase líquida de un extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u> HK-9	34
4.4.1.1 Análisis de las 20 fracciones obtenidas del IEF en fase líquida por SDS-PAGE	37
4.4.1.2 Análisis mediante EITB de las 20 fracciones obtenidas del IEF en fase líquida.	40
4.4.2. Refraccionamiento en un rango de pH 4.0 a 6.5.	43
4.4.2.1 Análisis por SDS-PAGE e EITB de las 20 fracciones obtenidas del refraccionamiento en un rango de pH 4.0 - 6.5	46
4.4.3. Refraccionamiento en un rango de pH 6.0 - 8.0	49
4.4.3.1 Análisis de las 20 fracciones obtenidas del refraccionamiento en fase líquida con un rango de pH 6.0 - 8.0	52
4.5 Análisis mediante IEF-EITB de las proteínas aisladas por isoelectroenfoque en fase líquida	55
4.6 Identificación de anticuerpos contra las proteínas de peso molecular relativo de 8 Kda, en los sueros de los animales inmunizados con extractos totales amibianos.	57

4.7 Comprobación de la conservación antigénica mediante EITB de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa aislada por IEF en fase líquida	59
5. DISCUSION	61
6. CONCLUSIONES	69
7. APORTACIONES ADICIONALES	70
8. PERSPECTIVAS	71
APENDICES	72
Apendice A	72
Apendice B	76
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Patrón electroforético de un extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u> . Tinción con Nitrato de Plata.	25
2.	Inmunoelctrotransferencia de un extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	26
3.	EITB de los electroeluidos obtenidos de las SDS-PAGE preparativas	28
4.	Banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa de <u>Entamoeba histolytica</u> , aislada y teñida con nitrato de plata	30
5.	EITB de la banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa aislada	31
6.	IEF analítico de la banda proteica aislada por electroelución.	33
7.	pH y absorbancia de las fracciones obtenidas en el IEF en fase líquida de extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	36
8.	SDS-PAGE de las fracciones 1 - 10 obtenidas por IEF en fase líquida. Tinción con nitrato de plata	38
9.	SDS-PAGE de las fracciones 11 - 20 obtenidas por IEF en fase líquida. Tinción con nitrato de plata	39

Figura	Página
10. EITB de las fracciones 1 - 10 obtenidas por IEF en fase líquida con un rango de pH 3 - 10	41
11. EITB de las fracciones 11 - 20 obtenidas por IEF en fase líquida con un rango de pH 3 - 10	42
12. pH y absorbancia de las fracciones obtenidas del refraccionamiento mediante IEF en fase líquida en rango de pH 4 - 6.5	45
13. EITB de las fracciones 1 - 10 obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida con un rango de pH 4 - 6.5	47
14. EITB de las fracciones 11 - 20 obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida con un rango de pH 4 - 6.5	48
15. pH y absorbancia de las fracciones obtenidas del refraccionamiento mediante IEF en fase líquida en un rango de pH 6 - 8.	51
16. EITB de las fracciones 1 - 10 obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida con un rango de pH 6 - 8.	53
17. EITB de las fracciones 11 - 10 obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida con un rango de pH 6 - 8.	54
18. EITB del IEF en gel de las proteínas aisladas por refraccionamiento en fase líquida.	56

19. Sueros analizados mediante EITB, identificando anticuerpos
contra la proteína de peso molecular relativo de 8 KDa
de Entamoeba histolytica 58

20. EITB de la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa
aislada por IEF en fase líquida 60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	pH y absorbancia de las fracciones obtenidas en el IEF en fase líquida de un extracto IC:MC de <u>Entamoeba histolytica</u>	34
II.	pH y absorbancia de las fracciones obtenidas del refraccionamiento mediante IEF en fase líquida en un rango de pH 4.0 - 6.5	43
III.	pH y absorbancia de las fracciones obtenidas del refraccionamiento mediante IEF en fase líquida en un rango de pH 6.0 - 8.0	49

NOMENCLATURA

1. AHA Absceso Hepático Amibiano
2. ASB Albúmina Sérica Bovina
3. CIE Contrainmunolectroforesis
4. cm Centímetro
5. EITB Inmunolectrotransferencia
6. g Unidades de Gravedad
7. gr Gramos
8. IC:MC Insoluble Cloroformo:Metanol Calentado
9. IEF Isoelectroenfoque
10. IgA Inmunoglobulina A
11. IgE Inmunoglobulina E
12. IgG Inmunoglobulina G
13. IgM Inmunoglobulina M
14. IHA Ensayo de Hemaglutinación Indirecta.
15. KDa Kilodalton
16. Kg Kilogramo
17. L Litro
18. M Molaridad
19. mg Miligramo
20. min Minuto
21. ml Mililitro
22. mm Milímetro
23. mM Milimolar
24. N Normalidad
25. ng Nanogramo
26. nm Nanometros
27. PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida
28. PBS Solución salina tamponada con fosfatos

29. pH Potencial de Hidrogeno
30. pI Punto Isoeléctrico
31. P.M. Peso Molecular
32. r Coeficiente de correlación
33. Rf Factor de Retardamiento (Movilidad relativa)
34. SDS Dodecilsulfato de sodio
35. seg Segundo
36. TEMED N',N',N',N', Tetrametiletilendiamino

LISTA DE SIGNOS

1. α Alfa
2. β Beta
3. $^{\circ}\text{C}$ Grados centígrados
4. μ Micra
5. μgr Microgramo
6. μL Microlitro
7. μM Micrometro
8. % Porcentaje
9. C Porcentaje de entrecruzamiento de la acrilamida
10. T Porcentaje total de acrilamida

RESUMEN

Roberto Rangel Orozco

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Título del Estudio: AISLAMIENTO MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE DE PROTEÍNAS DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 Kda DE Entamoeba histolytica, Y COMPARACION DE SU ANTIGENIDAD CONTRA EXTRACTOS IC:MC AMIBIANOS.

Número de páginas: 87

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con
Especialidad en Inmunología

Area de Estudio: Inmunología

Entamoeba histolytica es el agente causal del absceso hepático amibiano (AHA), la sintomatología de esta enfermedad no presenta un patrón clínico bien definido, por lo que en ocasiones el diagnóstico de esta parasitosis no se puede establecer con certeza, aún auxiliándose con pruebas serológicas de diagnóstico para amibiasis invasiva existentes en el mercado, ya que no son totalmente sensibles y específicas para el diagnóstico de esta parasitosis. En este sentido nuestro equipo de trabajo, utilizando técnicas de alta resolución como electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración en condiciones desnaturalizantes e inmunoelectrotransferencia ha identificado 7 antígenos inmunodominantes de Entamoeba histolytica, que son exclusivamente reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva, y ninguno de estos antígenos es reconocido por los anticuerpos séricos de pacientes con amibiasis intestinal asintomática y de sujetos sanos con examen coproparasitoscópico negativo que habitan en zonas endémicas. Uno de estos antígenos, posee un peso molecular de 8 kDa y es reconocido en un 99% de los casos. En base a estos antecedentes se planteó el aislamiento de la proteína de 8 kDa a partir de un extracto Insoluble Cloroformo : Metanol Calentado (IC:MC) de Entamoeba histolytica mediante isoelectroenfoque (IEF) en fase líquida y comparar su antigenicidad contra extractos IC:MC amibianos. Como primer objetivo nos propusimos aislar esta molécula mediante electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes. Para el aislamiento se utilizaron extractos IC:MC de Entamoeba histolytica y a partir de estos se logró el aislamiento de la proteína inmunodominante de 8 kDa de Entamoeba histolytica. Posteriormente esta molécula se sometió a isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, en donde se identificaron 3 bandas proteicas a los pH de 4.7, 5.9 y 6.75, pertenecientes a la banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa. En base a estos resultados se sometió un extracto IC:MC de Entamoeba histolytica al IEF en fase líquida, para aislarla en condiciones nativas con la finalidad de realizar investigaciones futuras de actividad biológica. Cada una de las fracciones obtenidas del IEF en fase líquida se analizaron mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE) e Inmunoelectrotransferencia (EITB). La proteína de peso molecular relativo de 8 kDa se identificó desde un pH de 4.4 hasta 8.1. Las fracciones del IEF en fase líquida de un rango de pH 4.6 - 5.4 y de 6.5 - 7.4 que contenían la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa se sometieron a refraccionamientos mediante IEF en fase líquida. En el primer refraccionamiento se sometieron las fracciones con un rango de pH 4.6 - 5.4, utilizando anfolitos con un rango de pH 4.0 - 6.5, en donde se logró aislar esta molécula a los pH de 5.2 - 5.3 y mediante otro refraccionamiento se sometieron las fracciones de pH de 6.5 - 7.4, utilizando anfolitos con un rango de pH de 6.0 - 8.0, logrando aislar la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa a los pH de 6.5 - 7.2. Estas dos moléculas aisladas por IEF en fase líquida se sometieron a un IEF en gel de poliacrilamida y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se comprobó que ambas moléculas se isoelectrofocalizaban a diferentes pH, comprobando que estas dos moléculas poseen cargas diferentes pero con un mismo peso molecular relativo. Para culminar con este trabajo de investigación, se inmunizaron conejos y ratones con extractos totales amibianos, logrando la inducción de anticuerpos anti-amiba contra la proteína de 8 kDa, además contra otros antígenos de mediano y alto peso molecular. Con estos anticuerpos anti-amiba presentes en los sueros de los animales inmunizados, se comprobó que la molécula de bajo peso molecular de Entamoeba histolytica conservó su antigenicidad, después de los tratamientos a los que fue sometida durante su aislamiento.

El aislamiento de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica, a escala preparativa en condiciones nativas, se utilizará en ensayos de actividad biológica y para estandarizar una prueba de diagnóstico sencilla, rápida y económica para amibiasis invasiva.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

La amibiasis es una enfermedad entérica, que puede ser invasiva y dispersarse a múltiples órganos. Esta parasitosis es causada por el protozoario conocido como Entamoeba histolytica (56).

La amibiasis es endémica, y se presenta tanto en los países tropicales en vías de desarrollo como en los países desarrollados de clima templado o frío (10, 44). Walsh calculó que cada año cerca de 48 millones de individuos sufren alguna forma de amibiasis, de los cuales un 80% presenta síntomas de diarrea, con invasión limitada a la mucosa intestinal. En el resto de los individuos (2% al 20%), las amibas causan lesiones extraintestinales, siendo las más comunes el absceso hepático amibiano (AHA) y la disentería. Del 2% al 10% de los pacientes con amibiasis invasiva fallecen a causa de la misma (76). En 1989, en México se estimaron aproximadamente 1 millón de casos de amibiasis y 1216 muertes asociadas a infecciones causadas por Entamoeba histolytica (51). La amibiasis es por lo tanto la segunda causa de muerte por parásitos en el mundo, después de la malaria (22).

El protozoario Entamoeba histolytica fue identificado en muestras fecales por Lewis en 1869. Lösh fue el primero en describir una disentería amibiana en 1875, en un paciente de San Petersburgo Rusia; posteriormente Lösh reprodujo la colitis en perros, administrándoles las heces de pacientes con colitis amibiana. La invasión de tejidos por amibas fue descrito por Koch en 1887. Cuatro años más tarde, Councilman y Lafleur publicaron descripciones anatómo-patológicas del hígado e intestino infectados por amibas. Los quistes del parásito fueron identificados por primera vez por Quincke y Roos en 1893. En 1903, Schaudinn

denominó a este parásito Entamoeba histolytica, por su aparente habilidad para lisar tejidos (24).

Este microorganismo pertenece al Phylum Protozoa; Subphylum Sarcomastigophora; Superclase Sarcodina; Clase Rhizopodea; Familia Endamoebidae; Género Entamoeba y a la especie histolytica (71).

En la naturaleza, este parásito se encuentra en forma de quiste, en cambio en el intestino del hombre se encuentra en su estado de trofozoíto y de quiste (46). El trofozoíto o forma móvil de la Entamoeba histolytica, es una célula pleomórfica, altamente dinámica, cuya forma o movilidad son extremadamente sensibles a los cambios fisicoquímicos en el medio. Su movimiento se efectúa por medio de pseudópodos, además los trofozoítos son anaerobios facultativos, poseen una membrana de doble capa y contienen un núcleo único, con cromatina fina periférica. El citoplasma consiste de un ectoplasma claro y un endosoma granular que contiene numerosas vacuolas (44).

La Entamoeba histolytica es uno de los eucariotes más simples estructuralmente, que carecen de mitocondrias, peroxisomas y de un aparato de Golgi bien desarrollado, y en su bioquímica se desvía substancialmente de los eucariotes más complejos (6).

Este organismo usualmente vive como un comensal en el lúmen del intestino del huésped, lo que clínicamente se le conoce como amibiasis asintomática. Los trofozoítos tienen una vida muy corta, una vez que han sido expulsados hacia el exterior por medio de las heces. Los quistes de las amibas pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en la naturaleza. Los humanos se infectan al ingerir agua o alimentos contaminados con heces conteniendo los quistes. Estos, a nivel del intestino, sufren un fenómeno denominado desenquistamiento, liberando una amiba metaquística que posteriormente da lugar

a ocho trofozoítos metaquísticos colonizando la mucosa del intestino del huésped (1).

Existen aspectos importantes en la biología de la Entamoeba histolytica, entre ellos es la expresión de su potencial patogénico. Se han encontrado que existen cepas patógenas y no patógenas. Sargeant y cols. en 1978, utilizando electroforesis en geles de almidón, encontraron diferencias de isoenzimas entre las cepas patógenas y no patógenas de Entamoeba histolytica, a estos patrones de isoenzimas se les denominó zimodemos. En 1982 en México, se obtuvieron los trofozoítos de 115 aislamientos y todas las amibas aisladas mostraron un patrón de zimodemos patógenos. Estos datos mostraron correlación con los cuadros clínicos de los pacientes (65).

Recientemente se han descrito dos especies de *Entamoeba*, que son morfológicamente idénticas, pero a nivel molecular poseen diferencias. Entamoeba dispar, es la especie no patógena prevalente en pacientes con amibiasis asintomática y Entamoeba histolytica es la especie patógena, por su capacidad de invadir tejidos y generar zonas de necrosis en el órgano afectado (55).

Trissl y cols., observaron que las cepas patógenas de Entamoeba histolytica eran capaces de aglutinar con concanavalina A, mientras que la aglutinación observada en cepas de amibas aisladas de pacientes asintomáticos era mucho menor (73). Más tarde Aley y cols., demostraron que al preincubar con concanavalina A, lograron estabilizar la membrana plasmática para separarla de otros componentes celulares utilizando gradientes de sacarosa. Al someter las membranas a columnas de lectina inmovilizada y eluídas con α -metilmanosido, lograron purificar 12 glicoproteínas con pesos moleculares desde 12 kDa a 200 kDa. En el mismo sentido Kobilier y Mirelman demostraron, que la adherencia de las amibas con la células del huésped esta mediada por proteínas que se unen a carbohidratos (lectinas) y que habían sido previamente descritas en trofozoítos,

además este mecanismo podía ser inhibido con galactosa o N-acetilglucosamina (2, 29).

Las cepas de amibas patógenas son virulentas y tienen la capacidad de producir abscesos hepáticos. La inoculación de amibas patógenas en el hígado de hámster y otros roedores lleva consigo la producción de abscesos (44). Los trofozoítos de Entamoeba histolytica de las cepas patógenas, son células invasoras capaces de penetrar el tejido y formar úlceras a nivel de intestino.

Se ha estudiado la degeneración de células epiteliales durante su invasión por los trofozoítos y se han sugerido dos mecanismos de daño celular: uno directo, que requiere del contacto entre el trofozoíto y las células blanco, conocido como "citólisis por contacto" y uno indirecto. En el primero están implicados los siguientes factores: fosfolipasas A1 y A2, ácidos grasos libres, un factor anfipático potenciador de la actividad lítica de los ácidos grasos libres y la proteína formadora de poros (69, 61, 5). En cuanto al daño celular indirecto, se han descrito varias enzimas que intervienen en este mecanismo como la β -N-acetilglucosaminidasa, que causa ruptura de uniones glucoproteicas entre células epiteliales adherentes de la mucosa. También se han identificado citotoxinas con actividad de proteinasa, como la histolisina que fue purificada por Lushbaugh (proteínasa histolítica dependiente de cisteína), además se han identificado citolisinas de origen amibiano, que son dependientes del potencial de oxido-reducción y de grupos -SH (39, 40, 14). Se ha observado experimentalmente que los trofozoítos de las cepas patógenas, son capaces de lisar a los neutrófilos y también a algunos macrófagos, debido a las enzimas liberadas por las amibas destruídas. (31, 64).

Isibasi y cols. han observado que algunos antígenos amibianos provocan la liberación de la histamina de los mastocitos de la mucosa intestinal, y sugieren que la liberación de esta sustancia puede inhibir los mecanismos locales de defensa permitiendo la permanencia y diseminación del parásito (12). Trissl ha sugerido

que los pacientes con amibiasis extraintestinal, tienen depresión en la inmunidad celular contra antígenos amibianos, aunque no se sabe en realidad hasta que grado, la inmunidad mediada por células de la mucosa, interviene en el proceso de protección. También se desconoce si la inmunidad celular, protege sólo contra la amibiasis extraintestinal, o si proporciona alguna defensa contra la amibiasis intestinal recurrente (74). Se sabe que los linfocitos CD8+ activados pueden matar a las amibas por contacto (67).

En cuanto a la respuesta inmune humoral en pacientes con amibiasis invasiva, se han detectado títulos elevados de IgG mediante técnicas serológicas, aunque también se han encontrado elevados los niveles de IgM, IgA e IgE, contra antígenos amibianos (30). Isibasi y cols. con modelos experimentales en ratas, demostraron que la IgA anti-amiba remueve de manera activa y con rapidez los antígenos amibianos presentes en la circulación general (13).

Los factores que intervienen en la patogénesis de esta enfermedad, son los factores alimenticios del hospedero, ya que la malnutrición está asociada con el aumento de la invasividad incluyendo la predisposición a la perforación intestinal en la amibiasis aguda. El uso de los corticosteroides o drogas inmunosupresoras comúnmente propician el cambio del estado asintomático a la amibiasis invasiva sintomática (23). Por lo tanto los factores responsables de la patogenicidad en la enfermedad invasiva se pueden relacionar entre un balance entre los factores de virulencia del parásito y de los mecanismos de defensa del hospedero (64).

Las amibas afectan principalmente el epitelio de la mucosa intestinal, ocasionando cuadros clínicos como colitis ulcerativa amibiana, ameboma y apendicitis amibiana; en cuanto a la amibiasis invasiva extraintestinal se caracteriza por la presencia de una o más áreas de necrosis o "abscesos" en el órgano afectado, principalmente hígado aunque también se puede presentar en pulmón y cerebro (43, 44).

Para comprender más la biología de este parásito, fue necesario aislarlo. En este sentido Musgrave y Clegg, lograron cultivar varias especies de amibas de vida libre en 1904; más tarde en 1924 Boeck y Drbohlav desarrollaron un medio de cultivo donde las amibas podían crecer fácilmente; sin embargo ese método requería sembrar las amibas en presencia de bacterias. No fue hasta en 1961, cuando Louis Diamond elaboró un medio de cultivo axénico que permite el cultivo del parásito, sin necesidad de asociarlo con otros microorganismos (44). Saíd Fernández y cols. elaboraron el medio de cultivo axénico PEHPS; según estos autores tiene las ventajas de ser más barato, soporta largos periodos de almacenamiento, se puede obtener mayor cantidad de microorganismos en comparación con el medio de cultivo axénico TPS-1 , y además favorece el enquistamiento de las amibas (62, 63).

Desde que fue posible cultivar axénicamente las amibas y fue descrita la preparación de extractos celulares solubles, éstos han sido utilizados en numerosos estudios tendientes a conocer aspectos bioquímicos y fisiológicos de las amibas. También se han utilizado para conocer más sobre la respuesta del sistema inmune del hospedero desencadenada por el protozoario, y la estandarización de pruebas de diagnóstico para amibiasis invasiva.

Son innumerables los investigadores que mediante técnicas serológicas han tratado de encontrar el método más específico y práctico para el diagnóstico de la amibiasis invasiva. En este sentido se han comparado especificidad y sensibilidad de varias técnicas serológicas para el diagnóstico de esta parasitosis. La especificidad y la sensibilidad, de la contraelectroforesis pueden compararse con la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA), siendo superior a la inmunodifusión en especificidad y sensibilidad (32, 3). El método de floculación de la bentonita, es menos sensible pero más específico que la hemaglutinación indirecta (75).

En 1980, Lin y cols. desarrollaron un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima en fase sólida, para detectar anticuerpos contra proteínas de Entamoeba histolytica (37).

Pillai y cols. en 1982, elaboraron una técnica de radioinmunoensayo, utilizando el método de sandwich en fase sólida, con la finalidad de detectar antígenos circulantes de Entamoeba histolytica, en pacientes con amibiasis invasiva, lograron detectar antígenos circulantes en el suero de pacientes con amibiasis intestinal y extraintestinal. Estos investigadores llegaron a la conclusión de que el antígeno detectado en el suero de pacientes con amibiasis invasiva, se encontraba en forma de complejos inmunes (53).

El empleo de pruebas serológicas han sido un medio para el diagnóstico indirecto, cuando la demostración del parásito es difícil. La mayor parte de las pruebas serológicas diagnostican absceso hepático amibiano, pero en etapas tempranas no tienen un 100 % de confiabilidad. Algunas de estas pruebas de diagnóstico no son positivas en el caso de una disentería amibiana a menos que la enfermedad sea extremadamente severa, por lo que el examen directo de heces permanece como el estandar de oro para el diagnóstico de una amibiasis intestinal (26, 48).

En general los ensayos mencionados anteriormente se elaboran con lisados completos de Entamoeba histolytica . Estos antígenos poseen ciertas desventajas, algunas veces pueden ser muy difíciles de estandarizar, debido a la autodregadación provocado por las diferentes proteinasas que contienen. Recientemente la Dra. Flores de Castañeda ha patentado un método que permite preservar estos antígenos por años, en base a este hallazgo se han abierto nuevas posibilidades para manipular estos extractos amibianos (17, 18, 19).

En años recientes la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda y un equipo de estudiantes, han abordado diferentes aspectos de la respuesta inmune de la amibiasis. Para ello se han estudiado varios aspectos, como son los niveles de inmunoglobulinas y los principales isotipos que se presentan en pacientes con absceso hepático amibiano. Estas fueron evaluadas mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima desarrollado en nuestro laboratorio, para detectar anticuerpos anti-amiba, encontrando los isotipos IgA e IgG de los pacientes con amibiasis invasiva elevadas en comparación con los sujetos sanos (38).

Otro aspecto importante que ha sido abordado es el estudio de la respuesta inmune de la amibiasis utilizando un modelo en ratones. Para ello se realizaron experimentos en ratones BALB/c, inmunizados por vía oral con trofozoítos de Entamoeba histolytica HK-9 y se evaluaron los isotipos de inmunoglobulinas que aparecen en respuesta a la exposición a las proteínas de este protozooario, encontrando elevados algunos isotipos de inmunoglobulinas (70).

Durante la amibiasis invasiva en el humano, se generan una gran cantidad de anticuerpos contra diferentes componentes inmunogénicos de Entamoeba histolytica, algunos de estos componentes pueden estar involucrados en daño y en respuesta el sistema inmune genera una gran cantidad de anticuerpos contra moléculas inmunodominantes. En este sentido nuestro grupo de trabajo, utilizando técnicas de alta resolución, como electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en gradiente de concentración e inmunoelectrotransferencia. Se lograron identificar antígenos inmunodominantes de Entamoeba histolytica HK-9, que fueron reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con amibiasis invasiva, sin embargo los anticuerpos séricos de pacientes con amibiasis intestinal asintomática y sujetos sanos con examen coproparasitológico negativo que habitan en zonas endémicas no reconocen ninguna de estas moléculas. Con esto se logró

establecer un patrón inmunolectroforético específico para amibiasis invasiva. Las moléculas con pesos moleculares relativos, que fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con amibiasis invasiva, fueron las siguientes : 8 KDa, 9 Kda, 10 KDa, 11 KDa, 23 KDa, 25 KDa, 37 KDa (20).

En resumen, sabemos que la proteína de peso molecular relativo de 8 Kda de Entamoeba histolytica, es inmunogénica y conserva su antigenicidad a diferentes pH, además esta proteína es reconocida exclusivamente por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con amibiasis invasiva y no es reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de sujetos sanos que habitan en zonas endémicas. Por lo que consideramos de gran importancia el aislamiento de esta molécula a gran escala en condiciones nativas, para ensayos de actividad biológica y estandarización de un prueba de inmunodiagnóstico específica y sensible para amibiasis invasiva.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar por isoelectroenfoque las proteínas con peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica y comparar su antigenicidad contra extractos crudos amibianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar la banda proteica inmunodominante con un peso molecular relativo de 8 kDa mediante electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes
2. Caracterizar el punto isoeléctrico de las proteínas de bajo peso molecular mediante isoelectroenfoque en gel analítico.
3. Aislar las proteínas inmunodominantes con un peso molecular relativo de 8 kDa mediante isoelectroenfoque en fase líquida.
4. Determinar si los anticuerpos inducidos en conejos y ratones con un extracto total de Entamoeba histolytica, reconocen las proteínas de bajo peso molecular aisladas por isoelectroenfoque.

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

3.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.1.1 Animales

Se utilizaron ratones BALB/c adultos, de sendos sexos (8 -12 semanas de edad), estos fueron alimentados con nutricubos para roedores (Purina U.S.A.) y agua estéril, se mantuvieron en jaulas de acrílico con rejillas metálicas.

Los conejos Nueva Zelanda adultos, machos de 4 - 6 meses de edad, fueron alimentados con Nutrialimentos Purina (Purina S.A de C.V. México) y agua, se hospedaron en jaulas metálicas en el bioterio a una temperatura de 18 a 20°C.

3.1.2. Sueros Humanos

Los sueros de pacientes con amibiasis invasiva se obtuvieron de pacientes que ingresaron al área de Medicina Interna I y II del Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio Gonzalez. Los sueros se analizaron por Inmunoelctrotransferencia (EITB) para identificar la presencia de anticuerpos anti amiba que identificaran el patrón antigénico específico para amibiasis invasiva (Número de Patente 5459042 E.U.A, Número de Patente de SECOFI 926019 MEXICO; Autoría intelectual : Flores de Castañeda M.S.). Los sueros se conservaron a -20°C.

Los sueros de los sujetos sanos se obtuvieron de personas con exámen coproparasitoscópico negativo, y se almacenaron a -20 °C.

3.1.3. Suero Bovino

El suero bovino (INMUTEC, S.A. de C.V. México, D.F.) fue empleado para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica HM-1:IMSS y HK-9 y se almacenó a -20°C.

3.1.4. Cepas amibianas

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica fueron proporcionados por el Dr. Armando Isibasi Araujo del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Posteriormente las cepas de Entamoeba histolytica HM-1:IMSS y HK-9 fueron cultivadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.2 OBTENCION Y PREPARACION DEL EXTRACTO INSOLUBLE CLOROFORMO:METANOL CALENTADO (IC:MC) DE Entamoeba histolytica.

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica HK-9 y HM-1:IMSS, fueron cultivados en medio de cultivo TYI-S-33 en condiciones axénicas a 37°C durante 72 horas (15). La cosecha de los trofozoítos se realizó al final de la fase logarítmica de crecimiento. Las botellas de cultivo (3028 FALCON), se colocaron en agua con hielo por 15 minutos. El paquete celular se obtuvo mediante centrifugación a 514 g/10 min.(4°C), se lavó 3 veces con PBS frío 0.15 M, pH 7.4; mediante centrifugación a 514 g/5 min. a 4°C . El paquete celular se congeló a -70°C y se liofilizó.

El sobrenadante del medio de cultivo TYI-S-33 se recuperó después de cada cosecha de trofozoítos de Entamoeba histolytica, se centrifugó a 2800 g/10 minutos a 4°C y se almacenó a -20°C.

El extracto crudo de trofozoítos de Entamoeba histolytica se trató con una mezcla de solventes orgánicos para disminuir la actividad proteolítica del antígeno. Se obtuvo la fracción Insoluble en Cloroformo : Metanol (IC:M) y se secó mediante vacío. Esta fracción se calentó en un amortiguador para obtener la fracción IC:MC (fracción IC:MC) (Dra. María del Socorro Flores de Castañeda, Patente No. 5,459,042; Departamento de Marcas y Patentes, Washington D.C. U.S.A.; Pat. SECOFI 926019, MEXICO) (17;18).

3.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

La concentración proteica del extracto IC:MC de Entamoeba histolytica se determinó por el método de Bradford (9).

3.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (EITB) DEL EXTRACTO IC:MC DE Entamoeba histolytica.

Para este estudio se utilizó el sistema discontinuo Laemli (33), en donde el extracto IC:MC de Entamoeba histolytica se sometió a SDS-PAGE e EITB, para analizar el patrón proteico y antigénico mediante tinciones para proteínas y western blot respectivamente. Los marcadores de peso molecular conocido, usados como referencia para calcular peso molecular, fueron electrotransferidos y se revelaron mediante un método inmunoenzimático (21).

3.4.1. Preparación de geles de poliacrilamida en gradiente de concentración lineal con SDS.

Se prepararon geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio en gradiente de concentración de 8.75% T a 18% T, 2.66 C, a pH 8.8, con un gel de

empaquetamiento al 5% T; 2.66 C, a pH 6.8 (4, 78). Las cantidades empleadas para elaborar este gradiente fueron las siguientes:

Gel separador en gradiente de concentración lineal de 8.75% T a 18% T; 2.66 C, pH 8.8 (geles de 18 x 14 cm x 0.75 mm).

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>	
	8.75%	18%
Solución patrón de acrilamida-bis-acrilamida 30 %T, 2.66 C	1.748 ml	3.597 ml
Amortiguador Tris-HCl, 3.02 M, pH 8.8	1.131 ml	1.131 ml
Glicerol al 50%	0.411 ml	0.634 ml
Agua bidestilada	2.622 ml	0.553 ml
Dodecil sulfato de sodio al 20%	0.030 ml	0.030 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.0214 ml	0.0214 ml
TEMED	0.0025 ml	0.0025 ml

Las soluciones 8.75 %T y 18 %T fueron colocadas en los reservorios de un formador de gradiente, éstas se mezclaron al iniciarse un flujo constante auxiliado por una bomba peristáltica, al final del flujo de los reactivos, se dejaron aproximadamente 40 min. para que las soluciones del gel de corrimiento polimerizaran. Después se adicionaron las soluciones para el gel de empaquetamiento, colocando el peine adecuado para cada experimento.

Gel de Empaquetamiento al 5% T, 2.66 C, pH 6.8

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Solución patrón de acrilamida bis-acrilamida 30% T, 2.66 C.	0.850 ml
Amortiguador Tris-HCl, 1.25 M, pH 6.8	0.520 ml
Agua bidestilada	3.600 ml
Dodecil sulfato de sodio al 20%	0.025 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.025 ml
TEMED	0.005 ml

Se dejó polimerizando aproximadamente 20 min., después se conservó a 4°C.

3.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Para el corrimiento electroforético se utilizó un amortiguador Trizma Base 50 mM, Glicina 384 mM, SDS 0.01% con un pH de 8.3. Se colocaron, marcadores de peso molecular conocido y extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9.

Para el corrimiento electroforético se aplicó un gradiente de voltaje. El voltaje se detuvo cuando el frente de corrimiento llegó al borde de la parte inferior del gel, sin dejar que este saliera. El gel fue seccionado para diferentes procesos como por ejemplo tinciones y EITB.

3.4.3. Tinción con nitrato de plata

La tinción descrita por Merrill (47) con modificaciones, fue empleada para revelar el patrón electroforético de las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida, y se describe a continuación:

1. Los geles se sumergieron en una solución fijadora (Metanol 50% y Acido Acético 12%) por 20 minutos.
2. El dodecilsulfato de sodio (SDS) se eliminó mediante tres lavados con solución de etanol al 10% y ácido acético al 5%.
3. Los geles se colocaron en solución oxidante (Dicromato de Potasio 3.4 mM, Acido Nítrico 3.17 mM) durante 5 min.

4. La solución oxidante se eliminó con tres lavados de 30 min cada uno con agua bidestilada.
5. Los geles se incubaron en solución de nitrato de plata (AgNO_3 12 mM) durante 30 minutos. Los primeros 10 min se llevaron a cabo bajo luz intensa.
6. Las bandas proteicas se visualizaron mediante una solución reveladora (carbonato de sodio 280 mM con 0.5 ml de formaldehído concentrado, por litro de solución). Se realizaron 2 lavados rápidos con esta solución y el último se dejó hasta que se observaron las bandas. La reacción se detuvo con ácido acético al 1 %.

3.4.4. Inmunoelectrotransferencia

La inmunoelectrotransferencia fue empleada para identificar la antigenicidad de las proteínas de Entamoeba histolytica y además detectar la presencia de las moléculas inmunodominantes, principalmente la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa. Para identificar estas proteínas se emplearon los sueros de paciente con amibiasis invasiva y como control negativo sueros de sujetos sanos. La reacción antígeno-anticuerpo se identificó mediante un método inmunoenzimático (72, 68).

Las condiciones empleadas para las EITB fueron las siguientes:

Las proteínas previamente separadas electroforéticamente por SDS-PAGE, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con albúmina sérica bovina al 1% en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó 3 veces con solución de lavado (gelatina de pescado al 0.3% en PBS-Tween 20 1:1000), cada uno de 10 minutos. El papel se cortó en tirillas y éstas se incubaron con los sueros a analizar, diluidos 1:25 en gelatina de pescado al 1.5% en PBS-Tween 20 1:1000, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación, y se

conservaron 12 hrs aproximadamente a 4°C. Al día siguiente, se hicieron 3 lavados con solución de lavado y se adicionaron los anticuerpos policlonales anti-gammaglobulinas humana elaborados en chivo y conjugados con peroxidasa. Los anticuerpos diluïdos 1:2000, se dejaron reaccionando por 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Las tiras se volvieron a lavar y se adicionó la solución substrato-cromógeno (3,3'-diaminabenzidina Tetraclorhidrato con peróxido de hidrógeno en PBS) para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. Después de unos minutos, la reacción se neutralizó con ácido clorhídrico 5 N, las tiras se lavaron con agua bidestilada y se secaron con papel filtro, para posteriormente analizarlas. Los marcadores de peso molecular conocido se incubaron con sueros de pacientes con amibiasis invasiva y se sometieron a los mismos tratamientos mencionados anteriormente.

3.5. ELECTROFORESIS PREPARATIVA Y ELECTROELUCION EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

Para el aislamiento de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa de Entamoeba histolytica, se utilizó electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes (66).

Se utilizaron geles preparativos al 18% T, 2.66 C, pH 8.8 . En este sistema se utilizó un amortiguador para electroforesis 2X (Trizma base 100 mM, glicina 768 mM con SDS 0.02%). El gel de poliacrilamida se sometió a un pre-corrimento de 50 volts por 30 min. Transcurrido este tiempo, se aplicaron los marcadores de peso molecular conocido y el extracto IC:MC de Entamoeba histolytica manteniéndose a una temperatura de 4°C. La electroforesis se detuvo cuando el frente de corrimiento alcanzó la parte inferior del gel sin que éste saliera. La zona del gel que corresponde a los marcadores de peso molecular conocido, se seccionó para ser teñida con azul de Coomassie, y la otra porción del gel de poliacrilamida se almacenó a -20°C.

El gel (conservado a -20°C) que contenía las proteínas del extracto IC:MC separado electroforéticamente, se cortó en porciones. El corte del gel se realizó de acuerdo a la movilidad electroforética de la banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa y la porción que contenía esta banda se llevó a electroelución. En la cámara de electroelución, se colocó una membrana de diálisis con un límite de exclusión molecular de 3.5 kDa, para atrapar las proteínas eluidas del gel de poliacrilamida, durante la electroelución. El amortiguador que se empleó en la cámara de electroelución fue el mismo que se utilizó en la electroforesis preparativa. Se aplicó un voltaje constante de 120 por 3 horas, a 4°C . Los electroeluidos se almacenaron a -20°C .

3.6. CARACTERIZACION DEL PUNTO ISOELECTRICO DE LAS PROTEINAS INMUNODOMINANTES DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica .

3.6.1. Preparación de la muestra

Los electroeluidos provenientes de varios geles se mezclaron, se dializaron contra agua desionizada por 24 hrs a 4°C ; se utilizó una membrana de diálisis con un límite de exclusión molecular de 3.5 kDa (SPECTRA/POR, Baxter Healthcare Co. Illinois U.S.A.). Los electroeluidos dializados se concentraron mediante liofilización.

Para eliminar el SDS, se utilizó cromatografía de intercambio iónico, empleando una columna empacada con resina AG 11 A8. Esta resina posee la propiedad de retener el detergente aniónico (7). La columna se activó con cloruro de amonio 1 M y después se lavó con agua desionizada. La muestra se aplicó a la columna con un flujo controlado, recolectando el eluido en varios tubos, los cuales se almacenaron a -20°C , y posteriormente se concentraron mediante liofilización.

3.6.2. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida

Las muestras se sometieron a isoelectroenfoque analítico en geles de poliacrilamida, con el objetivo de caracterizar su punto isoeléctrico (pI). Para este estudio se utilizaron geles de poliacrilamida al 5% T, 1.16 C; con anfolitos de un rango de pH de 3 a 10. Las soluciones utilizadas en los electrodos del isoelectroenfoque fueron, ácido fosfórico 1 M (ánodo) e hidroxido de sodio 1 M (cátodo). La electroforesis se inició con un pre-corrimiento empleando una potencia de 10 Watts durante 30 minutos, para distribuir los anfolitos y generar el gradiente de pH, después se aplicaron las siguientes muestras: Amiloglucosidasa p.I. 3.6; inhibidor de la tripsina p.I. 4.6; anhidrasa carbónica p.I. 6.6; mezcla de marcadores de p.I. 3 - 10; y los eluidos de peso molecular relativo de 8 KDa de Entamoeba histolytica. Enseguida se aplicó un pre-corrimiento a 10 Watts, se quitaron los papeles aplicadores de muestra y se incrementó la potencia a 15 Watts. En los 15 minutos finales se incrementó a 20 Watts para obtener mejor resolución en la separación. Durante el isoelectroenfoque se utilizó un sistema de enfriamiento (2209 Multitemp, Bromma LKB Sweden).

3.6.3. Tinción con azul de Coomassie G-250

El gel de poliacrilamida usado en el IEF se sometió a tinción con azul de Coomassie G-250, como a continuación se describe.

1. El gel se sumergió en una solución fijadora (Acido Tricloroacético 704 mM, Acido Sulfosalicílico 136 mM) por 1 hora.
2. El gel se equilibró con una solución de equilibrio (Metanol 25% y Acido Acético 5%) por 15 minutos.

3. El gel se incubó en solución de azul de Coomassie G-250 (0.01% de Azul de Coomassie G-250, Metanol 25% y Acido Acético 5%) por 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
4. El exceso de colorante se eliminó con una solución desteñidora (Etanol 25% y Acido Acético 8%) hasta la eliminación total del exceso de colorante.

En base a la migración electroforética de los marcadores de punto isoelectrico conocido, se elaboró una curva de calibración, en donde se extrapoló la movilidad electroforética de la proteína en estudio, para obtener el pI.

3.7 ISOELECTROENFOQUE EN FASE LIQUIDA DE UN EXTRACTO IC:MC DE Entamoeba histolytica.

3.7.1. Isoelectroenfoque en fase líquida con un rango de pH 3.0 - 10.0, del Extracto IC:MC de Entamoeba histolytica.

Las condiciones para la obtención y preparación del extracto IC:M de Entamoeba histolytica, fueron semejantes a las anteriormente mencionadas. El extracto IC:MC se preparó con la solución solubilizadora y calentando a ebullición. Al extracto IC:MC de Entamoeba histolytica se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

En el isoelectroenfoque en fase líquida se emplearon 2 soluciones para los depósitos de los electrodos, hidróxido de sodio 0.1 M (cátodo) y ácido fosfórico 0.1 M (ánodo). En la cámara de separación se adicionó la solución solubilizadora con anfólitos al 2% (pH 3.5 - 10). Se realizó un pre-corrimento por 2 horas para generar el gradiente de pH (3.5 - 10). Este sistema se mantuvo a una temperatura de 4°C (Multitemp II LKB).

El extracto IC:MC de Entamoeba histolytica se aplicó en la zona central de la cámara y para isoelectroenfocalizar las proteínas, se aplicaron 12 Watts. las muestras se recuperaron mediante vacío y se recolectaron en 20 tubos colocados dentro de una cámara. Cada una de las fracciones se sometieron a análisis de pH, absorbancia a 280 nm y SDS-PAGE e EITB.

3.7.2. Refraccionamiento mediante IEF en fase líquida (Anfolitos de pH 4.0 - 6.5 y 6.0 - 8.0).

Las fracciones con un rango de pH de 4.6 - 5.4, provenientes del IEF en fase líquida, fueron sometidas a un refraccionamiento mediante IEF en fase líquida, empleando anfolitos con un rango de pH 4.0 - 6.5. Las fracciones con un rango de pH de 6.5 - 7.4, fueron sometidas a un refraccionamiento empleando anfolitos con un rango de pH 6.0 - 8.0. Las condiciones de isoelectrofocalización fueron semejantes a las anteriormente descritas en este trabajo. La muestras se recolecton en 20 tubos mediante vacío y fueron sometidas a medición de pH y absorbancia a 280 nm. Las 20 fracciones se congelaron a -70°C y se concentraron mediante liofilización. Cada una de estas fracciones se sometieron a SDS-PAGE e EITB.

3.8 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PROTEINAS AISLADAS POR IEF EN FASE LIQUIDA, SOMETIDAS A IEF EN GEL.

Para comprobar si las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa, aisladas por IEF en fase líquida poseían diferentes pI, éstas se sometieron a un IEF gel de poliacrilamida, preparado y sometido a las mismas condiciones como se mencionaron anteriormente en esta tesis. En el gel se aplicaron marcadores de pI conocido y las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa aisladas en los rangos de pH 5.2-5.3 y 6.9. Al final del tiempo de corrimiento, estas proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia semi-seco a miliamperaje constante por 2 hrs. Después la membrana

de nitrocelulosa se sometió al mismo tratamiento que se ha mencionado anteriormente en este trabajo.

3.9. ANTIGENICIDAD DE LAS PROTEINAS DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica.

La antigenicidad de las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa aisladas por IEF en fase líquida, se analizaron mediante SDS-PAGE 12 - 18 %T e EITB. Se utilizaron sueros de conejos y ratones inmunizados y sin inmunizar, también se emplearon sueros de pacientes con amibiasis invasiva y de sujetos sanos que habitan en zonas endémicas de amibiasis.

3.9.1. Protocolo de Inmunización para los conejos Nueva Zelanda.

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda (machos de 4 - 6 meses de edad), estos se sangraron en la vena de la oreja al tiempo 0 (suero control), el suero se almaceno a -20°C.

Para inmunizar se utilizó como inmunógeno un extracto total de Entamoeba histolytica HK-9 con adyuvante completo de Freund . La emulsión se administró a los conejos por vía subcutánea. A los 7 días se sangraron y se volvieron a inmunizar bajo el mismo protocolo, pero el inmunógeno se preparó con adyuvante incompleto de Freund. Todos los sueros se almacenaron -20°C.

3.9.2. Protocolo de inmunización de los ratones BALB/c.

Se utilizaron ratones Balb/c, cada uno de ellos se sangraron por la vena caudal antes de ser inmunizados, y el suero se guardó a -20°C.

La suspensión empleada para las inmunizaciones se preparó de la siguiente manera: El extracto de Entamoeba histolytica HK-9 se suspendió en solución salina y se sonicó 3 veces durante 20 segundos cada vez, la muestra se mantuvo en un baño con hielo, finalmente se hizo una emulsión con adyuvante

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1. ANALISIS MEDIANTE SDS-PAGE E EITB DE UN EXTRACTO IC:MC DE Entamoeba histolytica HK-9.

El extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9, se analizó en SDS-PAGE e EITB, con la finalidad de conocer el patrón electroforético y antigénico, mediante tinción con nitrato de plata y western blot respectivamente.

En la figura 1 se observa un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, en el carril B se aplicó el extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9, en donde se identificaron más de 32 bandas proteicas que abarcan un rango de peso molecular inferior y superior a los 14 kDa y 66 kDa respectivamente, en base a los marcadores de bajo peso molecular que se muestran en el carril A. Este extracto fue aceptable para ser empleado para ensayos posteriores.

El análisis por EITB del extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9, se muestra en la figura 2; en 2A y 2B se electrotransfirieron marcadores de peso molecular conocido y extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9 respectivamente, la tira B1 se incubó con un suero de un paciente con amibiasis invasiva, y se observó que los anticuerpos presentes en el suero reconocen la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, además reconocen otras moléculas de mediano y alto peso molecular, que también son inmunodominantes, sin embargo esta molécula no fue reconocida por los anticuerpos presentes en el suero de un sujeto sano, como se observa en la tira B2. Estos resultados que indican la presencia de la banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica, la cual forma parte del patrón característico de amibiasis invasiva. Esta EITB muestra que el extracto empleado, podrá ser utilizado para el aislamiento de la banda proteica inmunodominante de bajo peso molecular.



FIGURA 1. PATRON ELECTROFORETICO DE UN EXTRACTO IC:MC DE Entamoeba histolytica. SDS-PAGE en gradiente lineal. Tinción con nitrato de plata. A. Marcadores de peso molecular; B. Extracto IC:MC .

4.2. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica HK-9, MEDIANTE ELECTROFORESIS PREPARATIVA Y ELECTROELUCION EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

Para el aislamiento de la proteína de peso molecular relativo de 8 KDa, se utilizaron geles preparativos al 18 %T. En este sistema se aplicaron extractos IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9.

Los cortes de los geles preparativos se realizaron en el área de la movilidad electroforética de la proteína de peso molecular relativo de 8 KDa. Se hicieron diferentes cortes por debajo del marcador de 14 KDa. Las proteínas presentes en los fragmentos de los geles de poliacrilamida se extrajeron mediante electroelución.

Para analizar la presencia de las moléculas inmunodominantes de peso molecular relativo de 8 KDa en los electroeluidos, estos se sometieron a SDS-PAGE e EITB al 18 %T. En la figura 3, se puede observar la presencia de la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa en la sección C, pero también se identificaron bandas antigénicas con un peso molecular aproximado de 67, 29, 16 y 14 KDa.



FIGURA 3. EITB DE LOS ELECTROELUIDOS OBTENIDOS DE LAS SDS-PAGE PREPARATIVAS. A. Marcadores de peso molecular; B Extracto IC:MC; C. Electroeluidos. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

Para solucionar este problema, los electroeluidos que contenían la proteína de peso molecular relativo de 8 KDa se sometieron nuevamente a electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes, y el electroeluido obtenido se analizó mediante SDS-PAGE e EITB.

En la figura 4 se muestra el gel teñido con nitrato de plata. Se observó la presencia de una sola banda proteica (Carril C), por debajo del marcador de 14 KDa (Carril A). Cuando se transfirieron estas muestras a papel de nitrocelulosa, y se incubaron con el suero de un paciente con AHA, se observó que la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa estaba aislada y las bandas antigenicas de 67, 29, 16 y 14 KDa se lograron eliminar por la metodología que se mencionó anteriormente. Estos resultados se muestran en la figura 5.



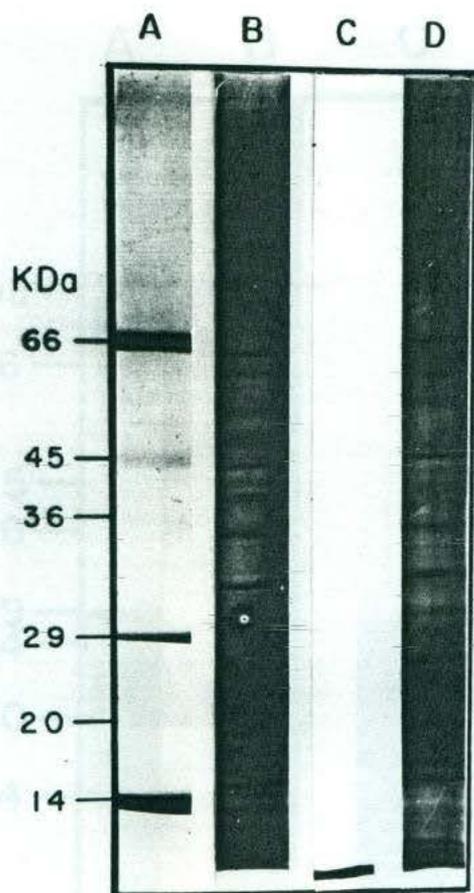


FIGURA 4. BANDA PROTEICA DE P.M. RELATIVO DE 8 KDa AISLADA Y TEÑIDA CON NITRATO DE PLATA. SDS-PAGE; A. Marcadores de peso molecular; B y D. Extracto IC:MC, C. Banda proteica de P.M. relativo de 8 kDa aislada mediante electroforesis preparativa y electroelución.

ANÁLISIS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL P.M. RELATIVO DE 8 kDa
PROTEICA. ANTICORPOS MONOCLONALES DE P.E.M. MOLECULAR
CON EL P.M. RELATIVO DE 8 kDa.

Se realizó un EITB de la banda proteica de 8 kDa de peso molecular
relativo de P.M. aislada por electroelución. Se utilizó un suero de un paciente
con AHA. Se observó una banda proteica de 8 kDa de peso molecular
relativo de P.M. en el extracto IC:MC y en la banda proteica de P.M.
relativo de 8 kDa aislada por electroelución.

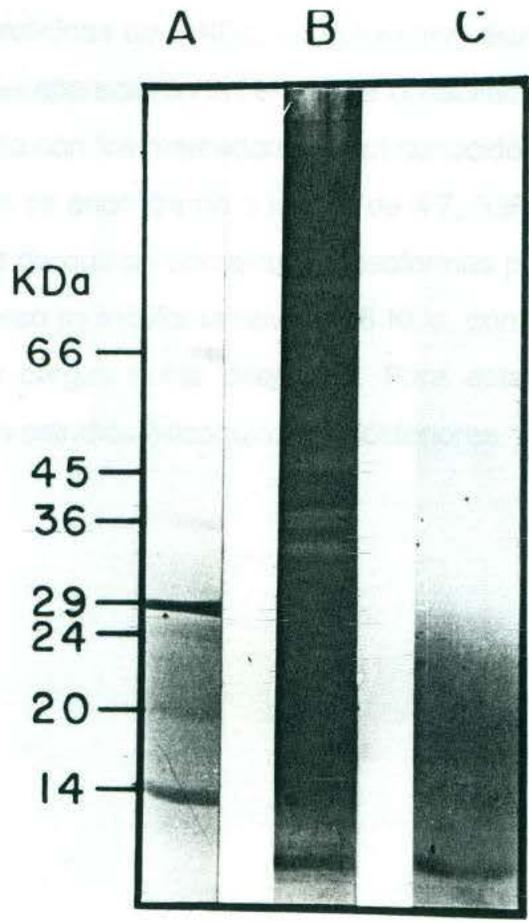
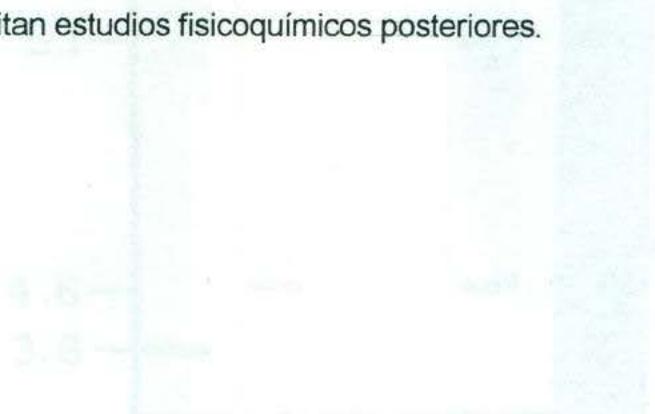


FIGURA 5. EITB DE LA BANDA PROTEICA DE P.M. RELATIVO DE 8 kDa AISLADA. A. Marcadores de peso molecular; B. Extracto IC:MC; C. Banda proteica de P.M. relativo de 8 kDa aislada por electroelución. Se utilizó un suero de un paciente con AHA.

4.3. CARACTERIZACION DEL PUNTO ISOELECTRICO DE LAS PROTEINAS INMUNODOMINANTES DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica .

Las proteínas presentes en la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa fueron sometidas a isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida 5 %T, 1.16 C, obtenidas por electroelución. Al revelar mediante tinción con azul de Coomassie G-250, se identificaron 3 bandas protéicas (Figura 6, carril E). Los puntos isoeléctricos de la proteínas de 8 KDa, se obtuvieron extrapolando los pH de las bandas protéicas que aparecieron en el gel de poliacilamida, con la curva de calibración elaborada con los marcadores de pI conocido (Carriles A, B, C y D). Las bandas proteicas se encontraron a los pH de 4.7, 5.9 y 6.75, estos resultados indican la posibilidad de que se encuentren 3 isoformas proteicas presentes en la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa, con un peso molecular muy semejante pero con cargas netas diferentes. Para establecer firmemente este hallazgo se necesitan estudios fisicoquímicos posteriores.



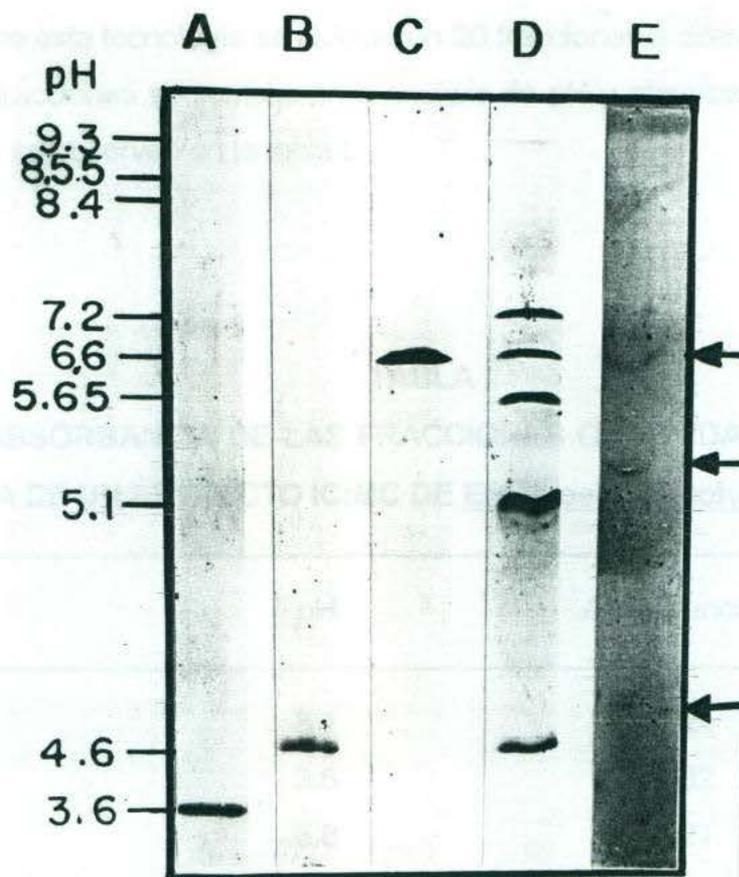


FIGURA 6. IEF ANALITICO DE LA BANDA PROTEICA AISLADA POR ELECTROELUCION. Anfolitos (pH 3 - 10). Tinción con azul de Coomassie G-250. A. Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (p.I. 3.6); B. Inhibidor de la tripsina del frijol de soya (p.I. 4.6); C. Anhidrasa carbónica humana (p.I. 6.6); D. Marcadores de punto isoeléctrico conocido (Rango de p.I. de 3.6 a 9.3); E. Proteínas de la banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa de *Entamoeba histolytica* HK-9.

4.4. AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE EN FASE LIQUIDA.

4.4.1. Isoelectroenfoque en fase líquida de un extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9.

Mediante esta tecnología se obtuvieron 20 fracciones a diferentes pH. Cada una de estas fracciones se sometieron a análisis de pH y absorbancia a 280 nm. Los resultados se observan en la tabla I.

TABLA I
pH Y ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL IEF EN FASE LIQUIDA DE UN EXTRACTO IC:MC DE Entamoeba histolytica.

Fracción	pH	Absorbancia (280 nm)
1	3.1	0.024
2	3.6	0.032
3	3.8	0.121
4	4.2	0.128
5	4.4	0.156
6	4.5	0.255
7	4.6	0.348
8	4.7	0.507
9	5.0	0.543
10	5.4	0.303
11	6.0	0.160

Continúa Tabla I

Fracción	pH	Absorbancia (280 nm)
12	6.5	0.111
13	6.9	0.127
14	7.4	0.107
15	8.1	0.091
16	8.6	0.104
17	9.3	0.036
18	9.6	0.083
19	10.0	0.027
20	10.5	0.018

Para conocer la distribución proteica del extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9, a través del gradiente de pH generado por el IEF en fase líquida, las lecturas de absorbancia (tabla 1), se graficaron al igual que el pH de cada una de las fracciones. En la figura 7, se aprecia una curva con un pico a pH de 5.0 que corresponde a la fracción 9, siendo la fracción más concentrada en cuanto a proteínas. Cabe destacar que el mayor contenido proteico de la fracción IC:MC de trofozoítos de este protozoario se localiza en un rango de pH de 3.8 - 7.4 .

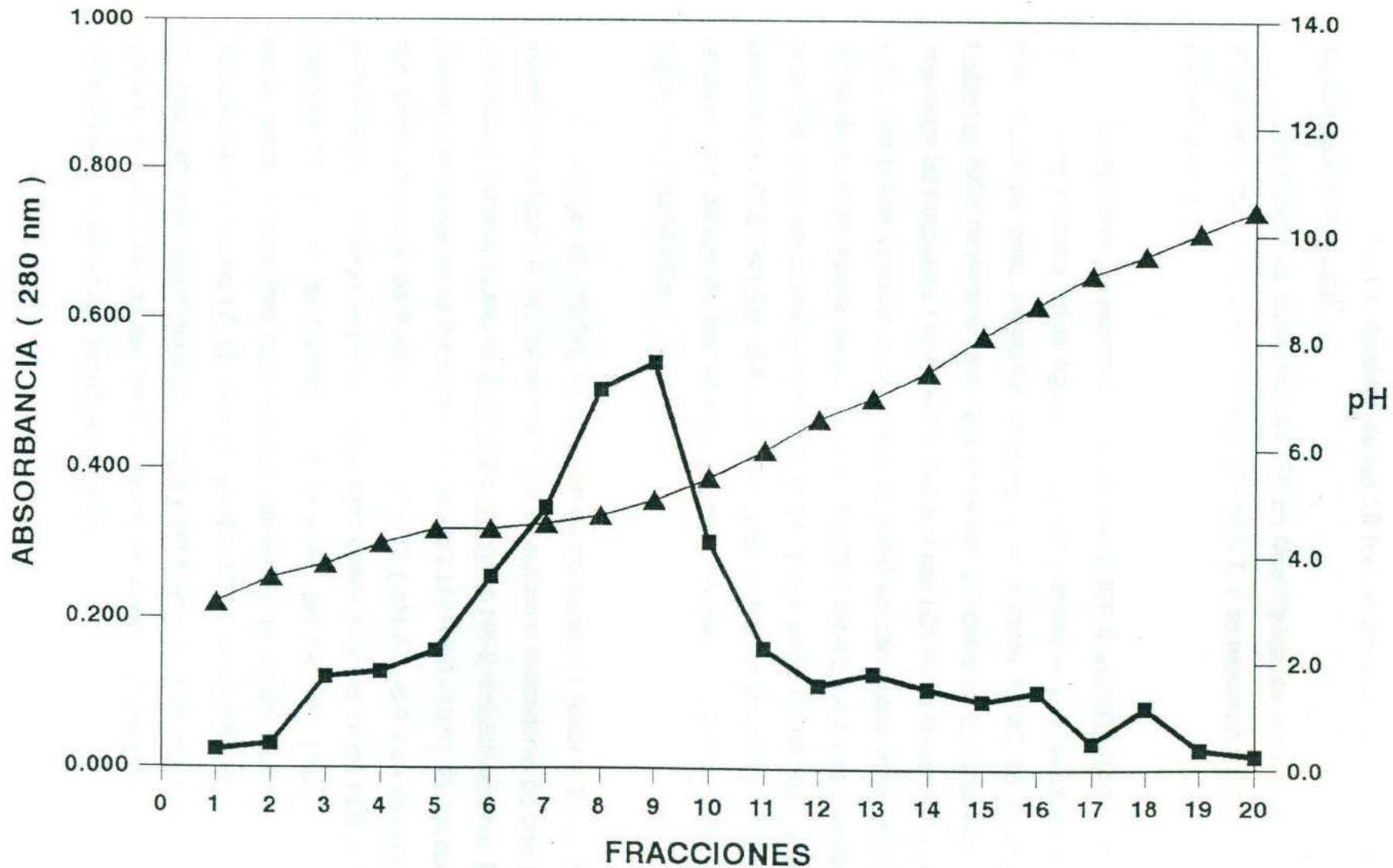


FIGURA 7. pH Y ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN EL IEF EN FASE LIQUIDA DE UN EXTRACTO IC:MC DE *Entamoeba histolytica* . (■) Absorbancia, (▲) pH .

4.4.1.1. Análisis de las 20 fracciones obtenidas del IEF fase líquida, por SDS-PAGE.

Las fracciones obtenidas del IEF en fase líquida se sometieron a SDS-PAGE en gradiente de concentración 12 - 18% T, y se revelaron mediante tinción con nitrato de plata.

Se aplicaron las primeras 10 fracciones de IEF a una SDS-PAGE 12 - 18% T; como se muestra en la figura 8 . En los carriles A y B se observan los marcadores de peso molecular conocido y el extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9 respectivamente, que se usaron de controles. En la porción C, se colocaron las fracciones 1 hasta la 10. Desde el carril C1 hasta el carril C6 (pH 3.1 - 4.5) se puede apreciar la presencia de proteínas con pesos moleculares por arriba de 45 KDa. Apartir de los carriles C7 y C8 (pH 4.6 - 4.7) se identificaron proteínas entre los pesos moleculares de 14 y por arriba de 66 KDa; y en los carriles C9 y C10 (pH 5.0 - 5.4) se identificaron moléculas de pesos moleculares relativos por debajo de los 14 KDa y otras proteínas con pesos moleculares superiores a los 66 KDa.

En otro gel 12 - 18 %T, se aplicaron las fracciones 11 hasta la 20, como se muestra en la figura 9. En los carriles A y B se aplicaron marcadores de bajo peso molecular y Extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9 respectivamente. En la porción C se aplicaron las fracciones 11 hasta la 20 (pH 6.0 - 10.5). En los carriles que corresponden a las fracciones 11, 12 y 13 (pH 6.0 -6.9) se identificaron proteínas con un rango de pesos moleculares desde mayores de 66 KDa y hasta menores 14 KDa; en las fracciones 14, 15 y 16 (pH 7.4 - 8.7) se observó un patrón protéico semejante pero con una intensidad de tinción más débil, y por último en las fracciones 17, 18, 19 y 20 (pH 9.3 -10.5) se identificaron bandas de un peso molecular aproximado de 14 kDa y entre 45 - 66 KDa. En esta zona se dificulta la resolución de las bandas debido al fondo que presentó el gel de poliacrilamida, al ser teñido con nitrato de plata.

Al enlazar los resultados de las figuras 8 y 9, podemos decir que la mayor cantidad de proteínas, poseen puntos isoeléctricos a pH ácidos, como se observa en las fracciones 5 hasta la 13 con pH de 4.4 hasta 6.9 respectivamente.

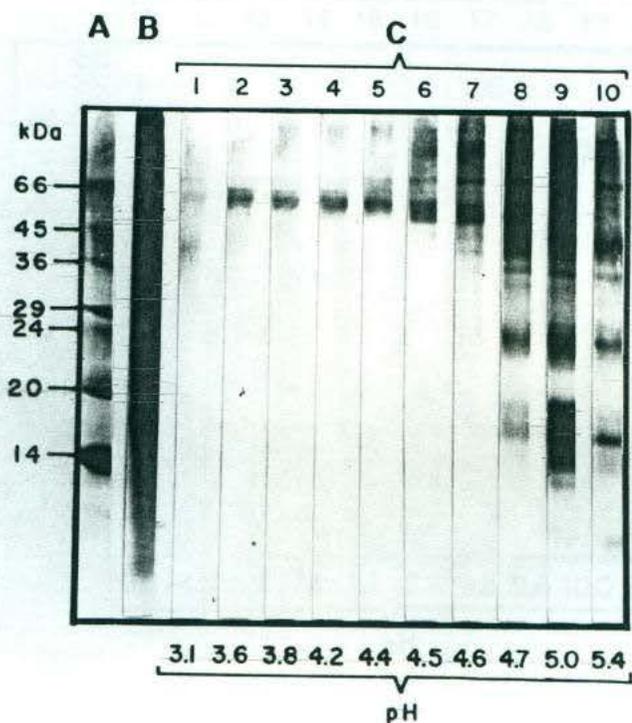


FIGURA 8. SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES 1 - 10 OBTENIDAS POR IEF EN FASE LIQUIDA. Tinción con nitrato de plata. A. Marcadores de peso molecular; B. Extracto IC:MC; C. Fracciones del IEF en fase líquida.

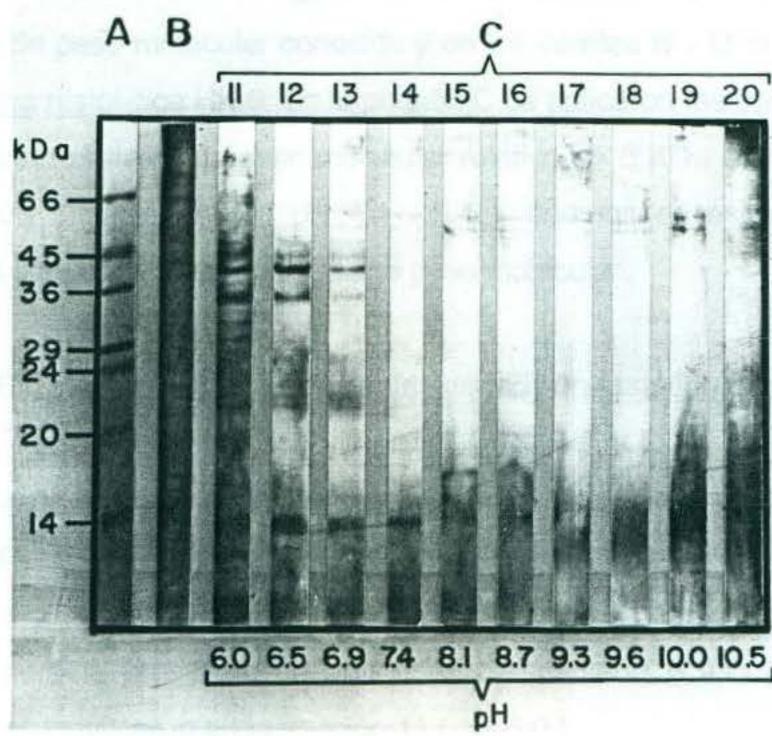


FIGURA 9. SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES 11- 20 OBTENIDAS POR IEF EN FASE LIQUIDA. Tinción con nitrato de plata. A. Marcadores de peso molecular; B. Extracto IC:MC; C. Fracciones obtenidas por IEF en fase líquida.

4.4.1.2. Análisis mediante EITB de las 20 fracciones obtenidas del IEF fase líquida.

Las fracciones obtenidas del IEF en fase líquida se sometieron a SDS-PAGE e EITB 12 % - 18 %T. Este análisis se realizó para identificar en que fracciones, se encontraban las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa y además conocer la distribución antigénica de la fracción IC:MC de los trofozoítos de Entamoeba histolytica HK-9, desde un pH de 3 hasta 10.

Las fracciones obtenidas del IEF se sometieron a SDS-PAGE e EITB. Los resultados se muestran en la figura 10. En los carriles A y E se observan los marcadores de peso molecular conocido y en los carriles B y D el extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9. En la porción C se aplicaron las fracciones 1 hasta la 10. La banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa se identificó a partir de la fracción 5 hasta la 10 (pH 4.4 - 5.4), además en estas fracciones se identificaron antígenos de alto y mediano peso molecular.

La EITB, de las fracciones restantes del IEF en fase líquida se muestran en la figura 11. Marcadores de peso molecular (Carril A y E) y extracto IC:MC de Entamoeba histolytica HK-9 (Carril B y D), en la porción C se aplicaron las fracciones 11 hasta la 20. Se puede apreciar en las fracciones 11, 12, 13, 14 y 15 (pH 6.0 - 8.1) la presencia de la banda proteica de bajo peso molecular relativo de 8 KDa, pero la presencia de antígenos de mediano y alto peso molecular solamente se identificaron en la fracción 11 (pH 6.0).

Los resultados de las figuras 10 y 11, indican que la banda proteica de 8 KDa se enfoca casi en 4 unidades de pH; (pH de 4.4 hasta 8.1).

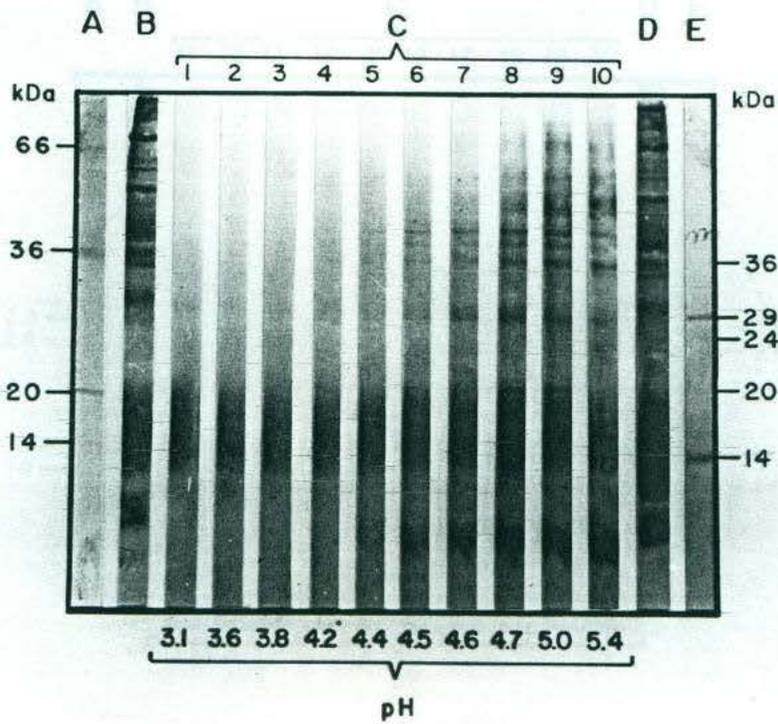


FIGURA 10. EITB DE LAS FRACCIONES 1 - 10 OBTENIDAS POR IEF EN FASE LIQUIDA CON RANGO DE pH 3 - 10. A y E: Marcadores de peso molecular; B y D: Extracto IC:MC; C: Fracciones del IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

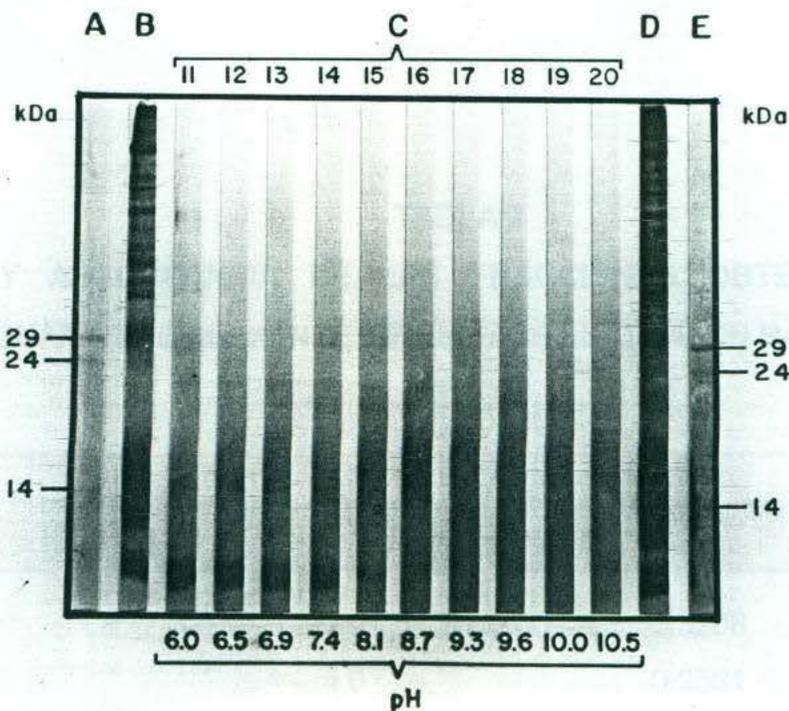


FIGURA 11. EITB DE LAS FRACCIONES 11 - 20 OBTENIDAS POR IEF EN FASE LIQUIDA CON UN RANGO DE pH 3 - 10. A y E: Marcadores de peso molecular; B y D: Extracto IC:MC; C: Fracciones del IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

4.4.2. Refraccionamiento en un rango de pH 4.0 - 6.5 .

Las fracciones obtenidas del IEF en fase líquida en un rango de pH de 4.6 - 5.4 de la figura 10, fueron sometidas a un refraccionamiento de pH más estrecho, empleando anfolitos con un rango de pH de 4.0 - 6.5. Se siguió la metodología estandarizada. Al final de la isoelectrofocalización, las muestras se recolectaron en 20 tubos. Cada una de estas fracciones se sometieron a medición de pH y absorbancia a 280 nm. Los resultados se muestran en la tabla II.

TABLA II

pH Y ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL REFRACCIONAMIENTO MEDIANTE IEF EN FASE LIQUIDA, EN RANGO DE pH 4.0 -6.5 .

Fracción	pH	Absorbancia (280 nm)
1	3.6	0.3208
2	4.0	0.2581
3	4.4	0.2663
4	4.7	0.5060
5	4.9	0.5084
6	5.0	0.3798
7	5.1	0.2573
8	5.15	0.2090
9	5.2	0.1627

Continúa Tabla II

Fracción	pH	Absorbancia (280 nm)
10	5.3	0.1326
11	5.5	0.1031
12	5.7	0.0731
13	5.9	0.0842
14	6.1	0.0646
15	6.3	0.0629
16	6.6	0.0609
17	6.8	0.0540
18	7.3	0.0550
19	7.9	0.0663
20	8.1	0.0455

Para conocer la distribución protéica a través del gradiente de pH generado por el IEF en fase líquida, se graficaron los datos de la tabla II. En la figura 12 se aprecia que el mayor contenido proteico se isoelectrofocalizó en un rango de pH de 3.6 - 5.15, sin embargo entre los pH de 4.7 - 4.9 se formó un pico, indicando que las fracciones 4 y 5 son las más concentradas en cuanto a proteínas. Las lecturas de absorbancia disminuyeron conforme el pH se acercaba hacia la zona de pH neutro.

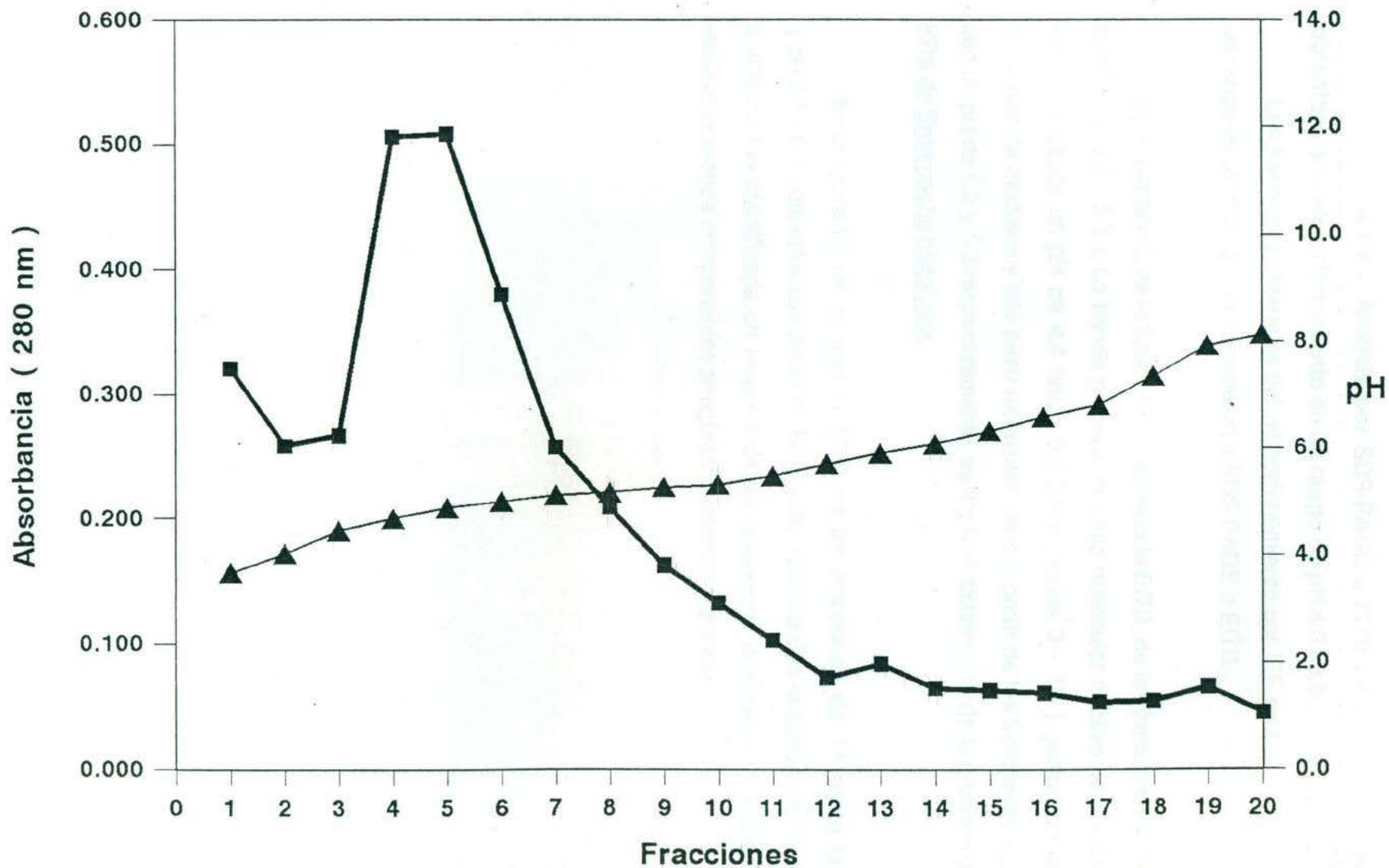


FIGURA 12. pH Y ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL REFRACCIONAMIENTO MEDIANTE IEF EN FASE LIQUIDA CON UN RANGO DE pH 4.0 - 6.5. (■) Absorbancia, (▲) pH.

4.4.2.1. Análisis por SDS-PAGE e IITB de las 20 fracciones obtenidas del refraccionamiento en un rango de pH 4.0 - 6.5 .

Las fracciones obtenidas del refraccionamiento por IEF en fase líquida con un rango de pH 6.0 - 8.0 se sometieron a SDS-PAGE e IITB.

En la porción C de la figura 13, se aprecia la IITB, de las fracciones 1 hasta la 10 (pH 3.6 - 5.3). La banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa se identificó desde un pH de 4.4 hasta 5.3 (Fracciones 3 - 10), junto con otras proteínas de mediano y alto peso molecular, pero a partir de las fracciones 9 y 10 con un pH de 5.2 y 5.3 respectivamente, se logró el aislamiento de la proteína de 8 KDa de Entamoeba histolytica.

En la figura 14, se aprecia la IITB, de las fracciones de 11 hasta la 20 (pH 5.5 - 8.1) del refraccionamiento. Se puede observar que la banda proteica de 8 kDa no fue identificada en ninguna de las fracciones analizadas. También se observó que otros componentes antigénicos estaban ausentes.

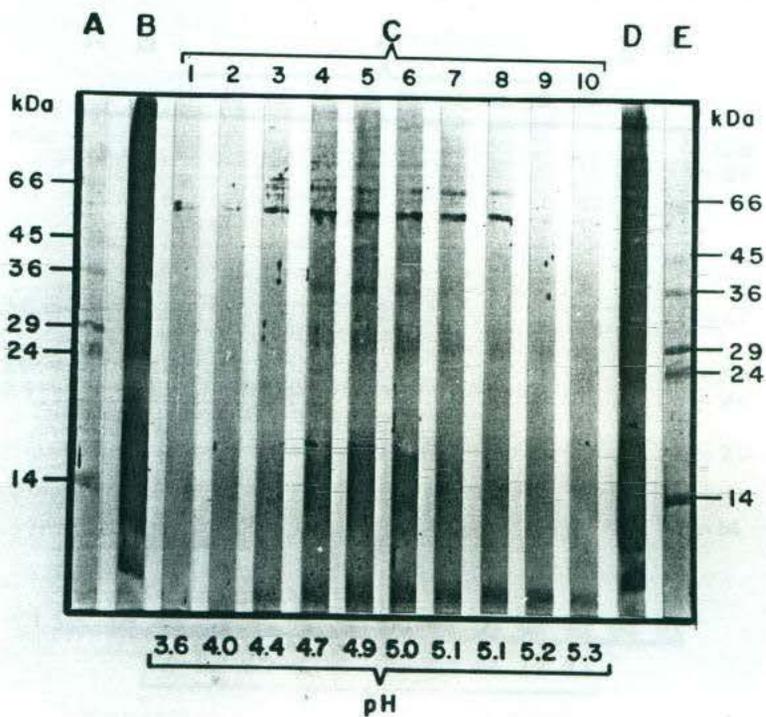


FIGURA 13. EITB DE LAS FRACCIONES 1 - 10 OBTENIDAS POR REFRACCIONAMIENTO EN UN RANGO DE pH 4.0 - 6.5. A y E: Marcadores de peso molecular; B y D: Extracto IC:MC; C: Fracciones obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

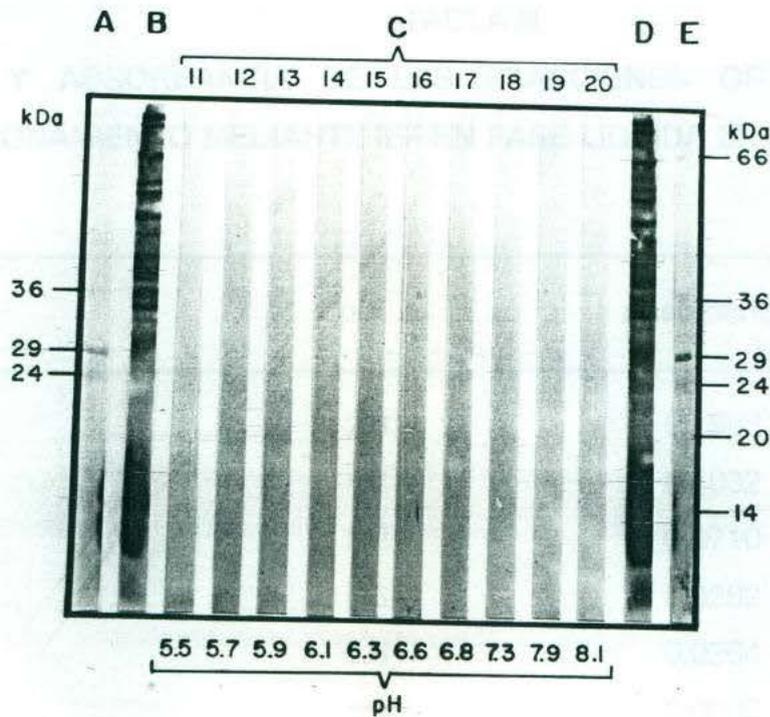


FIGURA 14. EITB DE LAS FRACCIONES 11 - 20 OBTENIDAS POR REFRACCIONAMIENTO EN UN RANGO DE pH 4.0 - 6.5. A y E: Marcadores de peso molecular; B y D. Extracto IC:MC; C. Fracciones obtenidas por el refraccionamiento. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

4.4.3. Refraccionamiento en un rango de pH 6.0 - 8.0 .

Las fracciones obtenidas del IEF en fase líquida, en el rango de pH de 6.5 - 7.4 de la figura 11, se sometieron a un refraccionamiento empleando anfolitos con un rango de pH de 6.0 - 8.0 . Se siguió la metodología estandarizada, al final de la isoelectrofocalización, las muestras se recolectaron en 20 tubos. Cada una de estas fracciones se sometieron a medición de pH y absorbancia a 280 nm. Los resultados se muestran en la tabla III.

TABLA III
pH Y ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL REFRACCIONAMIENTO MEDIANTE IEF EN FASE LIQUIDA EN RANGO DE pH 6 -8.

Fracción	pH	Absorbancia (280 nm)
1	2.8	0.1983
2	4.2	0.1032
3	5.2	0.0710
4	5.6	0.0382
5	5.8	0.0264
6	5.9	0.0002
7	6.1	0.0000
8	6.2	0.0000
9	6.3	0.0000
10	6.5	0.0000

Continúa Tabla III

Fracción	pH	Absorbancia (280 nm)
11	6.7	0.0000
12	6.9	0.0000
13	7.0	0.0000
14	7.2	0.0000
15	7.3	0.0000
16	7.4	0.0000
17	7.8	0.0000
18	8.6	0.0000
19	9.5	0.0000
20	9.7	0.0000

Los datos de la tabla 6, se graficaron para conocer la distribución proteica del refraccionamiento a través del gradiente de pH generado por el IEF en fase líquida. De acuerdo a la Figura 15, se aprecia que el mayor contenido protéico se enfocó en un rango de pH de 2.8 a 5.8. En las fracciones de la 6 hasta la 20 , las lecturas de absorbancia a 280 nm fueron de cero. En base a estos resultados, las muestras se concentron mediante liofilización y se analizaron mediante EITB.

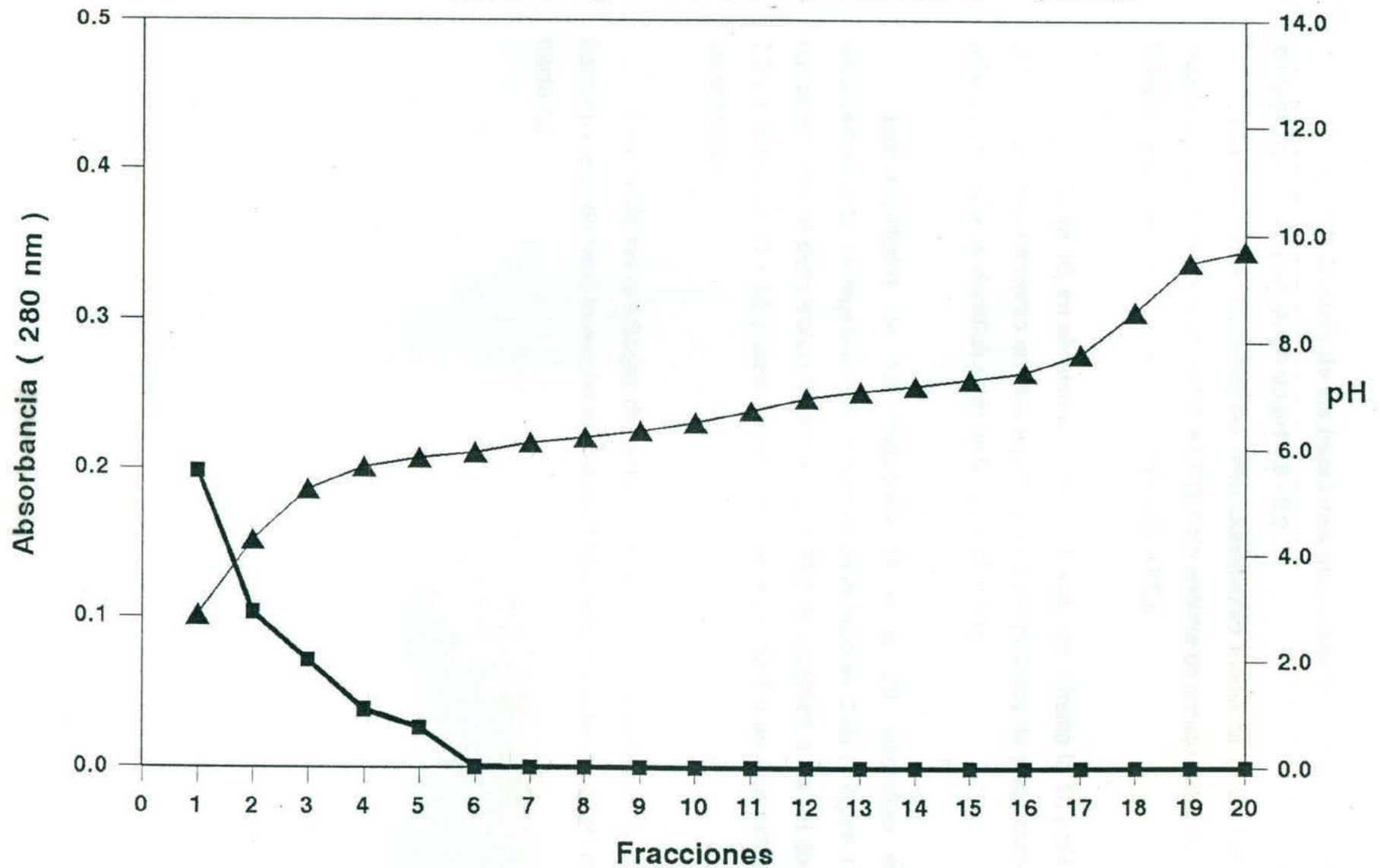


FIGURA 15. pH Y ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL REFRACCIONAMIENTO MEDIANTE IEF EN FASE LIQUIDA CON UN RANGO DE pH 6.0 - 8.0. (■) Absorbancia, (▲) pH .

4.4.3.1. Análisis de las fracciones obtenidas del refraccionamiento en fase líquida con un rango de pH 6.0 - 8.0 .

Las fracciones obtenidas del refraccionamiento mediante el IEF en fase líquida se sometieron a SDS-PAGE e EITB. Este análisis se realizó para identificar la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa.

En la figura 16, se observa la EITB, las fracciones 1 hasta la 10 (pH 2.8 - 6.5) del refraccionamiento en fase líquida. La banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa se identificó al pH de 6.5 (fracción 10).

Los resultados de las fracciones 11 a la 20 obtenidas en el refraccionamiento, se muestran en los carriles de la porción C de la figura 17. La banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa se identificó a los pH de 6.7 - 7.2 (Fracciones 11 - 14), pero se observó que a pH de 6.9 se encuentra más concentrada.

Enlazando los resultados de la figura 16 y 17, se puede apreciar que la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa se enfoca desde un pH de 6.5 hasta 7.2.

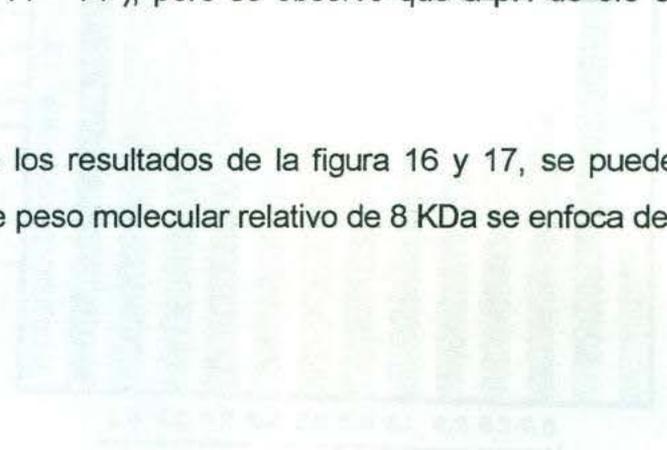


FIG. 16. EITB DE LAS FRACCIONES 1 A LA 10 DEL REFRACCIONAMIENTO EN FASE LIQUIDA CON UN RANGO DE pH 6.0 - 8.0. LA BANDA PROTEICA DE PESO MOLECULAR RELATIVO DE 8 KDa SE IDENTIFICÓ AL pH DE 6.5 (FRACCIÓN 10).

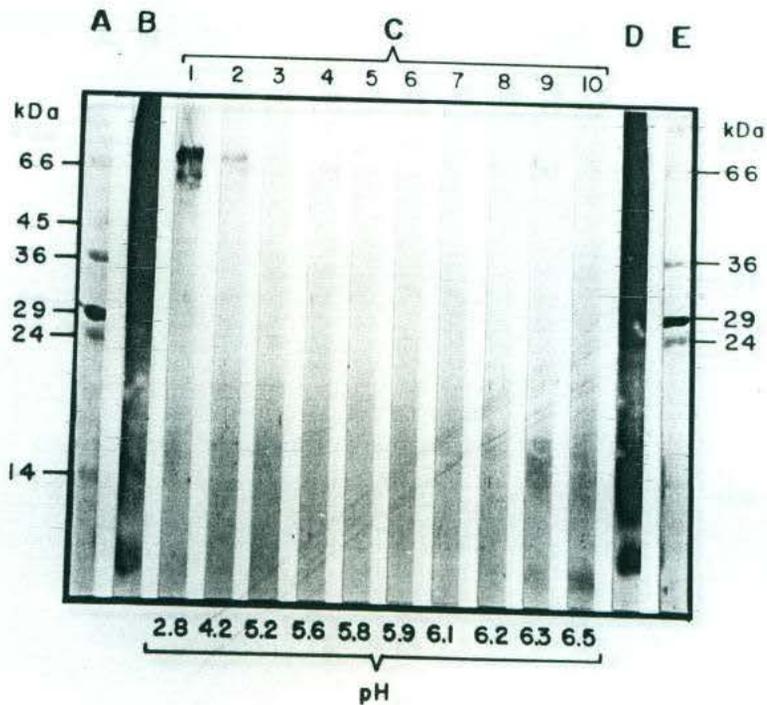


FIGURA 16. EITB DE LAS FRACCIONES 1 - 10 OBTENIDAS POR REFRACCIONAMIENTO EN UN RANGO DE pH 6.0 - 8.0. A y E: Marcadores de peso molecular; B y D: Extracto IC:MC; C: Fracciones obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

POSDOCTORAL EN INMUNOPATOLOGÍA DE PASADILLA

En este experimento se analizaron los cambios en la inmunidad, el suero de un paciente con amibiasis invasiva, el cual fue fraccionado en 10 fracciones mediante IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva, el cual fue fraccionado en 10 fracciones mediante IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva, el cual fue fraccionado en 10 fracciones mediante IEF en fase líquida.

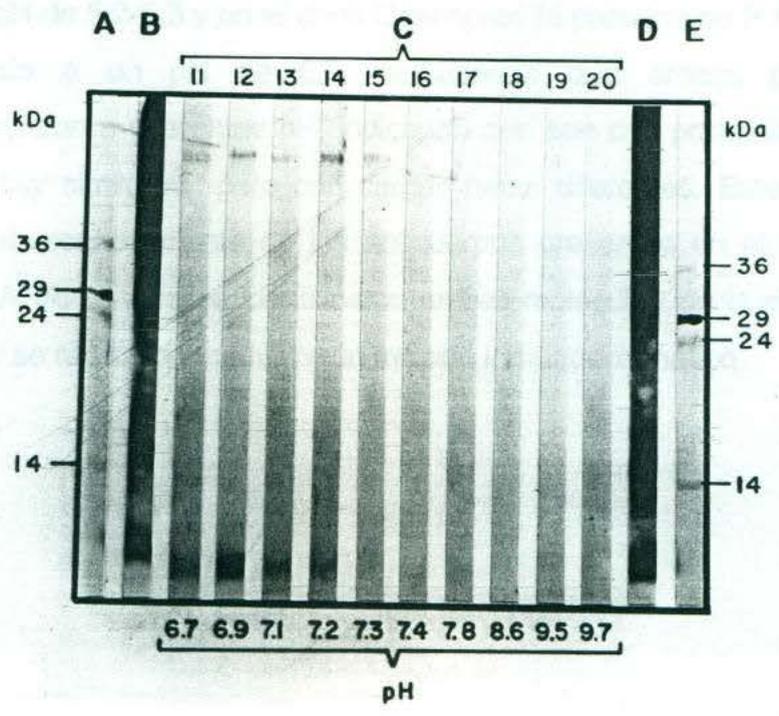


FIGURA 17. EITB DE LAS FRACCIONES 11 - 20 OBTENIDAS POR REFRACCIONAMIENTO EN UN RANGO DE pH 6.0 - 8.0. A y E: Marcadores de peso molecular; B y D: Extracto IC:MC; C: Fracciones obtenidas por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida. Se utilizó el suero de un paciente con amibiasis invasiva.

4.5 ANALISIS MEDIANTE IEF-ETIB DE LAS PROTEINAS AISLADAS POR ISOELECTROENFOQUE EN FASE LIQUIDA.

En esta etapa experimental, las proteínas aisladas a los pH de 5.2-5.3 y 6.9 (de la figura 13 y 17 respectivamente) por refraccionamiento en fase líquida, se sometieron a un IEF en gel de poliacrilamida; al terminar la electroforesis del IEF, las moléculas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana se incubó con un suero de un paciente con amibiasis invasiva y se procedió a utilizar la misma metodología de la EITB anteriormente mencionada . Los resultados se muestran en la figura 18, en el carril A se aplicaron marcadores de pI conocido, en el carril B se sometió la proteína de P.M. relativo de 8 KDa aislada a los pH de 5.2-5.3 y en el carril C se aplicó la proteína de P.M. relativo de 8 kDa aislada a un pH de 6.9, se aprecia que ambas proteínas se electroenfocalizaron a diferentes pH, indicando que son dos proteínas con pesos moleculares muy similares pero con cargas netas diferentes. Este hallazgo se observó por el reconocimiento de los anticuerpos presentes en el suero de un paciente con AHA, ya que se identificaron ambas moléculas en la membrana de nitrocelulosa y se revelaron mediante un método inmunoenzimático.

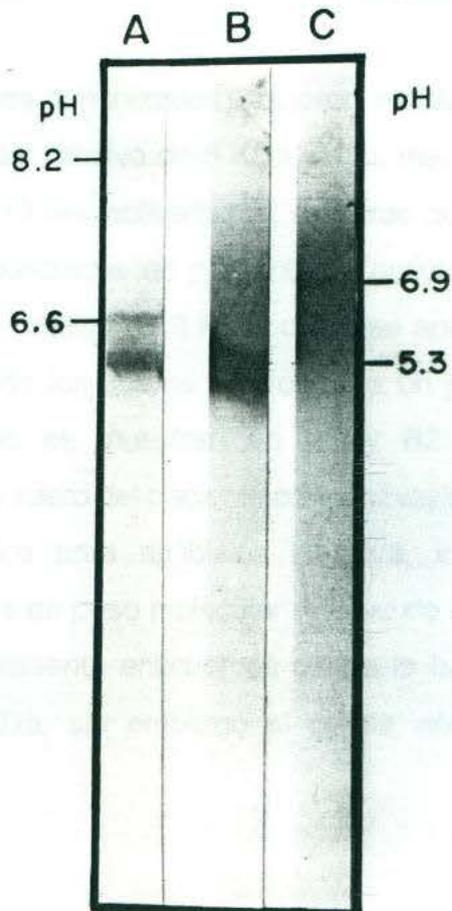


FIGURA 18. EITB DEL IEF EN GEL DE LAS PROTEINAS AISLADAS POR REFRACCIONAMIENTO EN FASE LIQUIDA. A: Marcadores de pI conocido; (Anhidrasa carbónica pI 6.6, Lentil lectina pI 8.2) B. Proteína de P.M. relativo de 8 KDa aislada a un pH de 5.2-5.3. C. Proteína de P.M. relativo de 8 KDa aislada a un pH de 6.9.

4.6. IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS CONTRAS LAS PROTEINAS DE P.M. RELATIVOS DE 8 kDa EN LOS SUEROS DE LOS ANIMALES INMUNIZADOS CON EXTRACTOS TOTALES AMIBIANOS .

Para identificar la inducción de anticuerpos contra las proteínas de peso molecular relativo de 8 kDa, en sueros de ratones y conejos inmunizados con extractos totales amibianos, se utilizó la EITB, además se utilizaron sueros de pacientes con amibiasis invasiva y de sujetos sanos como controles.

Los conejos y ratones inmunizados indujeron anticuerpos contra la banda antigénica de peso molecular relativo de 8 KDa, estos resultados se observan en B3, B4 y B6 de la figura 19 respectivamente, mientras que los sueros de estos animales antes de ser inmunizados no presentaron anticuerpos contra la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa, como se aprecia en B5 y B7 de la figura 19. Los resultados de los sueros controles de un paciente con amibiasis invasiva y un sujeto sano se muestran en B1 y B2 respectivamente. Los anticuerpos presentes en el suero del paciente con amibiasis invasiva, reconoció el patrón antigénico específico para amibiasis invasiva, incluyendo las bandas proteicas inmunodominantes de peso molecular relativo de 8 KDa, mientras que el suero del sujeto sano no presentó anticuerpos contra la banda proteica de peso molecular relativo de 8 KDa, sin embargo sí posee anticuerpos contra otras proteínas de los trofozoítos.

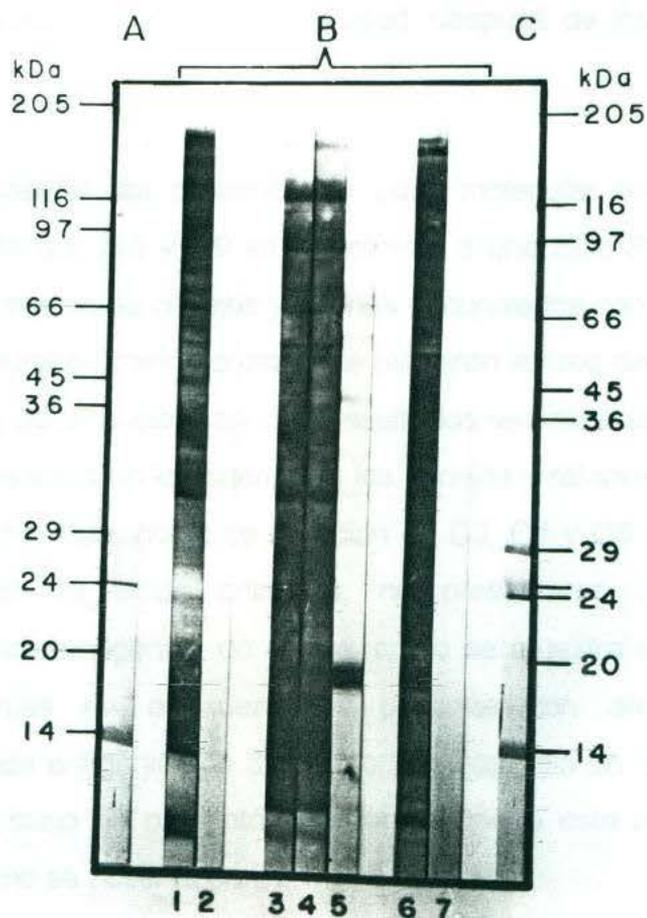


FIGURA 19. SUEROS ANALIZADOS MEDIANTE EITB, IDENTIFICANDO ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEINA DE P.M. RELATIVO DE 8 KDa DE Entamoeba histolytica. A y C: Marcadores de alto y bajo peso molecular, se incubaron con un suero de un paciente con AHA. B: Extracto IC:MC. B1 Suero de un paciente con amibiasis invasiva, B2 suero de un sujeto sano. B3 y B4: sueros de conejos inmunizados con extractos totales amibianos. B5: suero de un conejo sin inmunizar. B6 suero de un ratón inmunizado con extractos totales amibianos y B7 suero de un ratón antes de ser inmunizado.

4.7. COMPROBACION DE LA CONSERVACION ANTIGENICA DE LA PROTEINA DE P.M. RELATIVO DE 8 kDa AISLADA POR IEF EN FASE LIQUIDA.

Este análisis se realizó para conocer si las proteínas de peso molecular relativo de 8 kDa conservaron su antigenicidad, después de los tratamientos de IEF en fase líquida.

Para este análisis las proteínas de peso molecular relativo de 8 kDa aisladas a los pH de 5.2, 5.3 y 6.9 se sometieron a una SDS-PAGE e EITB, en donde se utilizaron sueros de conejos y ratones inmunizados con extractos totales amibianos y sin inmunizar; como controles se utilizaron sueros de un paciente con amibiasis invasiva y de un sujeto sano, los resultados se observan en la figura 20. Los anticuerpos presentes en los sueros de los conejos y ratones reconocieron la banda antigénica de 8 kDa, como se aprecian en C3, C4 y C6 respectivamente. Los sueros control de estos animales, no presentaron anticuerpos que reconocieran la banda antigénica de 8 kDa, como se muestra en C5 y C7. Los anticuerpos presentes en el suero del paciente con amibiasis invasiva reconocieron la banda antigénica de 8 kDa, como se aprecia en C1, mientras que el suero del sujeto sano no presentó anticuerpos contra esta molécula de bajo peso molecular, como se observa en C2.

Los resultados anteriores indican que la proteína de 8 kDa, mantuvo su antigenicidad, ya que fue reconocida por los anticuerpos presentes en los sueros de los animales inmunizados y por los anticuerpos séricos del paciente con amibiasis invasiva.

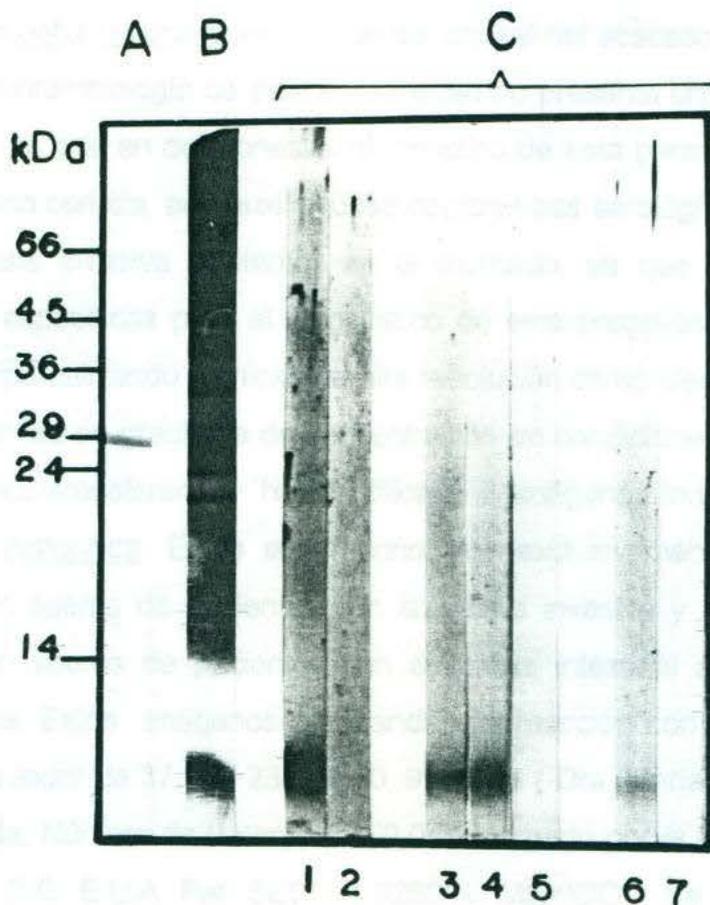


FIGURA 20. EITB DE LA BANDA PROTEICA DE P.M. RELATIVO DE 8 kDa AISLADA POR IEF EN FASE LIQUIDA. A: Marcadores de alto y bajo peso molecular; B: Extracto IC:MC. C: Proteína de P.M. relativo de 8 kDa aislada por refraccionamiento en fase líquida. C1: suero de un paciente con amibiasis invasiva, C2: suero de un sujeto sano. C3 y C4: sueros de conejos inmunizados con extractos totales amibianos. C5: suero de un conejo sin inmunizar. C6: suero de un ratón inmunizado con extractos totales amibianos y C7: suero de un ratón antes de ser inmunizado.

CAPITULO 5

DISCUSION

Entamoeba histolytica es el agente causal del absceso hepático amibiano (AHA), la sintomatología de esta enfermedad no presenta un patrón clínico bien definido, por lo que en ocasiones el diagnóstico de esta parasitosis no se puede establecer con certeza, aún auxiliándose con pruebas serológicas de diagnóstico para amibiasis invasiva existentes en el mercado, ya que no son totalmente sensibles y específicas para el diagnóstico de esta parasitosis. En este sentido nuestro equipo utilizando técnicas de alta resolución como electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente de concentración en condiciones desnaturalizantes e inmunoelectrotransferencia ha identificado 7 antígenos inmunodominantes de Entamoeba histolytica. Estos son reconocidos exclusivamente por anticuerpos presentes en sueros de pacientes con amibiasis invasiva y no por anticuerpos presentes en sueros de pacientes con amibiasis intestinal asintomática ni por sujetos sanos. Estos antígenos dan bandas de reacción con pesos moleculares relativos alrededor de 37, 25, 23, 11, 10, 9, 8 kDa (Dra. María del Socorro Flores de Castañeda; Número de Patente 5,459,042 otorgado por el Depto. de patentes, Washington D.C. E.U.A. Pat. SECOFI 926019, MEXICO). La banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa, ha sido más estudiada y se ha encontrado que los anticuerpos presentes en los pacientes con amibiasis invasiva, reconocen la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa en un 99% de los casos, es antigénicamente estable desde pH 3 hasta pH 10, además esta proteína ha sido identificada en los sobrenadantes del medio de cultivo (20, 54).

En base a estos antecedentes se planteó el aislamiento de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, a partir de un extracto IC:MC de Entamoeba histolytica mediante isoelectroenfoque en fase líquida y la comparación de su antigenicidad contra extractos IC:MC amibianos. Primero nos propusimos aislar

esta molécula de bajo peso molecular mediante electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes, para posteriormente aplicarla a un isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, para caracterizar el punto isoeléctrico. Posteriormente se sometió un extracto IC:MC amibiano, a IEF en fase líquida para aislar la molécula de peso molecular relativo de 8 kDa. Finalmente se comparó la antigenicidad de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, aislada por IEF en fase líquida, contra la molécula de peso molecular relativo de 8 kDa presente en extractos IC:MC amibianos.

Para el aislamiento de la proteína de 8 kDa de Entamoeba histolytica HK-9, se partió de trofozoítos cultivados en medio de cultivo TYI-S-33, cosechados en su fase logarítmica, lavados con PBS, congelados y liofilizados. La fracción IC:MC de Entamoeba histolytica se obtuvo a partir del tratamiento con Cloroformo-Metanol y Calor; esta fracción se aplicó a SDS-PAGE preparativa y las proteínas fueron electroeluidas. Los electroeluidos proteicos se analizaron mediante SDS-PAGE e EITB. Al revelar la EITB, se hizo evidente la presencia de la molécula de peso molecular relativo de 8 kDa aunque también, se identificaron algunas bandas antigénicas con pesos moleculares de 67, 29, 16 y 14 kDa aproximadamente; probablemente estas bandas antigénicas sean agregados protéicos o contaminantes y con la sensibilidad de estas técnicas son detectados. Este mismo fenómeno ha sido reportado por Mardian, Öfverstedt y Otto al aislar proteínas mediante electroelución y al analizar la presencia de las mismas mediante SDS-PAGE (42, 49, 50). Otros investigadores como Young y cols, caracterizaron una proteína amibiana formadora de poros, con un peso molecular relativo de 30 kDa y durante los tratamientos observaron que a temperatura de 4°C, se formaban agregados por arriba de los 200 kDa (79).

Para eliminar estos artefactos, se hizo un pool de los electroeluidos protéicos que poseían la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, y se sometieron a una SDS-PAGE preparativa y electroelución en condiciones

desnaturalizantes. La identificación se hizo mediante SDS-PAGE con tinción de nitrato de plata y EITB, observando la presencia de una sola banda proteica de peso molecular relativo de 8 kDa; por lo que la SDS-PAGE preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes fueron aceptables para el aislamiento de esta molécula. Resultados similares han sido reportados por Hunkapiller y cols. que han aislado microgramos de proteínas mediante esta tecnología, que posteriormente han sido utilizadas para análisis de secuencia aminoacídica (28).

Otros investigadores han tenido éxito al purificar proteínas de amibas por electroelución, como lo demuestran los trabajos realizados por Rosales y cols (59) quienes lograron purificar dos proteínas de 23.5 y 25 kDa de Entamoeba histolytica. También Rigother y cols (58) lograron aislar en condiciones nativas una proteína amibiana de 112 kDa. Ambos grupos lograron realizar estudios de actividad biológica y secuenciación aminoacídica.

Para caracterizar el punto isoeléctrico de la molécula inmunodominante de peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica HK-9, aislada en condiciones desnaturalizantes, fue necesario eliminar sales y el detergente aniónico (SDS) mediante diálisis y cromatografía de intercambio iónico. Después de cada paso fisicoquímico se demostró la presencia de esta molécula en el electroeluido, mediante SDS-PAGE e EITB, esto con el fin de verificar que no se hubiera perdido durante la manipulación. Posteriormente este electroeluido se sometió a isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida y se identificó mediante tinción con azul de Coomassie G-250. En el carril donde se aplicó el electroeluido, se identificaron 3 bandas protéicas a los pH de 4.7, 5.9 y 6.75. Estos resultados sugieren que se trata de 3 isoformas protéicas con cargas netas diferentes, aunque se sabe que las proteínas al ser manipuladas durante el aislamiento pueden sufrir daños durante la eliminación de sales y el detergente, produciendo artefactos, en donde pueden perder grupos cargados, daño proteolítico o agregados de la misma

proteína, proporcionándole a la proteína diferente carga neta (52, 25). Otro factor que interviene en la carga neta de una proteína, es el detergente aniónico (SDS) que puede estar unido a la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa y que pudiera estar alterando la carga neta de esta molécula. Weber y Kuter (77), han logrado recuperar la actividad catalítica de varias enzimas, que habían sido perdidas con el SDS. Empleando cromatografía de intercambio iónico y con un sistema de detección de radiomarcaje lograron recuperar un 95% de la proteína sin SDS. Por lo que descartamos que la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, éste severamente alterada por cargas que le pudiera estar confiriendo el SDS.

Cabe mencionar que también otros investigadores han tenido resultados similares a los nuestros como Bruchhaus y cols., quienes aislaron una proteína de 25 kDa de Entamoeba histolytica y al someterla a isoelectroenfoque en gel, se identificaron 3 isoformas con puntos isoelectricos distintos (11). También Rosenberg y cols. han identificado isoformas proteicas de Entamoeba histolytica, con un peso molecular relativo de 26 - 30 kDa, las cuales fueron separadas mediante cromatografía de intercambio iónico a los pH de 5.3 y 6.8 (60).

Existen en la literatura tablas de proteínas con sus respectivos p_i , determinados por IEF en gel de poliacrilamida y se han reportado proteínas hasta con 10 isoformas y que se distribuyen a lo largo de 4 unidades de pH (57, 41). Para establecer las isoformas de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica es necesario realizar más estudios bioquímicos y de biología molecular, para establecer o determinar las propiedades bioquímicas de estas moléculas.

Para el aislamiento de esta molécula de bajo peso molecular mediante IEF en fase líquida, se partió de un extracto IC:MC de Entamoeba histolytica . Este fue sometido al IEF en fase líquida empleando anfilitos con un rango de pH de 3 a 10. Se sabe que las proteínas al ser sometidas en el IEF en fase líquida, pueden sufrir

varios fenómenos al acercarse a su punto isoeléctrico, como la repulsión entre ellas debido a las cargas eléctricas similares; también pueden existir interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y que pueden provocar la unión entre ellas alterando su carga neta, también existen proteínas que al llegar a su punto isoeléctrico se precipitan. Para prevenir estos fenómenos empleamos un solución solubilizadora que contenía un agente caotrópico, un detergente zwitteriónico, un aditivo y una sal, con la finalidad de mantener la estabilidad y solubilidad de las proteínas del extracto IC:MC amibiano (8, 45). Ninguno de estos agentes interfiere en la formación del gradiente de pH, aunque las sales a la concentración empleada en esta tesis interfieren de una manera mínima. Se obtuvieron 20 fracciones del IEF en fase líquida con diferentes pH, desde 3.1 hasta 10.5. Al analizar cada una de las fracciones se observó que 2 fracciones presentaron un color verde - amarillo, proveniente de impurezas que interfería con la lectura de 280nm. Este color se eliminó al dializar estas fracciones.

Al analizar cada una de las fracciones del IEF en fase líquida mediante SDS-PAGE y revelando mediante tinción con nitrato de plata, se observó que el mayor contenido proteico se enfocaba desde un pH de 4.6 a 6.9. A partir de las fracciones con pH de 8.1 hasta 10.5 se observó un patrón de bandas proteicas muy similar, esto se puede deber a la derivación catódica, ya que algunas proteínas se pueden quedar atrapadas a esos pH, y no pueden migrar al pH en donde su carga neta es cero (78). Los pH de las fracciones de los extremos, fuera de los rangos de los anfolitos empleados, ha sido también reportado por Hirayama y cols. cuando aislaban proteínas de membrana (27).

Al analizar mediante EITB cada una de las fracciones del IEF en fase líquida, se encontró que la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, se isoelectroenfocalizaba desde un pH de 4.4 hasta 8.1, distribuyéndose casi en 4 unidades de pH. Cabe mencionar que cuando existen isoformas proteicas se pueden obtener resultados de este tipo. Egen y cols., identificaron 5 isoformas de

anticuerpos monoclonales mediante un radioligando y revelando mediante autoradiografía, y al someter a IEF en fase líquida, estos anticuerpos se isoelectroenfocalizaron en 10 fracciones a diferentes pH (16).

La siguiente etapa, fue el refraccionamiento. Se hizo un pool de las fracciones con un pH de 4.6 a 5.4 y se volvió a someter a IEF en fase líquida con un rango de pH de 4.0 a 6.5. Por otro lado se hizo un pool de las fracciones con un pH de 6.5 a 7.4 y se sometieron a IEF en fase líquida utilizando un rango de pH de 6.0 a 8.0 .

Al analizar las fracciones obtenidas del refraccionamiento por IEF en fase líquida del rango de pH 4.0 - 6.5, se logró detectar la presencia de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa, desde un pH de 4.4 hasta 5.3. A partir de un pH 5.2-5.3, la proteína de P.M. relativo de 8 kDa, se encontraba aislada de otros componentes de mediano y alto peso molecular.

Al analizar las fracciones del refraccionamiento por IEF en fase líquida, en donde se empleó un rango de pH 6 - 8, se logró identificar la proteína de 8 kDa, desde un pH de 6.5 hasta 7.2. Sin embargo esta proteína se encuentra más concentrada a un pH de 6.9. En todas las fracciones aparece una banda antigénica de aproximadamente 67 kDa, por lo que creemos que se trate de un artefacto o contaminante debido a que este se encuentra distribuido en las 20 fracciones del refraccionamiento; de esta manera podemos sugerir que la proteína de 8 kDa se encuentra aislada y se concentra a un pH de 6.9.

En los refraccionamientos mediante IEF en fase líquida se logró el aislamiento de 2 isoformas de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica . Además se logró incrementar el grado de pureza de la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa por refraccionamiento mediante IEF en fase líquida.

Las 2 proteínas aisladas a los pH de 5.2 - 5.3 y 6.9 de peso molecular relativo de 8 kDa, se sometieron a un isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, esto se realizó para conocer si ambas proteínas se focalizaban a diferentes pH en una matriz sólida (gel de poliacrilamida). Se observó que ambas proteínas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con amibiasis invasiva y además se isoelectroenfocalizaron a diferentes pH, comprobando que las moléculas de peso molecular relativo de 8 kDa poseen diferentes cargas netas.

La última etapa que se planteó en este trabajo, fue determinar si los anticuerpos inducidos en conejos y ratones con un extracto crudo de Entamoeba histolytica, reconocían la proteína de bajo peso molecular aislada por isoelectroenfoque. Primero se buscó la presencia de anticuerpos contra la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa en los sueros de conejos inmunizados con extractos totales amibianos mediante EITB. Al analizar los sueros de los conejos inmunizados se encontraron anticuerpos contra proteínas de pesos moleculares relativos desde 8 hasta 153 kDa. Este mismo rango fue reconocido por los anticuerpos anti-amiba presentes en los sueros de los ratones inmunizados con extractos totales amibianos. En base a estos resultados, tanto los conejos como los ratones produjeron anticuerpos contra la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa y contra otras moléculas de mediano y alto peso molecular de Entamoeba histolytica.

Recientemente Leippe y cols (34, 35, 36) purificaron una proteína amibiana de 4-5 kDa. Al clonar el gen que codifica para esta molécula, se dedujo que es una proteína que consta de 77 aminoácidos con un peso molecular de 8244 Daltons. Esta molécula la utilizaron para inmunizar conejos y obtener anticuerpos contra la proteína de 8 kDa. Estos datos sugieren, que si inmunizamos con la proteína de peso molecular relativo de 8 kDa de Entamoeba histolytica, probablemente pudiera ser inmunogénica en conejos y en ratones.

Para saber si las proteínas de peso molecular relativo de 8 kDa aisladas por IEF en fase líquida, eran antigénicamente estables a los tratamientos a los que fueron sometidas, se usó EITB. Se utilizó como muestra un pool de ambas isoproteínas de 8 kDa (pl 5.2, 5.3 - 6.9), una vez electrotransferidas se incubaron con los anticuerpos presentes en los sueros de ratones y conejos que fueron inmunizados con extractos totales amibianos. Se observó que esta molécula fue reconocida por los anticuerpos indicando que se conservó su antigenicidad.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

1. Las proteínas inmunodominantes de 8 kDa de Entamoeba histolytica se aislaron mediante electroforesis preparativa y electroelución en condiciones desnaturalizantes.
2. Las proteínas de 8 kDa de Entamoeba histolytica presentaron 3 puntos isoeléctricos, en IEF analítico en geles de poliacrilamida.
3. Se logró el aislamiento de las proteínas de 8 kDa de Entamoeba histolytica, por refraccionamiento mediante isoelectroenfoque en fase líquida.
4. Las moléculas de bajo peso molecular de Entamoeba histolytica conservaron su antigenicidad, después de los tratamientos a los que fueron sometidas durante su aislamiento.

CAPITULO 7

APORTACIONES ADICIONALES

Durante esta investigación, se obtuvieron resultados adicionales a los objetivos planteados en esta tesis. Entre ellos fue la identificación de la proteína de peso molecular relativo de 8 KDa de Entamoeba histolytica HK-9 en la cepa amibiana HM-1:IMSS.

Las moléculas de bajo peso molecular fueron identificadas mediante SDS-PAGE e EITB en los sobrenadantes del medio de cultivo TYI-S-33, después de cosechar las cepas de Entamoeba histolytica HK-9 y HM-1:IMSS. Además mediante electroelución se lograron aislar estas proteínas a partir del sobrenadante del medio de cultivo.

También se lograron aislar por refraccionamiento mediante isoelectroenfoque en fase líquida, las proteínas de peso molecular relativo de 8 KDa de Entamoeba histolytica, presente en el sobrenadante del medio de cultivo TYI-S-33.

El sobrenadante del medio de cultivo donde crecieron las amibas es una fuente útil de antígeno para el aislamiento y no de desecho como otros medios de cultivo.

CAPITULO 8

PERSPECTIVAS

El gran potencial que ofrecen las moléculas amibianas de bajo peso molecular aisladas en estas condiciones, nos brindan la oportunidad de realizar una gran cantidad de estudios, tanto para delucidar aspectos básicos a nivel molecular, como para desarrollar proyectos aplicativos.

Se tiene contemplada la clonación molecular de esta proteína de peso molecular relativo de 8 KDa de Entamoeba histolytica, mediante técnicas de Ingeniería Genética. Se realizarán estudios de interacción celular y bioquímicos, con células del sistema inmune, hepatocitos y con cepas de Entamoeba histolytica y Entamoeba dispar, dilucidándose además la localización de esta molécula y los factores que desencadenan su producción en este parásito.

La purificación de las moléculas de 8 KDa por la metodología previamente descrita en este trabajo, contribuirá en la producción a gran escala de dichas moléculas. Estas proteínas serán utilizadas para elaborar pruebas serológicas de diagnóstico para amibiasis invasiva, que sean económicas, sencillas y rápidas, pero altamente específicas y sensibles.

APENDICE A

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33

Reactivos	Cantidad
Peptona Biotriptasa con extracto de Levadura	3.0 gr
Dextrosa	1.0 gr
Cloruro de Sodio	0.2 gr
Fosfato de Potasio Monobásico	0.06 gr
Fosfato de Potasio Dibásico	0.1 gr
Acido L-ascórbico	0.02 gr
Clorhidrato de L-Cisteína	0.1 gr
Citrato de Amonio Férrico	2.28 mg

Estos reactivos se disolvieron en 87 ml de agua tridestilada, después se ajustó el pH a 6.8 con Hidroxido de Sodio 1 N, esta solución se filtró con papel Whatman #1 y se esterilizó a 121°C por 15 min., después que tomó temperatura ambiente, el medio de cultivo TYI-S-33 se complementó adicionandole 10 ml de suero bovino inactivado (56°C/30min.) y 3 ml de vitaminas "mezcla 107", bajo condiciones esteriles.

Preparación de la solución de vitaminas "Mezcla 107"

1. Vitaminas B, solubles en agua:

Solución A. Se pesaron 62.5 mg de niacina (ácido nicotínico) y 125 mg de ácido p-aminobenzoico, estos se disolvieron en 100 ml de agua destilada hirviendo y se llevaron a un volumen de 150 ml.

Solución B. Se pesaron 62.5 mg de niacinamida, 62.5 mg de piridoxina HCL, 25 mg de pantotenato de calcio, 125 mg de i-inositol y 1250 mg de cloruro de colina, se disolvieron en 100 ml de agua destilada y se llevaron a un volumen de 150 ml.

Solución C. Se pesaron 25 mg de riboflavina y se adicionaron 75 ml de agua destilada, esta mezcla se disolvió con la ayuda de hidróxido de sodio 0.1 N adicionandolo gota a gota, el volumen total fue de 100 ml.

Se combinaron las soluciones A, B, C y se aforaron a un volumen de 500 ml con agua destilada.

2. Solución de biotina.

Se pesaron 30 mg de d-biotina, y se disolvieron en 200 ml de agua destilada con la ayuda del hidróxido de sodio 0.1 N, llevandose a un volumen de 300 ml.

3. Solución de ácido fólico.

Se pesaron 30 mg de ácido fólico, y se disolvieron en 200 ml de agua destilada con la ayuda de hidróxido de sodio 0.1 N, llevandose a un volumen de 300 ml.

4. Solución de vitaminas liposolubles A, D y K.

Solución A. Se pesaron 300 mg de vitamina D2 (calciferol) y 300 mg de vitamina A (alcohol cristalina). La vitamina D2 se disolvió en 63 ml de alcohol etílico al 95% (v/v) y después se le adicionó la vitamina A, para disolverla.

Solución B. Se pesaron 60 mg de vitamina K (bisulfito de sodio menadiona) y se disolvieron en 300 ml con una solución acuosa de Tween 80 al 5%.

La solución B se mezcló con la solución A y se llevó a un volumen de 3000 ml, con agua destilada.

5. Solución de vitamina E.

Se pesaron 25 mg de vitamina E (acetato de α -tocoferol) y se disolvieron en 250 ml de agua destilada.

NOTA (modificación). Esta vitamina es aceitosa, por lo tanto segun la técnica no se disuelve en agua destilada por lo que se disolvió en un poco de etanol absoluto, luego se agrego agua y si se precipitá, se vuelve agregar etanol hasta llegar a el volumen deseado.

La mezcla de vitaminas de trabajo, se preparó por la combinación de las cinco soluciones stock, en la siguiente proporción:

Stock	Cantidad
Vitamina B solubles en agua	500 ml
Solución de biotina	250 ml
Solución de ácido fólico	250 ml
Solución de vitaminas liposolubles A,D y K	2500 ml
Solución de vitamina E	250 ml
<hr/>	
Volumen total	3750 ml

A esta solución se el denomina mezcla stock de vitaminas NCTC 107. Se deja reposar toda la noche a 4°C.

Preparacion de vitaminas extra adicionadas al medio BISS-33.

Solución Stock 1.

Se pesaron 100 mg de ácido fólico y se disolvieron en 100 ml de alcohol etílico absoluto.

Solución Stock 2.

Se pesaron 40 mg de vitamina B12 y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Solución Stock 3.

Se pesaron 50 gramos de Tween 80 y se disolvieron en 100 de alcohol etílico absoluto.

Para preparar la mezcla stock de vitaminas, ácido tióctico, B12 y Tween 80 se utilizaron las siguientes cantidades:

Solución Stock	Cantidad
Solución stock de ácido tióctico	15 ml
Solución stock de B12	45 ml
Solución stock de tween 80	15 ml
Agua destilada	675 ml
Aforar a 750 ml con agua destilada	

Los 750 ml de esta mezcla stock, se adicionaron a los 3750 ml de la mezcla NCTC 107, después se ajustó el pH a 7.0 - 7.2 con hidróxido de sodio al 0.1 N. La solución se esterilizó por filtración (filtros tipo sela #03 o millipore 0.22m) y se hicieron pruebas de esterilidad. La solución se almacenó a -20°C.

APENDICE B

PREPARACION DE REACTIVOS

1. Preparación de amortiguadores

Amortiguador salina fosfatos (PBS) 0.15 M, pH 7.4

Reactivo	Cantidad
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	1.22 gr
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 gr
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	0.20 gr
Cloruro de potasio (KCl)	0.20 gr

Estos reactivos se disolvieron en agua y se aforaron a un volumen de 1000 ml con agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1 M.

Solución Diamond 0.1 M

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	6.5 gr
Fosfato de Potasio Dibásico (K_2HPO_4)	2.8 gr
Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)	0.5 gr

Estos componentes se disolvieron en agua bidestilada y se aforaron con la misma a un volumen de 100 ml, enseguida se ajustó el pH a 7.4 - 7.5 con NaOH 1 M.

Amortiguador de muestra Tris-HCl 0.049 M, pH 6.8 .

Reactivo	Concentración
Trizma base	0.049 M
Glicerol	10 %

Ambos reactivos se disolvieron en 17.5 ml de agua bidestilada, y el pH se ajustó a 6.8 con HCl concentrado. Enseguida se añadieron los siguientes reactivos:

SDS	2 %
Azul de bromofenol	0.01%

Se mezclaron y se aforaron a un volumen de 50 ml con agua bidestilada, este amortiguador se conserva a temperatura ambiente.

Amortiguador Tris-HCl, pH 6.8 para gel de empaquetamiento

Reactivo	Concentración
Trizma base	1.25 M

Este reactivo se disolvió en 30 ml de agua bidestilada y se ajustó el pH a 6.8 con HCl concentrado y se aforó a 50 ml con agua bidestilada.

Amortiguador Tris-HCl, pH 8.8 para gel de separación

Reactivo	Concentración
Trizma base	3.02 M

Se disolvió en 30 ml de agua bidestilada y se ajustó el pH a 8.8 con HCl concentrado y se añadió:

EDTA	0.2 M
------	-------

Se aforó a un volumen de 50 ml con agua bidestilada. Este amortiguador se guarda a 4°C.

Amortiguador para cámara de electroforesis

Reactivo	Concentración
Trizma base	50 mM
Glicina	384 mM
SDS 20%	0.01 %

Las cantidades de los reactivos mencionados se disolvieron en 1000 ml de agua bidestilada. La solución tiene aproximadamente un pH de 8.3, y se guarda a 4°C.

Amortiguador para cámara de Inmunolectrotransferencia

Reactivo	Concentración
Trizma base	25 mM

Glicina	192 nM
Metanol	20 %

Los dos primeros reactivos se disolvieron en 500 ml de agua bidestilada, después se añadió el metanol y se aforaron a un volumen de 1000 ml con agua bidestilada. Este amortiguador se guardó a 4°C.

2. Preparación de marcadores

Preparación de marcadores de bajo peso molecular.

Se utilizó el Stock No SDS-7 Dalton Mark VII-L que contiene 3.5 mg de una mezcla liofilizada de 7 proteínas, que son:

Proteína	Peso Molecular (Daltons)
Albúmina sérica bovina	66,000
Albúmina de huevo	45,000
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	36,000
Anhidrasa carbónica bovina	29,000
Tripsinógeno de pancreas bovino	24,000
Inhibidor de la tripsina de frijol de soya	20,000
a-Lactoalbúmina de leche bovina	14,000

El vial de proteínas liofilizadas (Dalton Mark VII-L) se resuspendió en 1.5 ml de Amortiguador de muestra Tris-HCl 0.049 M, pH 6.8, se mezcló por agitación y se hicieron alícuotas de 20 μ L y se almacenaron a -20°C. Antes de usarse cada alícuota se le añadía el 5% de β -Mercaptoetanol y se calentaba a ebullición por 1 min.

Preparación de una mezcla de marcadores de punto isoelectrico conocido.

Se utilizó una mezcla de marcadores de punto isoelectrico stock IEF-MIX que contiene 1.5 mg de glicina y 40 μ gr de cada una de las siguientes proteínas:

Proteína	Punto Isoeléctrico
Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>	3.6
Inhibidor de la tripsina del frijol de soya	4.6
β -Lactoalbúmina A de leche bovina	5.1
Anhidrasa Carbónica de eritrocitos de bovino	5.65
Anhidrasa Carbónica de eritrocitos de humano	6.6
Mioglobina de corazón de caballo	6.8, 7.2
Deshidrogenasa I-Lactica de músculo de conejo	8.3, 8.4, 8.5
Tripsinógeno de pancreas bovino	9.3

Esta mezcla se reconstituyó con 100 μ L de agua desionizada, teniendo una concentración final de proteínas de 0.4 mg/ml en una solución de glicina 200 mM con un pH de 6.0. Se hicieron alícuotas de 15 μ L y se almacenaron a -20°C.

Preparación individual de marcadores de punto isoeléctrico conocido.

Para la preparación individual de marcadores de punto isoeléctrico se utilizó la misma metodología para cada uno de los marcadores, cada vial contiene 7.51 mg de glicina y 2 mg de las siguientes proteínas:

Proteína	Punto Isoeléctrico
Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>	3.6
Inhibidor de la tripsina del frijol de soya	4.6
Anhidrasa Carbónica de eritrocitos de humano	6.6
Lectina de lenteja <i>lens culinaris</i>	8.2, 8.6, 8.8

A cada vial se le adicionó 0.5 ml de agua desionizada y se agitaron hasta disolver totalmente cada una de las muestras, la concentración stock de cada una de las muestras fue de 4 mg/ml, se hicieron alícuotas de 50 μ L, y se guardaron a -20°C, solamente una alícuota se diluyó a una concentración proteica de 0.4 mg/ml, concentración recomendada por la casa comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adams B.E., MacLead N.I. 1977. Invasive amebiasis. *Medicine*. **56**:315-323.
2. Aley S. B., Scott W. A. and Cohn Z. A. 1980. Plasma Membrane of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* **152**: 391-404.
3. Alper I. Edward, Littler Curt, Monroe S. Lee . 1976. Counter-elektrophoresis in the diagnosis of amebiasis. *The Am. J. Gastroenterol.* **65**:63- 68.
4. Andrews A. T. 1987. *Electrophoresis*. Oxford Science Publications. Second edition. pp 100.
5. Arias Negrete Sergio, Villagomez Castro Julio C., Anaya Fernando, Lira Ortíz Rene. 1991. Entamoeba histolytica : a simplified method to quantify its cytotoxicity. *Intl. J. Parasitol.* **21**:373-375.
6. Bakker - Grunwald T., Wostam C. 1993. Entamoeba histolytica as a model for the primitive eucariotic cell. *Parasitology Today*. **9**:27-31.
7. BIO-RAD. Econo-Pac 10 Ion Retardation Columns with AG 11 A8 Resin. User guide. BIO-RAD Life Science Research Products. 1992. page 1-6.
8. BIO-RAD. Rotofor Isoelectric Focusing Cell. BIO-RAD Life Science Research Products. General Information. 1991. page 1 - 10
9. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248 - 252.
10. Brandt Herman, Perez Tamayo Ruy. 1970. *Amibiasis*. 1a ed. Ed. La Prensa Medica Mexicana. México D.F. pp 31.
11. Bruchhaus I., Bratting N.W., Tannich E. 1992. Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from Entamoeba histolytica. *Arch. Med. Res.* **23**(2): 27-29.
12. Campos R.R., Barranco T.C., Isibasi A.A., Kumate R.J. 1986. Papel de la histamina en la respuesta inmune local anti-amiba. *Arch. Invest. Med.* **17** (Supl.): 273 - 276.

13. Campos R.R., Diaz G.O., Barranco T.C., Isibasi A.A., Kumate R.J. 1986. Papel de la IgA en la eliminación de antígenos amebianos. Arch. Invest. Med. 17: 353 - 358.
14. Castro Garza Jorge Enrique. 1992. Actividad citolítica de Entamoeba histolytica dependiente del potencial oxido-reducción. U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis Doctoral. pp 61.
15. Diamond S. L. 1968. Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebae. J. Parasitol. 54:1047-1056.
16. Egen N.B., Bliss M., Mayersohn M. et.al. 1993. Isolation of monoclonal antibodies to phencyclidine from ascities fluid. BIO - RAD US/EG Bulletin 1475.
17. Flores Castañeda M.S. 1995. Procedure to preserve antigens of Entamoeba histolytica without enzymatic inhibitors. Patent No. 5459042, Department of Patents, Washignton D.C. U.S.A.
18. Flores Castañeda M.S. 1996. Procedimiento para la preservación de antígenos sin usar inhibidores enzimáticos. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, SECOFI Sol. No. 926019, México D.F.
19. Flores C. M. S., Leal G. C. I., Castañeda S. F., Said F. S. Preservation of Entamoeba histolytica trophozoite in cell-free extracts without using protease inhibitors. Parasitol. Res. in press.
20. Flores C. M. S., Mena G. L., Castañeda S. F., Said F.S. 1995. Specific diagnosis of amebic liver abscess using preserved Entamoeba histolytica antigens without enzymatic inhibitors. Hepatology 22(4):128.
21. Flores-Castañeda M. S., Rangel-Orozco R., García-Méndez B. L., Tijerina Menchaca R. SDS-weight markers recognized by human seric antibodies. 1996. Proceedings of the IV Latin American Congress of Immunology and XII Mexican Congress of Immunology. pag XCIII .
22. Gitler C., Mirelman D. 1986. Factor contributing to the pathogenic behavior of Entamoeba histolytica. Am. Rev. Microbiol. 40:437-461.

23. Goldsmith R., Heyneman D, Tropical Medicine and Parasitology. Appleton and Lange. U.S.A. pp 224-232.
24. Guerrant L. Richard. 1986. The global problem of amebiasis: current status, research needs, and opportunities for progress. Rev. Infect. Dis. 8:218-226.
25. Harris E.L.V. y Angal S. 1992. Protein Purification methods. Initial planning. Oxford University press. pp 31.
26. Healy G. R. 1986. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis : epidemiology in the United States. Rev. Infect. Dis. 8:239-246.
27. Hirayama B., Smith C., Wright E. 1993. Rotofor fractionation of intestinal brush border membrane proteins. BIO-RAD US/EG Bulletin 1517.
28. Hunkapiller M. W. , Lujan E., Ostrander F. y Hood L. E. 1983. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Methods in Enzimology. 91: 227 - 236.
29. Kobilier D., and Mirelman D. 1981. Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to monolayers of human cells. J. Infect. Dis. 144(6):539-546.
30. Kretschmer R. Roberto. 1986. Immunology of amebiasis. Amebiasis. Ed. Elseiver. pp. 128-129 .
31. Kretschmer R. Roberto. 1989. Amibiasis, características de su comportamiento inmunológico. Rev. Gastroenterol. Mex. 54:157-162.
32. Krupp M. I. 1969. Modification of the indirect haemagglutination test for amoebiasis. J. Clin. Path. 22:530-533.
33. Laemli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
34. Leippe M., Ebel S., Schoenberger O.L., Horstmann R.D., y Muller-Eberhard H.J. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7659-7663.
35. Leippe M., Tannich E., Nickel R., Goot G., Pattus F., Hortsman R.D., y Muller-Eberhard H.J. 1992. Primary and secondary structure of the pore-f

- forming peptide of the pathogenic Entamoeba histolytica. EMBO Journal. 11(10): 3501- 3506.
36. Leippe Matthias y Muller-Eberhard Hans J. 1994. The pore-forming peptide of Entamoeba histolytica, the protozoan parasite causing human amoebiasis. Toxicology. 87: 5-18.
37. Lin T. M., S. P. Halbert, C. T. Chiu, R. Zarco. 1981. Simple Standardized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Antibodies to Entamoeba histolytica. J. Clin. Microbiol. 13:646-651.
38. Lopez V. V. H., Tijerina M. R., Flores C. M. S. 1994. Correlación en pacientes con absceso hepático amibiano de parámetros clínicos y niveles de anticuerpos contra Entamoeba histolytica . Rev. Gastroenterol. Mex. 59(4):64.
39. Luaces A. L., Barret A. J. 1988. Affinity purification and Biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. Biochem. J. 250:903-909.
40. Lushbaugh W. B., Hofbauer A. F., Pittman F. E. 1984. Proteinase activities of Entamoeba histolytica cytotoxin. Gastroenterol. 87:17-27.
41. Malamud Daniel y Drysdale James W. 1978. Isoelectric points of proteins: a table. Anal. Biochem. 86: 620 - 647.
42. Mardian J.K. y Isenberg I. 1978. Preparative gel electrophoresis: detection, excision, and elution of protein bands from unstained gels. Anal. Biochem. 91: 1 - 12.
43. Martínez Palomo A. 1987. The pathogenesis of amebiasis. Parasitology Today. 3:11-18.
44. Martínez Palomo A. 1989. AMIBIASIS. Ed. Medica Panamericana. pp. 43, 58-62, 79, 164.
45. McNamara Peter J., Glenn Songer J. y Egen N.B. 1993. Isolation of a Toxic Phospholipase D from Corynebacterium pseudotuberculosis. BIO-RAD, US/EG Bulletin 1508.
46. Meerovitch Eugene, Khrisendath Chade. Immunology and Immunopathology of Amoebiasis. Protozoa, Arthropods, and Invertebrates. pp 82-95.

47. Merrill C. R., M. L. Dunau, D. Golman. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **116**:201-207.
48. Muñoz Onofre. 1989. La tecnología de los ochentas, II. Estudios de materia fecal y serología para el diagnóstico de la amibiasis: ¿ Han contribuido a mejorar el diagnóstico del absceso hepático?. *Rev. Gastroenterol. Mex.* **54**:177-180.
49. Ofverstedt L. G., Sundelin J. y Johansson G. 1983. Recovery of proteins on a milligram scale from polyacrylamide electrophoresis gels, exemplified by purification of a retinol-binding protein. *Anal. Biochem.* **134**: 361 - 367.
50. Otto M. y Snejdarkova M. 1981. A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **111**: 111 - 114.
51. Petri A. W. Jr., C. G. Clark, L. L. Braga, B. J. Mann. 1993. International Seminar on Amebiasis. *Parasitology Today.* **9**:73
52. Pharmacia Fine Chemicals. 1982. Isoelectric Focusing principles and methods. pp 5.
53. Pillai Shiu, Mohimen Alope. 1982. A solid-phase sandwich radioimmunoassay for Entamoeba histolytica proteins and the detection of circulating antigens in amoebiasis. *Gastroenterol.* **83**:1210-1216.
54. Rangel Orozco R., Tijerina Menchaca R. y Flores de Castañeda M.S. 1995. Identificación y aislamiento de una proteína inmunodominante de bajo peso molecular presente en el sobrenadante del medio de cultivo TYI-S-33. *Memorias de XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica.* pag. 56.
55. Ravdin I. Jonathan. 1995. Amoebiasis. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 1453 - 1466.
56. Ravdin I. Jonathan and Richard L. Guerrant. 1982. A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* **4**:1185-1207.
57. Righetti P. G. y Tudor G. 1981. Isoelectric points and molecular weights of proteins a new table. *J. Chromatography.* **220**: 115 - 194.

58. Rigother M.C., García Rivera G., Guaderrama M., Orozco E. 1992. Purification and functional characterization of the 112 kDa adhesin of Entamoeba histolytica. Arch. Med. Res. 23(2): 239-241.
59. Rosales Encina J.L., Schlie Guzman M.A. et. al. 1992. Purification and partial characterization of an hemolytic activity from Entamoeba histolytica. Arch. Med. Res. 23(2): 243-248.
60. Rosenberg I., Bach D., Loew L.M., y Gitler C. 1989. Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 237-248.
61. Said Fernández Salvador, Vargas Villarreal Javier, Castro García Jorge. 1986. Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. 17:173-176.
62. Said Fernández Salvador, Vargas Villarreal Javier, Castro García Jorge, Mata Cardenas Benito D., Navarro Marmolejo Leticia, Lozano Garza Gerardo, Martínez Rodríguez Herminia. 1988. PEHPS medium: and alternative for axenic cultivation of Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:249 - 253.
63. Said Fernández S., Mata Cárdenas B. D., Gonzalez Garza M. T., Navarro Marmolejo L., Rodriguez Perez E. 1993. Entamoeba histolytica cysts with a defective wall formed under axenic conditions. Parasitol. Res. 79:200-203.
64. Salata A. Robert, Jonathan I. Raudin. 1986. The interaction of human neutrophils and Entamoeba histolytica increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. J. Infect. Dis. 154:19-26.
65. Sargeant G. P., Williams E. J., Bhojnami B., Kumate J., Jimenez E. 1982. A review of isoenzyme characterization of Entamoeba histolytica with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. Arch. Invest. Med. 13:89-94.
66. Smith John A. 1991. Electroelution of proteins from stained gels. Current protocols in immunology. pp 8.8.1-8.8.5.

67. Stites P. Daniel, Terr I. Abba. 1993. Inmunología básica y clínica. 7 a. ed. Ed. Manual Moderno. pp 800 .
68. Stryer Lumbert. 1988. Biochemistry. W. H. Freeman and Company. Third edition. U.S.A. pp 63-64.
69. Talamas Patricia, Meza Isaura. 1988. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: changes in cytoskeleton organization. J. Cell Biol. **106**:1787-1794.
70. Tamez Treviño Eva. 1995. Estudio de Inmunidad inducida por vía oral contra extractos de Entamoeba histolytica en ratones BALB/c. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Asesora, Flores de Castañeda María del Socorro.
71. Tay Zavala Jorge, Lara Aguilera Ramón, Velasco Castrejon Oscar, Gutierrez Quiroz Manuel. 1988. Parasitología Medica. Ed. Mendez Cervantes. México. pp 29.
72. Towbin, H. T. Staehelin, J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**:4350-4354.
73. Trissl D., Martínez P. A., Arguello C., de la Torre M., Hoz R. 1977. Surface properties related to concanavalin A induced agglutination. J. Exp. Med. **145**:652- 664.
74. Trissl Dorothea. 1982. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Rev. Infect. Dis. **4**:1154-1183.
75. Vinayac V.K., Mohapatra L.N, Tandon B.N., Talwar G.P. 1974. Bentonite f flocculation test for amoebiasis. J. Trop. Med. Hyg. **77** (9): 215-219.
76. Walsh A. Julia. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amibiasis: estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. pp 228-238.
77. Weber Klaus y Kuter J. David. 1971. Reversible Denaturation of Enzymes by Sodium Dodecyl Sulfate. J. Biol. Chem. **246**:4504-4509.

78. Westermeier Reiner. 1993. Electrophoresis in Practice. First Edition. VCH. Federal Republic of Germany. pages 25-26, 44.

79. Young J.D.E., Young T.M., Lu L.P. et.al. 1982. Characterization of a membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 156: 1677-1690.

