



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

CONSTRUCCION DE DOS VECTORES DE
TRANSFECCION (pAP5'-Neo-AP3' Y pAP5'-Hyg-AP3')
PARA LA FUTURA OBTENCION DE UN KNOCK-OUT
EN *Entamoeba histolytica*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JULIO GARCIA CORDERO

ASESORA: DRA. EN C. REBECA G. MANNING CELA



MEXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS

AGRADECIMIENTOS

A la vida por darme la oportunidad de disfrutar este momento.

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación académica

Al CINVESTAV en su Depto. Biomedicina Molecular por el apoyo (material y reactivos) otorgado.

A mi asesora de Tesis Dra. en C. Rebeca Manning Cela. Por su apoyo y comprensión. Quien con su orientación y ánimo me impulsó hasta alcanzar la meta. Gracias por permitirme ser su alumno.

A la Dra Isaura Gómez-Palacio por todo el apoyo otorgado en cuanto a equipo y material biológico. Y a la oportunidad de poder trabajar en el departamento, mil gracias.

A todos los compañeros del laboratorio por su colaboración y apoyo profesional: Horacio, Alberto, Joel, Mari Carmen y muy en especial a mi colega David por todos sus sabios conocimientos.

A el auxiliar, Claudia Márquez Dueñas por toda la colaboración y enseñanza en la parte experimental del presente trabajo.

A los técnicos Isaías Carrasco Cerón y Alejandro Trejo Carmona por todas sus asesorías y el soporte técnico habilitado para el presente trabajo.

A los profesores: Sergio Vaca, Irma Dueñas, Ma Eugenia Eres y Elías Piedra; miembros de la Comisión Revisora de esta Tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias en la confirmación del documento final.

A todos mis compañeros del CRAPA: Nico, Montse, Míguel, Victor, Noemi, Roy, Sandra, Ricardo, Daniel, Vicky y a mi jefe Peter (Quien me dio la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo) con su pequeño Michael.

A todos mis amigos de la FES-IZTACALA con quienes compartí demasiadas vivencias inolvidables: David, José Luis ("el hermoso"), V. Hugo (coleguita), Alma, Karlita, Naty, Montse, Gina, Victoria, Karen, Sofi, Bety, Mayra, Norma, Lydia etc.

A todos mis compas: Noel, Omar, Alfredo, Chepo, Ulises, Zeus, Gemelos, Damián, Congo, Machacas, Negrito; y a mi primo Marshall.

DEDICATORIAS

A una personita muy en especial con quien lamentablemente no pude estar pero que siempre vivirá en mí. Mi querido "YEYO"

Diego M. Villa Mondragon.

A mis padres por darme la vida y la mejor herencia de todas, la educación.

Hipólito G.G y Rosa Ma. C.C.

A ustedes que con sus consejos, me alentaron a seguir adelante.

Mis abuelos: Daniel, Rafael, Lupe y Carmelita; Tíos: Carlos y Lorena

A el tío "CHEPO" que gracias a su carácter de constante lucha siempre ha sido un ejemplo para mi.

José Zaragoza

A mis hermanos con quienes he convivido malos y muy gratos momentos, gracias por su compañía.

Hipólito y Lizbeth

A mi compañera y mi amor "Matu" por su cariño y comprensión, además de haberme regalado lo mejor de mi vida: mi pequeño Gael; uno de los más importantes estímulos en mí vida.

Nydia Montiel y Jesús Gael.

A mis sobrinos quienes siempre tienen una sonrisa que regalarme.

B.Saúl y Eric M.

A uno de mis mejores amigos, quien siempre me ha brindado su amistad incondicionalmente.

Noel Colin

Con especial cariño a mi asesora, por toda la confianza brindada y por contagiarme de su entusiasmo y amor a la ciencia.

Dra. Rebeca Manning

Con respeto y admiración a el mejor de mis colegas, quien me enseñó lo que realmente significa la amistad y la hermandad.

David Esau.

Con cariño muy especial a una psi-cologuita, por sus sabios consejos, y por que siempre vive en mi esa vocecita que me dice "sigue adelante, tú puedes".

Norma Buendía.

INDICE

	Pag.
1. RESUMEN.....	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
3. LISTA DE FIGURAS.....	4
4. INTRODUCCIÓN.....	6
5. ANTECEDENTES GENERALES.....	6
5.1 Clasificación.....	6
5.1.1 Clasificación taxonómica.....	7
5.1.2 Clasificación isoenzimática.....	7
5.2 Epidemiología.....	7
5.3 Morfología.....	8
5.4 Organización del genoma.....	8
5.4.1 Ácidos nucleicos.....	8
5.4.2 Secuencias intergénicas.....	9
5.5 Ciclo biológico.....	9
5.6 Cuadro clínico.....	11
5.7 Mecanismos de patogenicidad.....	12
5.7.1 Adhesión.....	12
5.7.2 Proteinasa cisteínica.....	12
5.7.3 Ameboporo.....	13
5.8 <i>Knock-out</i>	14
5.9 Recombinación homóloga.....	14
5.10 Vectores de transfección.....	15
5.11 Transfección.....	16
6. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	17
7. JUSTIFICACIÓN.....	17
8. OBJETIVOS.....	18
9. ESTRATEGIA Y DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	19
10. MATERIALES Y METODOS.....	21
10.1 Material biológico.....	21
10.1.1 Bacterias.....	21
10.1.2 Parásitos.....	22
10.1.3 Plásmidos.....	22
10.2 Extracción de DNA de amiba.....	22
10.3 Preparación de células calcio competentes.....	23
10.4 Diseño de oligonucleótidos.....	23

10.5	Acoplamiento de oligonucleótidos.....	25
10.6	PCR.....	27
10.7	Purificación de PCR.....	28
10.8	Electroforesis en geles de agarosa.....	28
10.9	Análisis de restricción.....	28
10.10	Transformación.....	31
10.11	Lisis alcalina.....	31
10.12	Clonación.....	32
10.13	STET.....	34
10.14	Extracción de ADN por CsCl.....	34
10.15	Cuantificación espectrofotométrica.....	35
10.16	Purificación de DNA de geles de agarosa.....	35
10.17	Tinción de núcleo DAPI.....	35
11.	RESULTADOS.....	37
12.	DISCUSIÓN.....	51
13.	CONCLUSIONES.....	55
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
15.	APÉNDICE.....	62

1 RESUMEN

La transferencia de genes mediado por ADN ha sido usado ampliamente como una herramienta poderosa para la manipulación genética de organismos. La transfección y expresión de ADN exógeno en parásitos protozoos como es el caso de *Entamoeba histolytica* resulta difícil debido a sus difíciles condiciones de crecimiento así como a su particular organización y control de la expresión de genes. Diversos vectores se han utilizado para la transfección de este parásito obteniendo transfecciones transitorias y transfecciones estables episomalmente de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado llevar a cabo estrategias de recombinación homóloga que permitan estudiar la función de genes blanco en parásitos *knock-out* de *Entamoeba histolytica*. El objetivo principal de este proyecto es el de sentar las bases para el establecimiento de las condiciones para la obtención de amibas *knock-out*. Considerando todos los conocimientos hasta ahora reportados en la literatura, con respecto a la organización y expresión del genoma de amiba sin duda un muy buen candidato para usar como modelo, es el gen del ameboporo ya que además de estar representado en el genoma como copia única, se tienen suficientes conocimientos tanto bioquímicos como genéticos para facilitar la obtención y caracterización de amibas *knock-out* para este gen, además de tener una relevancia en la biología y patogenia de la amiba. Analizamos en primer término el número de genes de los cultivos de amiba con los que contamos, determinándolos bajo el microscopio de fluorescencia después de teñirlos con DAPI. Los resultados mostraron que el 83% de los trofozoítos de amiba son mononucleados, lo que hace factible el desarrollo de nuestro sistema propuesto. Con el fin de construir los vectores adecuados para la clonación y amplificación de nuestras secuencias a recombinar, se diseñaron *primers* para amplificar ambas regiones flanqueantes 5' y 3' del gen del ameboporo las cuales se clonaron en los vectores pBS:Neo y pBS:Hyg flanqueando los genes de resistencia a antibiótico. Se obtuvieron los plásmidos de transfección pAP5'-Neo-AP3' y pAP5'-Hyg-AP3' demostrándose por su patrón de restricción; los cuales serán utilizados para la transfección de trofozoítos de amiba y así obtener amibas *knock-out*, los cuales quedaran regulados por el promotor endógeno del ameboporo.

2 LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Ameboporo
AP1	Ameboporo 1
AP2	Ameboporo 2
AP3	Ameboporo 3
AP4	Ameboporo 4
AP5	Ameboporo 5
AP5'	Región flanqueante 5' del gen del ameboporo
AP3'	Región flanqueante 3' del gen del ameboporo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEAE-dextran	Dietilaminoetil-dextran
D.O.	Densidad óptica
°C	Grados centígrados
EDTA	Etilenediaminetetraacetato
ELT	Enzima lizosima tritón
gr	Gramos
G418	Gentamicina
Hyg	Higromicina
Kb	Kilo bases
nm	Nanometro
kDa	Kilo daltones
LB	Luria Broth
M	Molar
MCS	Sitio múltiple de clonación
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Mili molar
Neo	Neomicina
ng	Nano gramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de base
pBS +/-	Plásmido blue scribe +/-
PBS	Buffer salino de fosfatos
PEG	Polietilen glicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
seg.	Segundos
SI	Secuencia intergénica
TAE	Buffer Tris-acetato

TE	Buffer Tris-Cl-EDTA
TBE	Buffer Tris-borato
TS	Buffer Tris-HCl-Sacarosa
T _m	Temperatura de alineamiento
μl	Microlitros
μM	Micromolar
UV	Ultravioleta

3 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	11
Figura 2. Estrategia experimental.....	19
Figura 3. Diagrama experimental.....	20
Figura 4. Acoplamiento de “primers” AP1 (S) y AP2 (AS) de la región flanqueante AP5’ del gen del ameboporo, para su posterior clonación en pBS:Neo.....	25
Figura 5. Acoplamiento de “primers” AP3 (S) y AP4 (AS) de la región flanqueante AP3’ del gen del ameboporo, para su posterior clonación en pBS:Neo.....	25
Figura 6. Acoplamiento de “primers” AP1 (S) y AP5 (AS) de la región flanqueante AP5’ del gen del ameboporo, para su posterior clonación en pBS:Hyg.....	26
Figura 7. Acoplamiento de “primers” AP3 (S) y AP4 (AS) de la región flanqueante AP3’ del gen del ameboporo, para su posterior clonación en pBS:Hyg.....	26
Figura 8. Tinción de núcleos de trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> con DAPI.....	38
Figura 9. Amplificación por PCR de la región flanqueante 5’ del gen del ameboporo.....	39
Figura 10. Digestión de pBS:Neo con <i>Hind</i> III + <i>Hinc</i> II	40
Figura 11. Ligación pBS:Neo-----AP5’	40
Figura 12. Localización de la clona positiva de la ligación pBS:AP5’-Neo con <i>Hind</i> III + <i>Hinc</i> II	41
Figura 13. Análisis de restricción para pBS:AP5’-Neo (clona 6)	41
Figura 14. Amplificación por PCR de la región flanqueante 3’ del gen del ameboporo.....	42
Figura 15. Relación de ligación pBS:AP5’-Neo-----AP3’	43
Figura 16. Localización de clona positiva de la ligación pBS:AP5’-Neo-AP3’ con <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I.....	43
Figura 17. Análisis de restricción de pBS:AP5’-Neo-AP3’ de acuerdo a su patrón de restricción.....	44
Figura 18. Relación de ligación pBS:Hyg-----AP3’	45

Figura 19. Localización de la clona positiva pBS:Hyg-AP3' con <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I.....	45
Figura 20. Análisis de restricción para pBS:Hyg-AP3' (clona 27) con <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I.....	46
Figura 21. Amplificación por PCR de la región flanqueante 5' del gen del ameboporo.....	47
Figura 22. Relación de ligación pBS:Hyg-AP3'-----AP5'	47
Figura 23. Localización de la clona positiva pBS-AP5'-Hyg-AP3' con <i>Hind</i> III + <i>Sph</i> I.....	48
Figura 24. Análisis de restricción para pBS-AP5'-Hyg-AP3' (clona 7) con <i>Hind</i> III + <i>Sph</i> I.....	49
Figura 25. Análisis de restricción de pBS:AP5'-Hyg-AP3' de acuerdo a su patrón de restricción.....	50

4 INTRODUCCIÓN

El género *Entamoeba* incluye microorganismos que son parásitos de todas las clases de vertebrados y algunos invertebrados, de los cuales casi todas las especies parasitan el tracto intestinal de sus hospederos. El humano puede albergar varias especies una de las cuales es *Entamoeba histolytica* siendo este el agente causal de la amibiasis (Schaudinn, 1903). Este protozooario parásito normalmente, reside en el intestino grueso causando infecciones en su mayoría asintomáticas y sólo en algunas ocasiones llega a adquirir importancia clínica en las que se pueden producir lesiones en el intestino grueso así como tener capacidad invasora a otros órganos, manifestándose con la formación de abscesos (Jiménez-Cardoso *et al.*, 1989). *E. histolytica* se ha sub-clasificado para separar las formas patógena y no patógena *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente (Tannich *et al.*, Diamond y Clark, 1993; Clark, 1997).

Esta enfermedad ataca al ser humano en cualquier edad, siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes. La infección es endémica y ocurre tanto en los países desarrollados de clima templado o frío, como en los países tropicales en vías de desarrollo en donde se presenta de manera más frecuente. Se piensa que la virulencia del parásito, susceptibilidad del hospedero y factores ambientales contribuyen a la manifestación clínica de la enfermedad dando como resultado la amibiasis. De este modo pasa de un estado asintomático con amibas no invasoras a colitis y absceso hepático amibiano denominándosele amibiasis invasiva (Velázquez *et al.*, 1997). Esta última manifestación de la enfermedad, se acompaña generalmente por la aparición de anticuerpos específicos, los cuales comúnmente son utilizados para determinar la presencia o ausencia de la amiba. Ya que no todas las amibas poseen capacidad invasora, es difícil justificar la importancia de su presencia en el intestino (Jiménez-Cardoso *et al.*, 1989).

5 ANTECEDENTES GENERALES

5.1) Clasificación.

La palabra: *Entamoeba histolytica* proviene del griego *Endoentos* que significa adentro; *amebein* que significa cambiar transformar; e *histolytica* que significa destrucción, lisis o disolución de tejidos (Schaudinn, 1903).

Siguiendo la clasificación recomendada por la sociedad de protozoólogos (Honiberg, *et al.*, 1964) y modificada posteriormente por Lewine en 1980; el subreino Protozoa del reino protista, está comprendido por todos aquellos organismos que miden de 1 μm a 50 μm (5 y 25 μm en su mayoría) y que están formados por una sola célula que realiza todas las funciones esenciales de metabolismo y reproducción. Casi todos son holozoicos o saprozoicos. La principal línea de evolución en este grupo se ha llevado a cabo a través de especializaciones subcelulares u organelos involucrados en la alimentación, locomoción, osmoregulación y reproducción. La mayoría de los protozoarios tienen un solo núcleo vesicular aunque algunos son multinucleados.

5.1.1) Clasificación Taxonómica.

Reino	PROTISTA.
Subreino	PROTOZOA
Phylum	SARCOMASTIGOPHORA.
Subphylum	SARCODINA.
Super clase	RHIZOPODA
Clase	LOBOSEA
Subclase	GYMNAMOEBIDAE
Orden	AMOEBIDA
Suborden	ACANTOPHODINA
Familia	ENDAMOEBIDAE
Genero	ENTAMOEBIA
Especie	HISTOLYTICA

5.1.2) Clasificación isoenzimática:

Los primeros en clasificar la especie *Entamoeba histolytica* sobre las bases de sus propiedades electroforéticas de varias isoenzimas, cuyos patrones en conjunto forman los llamados zimodemos, fueron Sargeant y Williams en 1978 quienes realizaron estudios muy valiosos con el auxilio de la técnica enzimática para analizar cultivos de *Entamoeba histolytica* provenientes de varios continentes.

Los resultados de esas investigaciones arrojaron la información siguiente:

- Todas las especies de amibas que crecen en el intestino del hombre pueden ser caracterizadas mediante patrones isoenzimáticos característicos.
- Se han identificado más de 18 zimodemos diferentes de cepas de *Entamoeba histolytica* obtenidas en diferentes regiones del mundo.
- Las amibas cultivadas de muestras de casos bien caracterizados de amibiasis invasora (disentería amibiana o abscesos hepáticos) pueden ser clasificados en siete patrones isoenzimáticos diferentes (II; VI; VII; XI-XV).
- Todos los zimodemos restantes (I,III-V,VIII-X, XV-XVIII) se encuentran en amibas aisladas de posibles portadores.

5.2) Epidemiología.

El hombre es el principal reservorio de *Entamoeba histolytica*, aún cuando pueden encontrarse amibas morfológicamente similares en primates, perros y gatos así como a otras especies de mamíferos.

La infección es de distribución mundial y está catalogada como la segunda parasitosis causante de muerte debida a un protozooario parásito, sólo después de la malaria (Walsh, 1986; WHO,1997). Alrededor del 10 a 20 % de la población mundial se considera infectada y el 10 % de ésta sufre la enfermedad, con una mortandad que oscila entre el 0.1 y 0.25 % y cuya prevalencia varía de un país a otro]. En 1984 se estimó que 500 millones de personas estaban infectadas con *Entamoeba histolytica*, de las cuales 40 millones

tenían colitis o abscesos extraíntestinales y al menos 40000 murieron ese año (Walsh, 1988);

En México se ha calculado que por cada paciente con amibiasis invasora hay cuatro o cinco portadores asintomáticos (Sepúlveda, 1984), ocurriendo la mayor incidencia en las comunidades pobres y con mal saneamiento ambiental. En un estudio reciente realizado en nuestro país, se indica que hubo más de un millón de casos de amibiasis intestinal, y tres mil casos de absceso hepático amibiano durante 1993 (Cuevas *et al.*, 1994). El 8.4% de la población mexicana mostró ser seropositiva para antígenos de *Entamoeba histolytica* de los cuales la zona norte del país resultó la de menor incidencia y la del centro la de mayor incidencia; confirmando, que México es una zona endémica de amibiasis (Caballero y Salcedo, 1994). La prevalencia es más alta en niños de edad escolar, debido a que éstos están más expuestos a beber aguas contaminadas además de que algunos de ellos muestran malos hábitos higiénicos (Cifuentes *et al.*, 1994). Para controlar esto el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) provee atención social a más de la mitad de mexicanos y da tratamiento a más de la mitad de un millón de casos de amibiasis intestinal por año. En dicha institución, la presencia de casos de amibiasis así como la mortalidad causada por esta han mostrado un decremento en años recientes (Treviño *et al.*, 1994).

5.3) Morfología.

En general las amibas fijadas en cultivo son de forma alargada, tienen lobópodos que hacen protrusión y un uroide en la parte posterior. Las células menos activas tienden a hacer esféricas, sin lobópodos ni uroides, mostrando en todas aperturas pequeñas en la superficie. La superficie basal de los trofozoitos, que participan directamente en los fenómenos de adhesión e histólisis, no muestran caracteres morfológicos especiales, a no ser por la presencia de escasos y cortos filópodos en su borde externo. La asociación con bacterias tiende a aumentar el número de especializaciones de superficie de estas células (Martínez-Palomo, 1982). El citoplasma de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* se caracteriza por la ausencia de la mayoría de los organelos diferenciados encontrados en otras células eucarióticas como por ejemplo: mitocondrias, aunque se han identificado varias proteínas con función mitocondrial (Clark y Rogers, 1995); no contiene peroxisomas y presenta un aparato de Golgi y retículo endoplásmico en forma de vesículas poco estructurado, mostrando a la amiba como un modelo de célula eucarionte primitiva (Bekkler-Grunwald y Worstmann, 1993).

5.4) Organización del genoma.

5.4.1) Ácidos nucleicos.

El contenido total de DNA en los trofozoitos se estima que es de 5×10^{-14} g/núcleo (Dvorak y col., 1995). El nivel estimado de ploidía de este parásito se presume que sea por lo menos $4n$ y el tamaño del genoma haploide de ≤ 20 Mb (Willhoeft y Tannich, 1999). En estudios donde se llevaron a cabo tinciones con compuestos fluorescentes que se unen al DNA indicaron la presencia de 6 placas que contienen DNA en los núcleos en división, probablemente correspondan a 6 cromosomas (Gómez-Conde y col., 1997). Además, estudios recientes realizados con DNA de cultivos que provienen de una sola amiba,

demuestran que cada amiba tiene más de 4 cromosomas de diferentes tamaños y estos cromosomas contienen regiones grandes de homología (Willhoeft y Tannich, 1999).

5.4.2) Secuencias íntergénicas.

Aunque se ha reportado que las secuencias íntergénicas son relativamente cortas (400 a 2000pb) se considera que contienen todos los elementos "cis-acting" requeridos para la terminación y el inicio de la transcripción de los genes adyacentes. Sin embargo, también se reporta la presencia de dos genes, EhMC3 y EhPAK, que están físicamente unidos, sus transcritos están sobrelapados y por lo tanto carecen de secuencias íntergénicas (Gangopadhyay y col., 1997). El análisis de la secuencia íntergénica entre el gen que codifica para el ameboporo y un marco de lectura abierto (ORF) 5'- 3' de 0.75Kb, indica la presencia de secuencias repetidas en tandem como el elemento entremezclado IE (Cruz-Reyes y col., 1995) y se ha observado, incluso, que esta secuencia también reconoce un mensajero de 0.7Kb (Cruz-Reyes y col., 1992; Ortiz-García y col., 1997).

A pesar de esa simplicidad o tal vez debido a ella, este protozooario pequeño (10-40 μ) y frágil, sensible a ligeros cambios de temperatura, es capaz de colonizar el intestino grueso de un porcentaje considerable de personas de la población mundial. Como se dijo anteriormente en circunstancias aún desconocidas, puede invadir la mucosa intestinal y eventualmente destruir cualquier tejido del organismo humano. Al mismo tiempo el parásito evade con éxito las defensas moleculares y celulares del hospedero y encuentra los requisitos necesarios para su multiplicación. Sin embargo no se conocen a la fecha las bases moleculares de procesos fundamentales tales como la diferenciación del trofozoíto a quiste, el cambio de comensal inocuo a invasor dañino, los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, o los cambios celulares que ocurren durante la división nuclear (Martínez-Palomo, 1982; Vargas, 1994)



5.5) Ciclo biológico.

IZT.

Su ciclo vital es sencillo ya que a diferencia de otros protozoarios patógenos carece de etapas sexuales o de hospederos intermediarios. *Entamoeba histolytica* se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales, el trofozoíto (forma móvil o vegetativa), el prequiste y el quiste (inmóviles). El ciclo vital de *E. histolytica* no requiere una etapa de invasión tisular, de hecho en la gran mayoría de los casos, las amibas viven como pacíficos comensales en el colon (amibiasis luminal).

El quiste es la forma infectiva del parásito, es esférico, mide aproximadamente 12 μ m de diámetro, está rodeado por una pared de quitina, es tetranucleado con un cariosoma central en cada núcleo. El huésped se infecta al ingerir quistes, los cuales viajan por el aparato digestivo hasta el íleon donde desinquistan, originando un protoplasto desnudo tetranucleado. Cada uno de los núcleos se divide y el protoplasto da lugar a 8 trofozoítos metaquísticos, uninucleados que migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal. Miden de 7 a 40 μ m de diámetro, son pleomorfos, muy dinámicos, generalmente con un pseudópodo frontal, un uroide en la parte posterior y numerosos filopodios. Son altamente sensibles a los cambios del microambiente, como temperatura, pH, osmolaridad y potencial redox. Su núcleo, de 4-7 μ m de diámetro, contiene adosado a la membrana

interna una gran cantidad de RNA y probablemente DNA en forma de cromatina condensada y en el centro un endosoma rico en DNA. En el citoplasma hay numerosas vacuolas, cuyo contenido varía desde eritrocitos y bacterias hasta desechos celulares.

La forma activa, el trofozoíto, vive adherido al intestino delgado y grueso, donde se alimenta de bacterias y células del huésped, se divide por fisión binaria y puede seguir una de varias vías como: 1) vivir en el intestino como comensal, 2) enquistarse, 3) invadir la mucosa intestinal y producir desde síntomas leves hasta disentería grave, 4) invadir otros órganos entrando eventualmente al torrente circulatorio originando así las formas invasoras extraintestinales de las amebiasis produciendo por ejemplo absceso en hígado al que llegan por la vena porta; impidiendo así completar su ciclo de vida al no regresar al lumen del intestino; o, 5) salir al ambiente con las heces para morir inmediatamente debido a su poca resistencia a las condiciones atmosféricas. Los mecanismos moleculares que definen cuál vía seguirán los trofozoítos se desconocen casi en su totalidad (Aikat, 1989; Citado por Martínez-Palomo 1989).

Los individuos infectados eliminan aproximadamente 45×10^6 quistes (de 8-20 μm de tamaño) al día, de donde son impulsados por el viento contaminando a vegetales, frutas y agua potable, convirtiendo a éstos como fuentes potenciales de contaminación. Pueden sobrevivir en las heces por 8 días a temperaturas que oscilan entre 20 y 40 °C y por periodos hasta de 40 días de 2 °C a 6 °C, resistiendo incluso temperaturas de congelación. Resisten cloro a las concentraciones que se usan en el agua potable, siendo destruidos solo por los procedimientos de filtración, método de electrólisis, ebullición, yodo y ácido acético.

Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación de alimentos y la transmisión de persona a persona. El mayor riesgo está asociado con los portadores asintomáticos de quistes, especialmente si estos están dedicados al manejo y preparación de alimentos.

Otro factor importante en la transmisión es la forma en que se eliminan las excretas humanas en una comunidad. La contaminación fecal de las manos por falta de higiene y la contaminación del agua a través del fecalismo al aire libre que lleva a las heces hacia ríos, arroyos o depósitos de agua mal protegidos, son formas en que las heces infectantes pueden alcanzar altas concentraciones, convirtiéndose en un factor determinante en la transmisión ya que mientras mayor es la concentración fecal, mayor es el riesgo de transmisión. (Martínez-Palomo 1989).

Como se muestra en la Figura 1 el ciclo de vida de *E. histolytica* inicia con la infección del parásito después de la ingestión de quistes maduros ❶ en alimentos, agua o manos contaminadas con heces. El desenquistamiento ❷ ocurre en el intestino delgado en donde los trofozoítos ❸ son liberados migrando al colon. Aquí, los trofozoítos se reproducen por fisión binaria transformándose en quistes ❹ los cuales son eliminados con las heces fecales. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo siendo así los responsables de la transmisión de la enfermedad, contrario a los trofozoítos que en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A: infección no invasiva) de los individuos infectados comportándose como portadores asintomático eliminando quistes continuamente. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal) o a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones, cerebro, etc. (C: enfermedad extraintestinal). Se ha establecido también, que las

generalmente se inicia la infección por vía intestinal, por ello desde el punto de vista clínico, la amibiasis se ha clasificado de la siguiente manera:

I.- Amibiasis intestinal

- a) Aguda.
- b) Crónica.

II.- Amibiasis extraintestinal

- a) Hepática.
- b) Pulmonar.
- c) Cerebral.
- d) Mucocutánea.
- e) otras.

Por esta razón, varios grupos de investigadores han explorado otras características de *E. histolytica* aparte de las morfológicas, que pudieran correlacionarse con el comportamiento biológico de las distintas cepas amibianas. Tales características son por ejemplo los mecanismos de patogenicidad de la amiba.

5.7) Mecanismos de Patogenicidad.

5.7.1) Adhesión.

Ya que la interacción entre el parásito y la célula huésped es multifactorial; en un primer paso, la amiba reconoce a la célula huésped a través de moléculas de adhesión entre las que se encuentra por ejemplo la: lectina de 220Kda que reconoce células epiteliales (Rosales-Encino, *et al.*, 1987) y la adhesina de 112Kda (Arroyo y Orozco, 1987), la cual se identificó empleando anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión y por lo tanto de la fagocitosis de la célula blanco (Rodríguez *et al.*, 1994). Así mismo, se han identificado las otras adhesinas con peso molecular de 90 y 24Kda, las cuales fueron identificadas con antiseros dirigidos contra proteínas totales de *Entamoeba histolytica* y contra la adhesina de 112Kda. Su participación en el proceso de adhesión de la amiba se comprobó realizando una mutación en estas proteínas la que dio como resultado un fenotipo deficiente en adhesión (Rodríguez, *et al.*, 1989). Y la Lectina-Galactosa (L-170kda), la cual media la adherencia amibiana a mucina colónica humana y al epitelio intestinal siendo un prerrequisito para la invasividad (Seguin-Mann 1995). En el segundo paso varias moléculas efectoras como el ameboporo y la cisteín-proteasa neutra destruyen a la célula blanco (Keene *et al.*; 1986).

5.7.2) Proteinasas cisteínicas

Las proteinasas cisteínicas (CP) en *E. histolytica* son responsables de algunos efectos considerados importantes para la patogenicidad de la amiba. Estas proteasas purificadas destruyen monocapas de fibroblastos en cultivo (Keene *et al.*; 1990), se ha comprobado que su actividad guarda una correlación directa con su virulencia (Lushbaugh *et al.*; 1985; Keene *et al.*; 1990). Bruchhaus en 1996 identificó tres nuevos genes de CP (CP4, Cp3 y CP6) las cuales se expresan en amibas xénicas y axénicas. Jacobs *et al.*; en 1998 han aislado y caracterizado la cisteín proteasa CP5, la cual es exclusiva en *E.*

histolytica expresándose en niveles elevados. La proteasa CP5 está asociada a la membrana y se localiza como puntilleo en parches sobre la superficie de la amiba.

5.7.3) Ameboporo.

Como se mencionó anteriormente una de las principales funciones patogénicas de *E. histolytica* es su notoria capacidad citolítica. Se ha reportado que *Entamoeba histolytica* produce una proteína llamada ameboporo, capaz de formar canales iónicos o poros en membranas lipídicas así como, destruir células blanco por lo que se le ha considerado como un candidato primario para mediar esta extraordinaria actividad citolítica del parásito (Lynch *et al*; 1982; Young *et al*; 1982; Rosenberg *et al*; 1989; Leippe *et al*; 1991; 1994a; Leippe y Muller-Eberhand, 1994). Tanto por la secuencia deducida de la proteína así como por el análisis de secuencia del gen y confirmado por espectrometría de masas ha sido resuelta la estructura primaria de los 77 residuos que conforman el ameboporo los cuales incluyen 6 residuos de cisteína, tiene una conformación de alfa hélice (4 hélices anfipáticas) estabilizada por 3 puentes disulfuro que le confieren una estructura relativamente rígida y una masa molecular de 8kDa (Leippe *et al*; 1992, 1994b). Se ha encontrado que el ameboporo existe en forma de péptidos maduros y potencialmente activos dentro de los gránulos citoplásmicos de los trofozoítos de amiba (Leippe *et al*; 1994b). Aspectos genómicos del ameboporo indican que es codificado por una sola copia del gene, como lo demostró el análisis de Southern blot de DNA genómico de *E. histolytica* patógena digerido con varias enzimas de restricción (Leippe *et al*; 1992). La comparación entre secuencias de cDNA y DNA genómico reveló que el gen del ameboporo carece de intrones, lo cual es característico para todos los genes estructurales de *Entamoeba histolytica* analizados hasta la fecha (Bruchhaus *et al*; 1993). Por otro lado se conoce una familia de ameboporos que consiste de 3 isoformas (ameboporo A,B y C), que presentan una divergencia considerable en sus estructuras primarias pero con propiedades funcionales similares. Aún cuando las 3 isoformas exhiben actividad formadora del poro hacia vesículas lipídicas éstas difieren en su cinética de formación del canal iónico (Leippe *et al*; 1991; 1992; 1994b). Actualmente se cree que para que el trofozoíto destruya la célula blanco requiere de varios pasos consecutivos iniciándose por el reconocimiento de la célula mediado por lectinas-Gal específicas produciéndose así una estrecha adherencia a través de la cual la amiba descarga sus gránulos citoplásmicos en la zona de contacto (Leippe 1997; Brancha *et al*; 1999). Así el ameboporo es insertado en la membrana sin la necesidad de interaccionar con receptores específicos de membrana. Posterior a la inserción, las moléculas del ameboporo tienden a oligomerizarse, debido a la interacción péptido-péptido, formando así canales iónicos, que eventualmente resultan en la lisis de la célula blanco. La dependencia de contacto mostrada así como la rápida reacción citolítica son pasos parecidos a aquellos mostrados por los linfocitos citotóxicos (Ravdin y Guerrant, 1982; Tschopp u Nabholz, 1990). También, se han encontrado similitudes tanto estructurales como funcionales (Leippe, 1995) entre el ameboporo y otros polipéptidos efectores tales como NK-lisina y la granulisina, presentes en las células *natural killer* (NK) y células T citotóxicas de humano y de cerdo (Andersson *et al*; 1995; Peña *et al*; 1997; Stenger *et al*; 1998). Aún cuando se ha propuesto una actividad citolítica del ameboporo hacia las células humanas, esto solo ha sido demostrado por experimentos *in vitro* (Leippe *et al*; 1994^a; Berninghausen y Leippe, 1997), sin embargo la prueba definitiva del papel que el ameboporo tiene en la patogénesis de los trofozoítos de *E. histolytica* aún no está

esclarecida. Esto se debe principalmente a que no ha sido posible hasta el momento inhibir de manera específica la actividad de la proteína, ni tampoco el obtener parásitos *knock-out* carentes del ameboporo *in vivo*. Como un primer acercamiento, recientemente fue reportada la inhibición parcial (60%) del ameboporo utilizando una estrategia usando una transfectante que transcribe un RNA antisentido de la secuencia completa del gen que codifica para el ameboporo A (AP-A), que es la isoforma mayoritaria, y sus secuencias UTR 5' y 3'. Los resultados mostraron que estos parásitos transfectantes disminuyeron significativamente su capacidad patogénica (Bracha *et al*; 1999). Aun cuando estos resultados muestran una correlación entre la disminución de la capacidad patogénica de los parásitos transfectantes y la disminución de los niveles de expresión del AP-A, sería necesario contar con la obtención de parásitos *knock-out* para dar conclusiones definitivas.

5.8) *Knock-out* (inactivación de genes).

Las mutaciones génicas sitio dirigidas llegaron a ser posibles al final de los años ochenta, gracias a los avances logrados en biología molecular. En primer lugar, se requiere de la clonación del gen o de un fragmento del mismo y su propagación en la bacteria. Posteriormente se diseñan las modificaciones genéticas necesarias para inactivar la función normal del gen. En esta construcción, se añaden genes que confieren resistencia a antibióticos (neomicina, higromicina, etc) con el fin de seleccionar a aquellas células eucarióticas que han captado el transgen. Finalmente la construcción genética es introducida a la célula blanco por diversos métodos como electroporación, microinyección, transfección por fosfato de calcio, etc. obteniéndose la célula blanco transfectada ahora resistente al antibiótico de selección y expresando ya sea el gen exógeno mutado o reemplazando el gen endógeno (*knock-out*) por un gen exógeno. Para llevar a cabo este procedimiento se pueden utilizar secuencias homólogas a un sitio específico para dirigir este evento a un destino conocido denominándose a este procedimiento recombinación homóloga, o utilizar secuencias no específicas llevándose a cabo la recombinación en sitios no previstos resultando en una recombinación no dirigida.

El término recombinación homóloga es comúnmente intercambiable con el término "gene targeting". Siendo usado para inserción o reemplazamiento (interrupción de un gen o *Knock-out*). En el reemplazamiento del gen una secuencia endógena es precisamente reemplazada con una secuencia homóloga contenida sobre el vector usado. En el reemplazamiento de un gen no es necesario hacer un cambio en el número de nucleótidos del genoma, ya que el reemplazamiento del gen no necesita aumentar el genoma con secuencias foráneas. Ha sido demostrado para que el reemplazamiento del gen pueda ser promovido es necesario realizar digestiones en el DNA de la construcción dentro de las secuencias del vector, liberando la secuencia que contendrá la región homóloga en los extremos del fragmento que se usará en la transfección, esto para que la homología de la secuencia transfectada sea colineal con el blanco genómico.

5.9) Recombinación homóloga.

La recombinación homóloga (también llamada "recombinación general") puede ser definida como cualquier proceso en que secuencias de DNA similar intercambian información genética una con otra. Este tipo de recombinación homóloga es denominada no sitio específica y es distinguible de la recombinación sitio específica o de la

recombinación transposicional, en que no es necesario una secuencia de DNA 100% idéntica. Es decir la recombinación homóloga puede ocurrir entre 2 secuencias cualesquiera siempre y cuando entre las 2 secuencias haya suficiente homología. La recombinación es un evento que se lleva a cabo en varias células el cual involucra un intercambio de información genética entre secuencias de DNA diferentes. Este fenómeno participa en la generación de uno de los eventos esenciales para la evolución y la variabilidad entre individuos de una especie. Sin la recombinación genética el contenido de cada cromosoma tendría siempre los mismos alelos (formas alternativas de un gen) y cambiaría sólo por mutación. Si se acumularan mutaciones deletéreas se eliminaría el cromosoma completo así como las mutaciones favorables para el organismo. Por el intercambio de genes, la recombinación permite que mutaciones favorables y desfavorables sean probadas como entidades individuales y permite que mutaciones desfavorables sean eliminadas sin afectar otros genes a los que estuvieron unidos en el pasado.

La recombinación involucra el intercambio físico entre las correspondientes cadenas de DNA. Durante este evento se realiza la unión híbrida de dos cadenas parentales (hetero dúplex). Este evento inicia con el alineamiento de las dos hélices de DNA que van a recombinar, posteriormente se realiza un corte en una de las cadenas de ambos dúplex, entonces cada extremo libre se aparea con la cadena complementaria de DNA formando el hetero dúplex. En la siguiente fase aumenta el número de bases con apareamiento entrecruzado a través de las cadenas (migración del hetero dúplex) y finalmente las moléculas de DNA se separan. Para separar a los dúplex en recombinación se realiza otro corte en una de las cadenas, si se corta la misma cadena donde ocurrió el primer corte entonces, las cadenas que se liberan corresponden a las cadenas parentales pero conteniendo un hetero dúplex. Si se corta la otra cadena se generan moléculas DNA con regiones de ambos dúplex parentales unidas por el hetero dúplex. (Lewin. B.,1997).

La recombinación homóloga entre una secuencia de DNA transfectedo y una secuencia de DNA genómico homóloga (el blanco) es una aplicación experimental de la capacidad de la célula para desarrollar recombinación homóloga, resultando en la alteración programada de una secuencia endógena. Esto ha llegado a hacer una práctica común usándose el término recombinación homóloga o "gene targeting".

Utilizado para alguno de los siguientes propósitos:

- 1) Aprender acerca de la estructura y función del gen.
- 2) Crear modelos de animales para enfermedades
- 3) Curar enfermedades genéticas.

Recientemente se asumió basándose en estudios en su mayoría en procariontes, que la frecuencia de inserción, intercambio de un fragmento o el reemplazo completo del gen aumenta con el incremento de la longitud de la secuencia homóloga. Datos derivados de un experimento sobre recombinación intracromosomal determinaron que la mínima longitud de homología es de 150pb.

5.10) Vector de transfección.

Un vector de transfección es aquel que nos permite transportar, amplificar y expresar una secuencia exógena. Existen diversos tipos de vectores de transfección entre los que se encuentran los plásmidos, fagos, minicromosomas, etc. La selección del vector de transfección depende de varios factores, como los requerimientos en el tamaño del

inserto a clonar como de la célula receptora que lo contendrá ya sea para su amplificación, mutación, expresión, etc.

Los vectores de DNA de plásmido son uno de los más utilizados por sus múltiples ventajas. Estos se replican por sí mismos como moléculas de DNA extracromosomal en casi todas las especies de bacterias. En la naturaleza, los plásmidos son comunes presentando diferentes características como: variación en estructura, tamaño, modo de replicación, número de copias por célula bacteriana, habilidad para propagarse en diferentes bacterias y transferencia entre especies de bacterias, etc.

La replicación del plásmido depende de las proteínas de la célula huésped, pero también puede requerir funciones que se codifican en el plásmido.

Los plásmidos llevan genes que son específicos para una amplia variedad de funciones incluyendo: resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, sensibilidad a mutágenos, sensibilidad o resistencia a bacteriófagos, producción de enzimas de restricción, producción de aminoácidos poco frecuentes, producción de toxinas, determinación de virulencia, catabolismo de moléculas orgánicas complejas, habilidad para formar buenas relaciones simbióticas y habilidad para transferir DNA de un reino a otro.

Todos los vectores de DNA de plásmidos contienen tres características en común: un replicón, un marcador de selección y un sitio de clonación. El replicón es un fragmento de DNA que contiene el sitio de inicio de replicación del DNA (origen de replicación u *ori*) y que también incluye genes que codifica RNAs y proteínas que son necesarias para la replicación. El marcador de selección, es necesario para seguir manteniendo la presencia del plásmido en células, es usualmente dominante y este gen generalmente codifica para la resistencia a algún antibiótico. El sitio de multiclonación es un fragmento de DNA que contiene diferentes sitios únicos de reconocimiento de endonucleasas de restricción dentro del cual puede ser insertado el DNA foráneo sin interferir con la estabilidad del plásmido para replicar o para conferir un fenotipo de selección sobre su huésped. Por lo tanto algunas de las características básicas a considerar cuando se selecciona un vector de DNA de plásmido incluye el tamaño del vector, su número de copias, la región de policlonación y la habilidad para seleccionar las clonas positivas. (Frederick.M.Ausubel *et al*; 1995).

5.11) Transfección.

Las técnicas de transfección son el equivalente de las técnicas de transformación en procariontes. Han sido usadas una variedad de técnicas para transferir secuencias nuevas de DNA dentro de células eucariontes superiores *in vitro* que se basan en la introducción de material exógeno en el genoma de ese organismo. Hay dos tipos de transfecciones (descritos en células de mamíferos) transitoria y estable o permanente. En una transfección transitoria, la transcripción del gen puede ser analizado entre 1 y 4 días después de haber introducido el ADN. Por otro lado, muchos experimentos requieren la formación de líneas celulares que contengan el gen(s) los cuales son integrados dentro del ADN cromosomal dando como resultado una transfección estable o permanente.

Podemos considerar dos grandes grupos de técnicas de transfección: 1) Métodos físicos que se basan en el uso de sistemas mecánicos, no biológicos, para lograr la inserción de material genético en las células. Los principales son: Electroporación y Microinyección y 2) Métodos químicos basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta

endocítica (fosfato cálcico, DEAE dextrano) o a través de las membranas (lipofección) utilizando vehículos biológicos como liposomas, DNA viral y retroviral (o RNA).

En el primer caso, durante la microinyección el DNA exógeno es introducido directamente dentro del núcleo de la célula receptora mientras que en la electroporación, una descarga eléctrica crea o dota a la membrana de cierta permeabilidad al DNA exógeno durante unos pocos segundos. Si las células sometidas a dicho choque eléctrico están sumergidas en un medio rico en DNA de plásmido algunos de ellos penetran a la célula.

El método del fosfato cálcico esta basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células. Aparentemente el agregado de calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares aunque el mecanismo aún no se conoce con precisión. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso.

6 ANTECEDENTES DIRECTOS

En *Entamoeba histolytica* hasta la fecha solamente se ha logrado el establecimiento de condiciones para obtener una transfección transitoria y transfección estable episomal. Esto sólo ha permitido la caracterización parcial de algunas moléculas dejando preguntas aún sin responder. Ejemplo de esto es el estudio del ameboporo en el que evidencias obtenidas *in vitro* proporcionaron información indirecta de su participación en la patogénesis de este parásito. Posteriormente experimentos utilizando secuencias antisentido para bloquear la expresión del ameboporo han mostrado una correlación entre la disminución de la capacidad patogénica de los parásitos transfectantes y la disminución de los niveles de expresión del AP-A. Sin embargo esta inhibición es solamente parcial (60%) por lo que sería necesario contar con la obtención de parásitos *knock-out* y poder así no sólo analizar el fenotipo de estos parásitos nulos en la proteína sino incluso saber si hay o se activan otras moléculas capaces de sustituir sus funciones. También con este sistema sería posible poder realizar experimentos de reconstitución que confirmen de manera definitiva la participación de la proteína en todos los fenómenos en los que se propone está involucrada. Ya que el ameboporo es gen de copia única, este modelo resulta ideal para establecer las condiciones para la obtención de amibas *knock-out*.

7 JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes antes descritos nos muestran la importancia de establecer condiciones que permitan la obtención de *Knock-out* en *Entamoeba histolytica*, por lo que los objetivos de este trabajo se centran en la construcción de dos vectores de transfección que permitan la obtención de amibas *knock-out* del ameboporo, gen utilizado como modelo en el presente proyecto.

8 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Construcción de dos vectores de transfección (pAP5'-Neo-AP3' y pAP5'-Hyg-AP3') para la futura obtención de un *Knock-out* en *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el número de núcleos de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.
- Purificar DNA de los plásmidos pBS:Neo y pBS:Hyg.
- Amplificar por PCR las regiones flanqueantes 5' y 3' del ameboporo de *Entamoeba histolytica* a partir de DNA genómico de amiba.
- Clonar las regiones amplificadas anteriormente (AP5' y AP3') en los vectores pBS:Neo y pBS:Hyg que contienen las regiones que codifican para neomicina e higromicina respectivamente, para obtener los vectores de transfección pAP5'-Neo-AP3' y pAP5'-Hyg-AP3'.

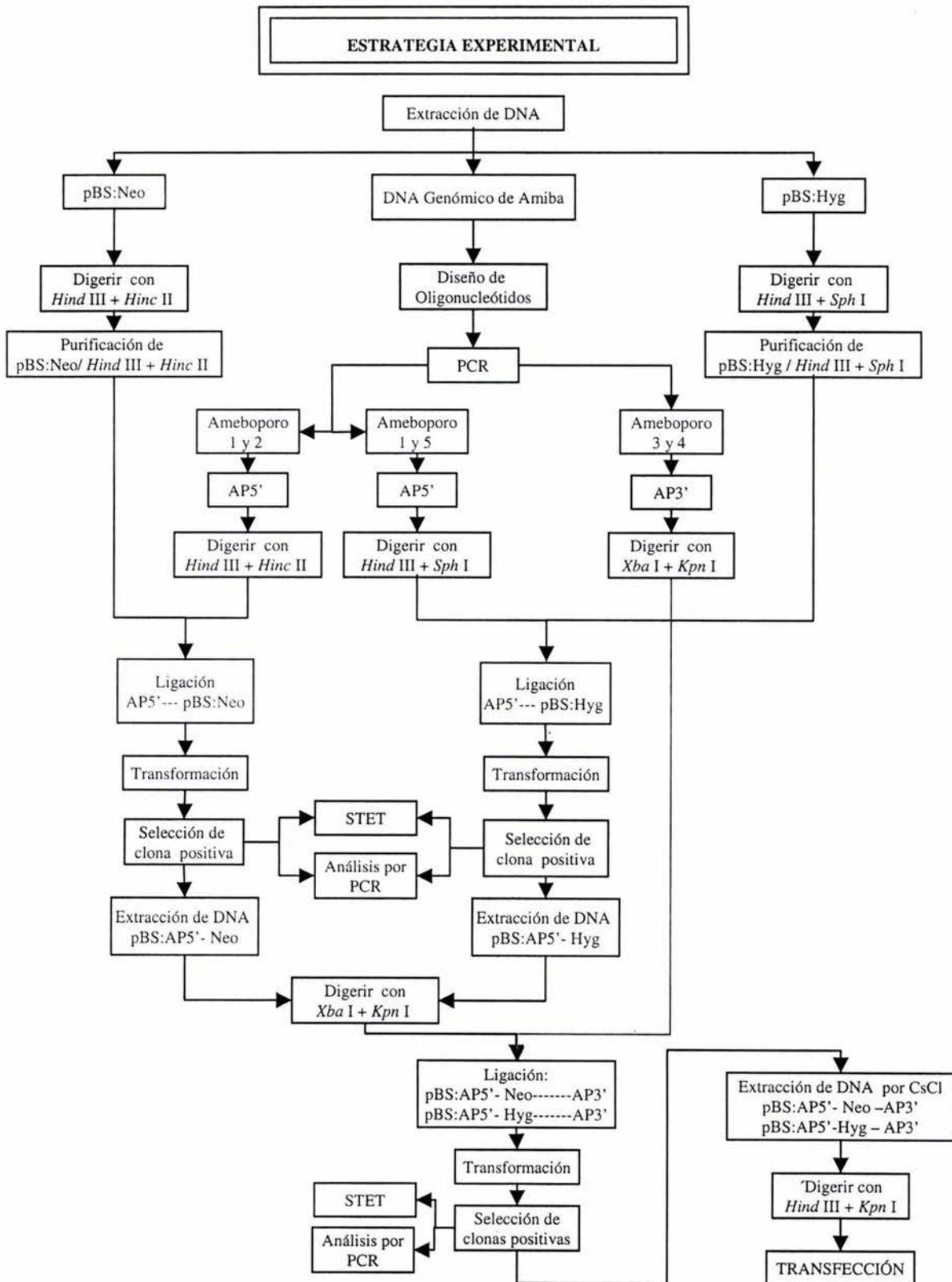


Figura No 2 Estrategia Experimental

DIAGRAMA EXPERIMENTAL

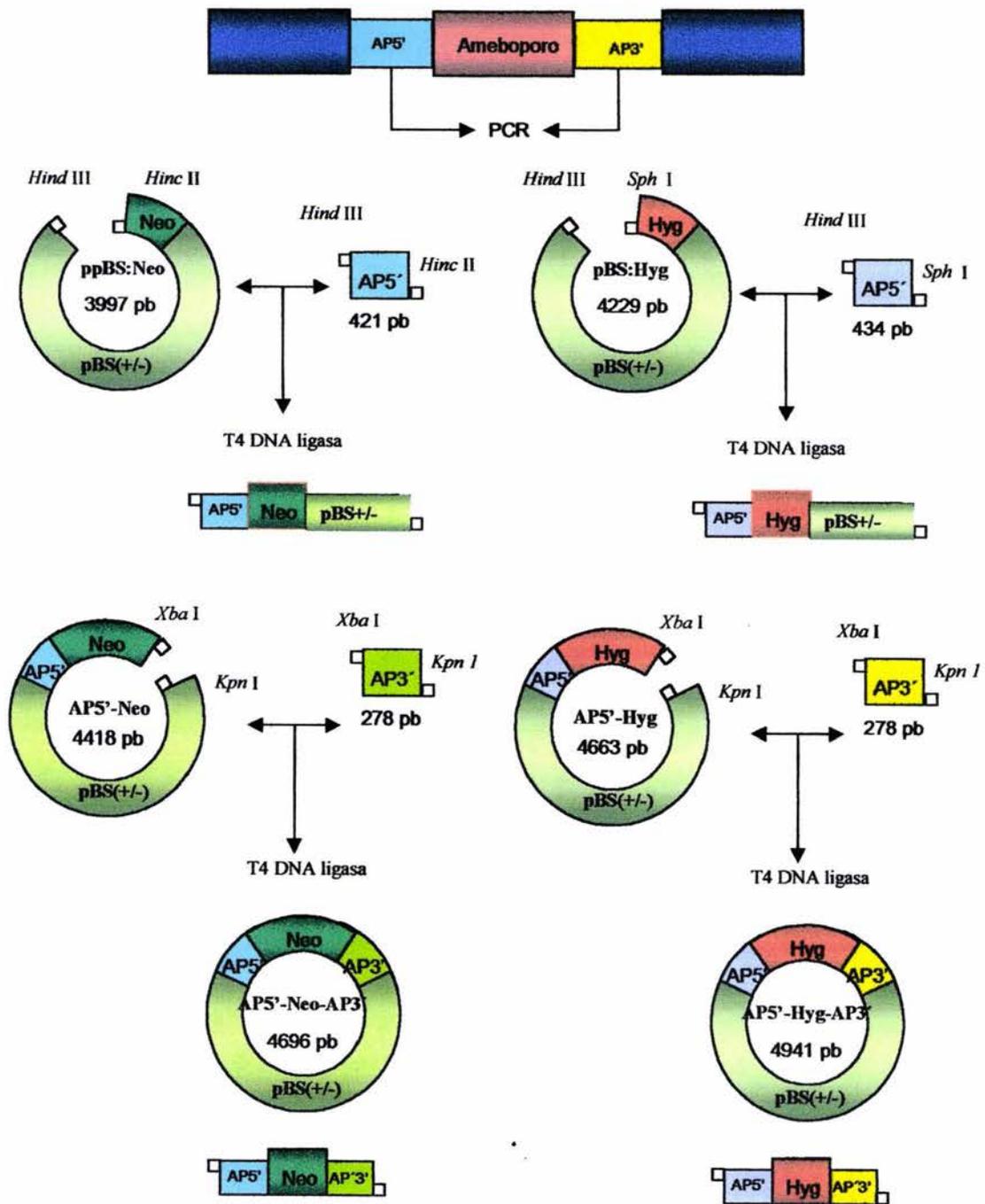


Figura No 3 Diagrama Experimental

10 MATERIALES Y MÉTODOS

10.1) Material Biológico.

10.1.1) Bacterias.

♣ *Escherichia coli* DH10B.

Son altamente eficientes, químicamente competentes para generar bibliotecas geonómicas. La cepa DH10B es *endA1*, lo cual mejora la calidad del ADN de plásmido obtenido de mini-preparaciones. Es *hsdRMS*, lo que permite clonar el ADN sin que se digiera por endonucleasas de restricción internas. La eficiencia máxima de las células calcio competentes DH10B es de 1×10^9 transformantes/ μg de monómero pUC19 ADN en una reacción de transformación de 100 μl .

- $>1 \times 10^9$ eficiencia de transformantes/ μg para la construcción de bibliotecas o transformaciones de ADN en cantidad limitante.
- Eliminación de los sistemas de restricción *mcrA*, *mcrB*, *mrrRMS* para permitir la construcción de bibliotecas geonómicas más representativas.
- Acepta plásmidos de tamaño grande debido a la mutación de *endA1*.

Genotipo: F' *mcrA* Δ (*mcr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*dlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (*ara,leu*)7967 *galU galK* λ *rpsL nupG*.*

♣ *Escherichia coli* SURE.

Reducen arreglos y eventos de deleción. Sirven para clonar ADN con secuencias repetidas invertidas o estructuras secundarias, como Z-ADN que puede ser rearrreglada o eliminada por otro sistema de reparación de *E.coli*. Las células SURE facilitan la clonación de ADN que contiene esas estructuras irregulares por la remoción de genes asociada con el rearrreglo y eliminación de estos ADN. El sistema de reparación UV (*uvrC*) y la vía de reparación SOS (*umuC*) involucrados en la reparación de lesiones del ADN, y cuya remoción resulta en un incremento en la estabilidad del ADN 10 a 20 veces mayor conteniendo repetidos invertidos largos. Las proteínas SbcC y RecJ de *E. coli* están involucradas en ciertos tipos de recombinación y mutaciones grandes en estos genes han incrementado la estabilidad de estructuras Z-ADN. La combinación de las mutaciones de *recB* y *recJ* confieren un fenotipo deficiente en recombinación a las células SURE ya que reduce enormemente la recombinación homóloga, de la misma manera que una mutación en el gene *recA*. Las células SURE son también restricción-negativa *mcrA*, (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 171 lo que permite la clonación de ADN metilado. El gene *endA1* ha sido mutado para obtener alta calidad de ADN de plásmido en mini-preparaciones que puede ser producido desde estas células.

Genotipo: Δ (*mcrA*) 183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kan^r* [F' *proAB lacI^q Z* Δ *M15 Tn 10*(Tet^r)]

10.1.2) Parásitos.

Se utilizó la cepa de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS, la cual se creció en condiciones axénicas en medio TYI-S-33. (Diamond et al; 1978)

10.1.3) Plásmidos.

10.1.3.1) pBS:Neo (3997pb).

Este vector contiene la secuencia de 792 pb que codifica para Neomicina (Neo) que confiere resistencia a G418 amplificada por PCR, clonado en los sitio *Hinc* II del sitio de policlonación del vector pBlue Scribe(-). En la secuencia del esqueleto del vector está contenida la secuencia que codifica para Ampicilina usada para seleccionar bacterias conteniendo el plásmido.

10.1.3.2) PBS:Hyg (4229pb).

Este vector contiene la secuencia de 1026 pb que codifica para Hygromicina (Hyg) amplificada por PCR, clonado en los sitio *Msc* I y *EcoR* V del sitio de policlonación del vector pBlue Scribe(+). En la secuencia del esqueleto del vector está contenida la secuencia que codifica para Ampicilina usada para seleccionar bacterias conteniendo el plásmido.

10.2) **Extracción del ADN de amiba**

Referencia: Rebeca Manning Cela (Mezcla de varias técnicas).

Se cosechó de $1-10 \times 10^6$ amibas en fase logarítmica de crecimiento (48 horas), se centrifugó a 1800rpm/ 4min., la pastilla se lavo 3 veces con PBS, se resuspendió cuidadosamente en un volumen igual de buffer de lisis frío y se revisó la integridad de las amibas al microscopio, se agregó Nonidet P-40 al 10% a una concentración final del 1% y se agitó vigorosamente dentro del baño de hielo, se revisó al microscopio la ruptura de todas las amibas y la integridad de los núcleos, la suspensión de núcleos se colocó sobre 10ml. de un colchón de sacarosa 1M en tubos Corex de 30ml y se centrifugó a 6000rpm/12 min. (rotor sorvall HB-4), se retiró con cuidado el sobrenadante y se resuspendió la pastilla muy suavemente en 500µl de EDTA 0.5M pH8/sarcosil 1%, se extrajo con un volumen igual de fenol equilibrado con inversiones suaves/ 1 minuto, se centrifugó 3 min. para separar las fases y se retiró la fase orgánica (que en este caso es la fase superior, ya que a tan alta concentración de sal usada las fases se invierten), se extrajo nuevamente con un volumen igual de fenol equilibrado como se indicó anteriormente, se extrajo 2 veces más con un volumen igual de cloroformo-isoamílico recuperando en ambos casos la fase acuosa (fase superior), el ADN se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol frío e inversiones suaves hasta que se formó la red, la cual se recuperó con una punta de micropipeta y se resuspendió con cuidado en 500µl de agua estéril, se precipitó el ADN con 1/10 del volumen de una solución de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol frío obteniéndose nuevamente una red, por último el ADN se resuspendió en 500µl de agua destilada estéril y se determinó su concentración por D.O. y en geles de agarosa donde también se confirma la integridad y pureza del ADN.

10.3) Preparación de Células Calcio Competentes.

Referencia Bibliográfica.- Dower *et al*; 1988, Sambrook, *et al.*, 1989.

El tratamiento aplicado a *Escherichia coli* provoca la eliminación de la membrana externa y además debilita la pared celular de la bacteria, para facilitar la entrada de ADN de plásmido al citoplasma bacteriano. La preparación de las células es un proceso muy delicado en el que hay que cuidar que las bacterias se encuentran en fase logarítmica de crecimiento y que todas las soluciones estén a 4°C y el procedimiento se haga en frío. Se prepararon las células calcio competentes de las siguientes cepas DH5 α , DH10B y SURE; para lo cual se realizó el siguiente método para cada una de ellas:

Se inoculó una colonia bacteriana fresca en 20 ml de medio LB en un matraz de 250 ml y se dejó toda la noche. De este cultivo se tomaron 2 ml y se pusieron en un matraz de 250 ml con 20 ml de medio TYM, en este paso el cultivo se dejó crecer hasta que se observó una D.O. entre 0.2-0.8. Se colocó todo el cultivo anterior en un matraz de 2 lt el cual tenía previamente 100 ml de medio TYM y se dejó incubar a una D.O. entre 0.5 a 0.9. Se agregó medio TYM hasta que alcanzó los 500 ml finales y se dejó crecer hasta que alcanzó una D.O. de 6.0 (esta lectura debe ser exacta ya que cualquier variación influye de manera considerable en la eficiencia de las células); el cultivo se colocó inmediatamente dentro de agua con hielo. Se centrifugó a 4000rpm 15'/4°C posteriormente se desechó el sobrenadante se resuspendió muy suavemente en 100ml de la solución TFBI. Después se centrifugó a 4000 rpm/ 8min./ 4°C, se desecho el sobrenadante se resuspendió muy suavemente en 20 ml de la solución TFBII. Se distribuyó en fracciones de 150 μ l en tubos eppendorf y se congelaron en hielo seco-etanol, finalmente se almacenaron en el ultracongelador. Posteriormente las células se transformaron con diferentes concentraciones de ADN de plásmido (0.1, 1.0 y 10 ng), para conocer su eficiencia de transformación. Cabe mencionar que para lograr una transformación exitosa la eficiencia de las células competentes debe de encontrarse dentro de los límites establecidos (10⁷ y 10⁸ transformantes/ μ g ADN).

10.4) Diseño de oligonucleótidos.

Referencia Bibliográfica.- Sambrook, J. *et al*; 1989.

Un oligonucleótido es una cadena de ácido nucleico formado por un número variable de bases nitrogenadas que van desde 10 hasta 30 nucleótidos. También conocidos como *primers*, sirven para alinearse con el ADN de cadena sencilla para formar un segmento de cadena doble, que sirve como cadena iniciadora para la amplificación sucesiva de la reacción en cadena de la polimerasa. Para el diseño de los *primers* es necesario conocer la secuencia de nucleótidos de la cadena que se desea amplificar; también se debe considerar que los *primers* tengan una Tm muy parecida (esto se logra aumentando o disminuyendo el número de nucleótidos de cada *primer* hasta lograr su homogenización en contenido de GC y por lo tanto de su Tm). Finalmente se debe incluir al inicio y final del *primer* ciertas secuencias que sean reconocidas por enzimas de restricción, esto con el fin

de manipular el producto de PCR y así facilitar su clonación a secuencias circulares de ADN autoreplicativas (plásmidos, cosmidos, etc.).

En base a la secuencia nucleotídica de las regiones flanqueantes 5' y 3' del ameboporo se diseñaron oligonucleótidos para amplificar cada una de ellas. Para cada fragmento se diseñó un oligonucleótido sentido y otro antisentido conteniendo la secuencia que corresponde a la región flanqueante del ameboporo en el extremo 3' y en su extremo 5' una secuencia para el corte con la enzima de restricción que se utilizó en la estrategia de clonación. También al final del extremo 5' se agregaron los nucleótidos necesarios para asegurar un corte eficiente por las enzimas de restricción considerando que éstas están en un extremo.

El diseño de los *primers* fue el siguiente, indicándose en todos los casos en negrillas el sitio de restricción agregado para la posterior clonación de los productos amplificados y la T_m de cada *primer* se indica a la derecha de cada uno.

Ameboporo 1 Sentido (+). De la secuencia -402 a la -387 del ATG (+1) de la secuencia del gen del ameboporo.

CATAAGCTTGGGAGAGTCGAAGTATG $T_m=53$
Hind III

Ameboporo 2 Antisentido (-). De la secuencia -1 a la -18 del ATG (+1) de la secuencia del gen del ameboporo.

GGGGGTCAACGATTGTTTGTAAGATATG $T_m=53$
Hinc II

Ameboporo 3 Sentido (+). De la secuencia +294 a la +311 del ATG (+1) de la secuencia del gen del ameboporo.

GCTCTAGATAAGTTTTAAGCTACTC $T_m=48$
Xba I

Ameboporo 4 Antisentido (-):

De la secuencia +556 a la +532 del ATG (+1) de la secuencia del gen del ameboporo.

GGGGTACCCCAATAGATACTCTTCTTG $T_m=55$
Kpn I

Ameboporo 5 Antisentido (-):

De la secuencia -1 a la -18 del ATG (+1) de la secuencia del gen del ameboporo.

GCAGCTGTGCATGCGATTGTTTGTAAGATATG Tm=57
Sph I

10.5) Acoplamiento de oligonucleótidos

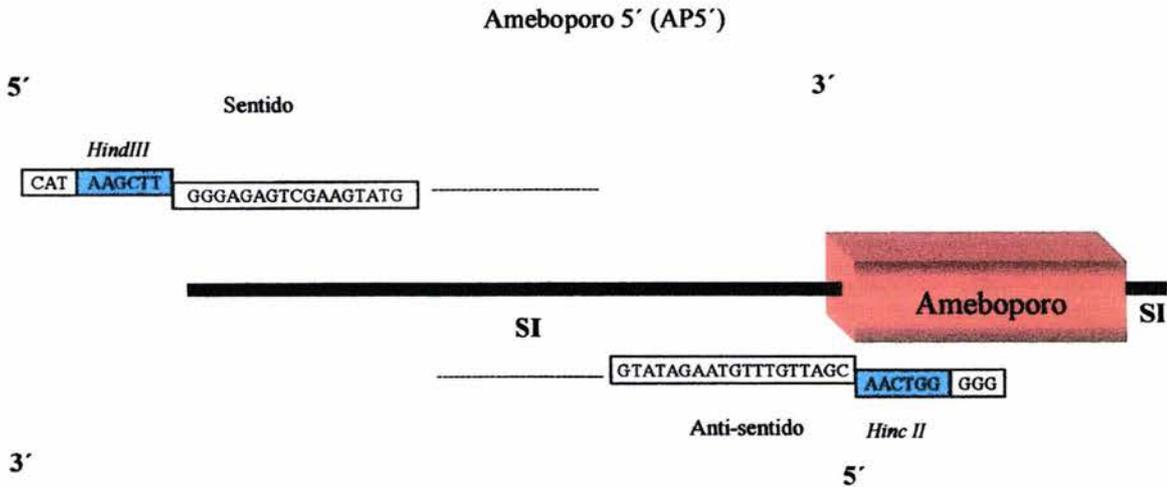


Fig. No 4. Acoplamiento de los *primers* Ameboporo 1 (sentido) y Ameboporo 2 (antisentido) de la Región flanqueante AP5' (421pb) del gen del ameboporo. El producto de PCR se usara para su posterior clonación en pBS:Neo.

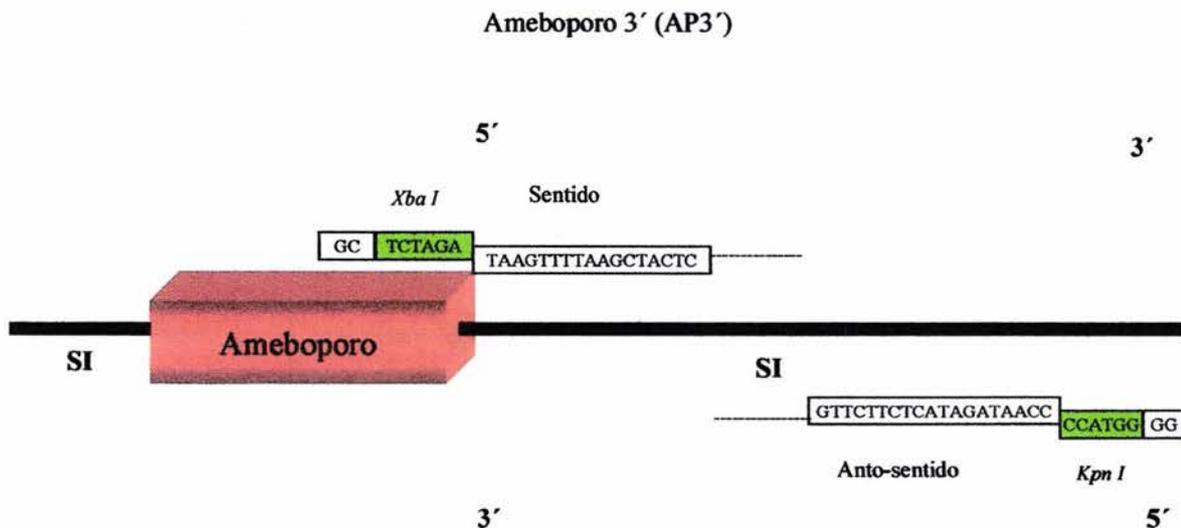


Fig. No 5. Acoplamiento de los *primers* Ameboporo 3 (sentido) y Ameboporo 4 (antisentido) de la Región flanqueante AP3' (278pb) del gen del ameboporo. El producto de PCR se usara para su posterior clonación en pBS:Neo.

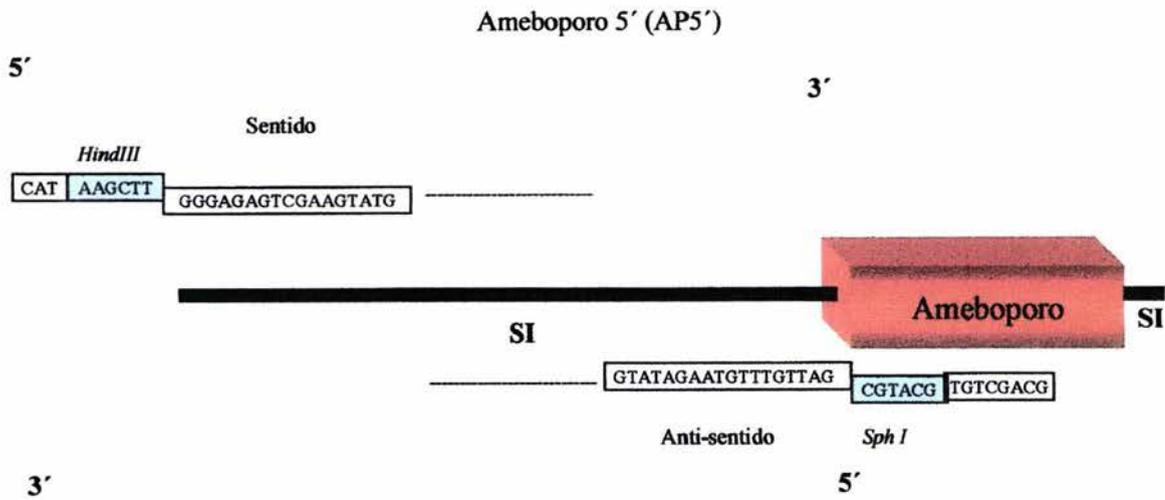


Fig. No 6. Acoplamiento de *primers* Ameboporo 1 (sentido) y Ameboporo 5 (antisentido) de la Región flanqueante AP5' (434pb) del gen del ameboporo. El producto de PCR se usara para su ulterior clonación en pBS:Hyg.

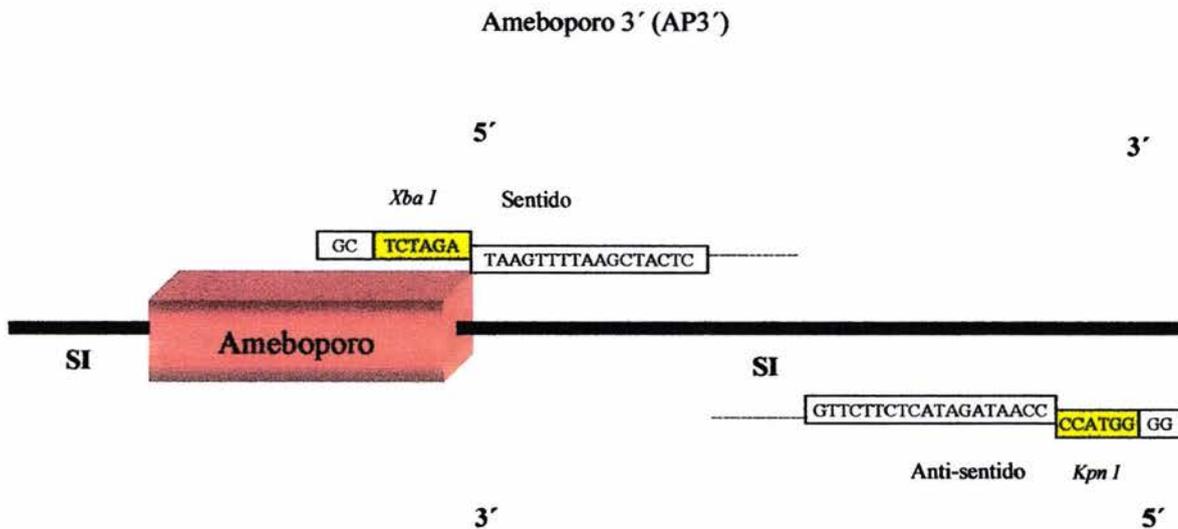


Fig. No 7. Acoplamiento de *primers* Ameboporo 3 (sentido) y Ameboporo 4 (antisentido) de la Región flanqueante AP3' (278pb) del gen del ameboporo. El producto de PCR se usara para su ulterior clonación en pBS:Hyg.

10.6) PCR

Referencia Bibliográfica.- Sambrook, J. *et al*; 1989.

La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento rápido para una amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN, que se encuentra entre dos regiones de secuencias conocidas, generando millones de copias a partir de una sola molécula. Esta técnica emplea a la enzima denominada "ADN Polimerasa I" la cual interviene en la síntesis del ADN de la célula. Comercialmente se le conoce como "Taq", ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* y es capaz de llevar a cabo la síntesis de ADN a temperaturas superiores de 90°C. La reacción de PCR consiste en varios ciclos repetidos a diferentes temperaturas para amplificar el ADN describiéndose a continuación cada una de estas etapas:

1. Desnaturalización.- esta etapa tiene como objetivo separar todo el ADN de doble cadena y convertirlo en ADN de cadena sencilla. Es necesario que se lleve a cabo a una temperatura superior a 90°C e inferior a 100°C. en un tiempo de 20-30''
2. Alineamiento.- consiste en el acoplamiento del oligonucleótido, cebador o *primer*, con la cadena molde de ADN para ayudar a la enzima Taq a reconocer un segmento de doble cadena: esta etapa se realiza a una temperatura que varía de acuerdo a la Tm (temperatura de desnaturalización de cada oligonucleótido) y el tiempo fluctúa entre 10 y 20''.
3. Síntesis.- como su nombre lo indica esta etapa consiste en la reacción de la enzima Taq para incorporar nucleótidos y completar la síntesis del ADN. La reacción se lleva a cabo a 72°C y el tiempo esta en función del tamaño de la cadena a amplificar.

Se amplificó la región flanqueante AP5' para lo cual se utilizó como ADN templado el ADN genómico de amiba y los iniciadores a emplear fueron los siguientes: iniciadores río arriba 5'CATAAGCTTGGGAGAGTCGAAGTATG3' (AP1) para ambos vectores pBS:Neo y pBS:Hyg y los iniciadores río abajo son: para pBS:Neo 5'GGGGTCAACGATTGTTTGTAAGATATG3'(AP2); y para pBS:Hyg 5'GCAGCTGTGCATGCGATTGTTTGTAAGATATG3' (AP5)

Para la amplificación de la región flanqueante AP3' que es igual tanto en pBS:Neo como en pBS:Hyg. Se utilizó también como templado el ADN genómico de amiba; los iniciadores río arriba: 5'GCTCTAGATAAGTTTAAAGCTACTC3' (AP3) y río abajo: 5'GGGGTACCCCAATAGATACTCTTCTTG3' (AP4). Se utilizaron 30ng de ADN genómico de *Entamoeba histolytica* HMI:IMSS, 100ng de *c/u* de los *primers*, 1.25mM de dNTPs, 50mM de Sulfato de Magnesio, 1/ 10 vol de solución amortiguadora 10X (Buffer Taq HiFi), 1 unidad de la enzima Taq ADN Polimerasa HiFi (Invitrogen) y agua Mili Q en un volumen de reacción de 100µl. El primer ciclo consistió en desnaturalizar el templado a 95°C/5minutos, Alineamiento a 55°C/1minuto y Tensión a 72°C/3minutos; esto fue seguido de 34 ciclos con las mismas condiciones anteriores. Finalmente el último ciclo se efectuó a 72°C durante 7minutos.

10.7) Purificación del Producto de PCR.

Para verificar nuestra amplificación se corrieron 10 µl de cada muestra AP5' y AP3' en un gel de agarosa al 1% TBE. Posteriormente el resto de la reacción del producto de PCR se precipitó con $\frac{1}{10}$ de Acetato de Sodio 3M más 2.5 volúmenes de etanol absoluto; se dejó a -70°C por 20', se centrifugó a 12,000rpm/15' a 4°C , se lavó con etanol al 70% y por ultimo se centrifugó a 12,000rpm/10' a 4°C , se secó perfectamente y se resuspendió en 10 µl finales de TE.

10.8) Electroforesis en geles de agarosa.

Referencia Bibliográfica.- Sambrook, J. *et al*; 1989.

El objetivo de la electroforesis es determinar el peso de una cadena de ADN basándose en el principio que cuando una corriente eléctrica pasa a través del gel, el ADN se desplazará a través del gel en una relación que es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, por lo tanto una banda de ADN más corta y con un peso molecular menor migra más rápido que una banda de ADN más larga.

Para preparar el gel se disolvió la cantidad de agarosa necesaria a la concentración deseada (1%) en la solución TBE 1X, después se calentó hasta solubilizarse y se vertieron 10ml sobre un vidrio con un peine que permitió la obtención de pozos (el no. de pozos depende de las muestras) donde se colocaron las muestras. Posteriormente ya que se solidificó el gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TBE 1X.

Cada alícuota de ADN de el producto de PCR (AP5' y AP3'), se mezcló con buffer de muestra, se colocó en cada uno de los pozos del gel y se corrió a 99 volts, se tiñó con bromuro de etidio (aprox. Al 1%) por 6 minutos, se lavó con agua miliQ durante 10' y finalmente se tomó la foto en un analizador de imágenes.

10.9) Análisis de restricción.

Las enzimas de restricción tienen la propiedad de reconocer secuencias cortas de unas 4-6 pares de bases en el ADN de doble hebra y cortar el ADN en todos los puntos donde se encuentre tal secuencia, llamada diana de restricción. La cantidad de enzima, ADN, buffer, concentraciones iónicas, la temperatura y duración de la reacción varían dependiendo de la aplicación específica. A continuación se describen las condiciones usadas para la digestión de fragmentos y vectores para su clonación así como para análisis de clonas positivas.

Los ADNs digeridos se utilizaron para reacciones posteriores las enzimas de restricción de pasos previos se inactivaron por calor a $65^{\circ}\text{C}/20$ minutos. Todas las enzimas utilizadas fueron adquiridas de *BioLabs*.

A continuación se describen las digestiones hechas para todas las construcciones y su verificación indicándose en la parte superior a que reacción corresponden.

Para generar extremos cohesivos tanto en el vector como en el inserto se realizaron las siguientes digestiones:

Inserto AP5'	
AP5'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Hinc</i> II	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Inserto AP5'	
Inserto ADN AP5'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Sph</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Inserto AP3'	
AP5'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Vector pBS:Neo	
ADN pBS:Neo	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Hinc</i> II	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Vector pBS:Hyg	
ADN pBS:Hyg	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Para verificar que efectivamente se ligó el fragmento clonado al vector se realizaron las siguientes digestiones.

Stet AP5' - pBS:Neo	
ADN AP5' -pBS:Neo	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Hinc</i> II	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Stet pBS:Hyg-AP3'	
ADN pBS:Hyg-AP3''	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis pBS:AP5'-Neo	
ADN AP5'Neo	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Hinc</i> II	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis pBS:Hyg-AP3'	
ADN pBS:Hyg-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Para realizar la siguiente clonación se efectuaron las digestiones siguientes, con el fin de generar nuevamente extremos cohesivos.

Lisis pBS:AP5'-Neo	
ADN AP5'-Neo	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis pBS:Hyg-AP3'	
ADN pBS:Hyg-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Sph</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Para verificar la correcta clonación de los fragmentos anteriormente ligados se realizaron las digestiones siguientes.

Stet AP5'-Neo-AP3'	
ADN AP5'-Neo-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Stet AP5'-Hyg-AP3'	
ADN AP5'-Hyg-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Sph</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis AP5'-Neo-AP3'	
ADN AP5'-Neo-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Hinc</i> II	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis AP5'-Hyg-AP3'	
ADN AP5'-Hyg-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis AP5'-Neo-AP3'	
ADN AP5'-Neo-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Xba</i> I	0.5 μ l
<i>Kpn</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

Lisis AP5'-Hyg-AP3'	
ADN AP5'-Hyg-AP3'	5 μ l
Buffer 2 10X	1 μ l
BSA 10X	1 μ l
<i>Hind</i> III	0.5 μ l
<i>Sph</i> I	0.5 μ l
H ₂ O	2 μ l
Total 10 μ l	

10.10) Transformación.

Debido a que los ácidos nucleicos no pueden ingresar a la bacteria autónomamente, es necesario que puedan atravesar la membrana para poder ser expresados y replicados, por tal motivo es necesario dar un choque térmico a la bacteria Ca²⁺ competente, para que pueda ingresar el ADN desnudo que se encuentre en el medio. Se transformaron bacterias Ca²⁺ competentes con ADN libre (desnudo) para lo cual se colocaron 100 μ l de buffer TFB-2 enseguida se adicionaron 5 μ l de ADN a transformar (según la concentración que se requiera transformar) y 50 μ l de células calcio competentes DH10B (célula receptora), se incubó en cuarto frío 10 minutos y se dio el choque térmico a 42°C por 1'30'', posteriormente se adicionó 1 ml de LB y se incubó a 37 °C por 1hr. Finalmente se plaquearon en cajas con LB agar con ampicilina (100 μ g/ml) y se dejaron incubando a 37°C por 24hrs.

10.11) Extracción y purificación de ADN de plásmido por lisis alcalina.

Referencia Bibliográfica.- Ausubel y col., 1999.

Es el procedimiento más usado, destruye RNA contaminante por la adición de 1 a 10mg/ml de solución de RNasas, es muy confiable para dar una mejor purificación del ADN.

Se inoculó una colonia bacteriana para cada una en 20ml de LB+100 μ g/ml de ampicilina, se incubó a 37°C por 24hrs. Se centrifugaron 10ml del cultivo anterior y se resuspendió la pastilla en 200 μ l de solución I y se mezcló vigorosamente. Se adicionaron 400 μ l de solución II (preparada fresca) y 300 μ l de solución III. Después de 5 minutos, se

centrifugó a 12000 rpm/5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 2 µl de RNAsas incubándose a 37°C/2hrs. Se extrajo con un volumen igual de Fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) mezclando vigorosamente hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 12000rpm /5 minutos a 4°C recuperando la fase acuosa (arriba). Se precipitó el ADN con un volumen igual de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000rpm/5 minutos a 4 . Se descartó el sobrenadante por aspirado y se resuspendió en 1ml de etanol al 70%, se centrifugó a 12000rpm/5 minutos a 4°C y se aspiró el sobrenadante y finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de TE.

10.12) Clonación o Ligación.

Referencia Bibliográfica.- Ausubel *et al*; 1999.

La ADN ligasa cataliza la formación de puentes fosfodiéster entre una yuxtaposición 5'fosfato y un hidroxilo terminal 3' en ADN duplex uniendo moléculas de ADN con extremos cohesivos compatibles.

La clonación consistió en insertar un segmento de ADN de interés dentro de un vector de clonación y obtener grandes cantidades del vector recombinante.

En cada caso el vector e inserto se precipitaron juntos y se resuspendieron en la cantidad de agua Mili Q estéril aquí descrita. Además antes de adicionar la enzima, se dio un choque térmico a 50°C/30 segundos (evitar estructuras secundarias en los ADNs), para aumentar la eficiencia de ligación; después se adicionaron 0.5µl de la enzima T4ADN Ligasa y se incubó a 16°C/ 4hrs. transcurrido el tiempo se le agregó nuevamente 0.5µl de la enzima T4ADN Ligasa para asegurar la ligación y se incubó a 16°C/ 4hrs.

A continuación se describen las reacciones de ligación realizadas para las diferentes construcciones indicándose en la parte superior de cada tabla a qué reacción específica corresponde.

Se procedió con la primera ligación del vector pBS:Neo y la región flanqueante AP5' tal como se describe abajo:

Ligación pBS:Neo---AP5'	
Vector ADN pBS:Neo+ <i>Hind</i> III + <i>Hinc</i> II	(3µl)
Inserto ADN AP5'+ <i>Hind</i> III + <i>Hinc</i> II	(5µl)
ATP 10mM	1µl
Buffer 10X T4 ADN Ligasa Biolabs	1µl
T4 ADN Ligasa Biolabs	0.5+0.5µl
H ₂ O MiliQ estéril	7µl
	Total 10 µl

Se ligó el fragmento AP3' amplificado por PCR al vector pBS:AP5'-Neo. Con la siguiente reacción:

Ligación AP5'-Neo-----AP3'	
Vector ADN AP5'-Neo+ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	(3 μ l)
Inserto ADN AP3'+ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	(4 μ l)
ATP 10mM	1 μ l
Buffer 10X T4 ADN Ligasa Biolabs	1 μ l
T4 ADN Ligasa Biolabs	1 μ l
H ₂ O MiliQ estéril	7 μ l
Total 10 μ l	

Se ligó el vector pBS:Hyg y el fragmento AP3' amplificado por PCR mediante la siguiente reacción:

Ligación pBS:Hyg-----AP3'	
Vector ADN pBS:Hyg+ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	(4 μ l)
Inserto ADN AP3'+ <i>Xba</i> I + <i>Kpn</i> I	(11 μ l)
ATP 10mM	2 μ l
Buffer 10X T4 ADN Ligasa Biolabs	2 μ l
T4 ADN Ligasa Biolabs	1 μ l
H ₂ O MiliQ estéril	15 μ l
Total 20 μ l	

Se ligó el vector anteriormente descrito (pBS:Hyg-AP3') y el fragmento AP5' con las condiciones siguientes:

Ligación AP5'-----Hyg-AP3'	
Vector ADN Hyg-AP3'+ <i>Hind</i> III+ <i>Sph</i> I	(2 μ l)
Inserto ADN AP5'+ <i>Hind</i> III+ <i>Sph</i> I	(5 μ l)
ATP 10mM	1 μ l
Buffer 10X T4 ADN Ligasa Biolabs	1 μ l
T4 ADN Ligasa Biolabs	1 μ l
H ₂ O MiliQ estéril	7 μ l
Total 10 μ l	

Se transformaron las ligaciones en las células calcio competentes DH10B utilizando 5 μ l de la reacción y plaqueándose 3 cajas con 350 μ l de la transformación en cada una.

10.13) Extracción de ADN de plásmido a baja escala (STET-prep).

Referencia Bibliográfica.- Ausubel *et al*; 1989.

Este procedimiento es recomendado para extraer pequeñas cantidades de ADN plasmídico (desde 1-24 cultivos) siendo un método rápido permitiendo analizar varias muestras a la vez.

De cada transformación se seleccionaron las colonias resistentes al antibiótico de selección y se colocaron 5ml de cultivo líquido LB + ampicilina (100 µg/ml). Se centrifugó 1.5 ml. de un cultivo de toda la noche a 12000 rpm por 30'', se resuspendió la pastilla en 350 µl de solución STET se mezcló en vortex y se agregaron 25 µl de 10 mg de lisozima/ tris pH8 10 mM (preparada fresca), se sometió a baño maría por 40'' exactos, se observó lisado, se mezcló suavemente y centrifugó 10 minutos a temperatura ambiente a 12000 rpm; se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se adicionaron 40 µl de acetato de sodio 2.5 M más 420 µl de isopropanol, se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm./ 5 minutos; se secó la pastilla parcialmente y se resuspendió en 1ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 12000 rpm, se retiró el sobrenadante, se secó y resuspendió en 25µl de TE.

10.14) Extracción de ADN por CsCl

Este procedimiento nos permite obtener ADN plasmídico en gran cantidad y pureza, libre de muchos contaminantes. Utiliza bromuro de etidio y centrifugaciones a altas revoluciones, estabilizando un gradiente que permite la separación de ADN cíclico del RNA y proteínas contaminantes.

Se inoculó una colonia bacteriana en 10ml de LB+Amp 100µg/ml y se dejó a 37°C todo el día. Se tomaron 5 ml del cultivo anterior y se pusieron en un matraz de 1 lt. más 500 ml de LB+Amp.100µg/ml y se dejaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm (rotor GSB)/10 minutos a 4°C se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 4 ml de solución TS después se le agregaron 4 ml de solución ELT y se colocaron a 70°C/10 min. exactos. Pasados los 10 minutos se centrifugó a 40,000 rpm/20min/20°C (rotor SW40Ti), se recuperó el sobrenadante y se le agrego volumen a volumen solución PEG-NaCl y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 7,000rpm/10min a 4°C(rotor GSB), se resuspendió en 3ml de solución TE, se adicionó 25 µl de RNAsa (5 µg/ml) y se incubó a 37°C aproximadamente 4 hrs. Posteriormente se agregaron 4gr de Cloruro de Cesio + 500 µl de Bromuro de Etidio (5 mg/ml). Se centrifugó a 90,000rpm/14hrs aprox. a 20°C (rotor STV90). Con la ayuda de la luz U.V. se recuperó la banda de ADN circular cerrado, se le agregó volumen a volumen isopropanol para quitar todo el Bromuro de Etidio tantas veces como sea necesario (aprox. 3 o 4), se agregaron tres volúmenes de etanol al 70 % y se dejó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 10,000rpm./10min./4°C, se resuspendió en TE y se extrajo volumen a volumen con fenol-cloroformo. Se centrifugó a 12,000rpm/1min. y recuperó la fase superior (dos veces). Se agregó 1/10 de acetato de sodio 2.5 M más 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -70°C/20min. Finalmente se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 12.000rpm./ 5min y se resuspendió en TE.

10.15) Cuantificación espectrofotométrica de ADN

Para cuantificar la cantidad de ADN y determinar la pureza de las muestras, se leyeron las densidades ópticas de éstas a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. Una D.O. corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de ADN de doble cadena, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla y aproximadamente 20 µg/ml para oligonucleótidos de cadena sencilla. Para cuantificar las muestras de ADN se hizo una dilución 1:1000 µl de agua y se vació en una cubeta de cuarzo. El ratio entre 260 nm / 280 nm = 1.8 indica la pureza de las muestras de ADN.

10.16) Purificación de ADN de geles de agarosa.

Cuando fue necesario las muestras o fragmentos de ADN se purificaron de geles de agarosa usando el método de purificación de Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit 50, no. Cat 28704 de Qiagen) siguiendo las especificaciones del proveedor:

Se corrió el ADN que se desea purificar en un gel de agarosa TAE al 1% en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a 60 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio y lavó (cubriéndolo de la luz con papel aluminio) y se cortó la banda de interés con la ayuda del transiluminador de luz U.V.

Se pesó el fragmento de gel de agarosa conteniendo el fragmento de ADN deseado y se hizo la conversión de gramos a mililitros asumiendo que 1 miligramos es igual a 1 µl. Se le agregó tres veces el peso de agarosa en µl de buffer QG y se incubó a 50°C por 10 min. hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se comprobó que el color de la mezcla fuera amarillo; si el color era naranja o violeta se adicionó 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5.0 y se mezcló hasta que el color se tornó amarillo. Se colocó la mezcla en una columna QIAquick y se centrifugó por 1min. a 13,000rpm. Se desechó el sobrenadante y se adicionó 0.5 ml de buffer QG a la columna y se centrifugó por 1' a 13,000rpm eliminando así los restos de agarosa. La columna se lavó con 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por 1min. a 13,000 rpm (antes de centrifugar es recomendable dejar 2-5 min. en el buffer si el ADN va a ser utilizado en ligaciones o secuenciación). Se desechó el sobrenadante y se volvió a centrifugar ya que se deben desechar todos los residuos de etanol. Finalmente se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml para eluir el ADN adicionando 50 µl de buffer EB, se dejó 1 min. y se centrifugó 1 min. a 13,000 rpm. El ADN purificado se almacenó a -20°C.

10.17) Tinción de núcleos de trofozoitos con DAPI.

Esta técnica nos permite teñir únicamente los núcleos ya que el colorante DAPI es ácidofilo por ello su atracción hacia el ADN.

Se colocó 1ml. de amibas en un cubreobjetos, dentro de una cajita de cultivo, se dejó incubando 20 minutos a 37°C para adherirse al cubre objetos, se lavó con PBS 1X a 37°C 3 veces, se fijaron las amibas con 1ml de formaldehído al 3.7% y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS 1X a 37°C, se permeabilizaron las amibas con acetona durante 5 minutos a -20°C, se dejó secar 20

minutos a temperatura ambiente y se colocaron 100 μ l de colorante DAPI, se lavó con PBS 1X, 2 veces y por último se montó en 30 μ l de Airvol. Por último se observaron en el microscopio de epifluorescencia (marca ZEISS) con ayuda de un filtro azul.

11 RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente el uso de los sistemas de transfección de DNA en *E. histolytica* en los últimos años, ha permitido un avance importante en el conocimiento de diversas áreas en este patógeno. Tal es el caso del estudio de la función de proteínas involucradas en la destrucción de tejidos como el ameboporo. Sin embargo, aún cuando este parásito es factible de ser transfectado y expresar DNAs exógenos, hasta la fecha no a sido posible la obtención de parásitos *Knock-out*. Por lo que los objetivos de este trabajo se centran en la construcción de 2 vectores de transfección para la obtención de *Knock-out* en *E. histolytica* por medio de recombinación homóloga utilizando como modelo el ameboporo.

Como primer objetivo se determinó el numero de núcleos por trofozoíto de *E. histolytica* HM1:IMSS de los cultivos del laboratorio, los cuales se tiñeron con DAPI como se describe en materiales y métodos. Como se observa en la tabla número 1y en la Figura No 8 se obtuvo un 83.6% de trofozoitos mononucleados.

CAMPO	No TOTAL	Mononucleadas	Binucleadas	Trinucleadas	Tetranucleadas
1	25	22	3		
2	21	20	1		
3	22	22			
4	24	22	2		
5	25	24	1		
6	12	11	1		
7	12	12			
8	15	13	2		
9	20	17	3		
10	24	22	2		
11	6	5	1		
12	10	8	2		
13	16	13	2	1	
14	24	17	2	4	1
15	27	20	5	1	1
16	23	17	5	1	
17	9	6	3		
18	22	17	4	1	
19	20	15	5		
20	13	9	4		
	370	289	48	8	2

Tabla No 1. Se observan los valores obtenidos para el muestreo de trofozoitos de amiba en donde se muestran el número de núcleos teñidos con DAPI. Arrojando 83.6% de trofozoitos mononucleados.

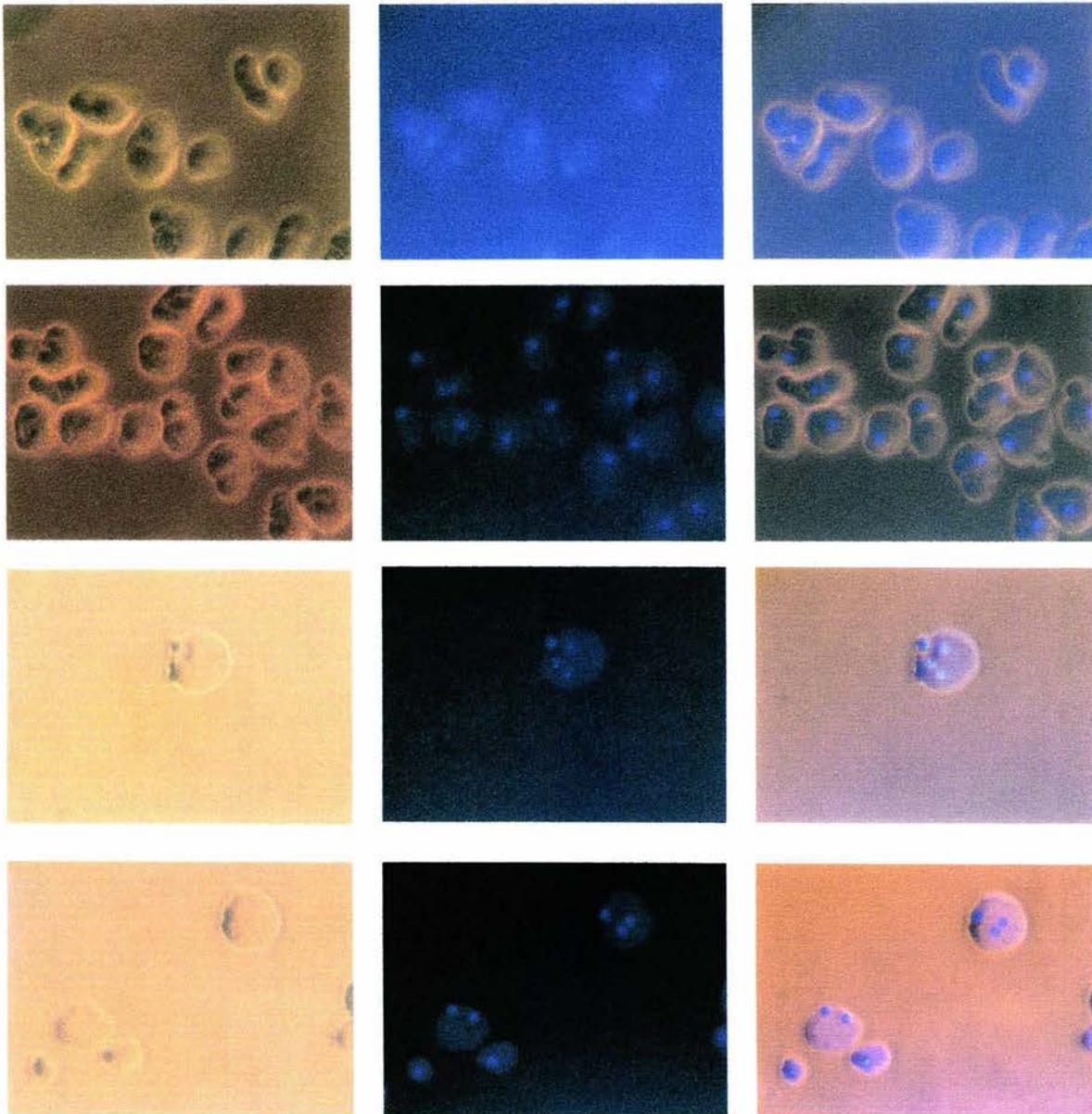


Figura No 8. Se muestran las tinciones con DAPI de los núcleos de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS, observandose por fila tres fotografías, las cuales corresponden a los mismos trofozoitos: a la izquierda los trofozoitos se observan en contraste de fase, en el centro se observan teñidos con DAPI y a la derecha la colocalización de las 2 fotografías anteriores (Contraste de fases-DAPI)

Como un primer paso en la estrategia de clonación para la construcción del vector pBS:AP5'NeoAP3' se amplificó por PCR la secuencia flanqueante 5' (AP5' de 421pb) del ameboporo. Se utilizó como templado ADN genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS y como iniciadores los oligos ameboporo 1 y 2. Como se muestra en la Figura No 9, se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 421pb que corresponde al tamaño esperado del fragmento. Posteriormente este producto de amplificación se sometió a una digestión con *Hind* III + *Hinc* II preparándolo para su clonación en el vector pBS:Neo.

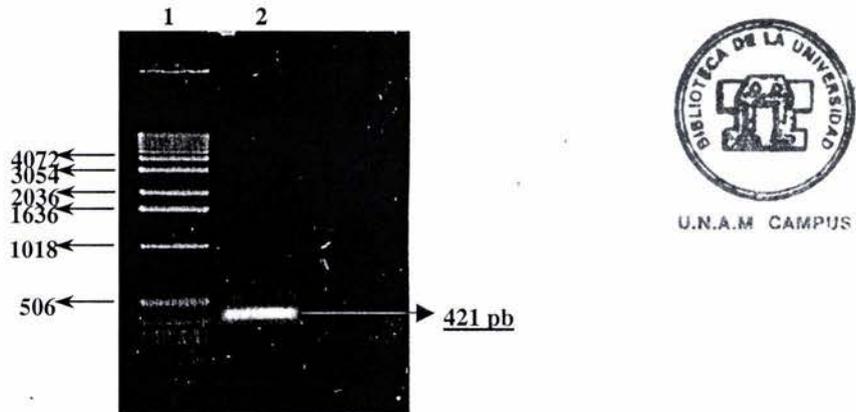


Figura No 9. Amplificación por PCR de la Región flanqueante 5' del gen del ameboporo denominada AP5'. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Carriles 1) Marcador de ADN de 1kb 3.5 μ l 2) Producto de PCR de la región flanqueante 5' del gen del ameboporo denominada AP5' de 421pb 10 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador y a la derecha el peso del producto amplificado.

IZT.

Se extrajo ADN de pBS:Neo por lisis alcalina y se digirió con las endonucleasas *Hind* III + *Hinc* II con la finalidad de linealizarlo (3997pb) y generar los mismos extremos cohesivos del producto de PCR AP5' (421 pb) permitiendo así una clonación dirigida. Una vez verificado que se obtuvo una digestión completa, el total de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% TAE y se purificó el vector linearizado/ *Hind* III + *Hinc* II con el Kit QIAquick de Qiagen como se indica en materiales y métodos. Como se muestra en la Figura No. 10, una alícuota del vector pBS:Neo+ *Hind* III + *Hinc* II ya purificado, se corrió en un gel de agarosa al 1% en TBE para verificar su pureza, integridad y concentración. Como se observa se obtuvo una única banda de 3997 pb que corresponde al peso molecular esperado.

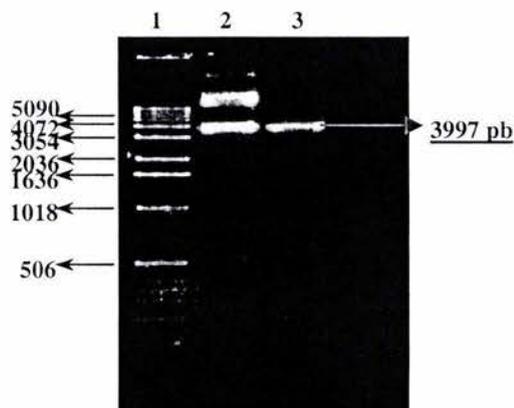


Figura No 10. Vector pBS:Neo linealizado con las endonucleasas *Hind* III + *Hinc* II y purificado con el kit de QIAquik. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Carriles 1) Marcador de ADN de 1kb 3.5 μ l. 2) Vector pBS:Neo de 3997pb 1 μ l. 3) Vector purificado pBS:Neo +*Hind* III + *Hinc* II de 3997pb 1 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayado el peso del vector.

Una vez que se obtuvieron tanto el vector como el inserto digeridos (*Hind* III + *Hinc* II) y purificados se corrieron ambos en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Figura No. 11) con la finalidad de calcular la cantidad necesaria para establecer las proporciones de cada uno en la reacción de ligación. Utilizando una relación de vector:inserto 1:2 ambos ADNs se precipitaron y se ligaron transformando posteriormente dicha ligación en células calcio competentes DH10B y seleccionando las colonias resistentes a ampicilina sembrando en placas de LB + 100 μ g/ml de ampicilina.

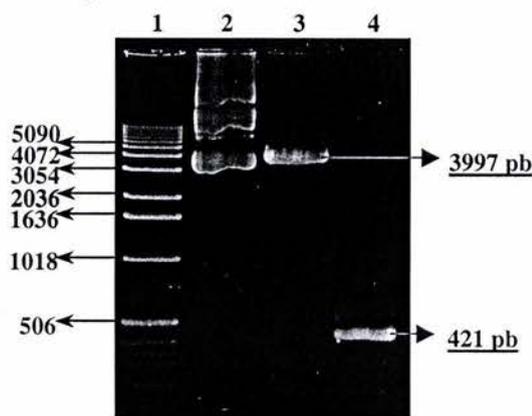


Figura No 11. ADN del vector pBS:Neo y de la región flanqueante AP5' del gen del ameboporo digeridos y purificados. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Carriles 1) Marcador de ADN de 1kb 3.5 μ l 2) vector pBS:Neo lisis alcalina 3997pb 1 μ l. 3) Vector purificado pBS:Neo +*Hind* III + *Hinc* II 3997pb 1 μ l 4) Región flanqueante del gen del ameboporo AP5' + *Hind* III + *Hinc* II de 421pb. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayado el peso molecular de las muestras.

Se obtuvieron varias colonias resistentes a ampicilina de las cuales se analizaron en grupos de 24 colonias por el método de STET como se describe en materiales y métodos. Para identificar las clonas positivas conteniendo la construcción deseada, los ADNs aislados se analizaron por su patrón de restricción con las enzimas *Hind* III+*Hinc* II que liberaría un

fragmento de 421 pb correspondiente a AP5' y otro de 3997 pb correspondiente al vector pBS:neo. En la Figura No. 12 se muestra un gel representativo del experimento completo en donde se observa una clona positiva (Figura No. 12, carril 4) obteniéndose las bandas esperadas de 3997 pb (BS:Neo) y 421pb (AP5').

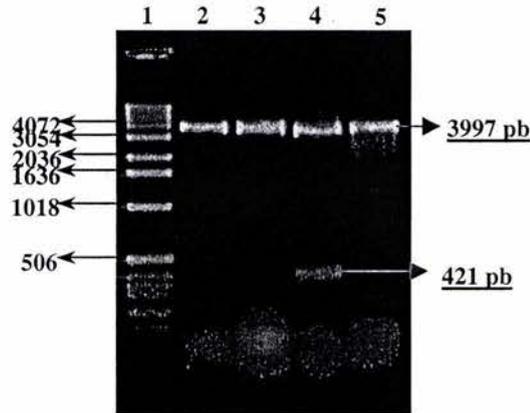


Figura No 12. Análisis de restricción mediante las enzimas *Hind* III + *Hinc* II, para la localización de la clona positiva de la ligación pBS:AP5'-Neo. Gel de agarosa al 1% , teñido con Bromuro de Etidio. Carriles: 1) Marcadores de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) Clona 1 del Stet pBS:AP5'-Neo + *Hind* III + *Hinc* II, 5 μ l. 3) Clona 2 del Stet pBS:AP5'-Neo + *Hind* III + *Hinc* II, 5 μ l. 4) Clona 6 del Stet pBS:AP5'-Neo + *Hind* III + *Hinc* II, 5 μ l. 5) Clona 7 del Stet pBS:AP5'-Neo + *Hind* III + *Hinc* II, 5 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador molecular y a la derecha subrayado el peso molecular de las muestras.

Se extrajo ADN por lisis alcalina de la clona positiva pBS:AP5'-Neo identificada anteriormente y se digirió con las enzimas de restricción *Hind* III+*Hinc* II. Como se aprecia en la Figura No 13, se obtuvieron las 2 bandas de 3997 pb (BS:Neo) y 421pb (AP5') las cuales corresponden a los pesos moleculares esperados verificando la pureza e identidad de nuestra clona positiva.

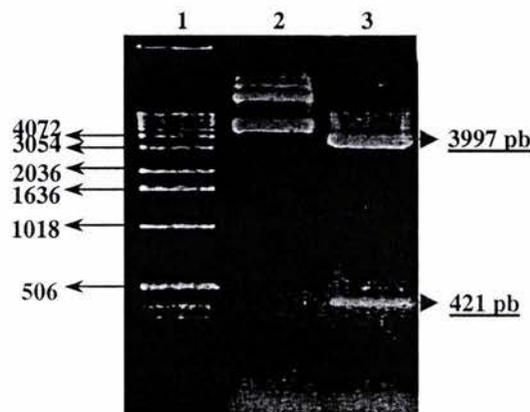


Figura No 13. Análisis de restricción con las enzimas *Hind* III + *Hinc* II del plásmido pBS:AP5'-Neo. Gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) ADN del vector pBS:AP5'-Neo extraído por lisis alcalina de 4418pb. 1 μ l. 3) Vector pBS:AP5'-Neo + *Hind* III + *Hinc* II. 5 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador molecular y a la derecha se muestra subrayado el peso molecular de las muestras.

Como se indica en la estrategia experimental el siguiente paso, fue la clonación de la secuencia flanqueante 3' de ameboporo (AP3') en el vector obtenido anteriormente (pBS:AP5'-Neo de 4418pb) para obtener así pAP5'-Neo-AP3'. Por un lado, se amplificó por PCR la secuencia flanqueante 3' del ameboporo de 278pb denominada AP3'. Se utilizó como templado ADN genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS y como iniciadores los oligos ameboporo 3 y 4. Como se muestra en la Figura No 14, se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 278pb que corresponde al tamaño esperado del fragmento. Posteriormente este fragmento se digirió con las enzimas de restricción *Xba* I y *Kpn* I preparándolo para ser clonado de manera dirigida en el vector pAP5'-Neo.

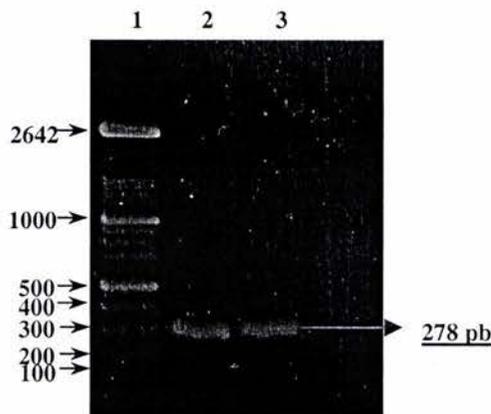


Figura No 14. Amplificación por PCR de la región flanqueante 3' (AP3') del gen del ameboporo. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) AP3' de 278pb purificado (A), 1 μ l. 3) AP3' de 278pb purificado (B). 1 μ l. A la izquierda se observan los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayado los del fragmento amplificado.

De manera paralela el vector pBS:AP5'-Neo se sometió a una digestión con *Xba* I y *Kpn* I. Una vez que se verificó que se obtuvo una digestión completa del vector, el total de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% TAE purificando el ADN del vector linearizado con el Kit QIAquick de Qiagen como se indica en materiales y métodos. Se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X alícuotas del ADN del plásmido pBS:AP5'-Neo y del inserto AP3' digeridos (*Xba* I y *Kpn* I) y purificados (Figura No 15) con la finalidad de evaluar su pureza e integridad y calcular la cantidad necesaria para establecer las proporciones de cada uno en la reacción de ligación. Utilizando una relación de vector:inserto 1:2 ambos ADNs se precipitaron y se ligaron transformando posteriormente dicha ligación en células calcio competentes DH10B y seleccionando las colonias resistentes a ampicilina sembrando en placas de LB + 100 μ g/ml de ampicilina.

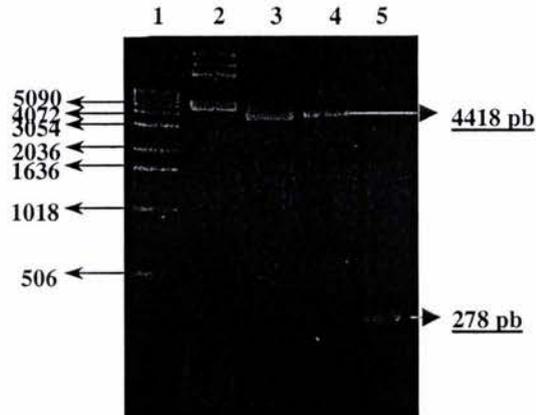


Figura No 15. ADN del vector pBS:AP5'-Neo y del fragmento AP3' digeridos y purificados. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) ADN del vector pBS:AP5'-Neo (4418pb) 1 μ l. 3) pBS:Ap5'-Neo+ Xba I + Kpn I, 1 μ l. 4) ADN de pBS:AP5'-Neo+ Xba I + Kpn I purificado 1 μ l. 5) AP3' + Xba I + Kpn I purificado de 278pb, 1 μ l. A la izquierda se observan los pesos moleculares del marcador y a la derecha el peso molecular de las muestras a ligar.

Se obtuvieron aproximadamente 50 colonias resistentes a ampicilina de las cuales se analizaron en grupos de 10 y 20 colonias por el método de STET. Se analizaron de acuerdo a su patrón de restricción con las enzimas *Xba* I y *Kpn* I con el propósito de identificar la clona positiva, condiciones con las que el fragmento clonado correspondiente a AP3' se liberaría observándose como una banda de 278pb y otra de 4418 pb correspondiente al vector pBS:AP5'-Neo. En la Figura No 16 se muestra un gel representativo del experimento completo en donde se aprecia una clona positiva (Figura No. 16, carril 9), la cual presenta como se esperaba las bandas de 4418pb (pBS:Ap5'-Neo) y 278pb (AP3').

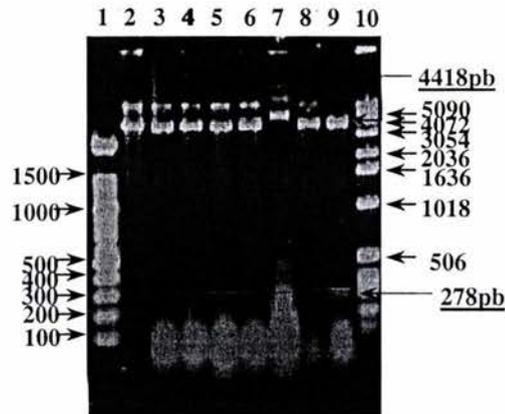


Figura No 16. Determinación del patrón de restricción mediante las enzimas *Xba* I y *Kpn* I de la clona positiva AP5'-Neo-AP3'. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 100pb, 3.5 μ l. 2) C-1 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 3) C-2 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 4) C-3 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 5) C-4 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 6) C-5 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 7) C-6 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 8) C-7 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 9) C-8 de AP5'-Neo-AP3' + Xba I + Kpn I, 5 μ l. 10) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. A los lados se muestran los pesos moleculares de los marcadores y a la derecha subrayado el peso molecular de la clona positiva.

Se extrajo ADN por lisis alcalina de la clona positiva (C-8) de pAP5'-Neo-AP3' (4696pb) y se digirió con diversas enzimas de restricción para verificar que el patrón obtenido corresponde al vector deseado. Para liberar las regiones flanqueantes AP5' (421pb) y AP3' (278pb) se utilizaron las enzimas de restricción *Hind* III + *Hinc* II y *Xba* I + *Kpn* I respectivamente. También se utilizó *Hind* III + *Kpn* I para liberar el cassette completo de AP5'-Neo-AP3' (1491pb). Como se muestra en la Figura No 17, en el carril 3 se aprecian las 2 bandas correspondientes a pBS:Neo-AP3' (4275pb) y a la secuencia AP5' (421pb) con las enzimas *Hind* III + *Hinc* II; en el carril 4 las bandas correspondientes a pBS:AP5'-Neo (4418pb) y a la región flanqueante AP3' (278pb) con *Xba* I + *Kpn* I; y en el carril 5 la liberación de el cassette completo AP5'-Neo-AP3' (1491pb) y el vector pBS (3204pb) con *Hind* III + *Kpn* I. Estos resultados nos verificaron que la clona 8 corresponde a la construcción pAP5'-Neo-AP3'.

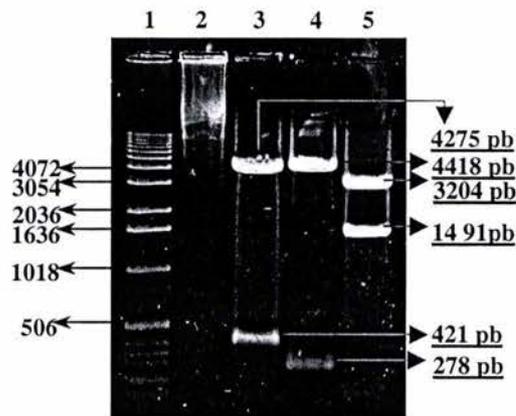


Figura No 17. Análisis del vector de transfección pBS:AP5'-Neo-AP3' de acuerdo a su patrón de restricción. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) Ap5'-Neo-AP3' extraído por CsCl, 1 μ l. 3) Ap5'-Neo-AP3' + *Hind* III + *Hinc* II, 1 μ l. 4) Ap5'-Neo-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 1 μ l. 5) Ap5'-Neo-AP3' + *Hind* III + *Kpn* I, 1 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayados se observan los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos de las muestras digeridas.

Continuando con la estrategia experimental. Se prosiguió con la construcción del vector pBS:AP5'-Hyg-AP3'. Como primer paso se digirió el plásmido pBS:Hyg con las enzimas *Xba* I + *Kpn* I con la finalidad de linearizarlo (4229pb) y generar los mismos extremos cohesivos del producto de PCR de 278pb de AP3' obtenido anteriormente (Figura No 14), utilizado para clonarlo en el vector pBS:Neo. Una vez verificado que se obtuvo una digestión completa, el total de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% TAE y se purificó el vector linearizado (*Xba* I + *Kpn* I) con ayuda del Kit QIAquick de Qiagen como se describe en materiales y métodos. Se corrieron alícuotas de los ADNs del vector (pBS:Hyg) e inserto (AP3') digeridos (*Xba* I + *Kpn* I) y purificados, en un gel de agarosa al 1% TBE 1X con la finalidad de calcular la cantidad necesaria para establecer las proporciones de cada uno en la reacción de ligación (Figura No 18). Utilizando una relación de vector-inserto 1:2, ambos ADNs se precipitaron y se ligaron transformando posteriormente dicha ligación en células Calcio competentes SURE y seleccionando las colonias resistentes a ampicilina, sembrando en placas de LB + 100 μ g/ml de ampicilina.

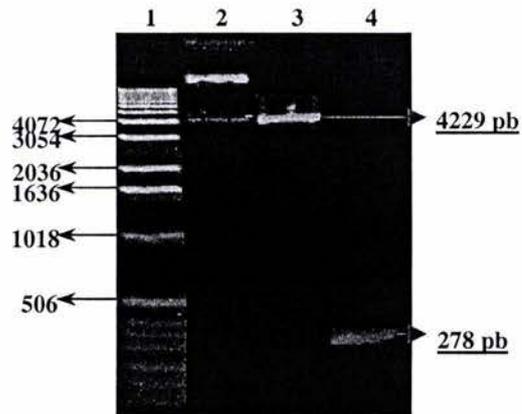


Figura No 18. ADN del vector pBS:Hyg y la región flanqueante 3' del gen del ameboporo (AP3'), digerida (*Xba* I + *Kpn* I) y purificada. Gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 100pb, 3.5 μ l. 2) Vector pBS:Hyg lisis alcalina 1 μ l. 3) Vector pBS:Hyg + *Xba* I + *Kpn* I, de 4229pb.1 μ l. 4) Región flanqueante 3' del gen del ameboporo (AP3') + *Xba* I + *Kpn* I, 1 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayado el peso molecular de las muestras.

Se obtuvieron 36 colonias resistentes a ampicilina de las cuales se analizaron en grupos de 12 colonias por el método de STET como se mencionó en materiales y métodos. Se analizaron de acuerdo a su patrón de restricción con las enzimas *Xba* I y *Kpn* I con el propósito de identificar la clona positiva, ya que esta liberaría el fragmento clonado de 278pb correspondiente a AP3', además de observar la banda correspondiente al vector pBS:Hyg de 4229pb. En la figura No 19 se muestra un gel representativo del experimento completo en donde se aprecia una clona positiva (C-27), la cual presenta las bandas de los pesos moleculares esperados de 4229pb (pBS:Hyg) y 278pb (AP3').

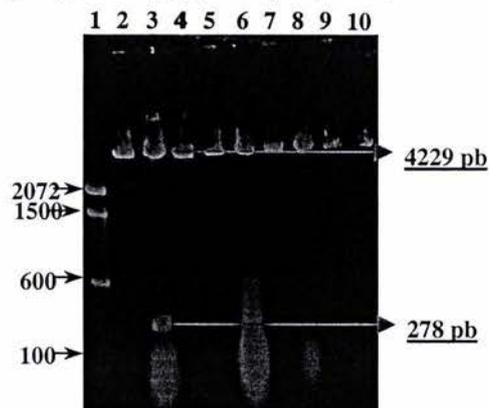


Figura No 19. Determinación del patrón de restricción con las enzimas *Xba* I + *Kpn* I de la clona positiva. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 100pb, 3.5 μ l. 2) C-26 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 3) C-27 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 4) C-28 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 5) C-29 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 6) C-30 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 7) C-31 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 8) C-32 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 9) C-33 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. 10) C-34 de pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. A la izquierda se observan los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayado el de la colonia esperada.

Se extrajo DNA por lisis alcalina de la clona positiva C-27 (de 4507pb) y se digirió con las enzimas *Xba* I y *Kpn* I para verificar nuestro DNA. Como se muestra en la Figura No 20, se obtuvieron las bandas de peso molecular esperado de 4229pb y 278pb correspondientes al vector y al inserto respectivamente. Posteriormente este vector se digirió con las endonucleasas de restricción *Hind* III y *Sph* I preparándolo para la clonación del fragmento AP5' (Figura No 20, carril 4).

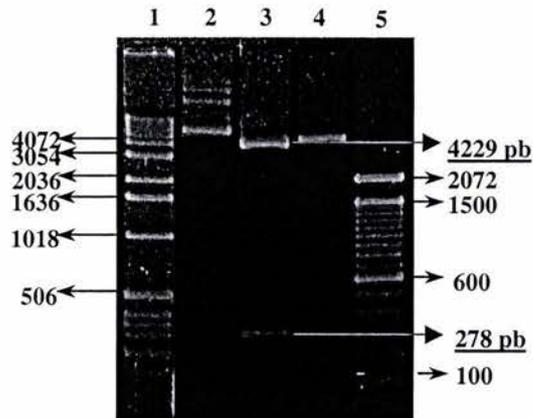


Figura No 20. Análisis de restricción del vector pBS:Hyg-AP3' con las enzimas *Xba* I + *Kpn* I y digestión de pBS:Hyg-AP3'+*Hind* III + *Sph* I. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5µl. 2) Lisis del vector pBS:Hyg-AP3'(4507pb) 1µl. 3) pBS:Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 1 µl. 4) pBS:Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 1 µl. 5) Marcador de 100pb, 3.5 µl. A la derecha subrayado se observan los pesos moleculares de las muestras. Y en ambos lados con negro los pesos moleculares de los marcadores.

Siguiendo con la estrategia de clonación para la construcción del vector pBSAP5'-Hyg-AP3'; se amplificó por PCR la secuencia flanqueante 5' (434pb) del ameboporo denominada AP5'. Ya que en este caso se utilizarán sitios de clonación diferentes a los utilizados en la construcción de pBS:Neo, amplificamos el fragmento AP5' utilizando un par diferente de iniciadores. Se utilizó como templado DNA genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS y como iniciadores los oligos ameboporo 1 y 5. Como se muestra en la Figura No 21, se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 434pb que corresponde al tamaño esperado. Posteriormente se sometió a una digestión con *Hind* III y *Sph* I preparándolo para su clonación en pBS:Hyg-AP3'.

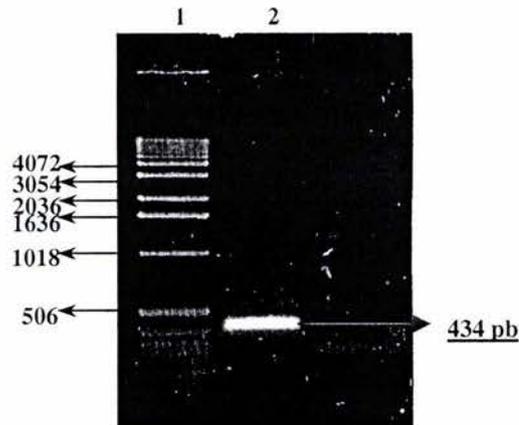


Figura No 21. Producto de amplificación por PCR de la región flanqueante 5' (AP5') del gen del ameboporo. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) AP5' de 434pb digerido (*Hind* III + *Sph* I) y purificado, 1 μ l. A la izquierda se observan los pesos moleculares del marcador y a la derecha el peso del fragmento amplificado.

Los DNAs del vector (pBS:Hyg-AP3' de 4507pb) e inserto (AP5' de 434pb) ya digeridos (*Hind* III y *Sph* I) y purificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Figura No. 22) con la finalidad de calcular la cantidad necesaria para establecer las proporciones de cada uno en la reacción de ligación. Utilizando una relación de vector-inserto 1:2, ambos DNAs se precipitaron y se ligaron transformando posteriormente dicha ligación en células Calcio competentes SURE y seleccionando las colonias resistentes a ampicilina, sembrando en placas de LB + 100 μ g/ml de ampicilina.

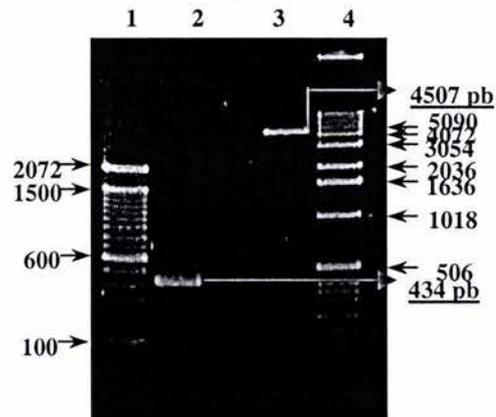


Figura No 22. ADN del vector pBS:Hyg-AP3' y la región flanqueante 5' (AP5') del gen del ameboporo digerida (*Hind* III + *Sph* I) y purificada. Gel de garosa al 1%, teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN 100pb, 3.5 μ l. 2) región flanqueante 5' del gen del ameboporo (AP5') + *Hind* III + *Sph* I de 434pb, 1 μ l. 3) Vector pBS:Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I de 4507pb, 1 μ l.. 4) Marcador de ADN de 1kb 3.5 μ l. Se muestran los pesos moleculares de ambos lados del gel y a la derecha se muestran subrayados los pesos moleculares de las muestras.

Se obtuvieron 42 colonias resistentes al antibiótico de selección, de las cuales se analizaron en grupos de 12 colonias por el método de S'TET' como se indica en materiales y métodos. Para identificar las clonas positivas conteniendo la construcción deseada, los DNAs aislados se analizaron por su patrón de restricción con las enzimas *Hind* III + *Sph* I que liberaría un fragmento de 434 pb correspondiente a AP5' y otro de 4507pb correspondiente al vector pBS:Hyg-AP3'. En la Figura No. 23 se muestra un gel representativo del experimento completo en donde se observa una clona positiva (clona 31, carril 9) obteniéndose las 2 bandas esperadas una de 4507 pb (pBS:Hyg-AP3') y otra de 434 pb (AP5').

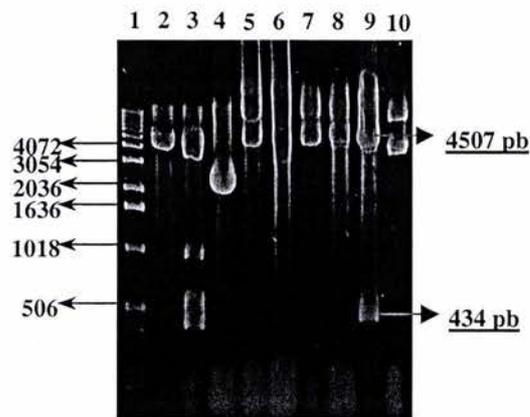


Figura No 23. Localización de la clona positiva pBS:AP5'-Hyg-AP3' de acuerdo a su patrón de restricción. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 1 μ l. 2) C-1 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 3) C-8 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 4) C-10 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 5) C-11 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 6) C-18 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 7) C-19 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 8) C-24 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 9) C-31 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 10) C-32 AP5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. A la izquierda se observan los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayados los de las muestras.

Se extrajo DNA por lisis alcalina de la clona positiva (C-31) de pAP5'-Hyg-AP3' (4941pb) y se digirió con las enzimas *Hind* III y *Sph* I para verificar nuestro DNA. Como se aprecia en la Figura No 24 se observan las bandas de peso molecular esperado, correspondientes a la secuencia del vector pBS:Hyg-AP3' (4507pb) y al fragmento AP5' (278pb).

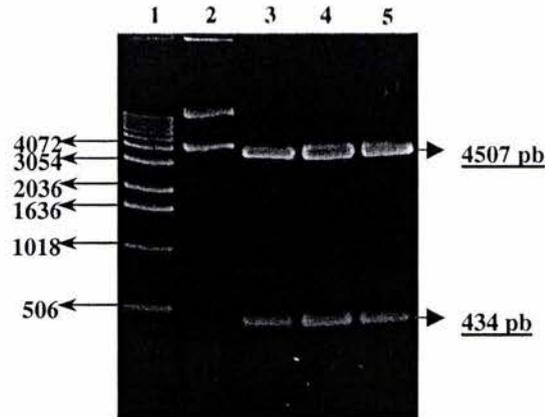


Figura No 24. Análisis de restricción de ADN obtenido por Lisis alcalina del vector pBS:AP5'-Hyg-AP3' con las enzimas *Hind III* + *Sph I*. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) Lisis alcalina de pBS:AP5'-Hyg-AP3' (4941pb), 1 μ l. 3) pBS:AP5'-Hyg-AP3' + *Hind III* + *Sph I* (A), 5 μ l. 4) AP5'-Hyg-AP3' + *Hind III* + *Sph I* (B), 5 μ l. 5) pBS:AP5'-Hyg-AP3' + *Hind III* + *Sph I* (C), 5 μ l. A la izquierda se observan los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayados los de las muestras.

Se analizó el patrón de restricción de la construcción pBS:AP3'-Hyg-AP5' con diferentes enzimas de restricción, para verificar nuestra construcción. Para liberar los fragmentos AP5' de 278pb y AP3' de 434pb se utilizaron *Hind III* + *Sph I* y *Xba I* + *Kpn I* respectivamente. Para liberar el cassette completo de AP5'-Hyg-AP3' se utilizaron las endonucleasas *Hind III* + *Kpn I*. Como se muestra en la Figura No 25, se observa el DNA de pBS:AP5'-Hyg-AP3' de 4941pb en el carril 2. En el carril 3 con las enzimas *Hind III* + *Kpn I* se observa la liberación de 2 bandas, una correspondiente al cassette pAP5'-Hyg-AP3' de 1787pb y otra a la secuencia de pBS: de 3204pb. En el carril 4 se aprecia la liberación de la región flanqueante AP5' de 434pb con las endonucleasas de restricción *Hind III* + *Sph I*, además de otra banda de aproximadamente 4507pb correspondiente al vector. En el carril 5 la digestión con *Xba I* + *Kpn I*, produjo la liberación de la secuencia que corresponde a la región flanqueante de AP3' de 278pb observándose también la banda de 4663pb correspondiente a la secuencia del vector. Estos resultados demuestran que los insertos correspondientes a las regiones flanqueantes AP5' y AP3' fueron clonados correctamente en el vector pBS:Hyg.

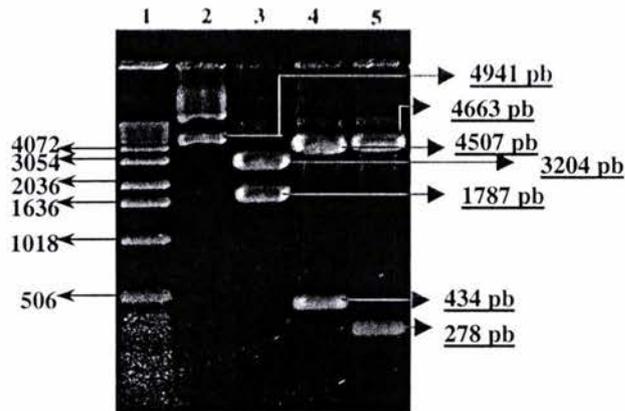


Figura No 25. Análisis del patrón de restricción del ADN del vector de transfección pBS:AP5'-Hyg-AP3' con diferentes enzimas de restricción. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de ADN de 1kb, 3.5 μ l. 2) Ap5'-Hyg-AP3', 1 μ l. 3) Ap5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Kpn* I, 5 μ l. 4) Ap5'-Hyg-AP3' + *Hind* III + *Sph* I, 5 μ l. 5) Ap5'-Hyg-AP3' + *Xba* I + *Kpn* I, 5 μ l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador y a la derecha subrayados se observan los pesos moleculares de las muestras.

Se extrajo DNA de ambas construcciones (pBS:AP3'-Neo-AP5 y pBS:AP3'-Hyg-AP5) por el método de CsCl como se describe en materiales y métodos, con la finalidad de obtener gran cantidad y pureza del DNA para su utilización en experimentos de transfección en trabajos futuros.

12 DISCUSIÓN

En años anteriores la transferencia de genes mediado por ADN ha sido usado ampliamente como una herramienta poderosa para la manipulación genética de células u organismos. La transfección y expresión de DNA exógeno en parásitos protozoos resulta difícil debido a sus difíciles condiciones de crecimiento así como a su particular organización y control de la expresión de genes. Es bien sabido por ejemplo, que en *E. histolytica* muchos determinantes de su virulencia son miembros de familias genéticas grandes lo que dificulta su análisis genético. Diversos vectores se han utilizado para la transfección de este parásito. Algunos de ellos han resultado eficientes para obtener una transfección transitoria (Gilchrist C. *et al*; 1995; BuB H. *et al*; 1995; Nickel R y Tannich E. 1994; Purdy JE. *et al*; 1994) y otros para obtener una transfección estable episomal de trofozoítos de *E. histolytica* (Arhets P. *et al*; 1998; Ankri S. *et al*; 1998; Bracha R, *et al*; 1999; Hamann L. *et al*; 1995; Moshitch-Moshkovitch S. *et al*; 1996; Moshitch-Moshkovitch S. *et al*; 1998; Purdy J. 1996; Rinat N. *et al*; 1997; Vines R. *et al*; 1995). Sin embargo hasta la fecha no se han logrado llevar a cabo estrategias de recombinación homóloga que permitan estudiar la función de genes blancos en parásitos *Knock-out* de *E. histolytica*. Ante este inconveniente, una alternativa ampliamente usada en células eucarióticas, es la transfección estable de plásmidos que codifican para RNAs antisentidos, utilizados como una herramienta eficiente para alterar la regulación o para llevar a cabo la inhibición funcional de la expresión del gen de interés, sobre todo para aquellos pertenecientes a familias multigénicas (Scherczinger *et al.*, 1992). Usando este diseño experimental en *E. histolytica* se ha logrado por ejemplo la inhibición antisentido de la proteína RP-L21 (Petter *et al*; 1994; Moshitch.Moshkovitch *et al*; 1997) en donde se observó una acumulación de transcritos que son incapaces de unirse a poli-ribosomas, así como para lograr la inhibición de la expresión de proteinasas de cisteína (Ankri *et al*; 1998; 1999b). También, utilizando un plásmido híbrido que expresa un antisentido para la secuencia que codifica para el ameboporo (pAP-R2) se ha logrado una inhibición hasta de un 60% de la expresión de este gen, apoyando los hallazgos previamente obtenidos por evidencias bioquímicas que sugiere la participación de esta molécula en el proceso citotóxico y citolítico de la ameba (Bracha *et al*; 1999). Sin embargo, ya que con esta estrategia no se logra el abatimiento total del ameboporo es difícil evaluar por un lado, la demostración inequívoca de su participación en los mecanismos de citotoxicidad y citólisis así como el grado en que participa en estos, con respecto a otras moléculas también participantes o si en su ausencia se activan otras proteínas o mecanismos que substituyan su función. Esto deja ver que aún cuando el método usando antisentidos resulta ser un buen acercamiento para el análisis funcional de una proteína, la limitante de no poder inhibir completamente su expresión continua siendo un problema para completar su caracterización funcional.

Estos antecedentes dejan claro que la obtención de parásitos *knock-out* en ameba sigue siendo indispensable como se ha observado en otros parásitos como *trypanosoma cruzi* (Manning-Cela, R., *et al*; 2001). Uno de los problemas que se ha reportado, podría ser determinante en la imposibilidad presentada hasta ahora para la obtención de *knock-out* en *E. histolytica*, es que este parásito presenta una ploidía variable (más de 4n) en su genoma presentando desde uno hasta 4 núcleos (Willhoeft and Tannich, 1999). Considerando que

este trabajo fue desarrollado para la construcción de vectores de transfección que puedan ser usados en trabajos futuros para la obtención de amibas *knock-out*, analizamos en primer término la ploidía de los cultivos de amiba con los que contamos. Determinamos el número de núcleos contando estos bajo el microscopio de fluorescencia después de teñirlos con DAPI. Los resultados mostraron que el 83% de los trofozoitos de amiba son mononucleados en tanto que el otro 17% restante en su mayoría son binucleadas y muy pocas tetranucleadas (Tabla No 1, Figura No 8). Considerando que un alto porcentaje de la población es mononucleada sugiere que la estrategia para la obtención de amibas *knock-out* es factible en nuestro sistema, al menos con lo que respecta a este criterio.

El objetivo principal de este proyecto fue el de sentar las bases para el establecimiento de las condiciones para la obtención de amibas *knock-out*. Considerando todos los conocimientos hasta ahora reportados en la literatura, con respecto a la organización y expresión del genoma de amiba, sin duda un muy buen candidato para usar como modelo, sería aquél que además de estar representado en el genoma como copia única, se tuvieran suficientes conocimientos tanto bioquímicos como genéticos para facilitar la obtención y caracterización de amibas *knock-out*, además de su relevancia en la biología y patogenicidad de la amiba.

Desde hace más de 17 años del descubrimiento de las proteínas del ameboporo, éstas han generado gran interés ya que fueron consideradas como uno de los candidatos principales del efecto citolítico mostrado por los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, sobre células de mamífero. Debido a esto el ameboporo es una de las moléculas con mayores avances en su caracterización bioquímica y molecular (Lynch y col 1982; Young y col, 1982; Rosenberg et al., 1989; Leippe y Muller-Eberhard, 1994; Leippe, 1997; Bracha y col. 1999) colocándola como un candidato ideal en el desarrollo de este proyecto, por lo que decidimos usarlo como modelo.

En base a estos antecedentes siguiendo con nuestros objetivos realizamos la construcción de los vectores de transfección pAP5'-Neo-AP3' y pAP-5'-Hyg-AP3' que contienen tanto la secuencia flanqueante 5' como 3' del ameboporo. Ya que conocemos la secuencia del ameboporo y sus regiones flanqueantes se diseñaron "primers" (Figura 3-6) para amplificar ambas regiones por PCR a los que también se les adicionó en sus extremos una secuencia para enzimas de restricción facilitando una clonación orientada de estos. En el proceso de reemplazo de un gen, una secuencia endógena es substituida por una secuencia homóloga exógena. Por lo que, durante este proceso es necesario preservar el 100% de la homología en la secuencia nucleotídica a reemplazar (Waldman, 1992). En nuestro diseño experimental tuvimos cuidado de seguir este lineamiento por lo que, los fragmentos obtenidos por PCR fueron amplificados conservando un 100% de homología de las secuencias flanqueantes 5' y 3' del ameboporo, a partir del nucleótido -1pb a -402pb y +294pb a +596pb respectivamente. Así ambas regiones se clonaron flanqueando secuencias que confieren resistencia a Neomicina o Hygromicina de tal manera que al llevarse a cabo la recombinación y reemplazo de la secuencia flanqueante 5' y 3' del ameboporo, también se llevo a cabo el reemplazo de la secuencia del ameboporo por Neomicina o Hygromicina. El resultado será que en el genoma tanto las secuencias exógenas de Neomicina como de Hygromicina estarán reguladas de manera idéntica a la secuencia del ameboporo en los

parásitos silvestres, es decir reguladas por el promotor y secuencias reguladoras endógenas del ameboporo.

Se ha reportado también que la longitud de la secuencia a recombinar es determinante para una buena eficiencia, siendo importante conservar un mínimo de 150 pb de contigua homología para que se lleve a cabo una eficiente recombinación (Waldman y Liskay en 1988). Al mismo tiempo también es importante no excederse ya que se ha observado que cuando se incrementa la longitud de la secuencia de 4 a 9 Kb, hay un incremento en la eficiencia del reemplazo de un factor de 10, pero al mismo tiempo, el número de recombinaciones ilegítimas se eleva a un factor de 40 (Vega, M., 2000). Por esto y basándonos en la experiencia exitosa en la obtención de otros parásitos *Knock-out* (Manning-Cela, R., 2001), así como la longitud y composición de las regiones intergénicas del ameboporo con respecto a los genes cuesta arriba y cuesta abajo de éste, diseñamos la amplificación del fragmento flanqueante 5' de 421pb y del 3' de 278pb. Estos tamaños reúnen las características antes mencionadas, además de haber sido seleccionadas bajo el criterio de usar secuencias nucleótidas en los oligos iniciadores que no contuvieran regiones altamente repetidas en A y T, nucleótidos que se sabe se presentan en un muy alto porcentaje en el genoma de ameba por lo que de usarse se podría propiciar una alta inespecificidad durante la amplificación y recombinación. El alto contenido de A y T en el genoma de la ameba ha sido otro factor que se ha considerado determinante en las dificultades para aplicar estrategias genéticas en particular recombinación homóloga exitosa en ameba.

Ambas regiones se clonaron en los vectores pBS:Neo y pBS:Hyg comprobando su exitosa construcción, de acuerdo a el patrón de restricción obtenido con diferentes enzimas (Figuras No 17 y 25) en donde se evaluó la liberación de las 2 regiones flanqueantes del ameboporo AP5' y AP3' por separado así como del cassette completo AP5'-Neo-AP3' y AP5'-Hyg-AP3'.

En base a lo discutido anteriormente podemos decir que los vectores de transfección construidos en este trabajo: pBS:AP5'-Neo-AP3' y pBS:AP5'-Hyg-AP3', cumplen con las características necesarias tanto para su eficiente amplificación en bacterias y su transfección en ameba, así como para que se lleve a cabo la recombinación homóloga y el reemplazo del gen del ameboporo por los genes de resistencia para la selección con los antibióticos Neomicina o Hygromicina. Considerando que el gen del ameboporo en ameba es copia única y que el genoma de este parásito es diploide nuestro diseño experimental está dirigido a llevar a cabo el reemplazo de ambos alelos con cada uno de los dos antibióticos utilizados para la selección de los parásitos *knock-out*, siguiendo los criterios ampliamente utilizados en la literatura para otros parásitos (Iovanisci, *et al*; 1989; Manning-Cela, *et al*; 2001). El vector pBS esqueleto usado para la construcción de los vectores contiene un sitio ori el cual permite su replicación en bacterias permitiendo la amplificación de la secuencia clonada de nuestro interés, también contiene el sitio múltiple de clonación en donde se clonaron las secuencias AP5'-Neo-AP3' y AP5'-Hyg-AP3' y un gen que le confiere resistencia a ampicilina para su selección en las bacterias transformadas con éste. Ya clonadas y amplificadas nuestras secuencias en este proyecto, los plásmidos pBS:AP5'-Neo-AP3' y pBS:AP5'-Hyg-AP3', serán digeridos para liberar los segmentos conteniendo las secuencias AP5'-Neo-AP3' y AP5'-Hyg-AP3' que se utilizarán para la

transfección de las amibas, para el reemplazo de los alelos “a” y “b” del gen del ameboporo por los cassettes que contienen las secuencias que codifican para los antibióticos Hygromicina y Neomicina por recombinación homóloga en futuros proyectos.

Es importante considerar que la alta frecuencia de reemplazo de un gene homólogo varía en un rango de 20 a 100% con respecto a la eficiencia de transfección de las secuencias nucleotídicas de plásmidos circulares (Cruz et al, 1990). Se ha reportado la transfección de DNA circulares de plásmidos las cuales se integran al genoma por un mecanismo de inserción lo que involucra no sólo incorporar la secuencia deseada si no también las secuencias del plásmido vector. Esto tiene como consecuencia una alteración de las secuencias endógenas que pudieran afectar la regulación de la expresión del gen a analizar o de los genes vecinos. Para sobrepasar estos inconvenientes es importante el utilizar segmentos de DNA lineal que contengan únicamente la secuencia a recombinar flanqueando el gen utilizado para la selección (Laban et al, 1990) con la finalidad de que la homología sobre la molécula transfectada sea colineal con el blanco de DNA genómico (Thomas *et al*; 1987) aumentando las probabilidades de que se lleve a cabo una recombinación homóloga entre estas secuencias; como se ha reportado en levadura (Vega, M., 2000), sistema en donde se han podido seguir y describir los posibles mecanismos por los que se lleva este proceso. Se ha reportado también que la cantidad de DNA utilizado durante la transfección es importante para aumentar la eficiencia de transfección (Thomas, K.R., 1986; Vega, M., 2000).

Es importante hacer notar que las secuencias correspondientes al promotor que dirige la síntesis del ameboporo así como las regiones responsables de la poliadenilación de este gen en amiba, no han sido caracterizadas por lo que las regiones flanqueantes 5' y 3' del ameboporo amplificadas y clonadas en nuestros vectores de transfección no sabemos si contienen o no dichas secuencias. Sin embargo esto no es determinante pues no se pretende el utilizar estos vectores de transfección como vectores de expresión extracromosomales. De tal manera que el diseño utilizado considera que el uso de las regiones 5' y 3' amplificadas y clonadas en nuestros vectores servirán para llevar a cabo la recombinación homóloga trasfectando el fragmento lineal que las contiene, por lo que los genes de Neomicina e Hygromicina estarán bajo el control de las regiones reguladoras endógenas del ameboporo.

La obtención exitosa de los vectores de transfección pAP5'-Neo-AP3' y pAP-5'-Hyg-AP3' en este proyecto, es el inicio del establecimiento de las condiciones que permitan en futuros proyectos la obtención de amibas *knock-out* en *Entamoeba histolytica* permitiendo no solo el estudiar la función del ameboporo bajo una estrategia genética si no también; como se dijo anteriormente, es muy importante si se quiere lograr un avance en el entendimiento molecular y funcional de muchas otras proteínas importantes en la patogenicidad así como en los diversos procesos celulares de la amiba. Esto permitiría por ejemplo determinar si las moléculas en estudio son o no parte de complejos funcionales, si hay o se activan otras moléculas capaces de sustituir sus funciones en su ausencia y de poder realizar experimentos de reconstitución que confirmen de manera definitiva la participación de la proteína en todos los fenómenos en los que se propone está involucrada.

13 CONCLUSIONES

- Los trofozoitos presentaron un numero variable de núcleos, siendo en su mayoría mononucleados (83%) lo que sugiere la factibilidad de llevar a cabo experimentos de transfección estable por recombinación homóloga en este sistema .
- Se amplificaron por PCR y se clonaron satisfactoriamente las regiones flanqueantes AP5' y AP3' del ameboporo en los vectores pBS:Neo y pBS:Hyg.
- Se obtuvieron los vectores de transfección pAP5'-Neo-AP3' y pAP-5'-Hyg-AP3' exitosamente como se determinó por su patrón de restricción.

14 BIBLIOGRAFIA

1. Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., et al. (1995) NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and Nk-cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumor activity. *EMBO J* **14**: 1615-1625.
2. Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol.* **28**(4): 777-85.
3. Arhats P, Olivo JC, Gounon P, Sansonetti P, Guillen N. (1998). Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell.* **9**(6): 1537-47.
4. Arroyo, R. y Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**:151-158.
5. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1999). Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
6. Bekker-Grunwald, T. and Wöstmann, C. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today.* **9**:27-31.
7. Beringhausen, O., and Leippe, M. (1997) Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **65**: 3615-3621.
8. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol.* **34**(3): 463-72.
9. Bruchhaus I, Jacobs, T., Leippe, M. and Tannich, E. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* **22**, 255-263.
10. Bruchhaus, I., M., Lioutas, C y Tannich, E. (1993). Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol.* **12**:925.
11. BuB H, Lioutas C, Dobinsky S, Nickel R, Tannich E. 1995. Analysis of the 170-kDa lectin gene promoter of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **72**(1-2): 1-10.
12. Caballero-Salcedo A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor J., Gutiérrez, G. Y Ortiz-Ortiz L. (1994), Seroepidemiology of Amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**:412-419.
13. Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruíz-Palacios, G., Bennett, S. y Peasey, A., (1994), Ambiente epidemiológico del uso de aguas negras en agricultura: Valle del Mezquital, México. *Salud Pública (Méx).* **36**: 3-9.
14. Clark, G. (1997). Riboprinting: A tool for study of genetic diversity in microorganisms. *J. Euk. Microbiol.* **44**:227-283.
15. Clark, C.G., and Roger, A.J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:6518-6521.
16. Cruz, A. and Beverley, S.M. (1990) Gene replacement in parasite protozoa, *Nature*, **348**, 171.

17. Cruz-Reyes, J., Rehman, T., Spice, W., and Ackers, J. (1995). A novel transcribed repeat element from *Entamoeba histolytica*. *Gene*. **166**: 183-184.
18. Cruz-Reyes, J., Spice, W.M., Rehman, T., Gisborne, E. and Ackers, J.P. (1992). Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*. **104**:239-246.
19. Cuevas R., Ramírez G., Sarti E., Velásquez O., y Tapia R. (1994) Epidemiología de las enfermedades parasitarias en México. *Bol. Morbil. Mortal.*,**1**: 1-18
20. Diamond L.S., harlow D.R. Cunnick C.C. (1978). A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**:431-2.
21. Diamond, L.S., and Clark, C.G.(1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* **40**:340-344.
22. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Alling, D.W. y Hallahan, C.W. (1995). Elucidation of the DNA syntethic cycle of *Entamoeba spp.* Using flow cytometry and mathematical modeling. *J. Euk. Microbiol.* **42**:610-616.
23. Gangopadhyay, S.S., Ray, S.S., Sinha, P and Lohia, A. (1997). Unusual genome organization in *Entamoeba histolytica* leads to two overlapping transcripts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **89**:73-83.
24. Ghosh,S.K.,Field,J., Frisardi,M.Rosenthal,B., Mai,Z., Rogers,R. and Samuelson,J. (1999).Chitinasa secretion by encysting *Entamoeba histolytica*; localización of secretory vesicles endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Infect. Immun.* **67** (6). 3073-3081
25. Gilchirist, C.A., Streets, H.L., Ackers, J.P. and Hall, R. (1995). Transient expression of luciferease in *Entamoeba histolytica* driven by the ferredoxin 5' and 3' regions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **71**: 265-267.
26. Gómez-Conde, E., Hernández. J.P., and Arguello, L. C. (1997). A morphodynamic study of the structural organization of *Entamoeba histolytica* chromatin during nuclear division. *Arch. Med. Res.* **28**: 124-126.
27. Hamann L., Nickel R. and Tannich E. (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(19): 8975-9.
28. Hoare, C.A. (1949) Handbock of Medical Protozoology for Medical Men, Parasitologist and Zoologist. Baillieri, Tindall and Cox Londres.
29. Honinberg, B., Balamuth, W., Boves, E.C., Corliss, J.O., Gojdies, H., Hall,R.P., Kudo, R.R. Levine, N.D., Loeblich, A.R., Jr., Weiser, J., and Wenrich, D.H. (1964). A revised classification of the phylum protozoa. *J. Protozool.* **11**:7
30. Iovannisci, D.M. and Beverley, S.M; (1989). Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy including spontaneous amplificación of the mini-exon array. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **34**,177.
31. Jacobs, T., Brchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E. y Leippe, M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **27**:269-276.
32. Jiménez C.J.,Jiménez E., Bernal M.J.,Kummate J. (1989) Inducción de Inmunidad protectora antiamebiana en hámster con Antígenos heterologos. *Rev. Invest. Clin.* **41**: 133-140.
33. Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., et al. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from plasmids col E1, F. RGK, and RK2. *Methods Enzimol.* **69**:268-280.

34. Keene, W.E., Pettitt, M.G., Allen, S. y McKerrow, J.H., (1985). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 163, 536-549.
35. Keene, W.E., Hidalgo, M.E., Orozco, E., and McKerrow, J.M. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease. *Exp. Parasitol.* **71**, 199-206
36. Laban, A., Tobin, J.F., de Lafaile, M.A.C. and Wirth, D.F. (1990) Stable expresión of the bacterial neo^r gene in Leishmania, enriettii, *Nature*, **343**, 572.
37. Leippe, M. (1992). Membrane perforation by *Entamoeba histolytica*, structural implications derived from the séquence of the pore-forming peptide. *Arch. Med. Res* 23-35
38. Leippe, M., (1995) Ancient weapons: NK-lysin is a mamalian homolog to pore-performing peptides of a protozoan parasite. *Cell.* **83**:17-18.
39. Leippe, M., Bahr, E., Tannich, R., y Horstmann, R. (1993) Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 101-110.
40. Leippe, M., Andrá, J., Müller-Eberhard, H.J. (1994^a) Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2602-2606
41. Leippe, M., Andra, J., Nickel, R., Tanich, E. Y Mueller-Eberhard, H.J. (1994c). Amoebapores a family of membranolytic peptides from cytoplasmic of *Entamoeba histolytica*: aislation, primary structure and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol. Microbiol.* **14**:895-904.
42. Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O.L., Horstmann, R.D., and Müller-Eberhard, H.J. (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7659-7663.
43. Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., Van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R.D y Mueller-Eberhard; H.J. (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **11**:3501-3506.
44. Leippe, M., and Muller-Eberhard, H.J. (1994) The pores forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* **87**: 5-18.
45. Leippe, M. (1997) Amoebapores. *Parasitol Today.* **13**: 178-183.
46. Leroy A., De Brayne G., Marcel M. Bailey G. (1995) Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of *E. Histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. *Infect Immun.* **63**:4253-4260.
47. Lewin B., (1997), *Genes VI*. Oxford University Press., Nueva York.
48. Lewine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honinberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lynn, D., Lom, J., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G. Sprague, V., Vaura, J. and Wallace, F.G. (1980). A Newly Revised Classification of the protozoa. *J. Protozool.*, **7** (1):37
49. Lushbaugh W.B, Hofbauer A.F. and Pittman F.E. (1985). *Entamoeba histolytica*: Purification of cathepsin B. *Experimental Parasitology* **59**, 328-336.
50. Lushbaugh W.B, Hofbauer A.F. and Pittman F.E. 1985. *Entamoeba histolytica*: Purification of cathepsin B. *Experimental Parasitology* **59**, 328-336.
51. Lynch, E.C., Rosenberg, I.M., and Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **1**, 801-804.

52. Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Regas, R., and Samuelson, J (1999). Hsp 60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle. ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* **19**(39): 2198-2205.
53. Manning-Cela, R.E., et al. LYT1 Protein Is Required for Efficient In Vitro Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, **69**(6), 3916-3923.
54. Martínez Palomo. Capítulos-2-4. 7: Amibiasis. Editorial Médica Panamericana. (1989). Barcelona (España): 17-179.
55. Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. John Wiley & Sons. England. pp 5-56.
56. McCoy J., Mann B.J., Petry W.A., (1994) Adherence and cytotoxicity of *E. Histolytica* how lectins let parasites stick around. *Inmun.* 3045-3050.
57. Moshitch-Moshkovitch, T., Stolarsky, D., Mirelman and N.R. Alon, 1996. Stable transfection and gene expression in *E. dispar*. *Mol Biochem Parasitol* **83**: 257-261.
58. Nickel R, Tannich E. 1994. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **91**(15): 7095-8.
59. Orozco, E., Gharaibeh, R., Riverón, A.M., Delgadillo, D.M., Mercado, M., Sánchez, T., Gómez Conde, E., Vargas, M.A., and López-Revilla, R. (1997). A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 250-257.
60. Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. and Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 635.
61. Ortíz-García, D., Meráz, M., and Meza, I. (1997). Possible role of transcribed intergenic sequences in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **28**:30-31.
62. Peña, S.V., Hanson, D.A., Carr, B.A., Gorralski, T.J., and Krensky, A.M. (1997) Processing, subcellular localization, and function of 519 (Granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic granule proteins. *J. Immunol* **158**: 2680-2688.
63. Petter, R., Moshitch, S., Rozenblatt, S., Nuchamowitz, Y., and Mirelman, D. (1994). Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L21 from pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Gene* **150**: 181-186.
64. Purdy J.E., B.J. Mann, L.T. Pho and W.A. Petri, Jr. (1994). Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of the firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7099-7103.
65. Purdy J.E., L.T. Pho, B.J. Mann and W.A. Petri, Jr., (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 91-103.
66. Ravdin JI, and Guerrant (1981). The role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Studies with mammalian tissue culture and human erythrocytes. *J. Clin. Inv.* **68**: 1305-1313.
67. Ravdin, J. I. (1995). Amebiasis. *Clin. Infec. Dis.* **20**: 1453-1466.
68. Rinat A.N., Bracha R, Mirelman D. (1997). Inhibition of expression of the lysine-rich 30 kDa surface antigen of *Entamoeba dispar* by the transcription of its antisense RNA. *Mol Biochem Parasitol.* **90**(1): 193-201.

69. Rodríguez, M.A., Hernández, F., Santos, L., Valdez, A. y Orozco, E. (1989). *Entamoeba histolytica*: Molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**:87-99.
70. Rodríguez, M.A., Orozco, E, Arroyo, R. (1994). Proteins of *Entamoeba histolytica* trophozoites uninvolved in the adhesion to target cell. *Arch med Res.* **25**:205-2210.
71. Rosales-Encina, J.L., Meza, I., López-De León, A., Talamás-Rohana, P. y Rojkind, M. (1987) Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**: 790-796.
72. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. 2ª edición.
73. Sargeant, P.G. y J.E. Williams, (1978), Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoeba of man, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**,164-166.
74. Schaudinn, F. (1903). Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden (Vorläufige Mittheilung). *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* (Beihefte zu den Veröffentlichungen des kaiserlichen Gesundheitsamte). Berlin 19:577.
75. Seguin R., Mann B.J., Keller K. (1995) Identification of the galactose- adherence lectin epitopes of *E. Histolytica* that stimulate tumor necrosis factor- production by macrophages. *Proceed of Nat Acad Sc.* **92**:12175-12179.
76. Sépulveda R. (1970) la amebiasis invasora por *E. Histolytica* gaceta medica. México. 100-101.
77. Sepulveda, B. and Martínez-Palomo, A. (1984). Immunology of Amoebiasis by *Entamoeba histolytica* En S. Cohen and K.S. Warren (Eds) *Immunology of Parasite Infection*, 2nd Edn., Blackwell Science, Oxford. Pp. 170-191.
78. Tannich, E., Horstmann, R.D. Knobloch, J., and Arnold H.M. (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5118-5122.
79. Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, *Cell*, **51**, 503.
80. Thomas, K.R., Folger, K.R., Capecchi, M.R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome, *Cell*, **44**, 419.
81. Tovar, J., Fisher, A., and Clark, C.G. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondrial in the mitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1013-1021.
82. Treviño García-Manzo, N., Escandón -Romero, C., Escobedo-de la Peña, J., Hernández Ramos, J.M y Fierro-Hernández, H. (1994) Amebiasis in the epidemiologia transition in México: its morbidity and mortality trends in the Mexican Institute of the Social Security. *Arch. Med. Res.* **25**:393-399.
83. Vargas, M.A., (1994) Variabilidad fenotípica y genotípica en *Entamoeba histolytica*: El efecto modulador del medio y su relación con la virulencia. Tesis de Doctorado en Ciencias (Patología Experimental). Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN. México, D.F.
84. Vega, A.M., Gene targeting. CRC Press. Boca Raton Ann Arbor London Tokyo. 1995.
85. Velázquez C., Mineko Shibayama, Tsutsumi V. (1997) Role of Neutrophil in the Pathogenesis of the Amebic Liver lesion in mice. *Arch. of Med. Res.* **28**:207-210.

86. Waldman, A.S. (1992) Targeted homologous recombination in mammalian cells. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **12**, 49.
87. Waldman, A.S., Liskay, R.M., Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology, *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5350, 1988.
88. Walsh, J.A.(1986) Problems in recognition and diagnosis of amebiasis:estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8**:228-237.
89. Walsh, J.A., (1988) prevalence of *Entamoeba histolytica* infection En: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin (ed.) John Wiley & Sons. EUA. Pp 93-105.
90. WHO. (1997). Amoebiasis. WHO Wwckly Epidemiol. Record. **72**: 97-100.
91. Willhoeft, U., and Tannich, E. 1999. The electrophoretic Karyotipe of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**:41-53.
92. Zhang T.,Cieslak P., Stanley S.L. (1994) Protection of gerbils from Amebic Liver Abscess by immunization with a recombinant *E. Histolytica* antigen . *Infect. Immun*, **62**: 1166-1170.

15 APÉNDICE

Medios

LB/lit: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Ajustar pH 7.5.

LB/Agar/lit: 25 g de LB, 12.5 g de agar.

LB/ampicilina: después de autoclavar agregar 100 µg/ml de ampicilina).

TYI-S-33/6lit: 219 g de peptona bitriptasa, 73.2 g de dextrosa, 14.64 g de NaCl, 4.44 g de KH_2PO_4 , 7.44 g de L-cisteína, 1.44 g de ácido ascórbico, 0.18 g de citrato férrico de amonio. Se ajustó el pH a 6.8 y se esterilizó en autoclave 15 min. a 110 °C y se mantuvo almacenado hasta su uso a -20 °C. Justo antes de su uso el medio se suplementó con suero bovino (previamente descomplementado por calor a 65 °C/30 min.) a una concentración final de 13%, con mezcla de vitaminas de Diamond (*in vitro*, México) a una concentración final del 3% y finalmente con bencilpenicilina (0.25U.I/ml). Una vez que los trofozoítos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se incubaron en hielo durante 10 min. para despegar a las células de las paredes del tubo, el inóculo deseado se sembró en tubos con 10 ml de TYI-S33 más 2 ml de la mezcla suero-vitaminas-antibióticos.

TYM: 2% Bacto-tryptona, 0.5% extracto de levadura, 0.1 M NaCl, 10 mM de MgSO_4 .

Antibióticos

Ampicilina, solución stock: 500 mg/ml en H_2O ; solución de trabajo: 100 µg/ml.

Geneticina (G418), solución stock: 100 mg/ml en Hepes 10 mM pH 7.2; solución de trabajo: 5 µg/ml.

Soluciones y Buffers

Buffer de muestra: azul de bromofenol 0.25%, cianol FF gileno 0.25%, glicerol en agua 30%. Almacenar a 4°C.

Buffer TFB I: 30 mM KOAc (pH 7), 50 mM MnCl_2 , 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 15% glicerol. Esterilizar por filtración (no autoclavar).

Buffer TFB II: 10 mM MOPS (pH 7), 75 mM CaCl_2 , 10 mM de KCL, 15% glicerol. Esterilizar por filtración (no autoclavar).

Buffer TE 0.1X p H8: Tris- HCl 1 mM pH 8/EDTA 0.1 mM pH 8.

HBS 2X: NaCl 280 mM/KCl 10 mM/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mM/dextrosa 12 mM/HEPES 50 mM. Ajustar pH 7.05.

CaCl_2 2 M: 10.8 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /20 ml de agua.

Solución I: Glucosa 50 mM/ Tris.Cl 25 mM (pH 8)/ EDTA 10 mM (pH 8). Autoclavar y guardar a 4°C.

Solución II: NaOH 0.2 N (preparada en el momento a partir de un stock 10 N)/ SDS 1%.

Solución III: Acetato de potasio 5 M Acido acético glacial 11.5 ml H_2O 28.5 ml. La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

STET: Sucrosa al 8% / tritón X- 100 5%/ EDTA 50 mM pH 8 (3.7 g)/ tris- HCL p H8.

dNTPs: Se preparan a un concentración 1.25 mM en TE.

Buffer ELT (EDTA, Lizosima y Tritón): EDTA 100 mM, lizosima 2 mg/ml, Tritón X-100 0.1%. Almacenar a -20 °C.

Buffer TS (Tris-Sacarosa): Tris-HCl 50 mM pH 7.5, sacarosa 25%. Almacenar a -20 °C.

PEG-NaCl (Polietilenglicol-cloruro de sodio): PEG 6000 al 20%, NaCl 1 M, adicionar 5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 1 ml de EDTA 0.5 M.

Solucion de Isopropanol saturada con NaCl: Se hace una solución sobresaturada de NaCl. Se mezcla un volumen de isopropanol con dos volúmenes de solución sobresaturada.

Aparatos e instrumentos

Centrífuga Eppendorf 5415C.

Centrífuga Sorvall RC 50.

Ultracentrífuga Beckman TL-100.

Microscopio invertido Carl Zeiss.

Microscopio de fluorescencia Olympus.

Espectrofotómetro UV/VIS Beckman.

Cámara de electroforesis para DNA.

SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN DEL AMEBOPORO

```

/gene="gEh-AP"
mkNA 2766..3117 /gene="gEh-AP"
CDS 2767..3083
/gene="gEh-AP"
/codon_start=1
/product="poreforming peptide"
/protein_id="CAA50203.1"
/db_xref="GI:1616588"
/db_xref="SWISS-PROT:P34095"

```

/translation="MKAIIVFLIFAVAFVATHTHQGEILCNLCTGLINTLENLLTKGADKVKDYISSLCNKASGFIALCTCKVLDFGIDKL
 IQLIEDKVDANAICAKIHAC"

BASE COUNT 1361 a 475 c 452 g 1193 t 6 others

ORIGIN

```

1 gatatccatg atgatagaag gattaatgaa agtaacgtca ccatataacc nagattatag
61 aatgcttcaa agtgcataac naggatttca ccaattttgt caaatttttaa atgaaagagc
121 aaaaatgaga gatagacttg ttgaagttgc taaagaacat caaatagatt ctattgttgc
181 aaaaggaaga ttccatttat tcaactgcaaa aggagaatta aaagataaaa agaaacaaca
241 agtgattata gaattatgta atgacaaaat ttattttttt gggaagaaag aaaagaaaaa
301 cgttcttatt aaagaatagc aattaagttg cgacatcaac tccagtaca atggaccaaa
361 atgacatta gtaaaaata gtgaattaca accacttggc attgtattta acaaagagca
421 agatgcagat gaatntattc gacncattca atggtctatt tcaacatgtt tctataaatt
481 agatgatgag cgtagtggga tggatcaatt aaaataataa atgaaaaaaa atatttattt
541 tgttttggat tttaaaatt gtttaggtgg gacttatcta tccaagtttt tagtttttaa
601 tgtgtttta caaagcggta taaaatgaaa aaacttcaaa tatccatgaa agaaaaactaa
661 agggatttta ataatacaat tgcacaaaa taataacctt tcaataataa ttgttaatat
721 aatcattctt tgaataaaaa taattctctc tttttatttt caataaaaga tatttngnta
781 tataatgtac taagtctgc aacgaaaatt taagaatgca agactgttca catatagaag
841 ataaagaaaa caaaaaggt atcgaatcaa agaagttaaa caatttcgaa aatggattta
901 tttcttttaa tattctataa ataaattaac gactgaaaag gttctcagat agatgagaac
961 ttaacctcaa tcatctaat taagaacaag acaaaagcat ttgcaaacat ttagtaccta
1021 taattttctt tgaattgttt aaatgtttaa acaactatat ttgcttcaa tcatctaat
1081 gttttctgga aacactctca ctctttgttc acttatcatg ccttctcta ttaaaaattc
1141 aagtttaaca gaagatagtt caattaatga agaaaattct ctatctgctg atgaaaaatc
1201 taaccttgat aaaatagata aaggatggtt tgaagaaata actcctaact acccaaaaga
1261 acaagttcct aaattcaat taaacattg gaatgaaaca acotccaag ttgaacttca
1321 atctatctgt ctatgtttat tatctgcaca ttgcaaaatt ttggttggta aaccaaatag
1381 atatagttca ttaacaaaac aatttghtaa gatcaaagaa atagagtta atagatttga
1441 tagtattaat gtaataaaat ttacaaaaga tagagtctct atgaaaatgt gtcttgaatg
1501 tcaaaaaca aatattaatg caaaaacgc actaagaaga ctccaacca tcaagaagaa
1561 aatagttatg aatctcttta ttgatttatt aatcgaattt ggatatttat ttgaaataca
1621 aaaagagact aaagaaggtt atgaaggatt agtaacgtac tttcataaaa atactttatt
1681 aatggaaaaa aaagaagttt gagaaaaagg tcatcaatac aatataaaaa ttacttctca
1741 acttgcctca acaacacctc tcaactctac tcttcttctc ttcaagata attgataata
1801 caaaaacatt ttataaaaa ttataacatt atttaattta tgtttttaga ataacattat
1861 acaattata ttaactaaaa catgataggg gtttattatt gaataaaaag taattaatta
1921 agtattaata gatttttctt ctattctctc tagctcaggg gagactaatc ccatcctga
1981 gnttatlaaa aaggttatat ctcttfgttt aaactatcat ttaggtttag ttgcaaaa
2041 ggggaagca ctctttgctt ttattttctc tattaaggtt ttcaaaactt ctctgctta
2101 tttctcttt ttaagccttt gtttgtttc tgccttaatt ttcaggaatt tcatttttct
2161 tattttatga atggaagaag gaatcatttt attactactg tattaacttg actaattttc
2221 tttttatctc taacttgaat aatcttctt tagtcatacc cacacttcag tagattotta
2281 tattacatcc atgtaattat ctactgtatt ctcttgcctg accotttgea gcttccctaa
2341 tacattccta atcaaaaggc accgtcataa ccagataata actgggagag tcaagattatg
2401 aatttgaact aggttttggc tgttgtgttt cagaggtgpc apcttccatc ttttattatt
2461 taaaaaaca atagaaaaa atataaaac actcaaatga aaaaaaac ttatgtctc
2521 tatagaatgt tcttattctt taagtatttt aaatttttta ataaatatta aaagagaaga
2581 aatgaaatac tcaatttaet ttttctgttt taaaaaaa agtttggaa attaaaaaa
2641 aagaaaaaga gaagaaaaac gaagatctaa aatttgataa aaaggctgac ttaagaattt
2701 aatgttttgc agaaaattc gacagatcac cgtgaattat taaagatta gtttgaaaa
2761 tcaaaaaaca tatcttcaaa acaatcctga aagccatcgt ctttgtttta atcttctgtg
2821 ttgcttttgc agtcaactgt actcacaag gagaatcct ctgcaacctt tgcactggac
2881 ttattaacac acttgaaaac ctctctacca ctaaggggag tgataaagta aaagattaca
2941 ttagcagcct ttgcaataaa gctcaggat tcaattgctac tctttgcaat aaagttcttg
3001 attttggat tgataaaact cccaactta ttgaagacaa agttgatgcc aatgctattt
3061 gtgctaagat tcatgcttgc taagttttaa gctactcaat tgagtaaat ttcatacttt
3121 ctttatgttt atttttttt tattcttttt cctttcttta aataaagaaa agatataaaa
3181 tatgaaataa aatgttactt tcttttgagt tttaaatgat aactttcctt cattcaaaa
3241 aaataaatc aaactaaaga aaaaaaac aaaaatccc aaaaaataat gaattattg
3301 atacaaata ataccattga acaacaagaa gagtatctat tggattttc ttcattaag
3361 atttacaaca aatgggtttt gttacaacat ctggaataat gtaattttct tttattaatt
3421 gatgaaatga aactgttcca tctgaagaa tccaaaatgc agaacaaca gtaaaaaaca
3481 aatatg

```

AP-1 sentido (subrayado).

Región flanqueante 5'

AP-2. Anti-sentido (subrayado).

Tercer ORF. Gen del ameboporo, (negrillas).

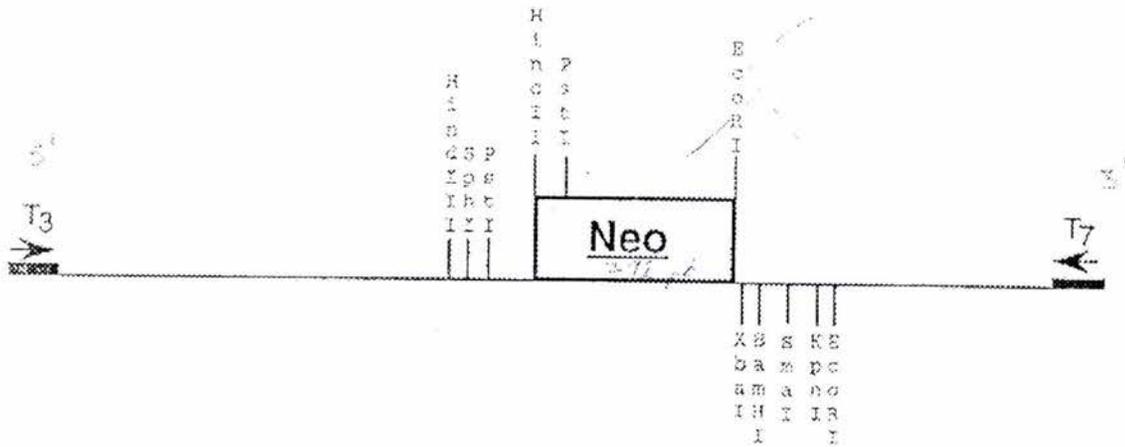
AP-3 Sentido (subrayado).

Región flanqueante 3'

AP-4. Anti-sentido (subrayado).

VECTORES

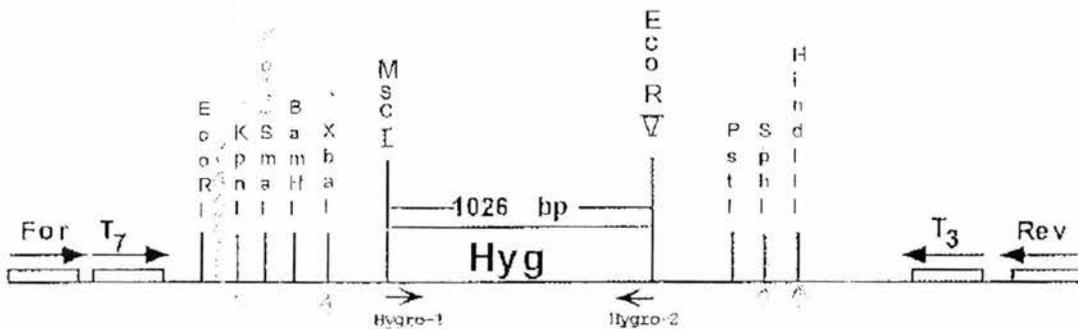
pBS:Neo



1. The Neo gene was cloned into the HindIII site of Blue Scribe (-)

XbaI

pBS:Hyg



1. pBS:Hyg was constructed by cloning the Hyg coding sequence into the HindIII site of Blue Scribe (+)
2. The Hyg coding sequence was generated by PCR using oligos Hygro 1 (GCTggcca**ATG**AAAAGCCTGAACTCACC, the MscI site is in lower case, the translation initiation codon is in bold type) and Hygro 2 (GCgatata**CTATTCCTTTGCCCTCGG**AGC, the EcoRV site is in lower case, the complement to the translation codon is in bold type)
3. 5' and 3' flanking sequences are normally cloned into the MscI and EcoRV sites respectively.