



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Análisis de las diferencias inmunoquímicas en la  
Lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba histolytica* obtenida  
por el método fenol-agua y el método fenol-agua modificado**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**Francisco Sierra López**

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Armando Isibasi Araujo**

ASESOR INTERNO:

**Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez**

México, D.F.

2011



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.

El presente trabajo fue realizado en la **Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica** del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del **Dr. Armando Isibasi Araujo**, y la Asesoría del **Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez**, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

El tesista fue apoyado a través de una beca, otorgada al Dr. Armando Isibasi por ser Investigador del SNI Nivel 3, con el número de expediente 1971 6945.

El proyecto de tesis fue financiado por el Fondo de Investigación en la Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo el registro:

FIS/IMSS/PROT/732    REGISTRO: 2009/3601-157

FIS/IMSS/PROT/738    REGISTRO: 2009/3601-158

## Dedicatorias

A mis padres, Pablo Sierra Juárez y Maura del Carmen López Hernández, por apoyarme todo este tiempo, darme ánimos para buscar y hacer lo que me gusta, y respetar mis decisiones, se que hicieron muchos esfuerzos y me ayudaron en todo lo posible. A ustedes y a mi hermano, son las personas a quienes más quiero y así como disfruto sus logros, se que ustedes disfrutan de los míos.

A mi hermano Javier Sierra López, se que en muchos momentos hubieron desacuerdos, pero eso ya ha quedado muy atrás, me has dado buenos consejos y ánimo para afrontar diversas situaciones de la vida.

A Cinthia Anselmo Caballero con quien compartí mucho, nos apoyamos durante la carrera y me animaste en todo momento en toda circunstancia que se presentó, te agradezco mucho el que siempre hayas estado ahí.

A José Luis Acosta quien es uno de mis mejores amigos, casi mi hermano, con quien me aconseje en todo tipo situaciones.

A mis amigos y seres queridos que han estado conmigo en todo momento en que he necesitado, tanto en los malos como buenos, y de la misma forma han podido contar conmigo en esos momentos.

A Blanca Estela Sandoval Miranda, con quien compartí muchos momentos en la realización de nuestras respectivas tesis, y otros momentos que hacían felices los días de arduo trabajo en el laboratorio, gracias por tu apoyo y los buenos momentos que levantaban el ánimo.

A Dios, quien nos da la vida y nos da la libertad de hacer con ella lo que queramos, he formado gran parte de mi comportamiento basado en el bien que enseña la biblia, he seguido una forma de ser en la que he tratado de ser lo mejor para mí mismo y los que me rodean, pero tengo muy en claro que todas las personas somos iguales ante Dios y la humildad es uno de los atributos más preciados que podemos llegar a tener, seguir un estilo de vida en el que es importante poseer valores propios y tener principios que sean prácticamente inquebrantables, tratar a las personas con el respeto que se merecen, sin importar su clase social, saber escuchar a otras personas y respetar sus formas de pensar, y no solo el respeto a las demás personas, sino, también respetar a todos los seres vivos que nos rodean y a nuestro planeta en que vivimos.

## Agradecimientos

Al Dr. Armando Isibasi, en primer lugar por la aceptación y la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en su laboratorio, más allá de lo académico, ha dado ejemplo en vida de los logros que puede tener una persona en vida y seguir aun así con una modesta forma de vivirla, en el laboratorio del cual él esta como jefe de la unidad, he podido aprender muchísimas cosas que se que me será de gran utilidad.

Al profesor Biólogo José Misael Vicente Hernández Vázquez que acepto ser mi asesor de tesis y además, se prestó a darme consejos tanto como académico y social, cuando lleve su clase de genética fue cuando retome los ánimos y el gusto que tenia al comenzar la carrera.

A M. C. Mario Adán Moreno, M.C. Mireille Gutiérrez, QBP. Griselda Ramírez Rubio, M.C. Alcántara Hernández Marcela, les agradezco toda la ayuda que me proporcionaron durante la realización de este trabajo, con su apoyo fue como pude realizarlo, además de que en su momento llegamos a convivir aún mas que solo en el sentido laboral, como persona que soy, he aprendido muchas cosas de la vida, a valorar y vivirla con mayor intensidad, obtuve de ustedes consejos que marcaron decisiones que debía tomar.

Al Dr. Alfonso Olivos del Hospital General de México en el Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, quien nos proporciono la cepa de amiba virulenta HM1:IMSS.

Al Médico Rafael Torres Rosas, de quien siempre obtuve apoyo en el trabajo de tesis, y me asesoro en diversos temas.

A Verónica Domínguez Arismendi, quien estuvo muy presente con el factor de motivación para realizar, continuar y terminar el trabajo, además, por ayudarme en tener más confianza en mí mismo.

A los compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, los cuales en su momento apoyaron este trabajo de diversas formas, también ya que fue una experiencia buena que me ha enseñado mucho sobre como es el ambiente de los que deseamos hacer investigación, cuando necesite un consejo para este trabajo siempre lo obtuve de ellos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología quien me apoyo con la beca durante este trabajo de tesis.

Al IMSS que mediante el FIS apporto el financiamiento para la realización de este trabajo de tesis, y por tener los sitios adecuados para el desarrollo de la investigación en México, y darnos la oportunidad de poder trabajar en sus instalaciones.

## Índice general

Abreviaturas.....	X
1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	2
2.1.    La amibiasis .....	2
2.2.    El parásito <i>Entamoeba histolytica</i> .....	2
2.3.    La infección natural causada por <i>Entamoeba histolytica</i> .....	3
2.4.    La superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> está asociada a su patogenicidad y virulencia .....	5
2.5.    La caracterización de la lipopéptidofosfoglicana de <i>E. histolytica</i> .....	9
2.6.    La respuesta inmunitaria a la lipopéptidofosfoglicana de <i>E.</i> <i>histolytica</i> .....	13
3. Antecedentes .....	14
4. Planteamiento del problema .....	17
5. Justificación .....	17
6. Hipótesis .....	18
7. Objetivos .....	19
7.1.    Objetivo general .....	19
7.2.    Objetivos particulares .....	19
8. Material y métodos.....	20



8.1.	Material .....	20
8.1.1	Reactivos .....	20
8.1.2	Material Biológico .....	20
8.1.3	Medios de cultivo celular .....	21
8.2.	Métodos .....	21
8.2.1	Cultivo cepas de amiba de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	21
8.2.2	Extracción de la LPPG por el método fenol-agua (método A) y el método fenol-agua modificado (método B) .....	21
8.2.2.1	Método fenol-agua modificado (método B) .....	24
8.2.2.2	Método fenol-agua (método A).....	27
8.2.3	Cuantificación de azúcares reductores por el método de antrona..	28
8.2.4	Cuantificación de proteínas de la LPPG por la técnica del ácido bicinconínico (BCA) .....	29
8.2.5	Separación de carbohidratos y tinción de plata de la LPPG en geles de poliacrilamida (Método SDS-PAGE) .....	30
8.2.6	Identificación de la LPPG por “Western-Blot” .....	31
8.2.7	Identificación de la LPPG por el método de Elisa .....	32
8.2.8	Determinación de endotoxina .....	33
8.2.9	Estimulación de macrófagos con LPPG de <i>E. histolytica</i> .....	33
8.2.10	Cuantificación de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 en sobrenadante de macrófagos humanos por Elisa .....	35
9.	Análisis estadístico .....	36
10.	Resultados.....	37
10.1.	Obtención de biomasa de <i>E. histolytica</i> .....	37
10.2.	Rendimiento en peso seco de LPPG de C-26 .....	38
10.3.	Cuantificación de carbohidratos en las LPPG de <i>E. histolytica</i> obtenida por los métodos A y B .....	38
10.4.	Cuantificación de proteínas de las LPPG.....	39
10.5.	Relación de proteínas-carbohidratos de las LPPG de C-26 y HM1:IMSS .....	40

10.6.	Perfil electroforético de las LPPG de <i>E. histolytica</i> revelado por el método de tinción de plata .....	41
10.7.	Evaluación de la antigenicidad de la LPPG de <i>E. histolytica</i> obtenida por ambos métodos mediante Inmunotransferencia .....	43
10.8.	Evaluación de la antigenicidad de la LPPG de <i>E. histolytica</i> obtenida por ambos métodos mediante Elisa .....	45
10.9.	Determinación de endotoxina de la LPPG de <i>E. histolytica</i> .....	47
10.10.	Niveles de citocinas en sobrenadantes de macrófagos humanos estimulados con las LPPG (TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6) .....	47
	10.10.1 Niveles de TNF- $\alpha$ en sobrenadantes de Macrófagos humanos..	48
	10.10.2 Niveles de IL-6 en sobrenadantes de Macrófagos humanos .....	50
	10.10.3 Niveles de IL-10 en sobrenadantes de Macrófagos humanos ...	52
11.	Discusión.....	54
12.	Conclusiones.....	57
13.	Perspectiva.....	58
14.	Bibliografía .....	59
15.	Apéndice .....	68

## Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
AcMo	Anticuerpo monoclonal/Anticuerpos monoclonales.
Ag	Antígeno/Antígenos.
A-poro	Proteína formadora de poros.
CP	Proteína tipo serina y fosfatasa ácida.
C26	Cepa HM1:IMSS de baja virulencia
CD80	Marcador de superficie de células dendríticas, linfocitos B y macrófagos activados
CD86	Marcador de superficie de linfocitos B, monocitos y algunos linfocitos T.
EH5	Anticuerpo monoclonal anti-PPG de <i>Entamoeba histolytica</i> .
EhCPADH112	Proteasa expuesta sobre la superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> .
Elisa	Ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada.
EtN	Etanolamina.
EU/ml	Unidades de endotoxina por mililitro.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
G	Fuerza de gravedad.
Gal	Galactosa.
Gal/GalNac	Galactosa/N-acetil-galactosamina.
GIPL	Glicoinositolfosfolípidos
Glc	Glucosa
GlcN	Glucosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEK-293	Células de riñón de embrión humano
Hgl	Subunidad pesada de Galactosa/N-acetil-galactosamina.
HM1:IMSS	Cepa virulenta de <i>Entamoeba histolytica</i>
HM1:IMSS C-26	Cepa HM1:IMSS de <i>Entamoeba histolytica</i> de baja virulencia
HRP	Peroxidasa de rábano.

IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
IFN- $\gamma$	Interferón gama.
Ig	Inmunoglobulina.
IgG	Inmunoglobulina tipo G.
IgI	Subunidad intermedia de Galactosa/N-acetil-galactosamina.
IL-6	Interlucina-6
IL-10	Interlucina-10
KDa	Kilodaltones
LAL	Lisado de amebositos de <i>Limulus</i>
LgI	Subunidad ligera de Galactosa/N-acetil-galactosamina.
LPG	Lipofosfoglicana.
LPGEh	Lipofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i> .
LPPG	Lipopéptidofosfoglicana.
LPPGEh	Lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i> .
LPS	Lipopolisacárido
Man	Manosa
MAP	Proteína tipo fosfatasa ácida expuesta sobre la superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> .
Método A	Método de extracción fenol-agua
Método B	Método de extracción fenol-agua modificado
NF- $\kappa$ b	Factor nuclear kappa B.
NK-T	Célula T asesina Natural.
P	Grupo fosfato.
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno.
PARP	Proteína repetitiva de ácido procíclico.
PBS	Solución buffer de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PG	Peptidoglicana

PI	Fosfoinositol
PIEha	Variante (a) en el GPI de la molécula de LPPGEh.
PIEhb	Variante (b) en el GPI de la molécula de LPPGEh.
PPG	Proteofosfoglicanos
PRR	Receptor de reconocimiento de PAMP.'
SAP	Proteína tipo fosfatasa ácida expuesta sobre la superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> .
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada.
SCID-HU-INT	Xenotransplante de colon humano a ratones con inmunodeficiencia severa combinada.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
Ser	Serina.
SFB	Suero fetal bovino.
SRHP	Proteína rica en serina.
TBS	Solución amortiguadora Tris.
TBS-T	Solución amortiguadora Tris-Tween.
TLR	Proteína similar a Toll.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UE	Unidades de endotoxina

## 1. Resumen

La amibiasis representa un problema de salud pública, principalmente en México que es considerado una zona endémica. *Entamoeba histolytica* es el agente causal de mayor frecuencia en ocasionar absceso hepático amibiano, por lo que es necesario contar con una vacuna para contrarrestar el efecto de este protozooario; se ha realizado la extracción de diferentes moléculas de membrana de la amiba para realizar ensayos de respuesta inmune. La lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *E. histolytica* es una molécula de superficie, que es un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP), ya que se ha reportado que induce la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos, macrófagos y células dendríticas, además es reconocida a través del Receptor Tipo Toll-2 y 4 (TLR2 y TLR4).

Isibasi *et al* aisló por primera vez, del protozooario *E. histolytica*, la molécula de LPPG por el método de extracción denominado fenol-agua (método A), otros grupos de investigación han estudiado la molécula LPPG obtenida de *E. histolytica*, por un método de extracción fenol-agua modificado (método B), sin embargo, esta LPPG no mostró activación de células dendríticas, lo cual no correlaciona con los primeros hallazgos, esto probablemente se pudiera deber al método de extracción utilizado, que pudieran obtenerse moléculas con diferente cantidad de azúcares y lípidos, que sean importante en la activación de células de la respuesta inmune.

En este trabajo, se realizó la comparación de ambos métodos de extracción, se caracterizó la LPPG de *E. histolytica*, extraída por el método A y el método B, se encontró que el mayor rendimiento, mayor contenido de carbohidratos, así como una menor cantidad de proteínas se obtuvo por el método A. Con ambos métodos se obtuvo un perfil electroforético semejante, que correlaciona con lo ya reportado previamente. Al evaluar la actividad biológica de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por los diferentes métodos, se encontró que con el método A, se obtiene una LPPG que es capaz de estimular una mayor secreción de TNF-alfa, IL-6 e IL-10 en macrófagos humanos, en comparación con la LPPG obtenida por el método B.

## **2. Introducción**

### **2.1 La amibiasis**

La amibiasis es una enfermedad entérica asintomática ó sintomática provocada por el parásito protozoario intestinal *Entamoeba histolytica*. La amibiasis, es la tercera causa de muerte por parásitos en el humano después de la malaria y la esquistosomiasis (Stanley, 2003). En la población mundial, se producen aproximadamente de 40 000 a 100 000 muertes al año debido a la parasitosis por *E. histolytica* (World Health Organization, 1997; Stanley, 2003).

En México, el sistema de vigilancia epidemiológica, en el año 2009, hasta la semana 12, reporto 108 023 casos de amibiasis intestinal, la cual en su mayoría es localizada en áreas tropicales (Vigilancia Epidemiológica, semana 12, 2009). Asimismo, la incidencia de esta parasitosis es elevada en las comunidades rurales e inclusive en las zonas urbanas del país; y está asociada a varios factores de la población, entre ellos, las condiciones precarias de vivienda y la pobreza de sus habitantes, mismas que favorecen la transmisión oral-fecal, y por tanto, la mayor probabilidad de infección por el parásito (Ramos *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2005; Ximenez, 2006).

### **2.2 El parásito *Entamoeba histolytica*.**

La familia *Entamoebidae* comprende tres géneros y seis especies, que pueden colonizar el lumen intestinal del humano: *E. histolytica*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. gingivalis*, *Iodamoeba buetschlii* y *Endolimax nana*. Sin embargo, solamente *E. histolytica* es considerada patógena. En 1925, Brumpt, propone una explicación a los casos asintomáticos de amibiasis: la existencia de otra especie morfológicamente idéntica a *E. histolytica* (Brumpt, 1925), con características de patogenicidad distinta: La *E. dispar*. Esta especie de entamoeba es confirmada por el trabajo de Sargeaunt y colaboradores (Sargeaunt *et al.*, 1982), al utilizar un análisis de isoenzimas (zymodemos) y de métodos moleculares, entre ellos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sobre aislados clínicos de amiba y donde se observan diferencias en

el patrón de zymodemos de ambas especies. Por lo tanto se propone la reclasificación de *Entamoeba* en dos especies: *E. dispar* (comensal) y *E. histolytica* (patógena) (Sargeant *et al.*, 1982).

*E. histolytica*, pertenece a la familia *Entamoebidae*, orden amoebidae, subphylum sarcodia. En su ciclo de vida adopta dos fases: quiste que es causa de la infección, y trofozoíto. El quiste de *E. histolytica* es de forma esférica u oval, mide entre 10 a 16  $\mu\text{m}$  de diámetro y está cubierto por una gruesa capa de quitina; ésta cubierta le permite sobrevivir en condiciones adversas que serían letales para el trofozoíto. Está descrito que dependiendo del grado de madurez, el quiste puede contener de uno a cuatro núcleos y estos se caracterizan por una membrana plasmática con frecuentes y profundas invaginaciones en su citoplasma, además de observarse polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno (Ludvik y Shipstone, 1970; Gómez *et al.*, 2007).

En contraste, el trofozoíto es una célula ameboide pleofórmica de gran movilidad, caracterizada por un ectoplasma hialino o claro y un endoplasma granular, que puede medir de entre 15 y 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, contiene pocos organelos en su interior y el análisis de microscopía de luz se observan numerosas vacuolas y un núcleo ovalado, con un nucléolo central. La amiba carece de mitocondrias y de aparato de Golgi y su retículo endoplásmico consiste de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas. Además el trofozoíto es considerado forma invasiva, en el ciclo de vida del parásito (Flisser y Pérez-Tamayo, 2006).

### **2.3 La infección natural causada por *Entamoeba histolytica*.**

La infección por *E. histolytica*, es provocada por la ingestión de quistes maduros presentes en agua y/o alimentos contaminados. Cuando los quistes pasan a través del aparato digestivo sufren un proceso llamado desenquistamiento (que ocurre en el intestino delgado). En este proceso, se pierde la cubierta de quitina y se inicia la diferenciación del parásito a trofozoíto que pueden migrar a lo largo del intestino y multiplicarse por división simple y eventualmente migrar hacia el hígado (Van Hal *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007) (Figura 1).



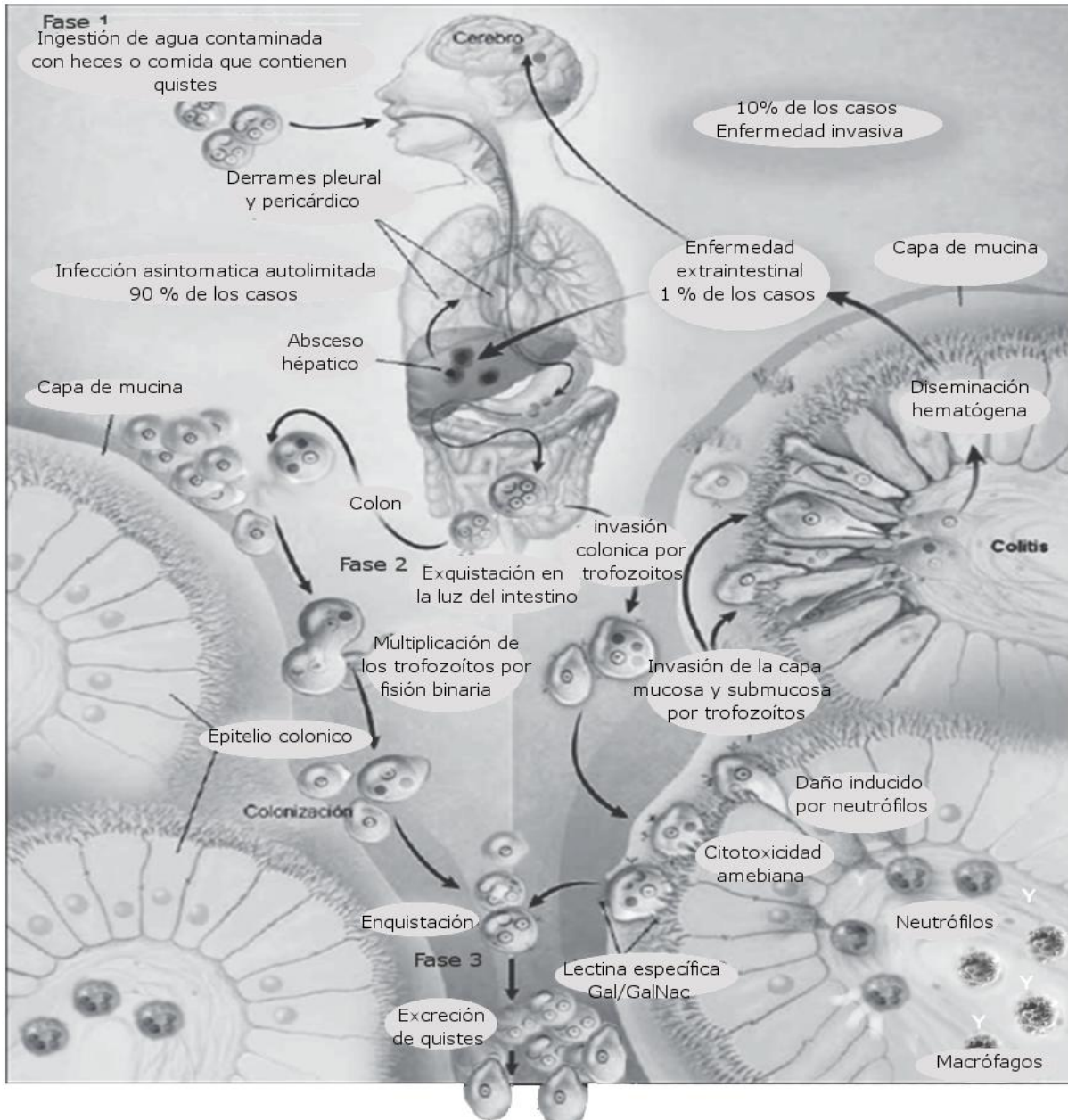


Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*. La infección por *E. histolytica* puede agruparse en tres fases: (1) La ingestión de quistes maduros del parásito presentes en alimentos contaminados o en manos mal lavadas. (2) Desenquistamiento y/o pérdida de la cubierta de quitina en los quistes ingeridos con desarrollo de trofozoitos y la multiplicación por división simple o binaria, y (3) La excreción de los quistes del individuo infectado, cerrando así el ciclo de vida del parásito.

Tomado y modificado de Gómez et al, 2007; 11(1):36-45.

En el intestino, es donde se producen las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, y los quistes de individuos infectados pueden ser secretados en las heces; siendo los responsables de la transmisión y, como se había señalado anteriormente,

estas formas en el ciclo de vida del parásito pueden sobrevivir por semanas en el ambiente externo; en contraste, los trofozoítos son más lábiles *in vitro* y pueden ser eliminados rápidamente por el microambiente gástrico (Martínez, 1982).

La infección por *E. histolytica* puede ser asintomática o sintomática. En la mayoría de los individuos es asintomática. En las infecciones sintomáticas, las formas clínicas de la amibiasis intestinal incluyen: la colitis ulcerosa (la más frecuente), la apendicitis amibiana, el megacolon tóxico, la disentería amibiana fulminante y el ameboma de colon (González-Ruiz y Wright, 1998). La infección por *E. histolytica* puede diseminarse a través de la vena porta del hígado y provocar el absceso hepático amibiano, siendo la complicación más grave de la amibiasis extra-intestinal y es más común en los hombres que en las mujeres (Stanley *et al*, 2003; Roberts *et al*, 2001).

En México, los reportes epidemiológicos de la amibiasis extra-intestinal (absceso hepático amibiano), han declinado notablemente y son muy pocos casos los reportados últimos años; sin embargo la colitis ulcerativa se mantiene en un rango importante (Ramos *et al*, 2005); por ejemplo, en el año 2000 se reportaron 1 353.4 casos de colitis ulcerativa versus 6.37 casos de amibiasis extra-intestinal por cada 100 000 habitantes (Secretaria de Salud, 2001). Los efectos por la infección sintomática por *E. histolytica* son provocados por la citólisis dependiente del contacto del trofozoíto con el epitelio y otras células blanco, siendo también influenciado por varios factores, entre ellos: la relación hospedero-parásito y las moléculas asociadas a su capacidad de virulencia y patogenicidad, expresadas en la superficie del parásito.

#### **2.4 La superficie de *Entamoeba histolytica* está asociada a su patogenicidad y virulencia.**

La patología de la amibiasis está caracterizada por el daño masivo del tejido del hospedero por los trofozoítos que provocan citólisis-contacto-dependiente (Petri, 2002; Stanley, 2003). En esta etapa, el trofozoíto mata a las células por un proceso de contacto transitorio, siendo las moléculas presentes en la membrana plasmática de la amiba, los factores condicionantes (Ackers y Mirelman, 2006).

Se han descrito distintos complejos de moléculas relacionadas a la patogénesis y virulencia del parásito. En este grupo de moléculas, cada una tiene su particular contribución en los eventos de daño (Figura 2).

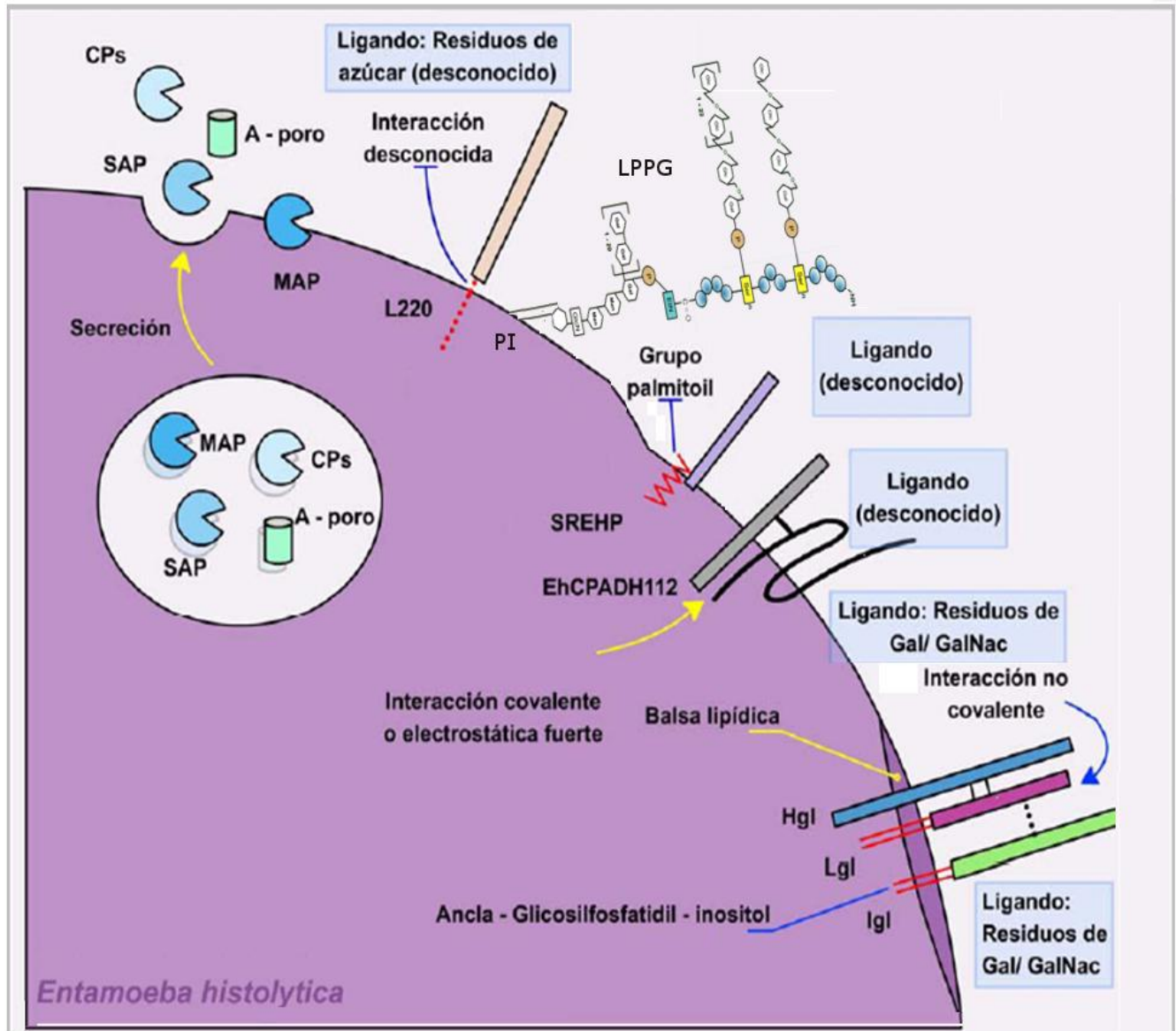


Figura 2: Moléculas asociadas a la patogénesis y virulencia de *E. histolytica*. A pesar de la descripción de diferentes moléculas presentes en la membrana de *E. histolytica*, son desconocidos sus posibles ligandos de interacción. Galactosa N-acetil-galactosamina (Gal/Gal/Nac), en sus subunidades pesada, ligera e intermedia (Hgl, Lgl e Igl); proteasas (EhCPADH112); proteína rica en serina (SREHP); proteína de membrana de 220 kDa (L220), tipo serina y fosfatasa ácida (CPs, MAP y SAP) y péptido formador de poros, ameboporo (A-poro).

Tomado y modificado de Richard. *ERMM*. 2005. 7 (13):1-19.

Las moléculas que intervienen en la patogenicidad de la amiba se han clasificado de la siguiente manera:

- 1) **Moléculas tipo lectina.** Estas proteínas de superficie reconocen carbohidratos, entre ellas la inhibible por Galactosa/N-acetil-galactosamina, denominada Gal/GalNac. Su estructura es un complejo poco común, formado por un grupo disulfuro unido a dos subunidades (ligera de 35 KDa y pesada de 170 KDa), ambas están insertadas dentro de la membrana del parásito por anclajes separados (Figura 2). Entre las funciones atribuibles a la Gal/GalNac de *E. histolytica* está su papel en la adherencia y la modulación del efecto citotóxico del parásito (Frederick y Petri, 2005).
  
- 2) **Péptidos formadores de poros (ameboporos).** Estas moléculas no enzimáticas tienen un peso molecular de 18 KDa, pueden lisar bacterias o células eucarióticas, así como producir canales iónicos en la membrana de ciertas células. Sin embargo no son exclusivos de la especie *E. histolytica*, ya que también se han descrito en *E. dispar* (Leippe *et al*, 2005).
  
- 3) **El grupo de proteasas.** Las proteínas de la matriz extracelular de las células del hospedero que son degradadas por el parásito, se debe a un conjunto de moléculas como las proteasas, entre ellas las proteínas de cisteína. Estas endopeptidasas de cisteína facilitan la invasión de la mucosa, demostrado por estudios *in vitro* e *in vivo* (Schulte y Scholze, 1989; Li *et al*, 1995) (Figura 2).

Parte de todas estas moléculas tienen una participación importante en la invasión del epitelio intestinal por el parásito (Figura 3). En el modelo de la colitis amibiana, se demuestran efectos diferentes, entre ellos, la producción de interleucina 8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), dichos mediadores, de la inflamación activan a su vez la vía de la ciclooxigenasa, causando destrucción de las células epiteliales y también las proteasas contribuyen en este proceso inflamatorio causado por *E. histolytica* (Ackers y Mirelman, 2006).

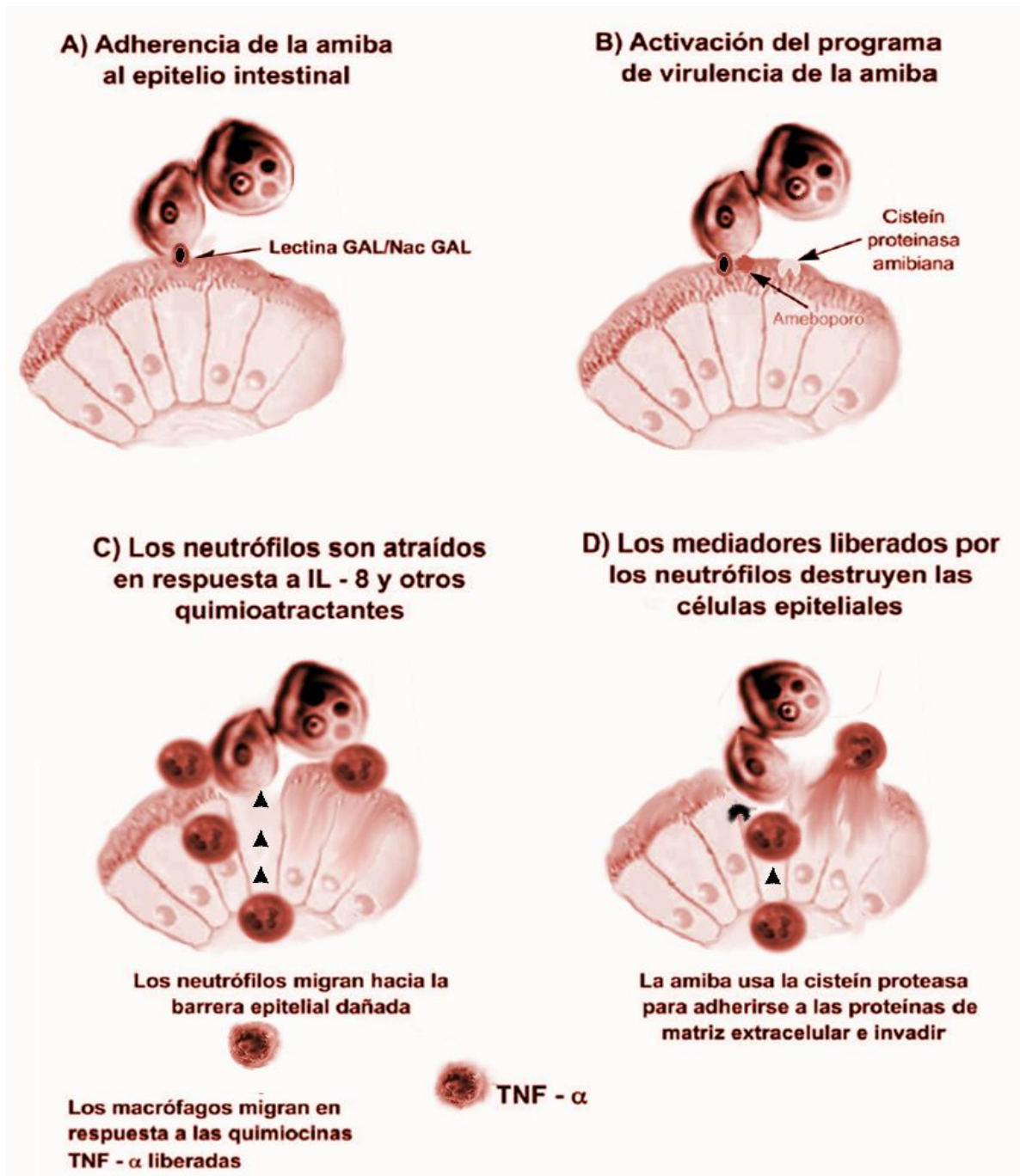


Figura 3: Modelo de la interacción de *E. histolytica* en la colitis amibiana. (a) La adherencia al epitelio mediada por lectinas (b) Formación de ameboporos y (c y d) rompimiento de la proteína que favorece el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos) y que también contribuyen al daño del epitelio intestinal.

Imagen diseñada por Francisco Sierra López, Tomado de Ackers y Mirelman, COM. 2006; 9:367:373.



Otro grupo de moléculas importantes en la patogenicidad de la amiba, clasificadas dentro del cuarto grupo son:

- 4) **Moléculas tipo proteoglicano y lipopéptidoglicano (PPG).** Estas moléculas son abundantes en membrana de varios protozoarios y se encuentran anclados por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estudios recientes han documentado actividades inmunoestimuladora y reguladora de los anclajes de GPI de protozoarios y estructuras relacionadas (Campos *et al*, 2001). Entre las propiedades biológicas de estos anclajes GPI esta su capacidad de inducir respuesta inmunitaria similar a la observada en muchos aspectos al LPS. En contraste, glicoinositolfosfolípidos (GIPL) purificados y tipo lipofosfoglicanos (LPG) de parásitos suprimen algunas funciones del hospedero, especialmente a altas concentraciones, como la mitogénesis de células T CD4+ y CD8+ inducida por superantígenos microbianos, así como la secreción de IL-12 (Descoteaux *et al*, 1992; Gómes *et al*, 1996).

En particular en *E. histolytica*, la familia de PPG incluye a la LPG y a LPPG de cepas patógenas y no patógenas (Moody-Haupt *et al*, 2000).

## 2.5 La caracterización de la lipopéptidofosfoglicana de *E. histolytica*.

Esta molécula (LPPGEh), se caracteriza por una cadena polipeptídica ácida, la cual está extensamente modificada por cadenas laterales de glucanos unidos por enlaces  $\alpha$  1-6. Estas macromoléculas, en la cepa patógena de *E. histolytica* HM1-IMSS, contienen 3 dominios estructurales (Figura 4):

- 1) La cadena polipeptídica con residuos de serina, 2) cadenas laterales heterogéneas de glucanos unidos en posición  $\alpha$  1-6 (con secuencias de 4 a 25 residuos) que tienen un disacárido central (Glc beta 1-6Gal), unido vía puentes fosfodiéster a residuos de serina en la cadena polipeptídica y 3) un GPI que caracteriza a los PPG y que contienen una secuencia central de glicanos y cadenas laterales más extensas de  $\alpha$  galactosa (Mody-Haupt *et al*, 1997).

La LPPGEh está considerada como una molécula tipo polisacárido ya que es la mayor proporción de la molécula, la cual contiene 75 a 80 % de carbohidratos, 8% de proteína, 2.5 % de lípidos y 1 % de fosfato (Isibasi *et al*, 1986; Isibasi *et al*, 1990). El análisis previo ha mostrado que las preparaciones de LPG y LPPG migran como bandas polidispersas entre 100 a 190 KDa y 36 a 57 KDa, observado en el análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Moody *et al*, 1997).

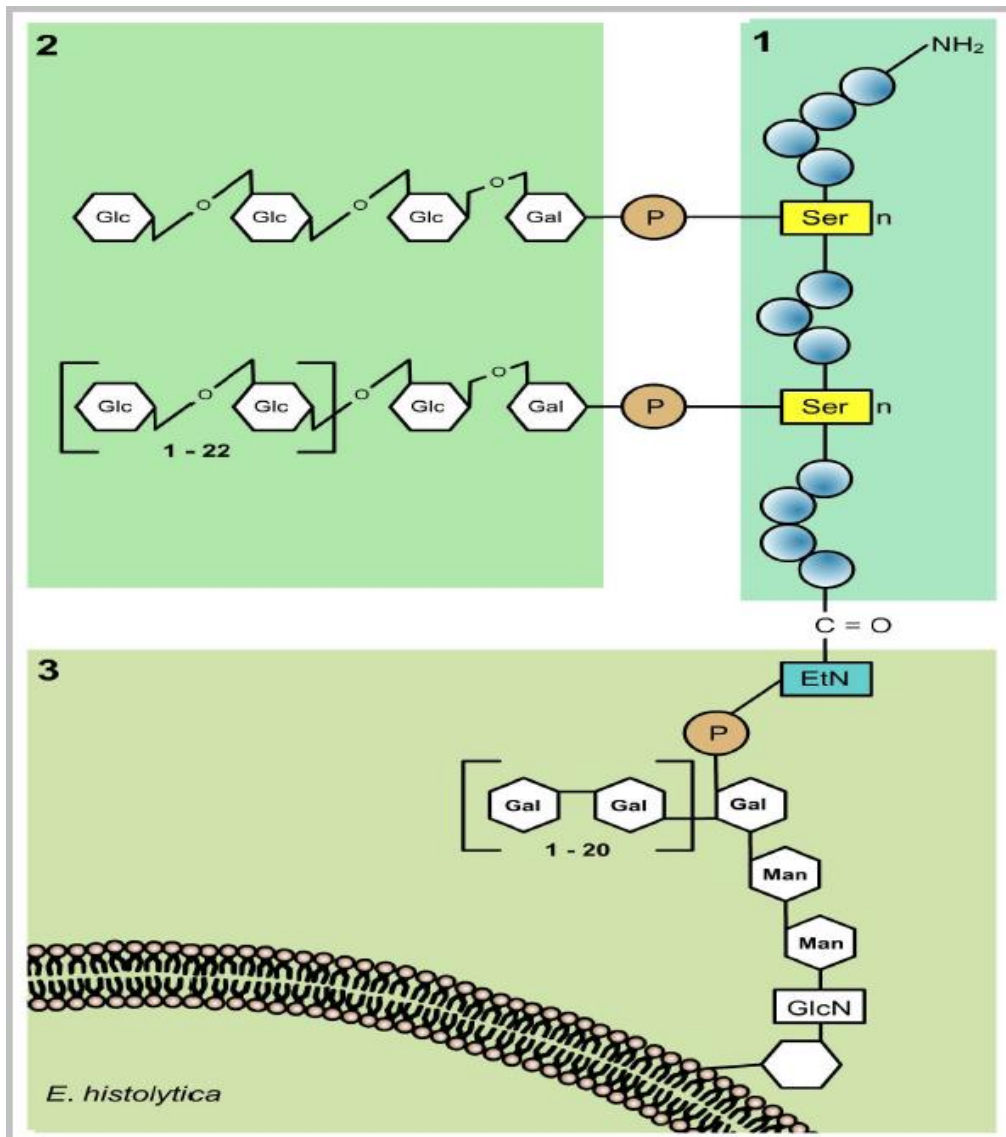


Figura 4: Estructura parcial de la LPPGEh. 1) Dominio polipeptídico; 2) Dominio de glucanas. Glc:Glucosa; Man: Manosa; Gal: Galactosa; Ser: Serina; EtN: Etanolamina; P: Grupo fosfato; GlcN: N-acetilgalactosamina, y 3) Dominio GPI anclada a glicanas.

Modificado de Moody-Haupt *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2000. 297:409:420.

En el análisis químico de la LPPGEh se encuentran diferencias inmunoquímicas importantes en la porción lipopolisacáridica entre las clonas virulentas y no virulentas obtenidas de trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS (Isibasi *et al*, 1990).

Ambas moléculas, LPG y LPPG reaccionan con concanavalina A, a diferencia de las lectinas que reconocen la galactosa y son sensibles a la digestión con fosfolipasa C específica a inositol fosfato (PI), y están libres de bandas de proteínas, por lo que son reveladas mediante tinción para carbohidratos con reactivo para tinción de Schiff (periodato-plata) y han sido asignadas como PPG (Moody *et al*, 1997).

Sin embargo, en estudios recientes (González-Roldán, 2008), existe controversia en las variantes de LPG y LPPG. Los resultados del análisis químico y espectrometría de masas, muestran diferencias en la LPPGEh, estableciendo dos variantes de fosfatidilinositol en su dominio GPI, designados como 1-O-(28:0)-*lyso-glycero-3-fosfatidilinositol* (PIEha) y como 1-O-[(28:0)-*lyso-glycero-3-fosfatidil-2-O-(16:0)-inositol* (PIEhb). Las estructuras propuestas a estas variantes se muestran en la figura 5.

En la PIEha, el glicerol está sustituido únicamente en la posición *sn-1* por un ácido graso de cadena larga, lo cual se asemeja al anclaje presente en la LPG de *Leishmania donovani* (Orlandi, 1987). Por otra parte, PIEhb también posee un solo ácido graso de cadena larga en la posición *sn-1* del glicerol, pero también posee una acilación en el anillo inositol en la posición 2, lo cual no es característica común de anclajes GPI de protozoarios, ya que generalmente ésta acilación se presenta únicamente durante el proceso de biosíntesis y es removida como un pre-requisito para su expresión en la superficie. Además se propuso la presencia de un GPI anclado en la superficie de la LPPGEh basado en la presencia del motivo o *core Manα 1-4 GlcNa1-6myo-inositol-1-PO<sub>4</sub>-lipido*, que lo sitúa como miembro de la familia de los GPI. Sin embargo, no se demostró ninguna evidencia de la presencia de lípidos unidos al *core* (González-Roldán, 2008). El PIEhb no es el único ya que se ha encontrado en el caso de los GPI de *Plasmodium falciparum* (Naik *et al*, 2000) y del GPI de la proteína PARP (proteína repetitiva del ácido procíclico) de *Trypanosoma brucei* (Field *et al*, 1991).



Por lo que, tanto el rearrreglo como distribución de los ácidos grasos muy probablemente influyan en las propiedades biológicas de la LPPGEh, y en base a estas estructuras y a sus efectos en las células del sistema inmune, se señala a la porción PIEh como una parte activa de la molécula de LPPGEh para inducir IFN- $\gamma$  en células NK-T obtenidas de ratón C57/BL6 (González-Roldán, 2008).

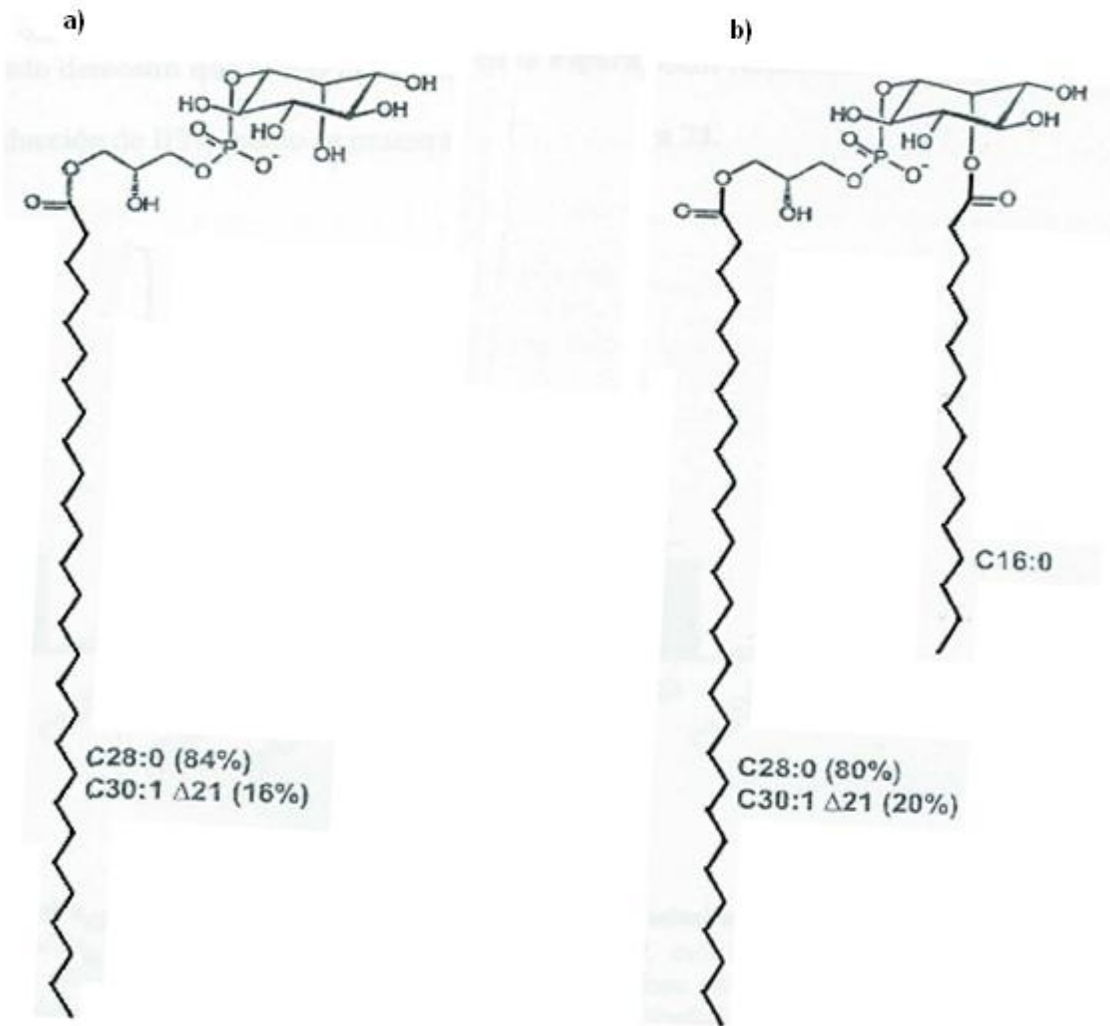


Figura 5: Estructuras (a) PIEha y (b) PIEhb, propuestas para el GPI de *E. histolytica*.

Tomado de González-Roldán, ENCB IPN. 2008. pp. 63-79.

## 2.6 La respuesta inmunitaria a la lipopéptidofosfoglicana de *E. histolytica*.

El sistema inmunitario del hospedero, está integrado por dos tipos de mecanismos: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adquirida, ambas son interdependientes y mutuamente complementarias (Medzhitov y Jeneway, 2000a). La activación de la inmunidad innata, es dependiente del reconocimiento de las moléculas comunes presentes en los diversos patógenos (bacterias, virus, parásitos y hongos), y diferentes a las moléculas propias del hospedero. Este grupo de moléculas son conocidas con el nombre genérico de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Medzhitov y Jeneway, 2000b).

Las moléculas tipo PAMP, dan especificidad a la respuesta inmunitaria innata al interactuar con otro tipo de moléculas denominados receptores de reconocimiento de patógenos (patterns recognition receptors, PRR) que son expresados en diferentes células de la respuesta inmunitaria. La interacción vía PAMP-PRR provoca un estado de alerta en las células de la inmunidad innata, entre ellas, la activación de monocitos y macrófagos; y su activación por esta vía induce la secreción de citocinas pro- y antiinflamatorias entre otros mecanismos efectoros (Underhill y Ozinsky, 2002). La mayoría de las moléculas efectoras, son desencadenadas por diferentes factores de la transcripción, entre ellos: el factor nuclear NF- $\kappa$ B; el cual participa en la señalización para la síntesis de citocinas y de señales coestimuladoras de CD80 y CD86; moléculas muy importantes en la conexión entre la respuesta innata y la respuesta inmunitaria adaptativa (Akira, 2003).

Al grupo de moléculas tipo PAMP, entre ellas, el LPS, los ácidos lipoteicoicos, la flagelina, la peptidoglicana y las mananas, se propone incluir la LPPGEh. El estudio de las estructuras de la LPPG y su habilidad de activar *in vitro* a la respuesta inmunitaria innata, es muy importante para el control inmune del parásito. De acuerdo a esta respuesta, un aspecto interesante, es el análisis de la estructura y la interacción de las variantes de LPPG con el grupo de receptores tipo PRR, entre ellos, los receptores tipo Toll (TLR). Está demostrado que los TLR son capaces de distinguir modificaciones estructurales de las moléculas; por ejemplo, el LPS de diferentes bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (LPS hexa-acilado), que activa fuertemente TLR4 humano a

diferencia del LPS pentacilado de la misma especie, que no lo activa (Hajjar *et al*, 2002). Asimismo, otras moléculas de LPS de otras bacterias como *Helicobacter pylori*, *Liogenela pneumófila*, *Yersinia pestis*, activan escasamente a TLR4 humano, por lo que esta activación diferencial por estas moléculas a los TLR podría estar relacionada al potencial de estos microorganismos de causar enfermedad (Miller *et al*, 2005).

Moléculas de LPGEh y LPPGEh también señalizan a través del TLR, particularmente TLR2 y TLR4 (Maldonado *et al*, 2000; Maldonado *et al*, 2005, Wong-Baeza *et al*, 2010). El reconocimiento de moléculas tipo PAMP de *E. histolytica* puede iniciar la respuesta inflamatoria e innata y contribuir al daño o invasión del parásito al hígado (Moody-Haupt *et al*, 2000), o en su caso, el parásito puede iniciar activación en macrófagos o producción de óxido nítrico.

En un estudio reciente, se ha mostrado que la LPPG es internalizada en compartimientos endosomales de la célula dendrítica y macrófagos humanos, co-localizable mediante el uso de un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo, marcado con un isotiocianato de fluoresceína (FITC) y observado por Inmunofluorescencia directa (IFI), sugiriendo que la molécula podría estar siendo presentada por células dendríticas vía moléculas CD1 (Vivanco-Cid *et al*, 2007).

### **3. Antecedentes.**

La LPPGEh es una molécula tipo polisacárido que se involucró en forma inicial en la adhesión del parásito a las células del hospedero (Stanley *et al*, 1997). Los estudios preliminares del análisis estructural y funcional de la LPPGEh, revelan a una molécula tipo PAMP, que correlaciona con la virulencia del parásito, única en especificidad. Así mismo, trabajos previos han descrito anticuerpos de tipo monoclonal que reconocen proteoglicanos en algunas clonas axenizadas de *E. histolytica*, entre ellos, el de anticuerpo llamado 2D7.10 (Bhattacharya *et al*, 1990). Sin embargo, este anticuerpo no reconoce a otras cepas, por ejemplo, la cepa 200:NHI y la Rahman. Estos resultados sugieren a los proteofosfoglicanos de estas cepas como antigénicamente diferentes (Bhattacharya *et al*, 1990; Bhattacharya *et al*, 1992). El polimorfismo en la LPG ha sido

observado en varias clonas de *E. histolytica* y está demostrado porque el anticuerpo 1D7.10 es incapaz de reconocer estas clonas.

Por otro lado, la inmunización pasiva con AcMo (EH5) contra los proteoglicanos de *E. histolytica*, inhibe la formación de absceso hepático amibiano en modelo de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), lo que hace sugerir que estos Ag son importantes en la virulencia del parásito (Marinets *et al*, 1997). En otros estudios, el pre-tratamiento a ratones (SCID-HU-INT) por vía intraperitoneal con antígenos de membrana y xenotransplante intestinal sometidos a infección *E. histolytica*, genera menor inflamación intestinal con respecto al grupo murino control (Marinets *et al*, 1997).

Las moléculas de superficie de las amibas se han estudiado extensivamente, ya que son los primeros en ser reconocidos por el sistema inmune del hospedero, durante la infección, a través de PRR que activan vías de señalización dando lugar a la respuesta inflamatoria, por lo tanto, representan unos candidatos de vacunas posibles (Marinets, 1997).

Por diversos grupos se han tratado de obtener estos antígenos de membrana, ya que se conocía la presencia de polisacáridos en la superficie de amibas, en un comienzo mediante el método de extracción de Freedman-Staub obtuvieron como productos una serie de azúcares neutros (manosa, galactosa, glucosa) y otros azúcares de los cuales, estudios inmunológicos revelaron que reaccionaban con sueros de conejos inmunizados vía intraperitoneal con trofozoítos vivos, pero no reaccionaban con los sueros de pacientes con absceso hepático amebiano, por tanto se cambió el método de extracción de estos polisacáridos, utilizando el método denominado fenol-agua que se usaba para la extracción de LPS de bacterias Gram negativas (descrito por Westphal-Jann, 1965) con ligeras variantes, una de estas variantes es la no utilización del tratamiento con Cetavión para eliminar ácidos nucleicos ya que al emplear el método de extracción en amibas, no encontraron ribosa, desoxirribosa, lo que fue corroborado con lecturas no significativas a 260 nm de estos ácidos (Isibasi *et al*, 1982a). Tras extraer de nueva cuenta el polisacárido de superficie de amibas, los métodos químicos que se emplearon para la caracterización del polisacárido obtenido determinaron que efectivamente se trataba de una lipopéptidofosfoglicana, esta LPPG

fue inmunógena para conejos y reaccionó con el suero de pacientes de diagnóstico de absceso hepático amebiano (Isibasi *et al*, 1982b).

Posteriormente, se le agregó un tratamiento para la eliminación de lípidos, debido a la posibilidad de que se encontraran contaminantes de esta naturaleza en las LPPG, este tratamiento consiste en una solución cloroformo/metanol/agua (10:10:3) en la cual mediante ultracentrifugación se eliminan los lípidos, ya que la mayoría de ellos son solubles en el cloroformo, se forman dos fases, una compuesta por agua/metanol que son altamente miscibles y la otra por el cloroformo (Gonzales-Néstor, 2008; Alcántara-Hernández, 2010).

La LPPG procedente de cepas virulentas y extraída por el método fenol-agua clásico (método A) se empleó para la estimulación de células con diversos TLR, los resultados indicaron que el antígeno es reconocido principalmente por TLR4 y TLR2, y conduce a la liberación de citocinas de los monocitos humanos, macrófagos y células dendríticas, *in vivo* también induce a la producción de anticuerpos y a su vez estos anticuerpos antiLPPG previenen el desarrollo de la enfermedad en modelos *in vivo* de la amibiasis (Wong-Baeza *et al*, 2010; Maldonado-Bernal *et al*, 2005 ). En ensayos más actuales de estimulación de células humanas HEK293 con transfección estable para los receptores TLR2 y TLR4 en donde se utilizó como antígeno a la LPPG de la cepa C-26 de fase virulenta, no se apreció estimulación vía TLR, y se requirieron concentraciones altas del antígeno (50 µg/m) para apreciar la secreción de citocinas en cultivo de monocitos humanos, probablemente la diferencia de resultados se debió a que el método que se empleo fue el de fenol-agua modificado (método B), el cual contiene un tratamiento para la eliminación de lípidos (Alcántara Hernández, 2010). Lotter y colaboradores reportaron que la LPPG extraída por el método modificado si presentaba efecto biológico en la presentación a través de CD1d a células NKT, en donde se requiere de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF, ésto fue realizado en modelo de células de ratón en cocultivo de células dendríticas con linfocitos (Lotter H, *et al*, 2009).

#### **4. Planteamiento del problema**

Se ha reportado previamente que la LPPG de *Entamoeba histolytica* extraída por el método de fenol-agua es agonista de receptores tipo Toll- 4 y 2 (TLR4 y TLR2) y activador de células de la respuesta inmune innata, sin embargo otros estudios demuestran que la obtención de LPPG de *E. histolytica* por el método fenol-agua modificado, no estimula las células de la respuesta inmune innata, dada las discrepancias es necesaria la caracterización inmunoquímica de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por el método fenol-agua tradicional y el método fenol-agua modificado.

#### **5. Justificación**

La amibiasis representa un problema de salud pública, principalmente en México que es considerado una zona endémica. *E. histolytica* es el agente causal de mayor frecuencia en ocasionar absceso hepático amibiano, por lo que es necesario contar con una vacuna para contrarrestar el efecto de este protozooario; se ha realizado la extracción de diferentes moléculas de membrana de la amiba para realizar ensayos de respuesta inmune. Una de las moléculas más prometedoras ha sido la Lipopéptidofosfoglicana (LPPG), estudios iniciales de esta molécula, se encontró que la LPPG es agonista de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4), y que esta interacción tiene efecto sobre la respuesta efectora de la inmunidad innata. Sin embargo, en estudios más actuales con LPPG extraída de cepas de alta virulencia de *E. histolytica* obtenida por un método modificado del tradicional, no mostró activación de células dendríticas, lo cual no correlaciona con los primeros hallazgos, esto probablemente se pudiera deber al método de extracción utilizado, que pudieran obtenerse moléculas con diferente cantidad de azúcares y lípidos, que sean importante en la activación de la respuesta inmune. Por lo que en este trabajo se caracterizó la LPPG de *E. histolytica* HM1:IMSS, extraída por el método fenol-agua (método tradicional) y el método fenol agua modificado.

## **6. Hipótesis:**

La LPPG de *E. histolytica* obtenida por el método fenol-agua y el método fenol-agua modificado tendrán diferencias en la cantidad de molécula extraída, proteínas y azúcares, y entonces éstas diferencias podrían influir de forma importante en la activación de macrófagos humanos.

## 7. Objetivo

### 7.1 Objetivo general

Analizar la diferencia inmunoquímica de la LPPG de *Entamoeba histolytica* extraída por el método fenol-agua y el método fenol-agua modificado.

### 7.2 Objetivos particulares

- Obtención de biomasa de trofozoítos de *E. histolytica* a partir de un cultivo axénico de la cepa de *E. histolytica* C27 y HM1:IMSS.
- Extraer LPPG de *E. histolytica* por el método fenol-agua y por el método fenol agua modificado.
- Comparar el rendimiento de extracción de la LPPG de *E. histolytica* por ambos métodos (método tradicional y método modificado).
- Comparar el contenido de azúcares de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos (método tradicional y método modificado) por la técnica de Antrona.
- Comparar el contenido de proteínas de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos (método tradicional y método modificado) por la técnica de ácido bicinconínico.
- Comparar el perfil electroforético de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos (método tradicional y método modificado).
- Comparar la antigenicidad de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos (método tradicional y método modificado) por la técnica de Western-Blot y Elisa.
- Comparar la capacidad de activación de macrófagos humanos inducida por la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos (método tradicional y método modificado).



## **8. Material y métodos**

Todo procedimiento y preparación de reactivos se lleva a cabo en campana de flujo laminar. El material utilizado debe ser estéril por autoclave a 121 °C 15 minutos o despirogenizado a 220 °C durante 2 horas, el material de plástico se despirogeniza con lavado de 1 hora con NaOH 1 M y lavando posteriormente con agua inyectable hasta que tenga un pH neutro.

### **8.1 Material**

#### **8.1.1 Reactivos**

Los reactivos para la preparación del medio TYI-S33 del cultivo axénico de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS, se adquirieron de Becton Dickson Company (EUA) y SIGMA; el Fenol al 90 %, Cloroformo 99.8 % y Metanol 99.97 % empleados en la extracción de LPPG fueron grado HPLC adquirido de Riedel de häen (Sigma Aldrich, Germany), de tecsiquim (tecsiquim, México) y J. T Baker (J. T Baker. México). Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de GIBCO (Grand Island, N. Y.), y los reactivos de biología molecular se adquirieron de Sigma (USA).

#### **8.1.2 Material Biológico**

Para la extracción de LPPG se utilizaron trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de las cepas HM1:IMSS de baja virulencia (denominada en este trabajo como C-26) y *E. histolytica* HM1:IMSS (alta virulencia), cultivadas en medio axénico.

En la estimulación de macrófagos humanos, estos se obtuvieron a partir de la diferenciación de monocitos en cultivo celular, lo monocitos se obtuvieron a partir de concentrados leucocitarios de donadores del banco de sangre de Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### **8.1.3 Medios de cultivo de Celular**

Para el cultivo celular de células humanas, se utilizó medio Advanced RPMI-1640 GIBCO (Grand Island N. Y.), suplementado con 2 y 10 % de suero fetal bovino (SFB) GIBCO.

## **8.2 Métodos**

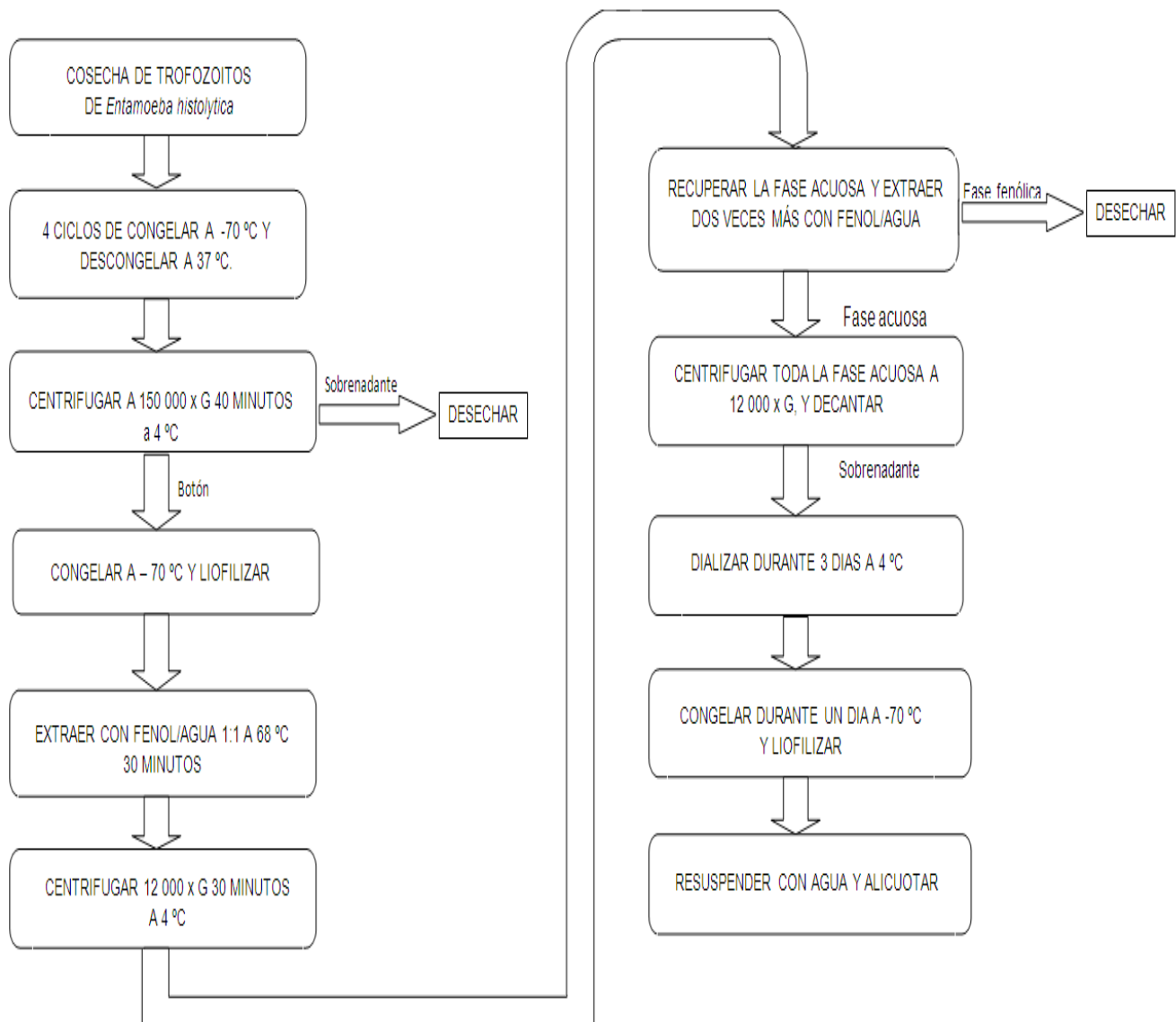
### **8.2.1 Cultivo de las cepas de amibas de *Entamoeba histolytica***

Los trofozoítos de *E. histolytica* de las cepas de HM1:IMSS de alta y baja virulencia fueron cultivados axénicamente a 37 °C en medio TYI-S33. Al medio se le ajustó el pH a 6.8, la esterilización fue realizada a 121 °C a 15 lb durante 15 minutos. Posteriormente el medio fue suplementado agregándole 160 ml suero bovino (Gibco Invitrogen) + 40 ml de vitamina de Diamond (SAFC Biosciences) por cada 1000 ml de medio, el suero es previamente inactivado por calentamiento a 56 °C durante 30 min. Los trofozoítos fueron cosechados en la fase logarítmica de su crecimiento (Diamond *et al*, 1978) despegándolos de las paredes de las botellas de cultivo, colocando éstas en hielo durante 10 minutos; a continuación las botellas fueron agitadas, se colectó el medio y se centrifugó a 400 x G (1500 rpm) durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue decantado y el botón fue resuspendido con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se realizó el conteo de trofozoítos en cámara de Neubauer y nuevamente se centrifugó a las condiciones ya mencionadas, realizándose dos lavados más con PBS. La biomasa obtenida se concentró en un tubo Falcón y se conservó a -70 °C hasta su uso.

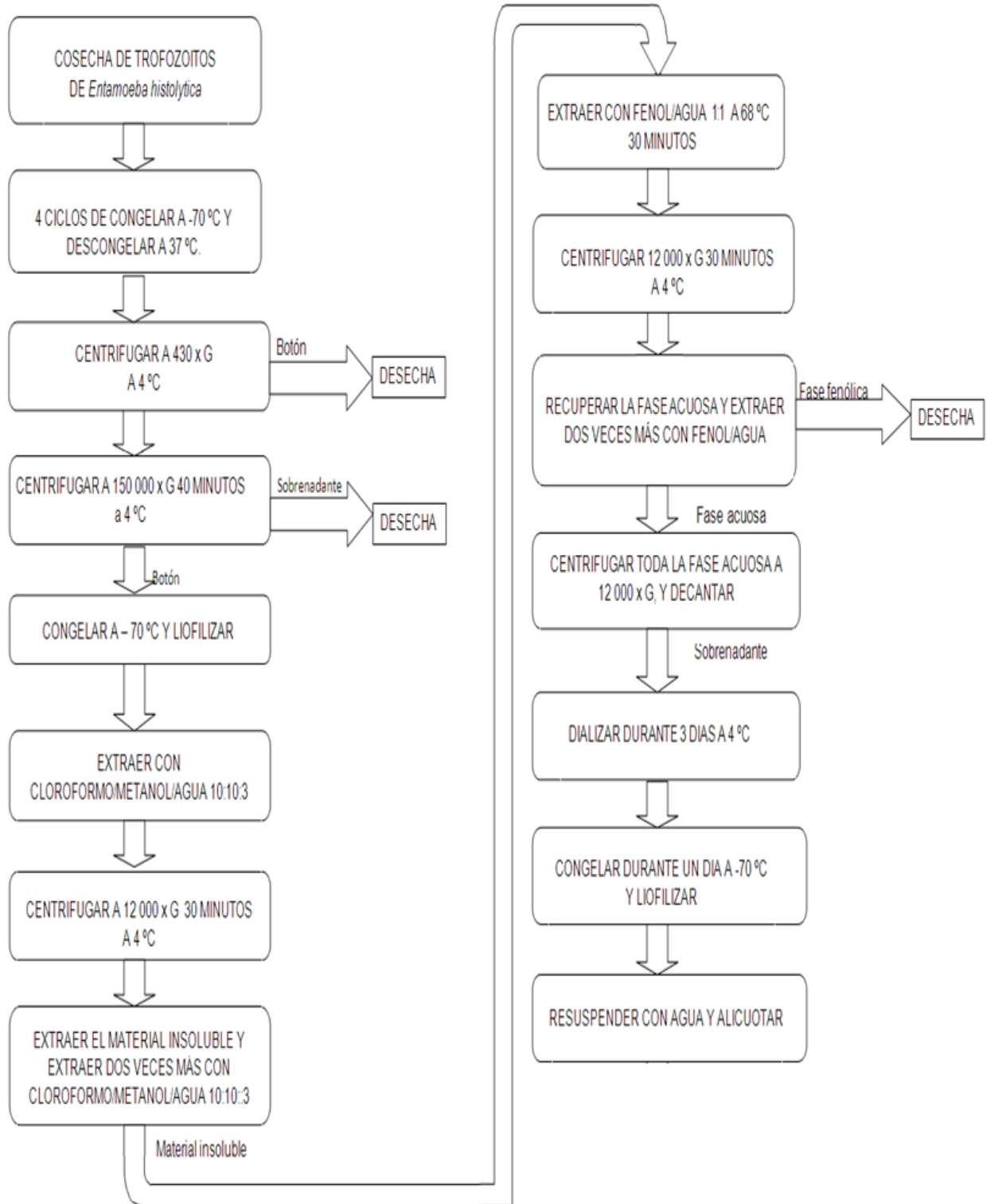
### **8.2.2 Extracción de la LPPG por el método fenol-agua (método A) y el método fenol-agua modificado (método B).**

La extracción de LPPGEh, se realizó a partir de trofozoítos de *E. histolytica* HM-1: IMSS C-26, 12 gramos de biomasa húmeda ( $5.7 \times 10^8$  trofozoítos recolectados en un tubo Falcón) para el método tradicional de extracción de LPPG por fenol-agua (Figura 6) el cual fue descrito por Westphal y Jann y modificado por Isibasi *et al* (Westphal, 1965;

Isibasi, 1982) para la extracción de antígeno de membrana de amibas, y 12 gramos de biomasa húmeda ( $5.7 \times 10^8$  trofozoítos recolectados en un tubo Falcón) para el método de fenol-agua modificado (Figura 7) el cual a su vez es una modificación del método empleado por Isibasi *et al* (Gonzales-Roldán, 2008; Alcántara Hernández 2010). Se requieren 10 gramos mínimo de biomasa húmeda para cada método (Alcántara Hernández, 2010) de trofozoítos cosechados en fase logarítmica que contienen aproximadamente  $6 \times 10^8$  trofozoítos almacenados a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Figura 6.-** Esquema de la extracción de LPPG por el método A.



**Figura 7.-** Esquema de extracción de la LPPG por el método B.

Se inicio la extracción de LPPG de la cepa HM1:IMSS C-26 por ambos métodos descritos a continuación de forma simultánea, fueron descongelada la cosecha de amibas en un solo tubo Falcón a temperatura ambiente, se homogenizo mediante agitación, se colocó 12 ml de cosecha de trofozoítos para cada metodología en tubo cónico de 50 ml (Falcón). Posteriormente el lisado de las amibas se realizó mediante la congelación a -70 °C durante 30 minutos y descongelación en baño maría a 37 °C durante 20 minutos (3x).

Los tubos con la biomasa lisada se centrifugaron a 430 x G durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar núcleos y organelos membranosos de gran tamaño, se colectó la suspensión espesa (sobrenadante), fue colocada en tubos para ultracentrífuga de policarbonato (Beckham).

Los tubos de ultracentrífuga que contienen el lisado de las amibas se llenan completamente con agua inyectable de tal forma en que se evite formar burbujas. Se centrifugo a 150 000 x G (35 000 rpm) durante 45 minutos a 4 °C, en está centrifugación se eliminan las moléculas contenidas en el citoplasma, las cuales se observan como un liquido amarillo. Se continúa trabajando con el botón, el cual es un concentrado de membrana, fue congelado a -70 °C, se realizó la liofilización al siguiente día hasta la completa eliminación del agua, hasta este punto, se hizo lo mismo en ambos métodos de extracción.

#### **8.2.2.1 Método fenol-agua modificado (método B)**

El liofilizado se disgregó para realizar un tratamiento contra lípidos adicionándole 3.6 ml de agua y 12 ml de metanol agitando en el tubo de ultracentrífuga, fue transferido todo a un tubo de teflón, se agregó 12 ml de cloroformo al tubo de teflón y de esta manera quedó una proporción 10: 10: 3 de metanol: cloroformo: agua, la miscibilidad que tiene el metanol con el agua es completa.

Se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente a 200 rpm, posteriormente se centrifugó a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos a 4 °C, se procedió a la eliminación de solventes sin tocar el botón insoluble (la fase orgánica es de color amarillo

y está saturada de lípidos), se resuspendió el botón insoluble con 27.6 ml de cloroformo/metanol/agua en proporción 10: 10: 3, fue centrifugada la solución a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos a 4 °C, se volvió a repetir este procedimiento una vez más con 27.6 ml de cloroformo/metanol/agua.

El tubo con el material insoluble fue colocado destapado en baño de hielo dentro de la campana de flujo laminar durante aproximadamente 1.5 horas, de esta forma se realizó el secado del material insoluble. Se resuspendió el material seco insoluble, agregando 5 ml de agua inyectable a 68 °C, se agitó perfectamente, agregamos el mismo volumen de fenol al 90 % a 68 °C (a esta temperatura la miscibilidad del fenol y el agua es completa), mezclado por agitación, tapado el tubo, fue colocado durante 30 minutos en el baño maría a 68 °C a 200 rpm y luego en el baño de hielo durante 30 minutos. Se procedió a centrifugar el tubo a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos.

Se observaron tres fases, la superior fue la acuosa, una interface sólida y la fase fenólica en la parte inferior del tubo, la fase acuosa fue extraída midiendo el volumen con precaución de no tomar de la fase sólida, la fase acuosa se depositó en un tubo de teflón en hielo dentro de la campana de extracción.

En el tubo con la fase fenólica y la fase sólida, se adicionó exactamente el volumen que se le retiró de agua a 68 °C y homogenizó, después se agregó 5 ml de fenol caliente y 5 ml de agua caliente, fue homogenizado, se colocó en el Maxi Shake durante 30 minutos en el baño maría a 68 °C a 200 rpm y luego en el baño de hielo durante 30 minutos. Se centrifugó el tubo a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos. La fase acuosa fue tomada midiendo nuevamente la cantidad que se retira, para colocarla en el mismo tubo de teflón en que se colocó la anterior fase acuosa.

En el tubo con la fase fenólica y la fase sólida, se le adicionó exactamente el volumen que se le había retirado de agua a 68 °C, se homogeniza, se tapó el tubo y fue colocado durante 30 minutos en baño maría a 68 °C a 200 rpm y luego en el baño de hielo durante 30 minutos. Fue centrifugado el tubo a 12 000 x G (8 300) durante 30 minutos.

La fase acuosa se tomó y fue colocada en el mismo tubo de teflón en que se colocaron las anteriores fases acuosas.

El tubo de teflón con la fase acuosa reunida, fue centrifugada a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos para la eliminación de los contaminantes sólidos, el sobrenadante se decantado en un tubo cónico de 50 ml.

Tomados 10 cm<sup>2</sup> de membrana para dializar (para el manejo de la membrana se realizó con pinzas despirogenizadas y guantes estériles, y la membrana fue hervida de 2 a 5 minutos en agua inyectable en un vaso de vidrio), fue amarrada la membrana de diálisis de uno de los extremos con hilo estéril o con sutura de nailon de tal manera que no hubo fuga de la fase acuosa que colocaremos dentro.

La fase acuosa se colocó dentro de la membrana procurando no tocar con los guantes, amarrando la membrana del extremo de donde se colocó la fase acuosa, la membrana fue colocada dentro de un matraz de 2 L, sujetando la membrana con hilo estéril de la boca del matraz, la membrana quedo centrada dentro del matraz, agregados 1.7 litros de agua inyectable, la diálisis se realizó durante tres días en cuarto frío (de 4 °C a 6 °C) en agitación, el agua se cambió diariamente, al concluir, la absorbancia fue medida a 288 nm de una muestra del agua del dializado en un espectrofotómetro de luz UV, la absorbancia fue de cero y esto nos indicó que se ha eliminado completamente el fenol.

Recuperado el dializado con ayuda de una jeringa para colocarlo en un tubo cónico de 50ml, se congeló a -70 °C y al siguiente día fue realizada la liofilización, en el momento de liofilizar, con el tubo destapado, se dejó funcionando el aparato toda la noche hasta la completa eliminación del agua, el producto liofilizado se almacenó en el ultracongelador a -70 °C. El liofilizado fue pesado, recomendable adicionar el agua inyectable necesario para dejar la LPPG a una concentración de 1 mg/ml (= 1µg/1µl) y viales a mayor concentración, dejándolo 15 minutos en hielo para completa solubilización de la molécula y posteriormente alicuotar en tubos cónico de 600µl, congelar a -70 °C.

### 8.2.2.2 Método fenol-agua (método A)

El liofilizado fue disgregado y trasvasado al tubo de teflón, se le agregó 5 ml de agua inyectable a 68 °C agitando, después agregando el mismo volumen de fenol al 90 % a 68 °C, se procedió a mezclar por agitación, se tapó y colocó durante 30 minutos a 68 °C a 200 rpm y luego en baño de hielo durante 30 minutos. Fue centrifugado el tubo a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos.

Se observaron tres fases, la acuosa en la parte superior, una interface sólida y la fase fenólica en la parte inferior del tubo, se extrajo la fase acuosa midiendo el volumen y fue depositado en un tubo de teflón en baño de hielo.

En el tubo con la fase fenólica y la fase sólida, se adicionó exactamente el volumen que se le había retirado de agua, a 68 °C y se homogenizó, fue agregado nuevamente 5 ml de fenol a 68 °C y 5 ml de agua caliente para colocarlo 30 minutos en el baño maría a 68 °C a 200 rpm, posteriormente en baño de hielo durante 30 minutos. El tubo fue centrifugado a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos. La fase acuosa se extrajo midiendo cuidadosamente la cantidad que se retiró y fue colocada en el mismo tubo de teflón en que se colocó la anterior fase acuosa.

Al tubo con la fase fenólica y la fase sólida, se adicionó exactamente el volumen que se le retiró de agua a 68 °C y fue homogenizado, se colocó durante 30 minutos en el baño maría a 68 °C a 200 rpm y luego en el baño de hielo durante 30 minutos. Se centrifugó el tubo a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos. Nuevamente la fase acuosa se tomó y fue colocada en el mismo tubo de teflón en que se colocaron las anteriores fases acuosas y a éste se le realizó una última centrifugación a 12 000 x G (8 300 rpm) durante 30 minutos para la eliminación de los contaminantes sólidos, el sobrenadante fue decantado con cuidado en un tubo cónico de 50 ml.

Tomados 10 cm<sup>2</sup> de membrana para dializar (para el manejo de la membrana fue hervida de 2 a 5 minutos en agua inyectable), se colocó dentro de la membrana la fase acuosa,



procurando no tocar con los guantes y sellando perfectamente de ambos lados para colocarla en un matraz de 2 L, sujetando la membrana con hilo estéril de la boca del matraz, la membrana estuvo centrada dentro del matraz, fueron agregados 1.7 litros de agua inyectable, al dializar se realizó en agitación constante durante tres días en cuarto frío (4 °C a 6 °C), cambiando diariamente el agua, al concluir la diálisis, de una muestra del agua del dializado se le leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de luz UV a 288 nm, obteniendo como resultado “cero” y esto indicó la eliminación del fenol.

Recuperado el dializado con una jeringa, se colocó en un tubo cónico de 50 ml, fue congelado a -70 °C, al siguiente día se realizó la liofilización, dejando destapado el tubo durante toda la noche, hasta la completa eliminación del agua, el producto liofilizado se almacenó en el ultracongelador a -70 °C. El liofilizado se pesó, se agregó agua inyectable para tener la LPPG a 1 mg/ml y a mayor concentración, dejándolo 15 minutos en hielo para completa solubilización y posteriormente fue alícuotar en tubos cónicos de 600 µl, congelada a -70 °C.

### **8.2.3 Cuantificación de azúcares reductores por el método de antrona.**

El contenido de carbohidratos de las LPPG obtenidos (método A, método B, y LPPG HM1:IMSS) se determinó por el método de antrona (Dubois, 1956).

Se preparó la curva con soluciones de D-glucosa: se realizaron en matraz aforado de 10 ml, con las siguientes concentraciones de D-glucosa en agua inyectable: 0, 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml, aforando con agua inyectable.

Se preparó la solución de antrona colocando 0.09 g de antrona en un matraz erlenmeyer, agregando lentamente 45 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, protegiendo de la luz cubriendo con aluminio el matraz. Las muestras de LPPG se prepararon por triplicado, colocando en un tubo de ensayo de 15x100 mm un volumen de 25 µl de muestra + 475 µl de H<sub>2</sub>O + 1 ml de la solución de antrona al 2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en otro tubo de ensayo fue agregado un volumen de 50 µl de muestra + 450 µl de H<sub>2</sub>O + 1 ml de la solución de antrona al 2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y en

un tercer tubo de ensayo fue agregado un volumen de 100 µl de muestra + 400 µl de H<sub>2</sub>O + 1 ml de la solución de antrona al 2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Se colocó 1 ml de cada una de de las soluciones de D-glucosa por separado a un tubo de ensayo de 15 x 100 mm debidamente rotulado a la concentración de D-glucosa (0, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/ml) y se agregó a los tubos, 2 ml de solución de antrona en ácido sulfúrico.

Las muestras y las soluciones de D-glucosa ya con la solución de antrona, fueron hervidas en baño de agua durante 10 minutos. La finalidad del ácido sulfúrico es el de hidrolizar los monosacáridos libres y los polisacáridos en sus extremos reductores, en forma de furfurales, formando un complejo azul verdoso con la antrona y cuya absorbencia a 620 nanómetros es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra. Se tomó lectura de las absorbencias a 620 nm después de 1 minuto de haber retirado del baño de agua en ebullición (Trevelyan, W, 1952).

#### **8.2.4 Cuantificación de proteínas de la LPPG por la técnica del ácido bicinconínico (BCA)**

La determinación del contenido de proteínas de las LPPG extraídas por los métodos A y el método B, se realizó por el método de ácido bicinconínico (BCA protein Assay, Thermo Scientific, USA).

Este método utiliza como fundamento la reacción de *Biuret*, en la que los péptidos de tres o más residuos de aminoácidos forman un complejo azul con los iones cobre, que en condiciones alcalinas se reducen de cobre con carga 2<sup>+</sup> a cobre con carga 1<sup>+</sup>. El Cu<sup>1+</sup> es detectado por el ácido bicinconínico, formando un complejo morado el cual absorbe la luz a 562 nanómetros.

Se realizó la curva estándar de BSA (albúmina sérica bovina), siguiendo las instrucciones del kit, primero se elaboró diluciones de la alícuota de BSA a las concentraciones que se emplean en la curva patrón, las cuales son: 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50, 25, 0 µg/ml utilizando como diluyente PBS pH 7.4

El reactivo de trabajo se elabora tomando 50 partes del reactivo A y 1 parte del reactivo B (para cada 50 ml de reactivo A, se le agrega 1 ml de reactivo B). Las muestras fueron calentadas a  $37 \pm 1$  °C previamente, todos los tubos de reacción contuvieron 100 µl de BSA a sus respectivas concentraciones ó de LPPG respectivamente.

Se le adicionó a cada tubo que contenían las muestras de BSA y LPPG, una cantidad de 2 ml de solución de trabajo, fueron cubiertos de la luz e incubados a 37 °C por 30 minutos. Tras un minuto de haber dejado enfriar a temperatura ambiente, se leyó la absorbencia de todas las muestras a 562 nm. Se determinó la línea de tendencia polinomial de segundo orden (datos no mostrados), y la ecuación de tendencia lineal (Alcántara Hernández, 2010) (apéndice 2).

### **8.2.5 Separación de carbohidratos y tinción de plata de la LPPG en geles de poliacrilamida (Método SDS-PAGE)**

Las LPPG extraídas por el método A, método B, y la LPPG HM1:IMSS (control positivo), se caracterizaron empleando geles de poliacrilamida al 12%.

Los geles de poliacrilamida constaron de una región concentradora y una separadora, en la preparación de 20 ml de gel separador, este tiene una concentración de 12 % de poliacrilamida y en su preparación se emplea: 11.68 % de acrilamida, 0.32 % de bis-acrilamida, 4.73% de Tris (hidroximetil) metilamina, 0.104 % de dodecilsulfato de sodio, aforado a 20 ml con agua inyectable.

La región concentradora se utilizó a una concentración del 5 % de poliacrilamida, y su función es la de alinear las muestras antes de comenzar su separación. La composición del gel concentrador es 4.866% acrilamida, 0.1334 % bis-acrilamida, 1.4848 % de Tris (hidroximetil) metilamina, 0.09813 % de dodecilsulfato de sodio, aforado a 20 ml con agua inyectable. Para llevar a cabo el proceso de gelificación de los geles, se adicionó los catalizadores persulfato de amonio (Sigma) y TEMED (Bio-Rad) (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) (García Pérez M, 2000).

El corrimiento del gel concentrador fue de 30 minutos a 50 volts y 4 horas para el separador a 80 volts, ambos en solución de corrimiento a pH 8.3. A los geles se les realizó la tinción con nitrato de plata, la cual consistió en colocar el gel durante una hora en una solución fijadora (25 % de metanol, 12.5 % ácido acético), posteriormente fue lavado con agua destilada, lavado con metanol al 50% por 15 minutos, después se colocó durante un minuto en una solución de oxidación (0.02 % tiosulfato de sodio), al retirar exceso de tiosulfato de sodio fue con lavado de 1 minuto con agua destilada, posteriormente se colocó el gel durante 15 minutos una solución de impregnación (0.2 % de nitrato de plata, 0.024 % de formaldehído), después fue lavado el gel varias veces con agua destilada durante 2 minutos, y posteriormente se le colocó en una solución de revelado (6 % de carbonato de sodio, 0.001 % de tiosulfato de sodio, 0.015 % de formaldehído), la solución de reveladora se dejó hasta que se apreciaron claramente las bandas del peso molecular y el barrido de la LPPG, esto no excedió en ninguno de los ensayos los 10 minutos, el gel fue lavado con agua durante unos segundos y se le agregó una solución de paro (65 % de ácido acético, 4 % metanol, 0.5 % formaldehído). Se comparo el barrido de las muestras obtenidas por ambos métodos de extracción así como el patrón de corrimiento (Lotter H, 2009).

### **8.2.6 Identificación de la LPPG por “Western-Blot”**

En la técnica de Western-blot, el corrimiento electroforético se realizó con las mismas condiciones que en los geles de poliacrilamida empleados para la tinción de plata de carbohidratos (Lotter H, 2009; Burnette, 1981; Correa, 2000).

La transferencia a la membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) se llevó a cabo en el sistema i-Blot Semy-Dry blotting (Invitrogen, Oslo) a 12 volts durante 10 minutos, posteriormente se bloquea la membrana con leche descremada sin grasa al 5% durante una hora. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con solución TRIS-HCl (pH 7.5) con 0.1% de Tween 20, una vez desechada la solución de lavado, se le agregó 10 ml de una solución 1:200 de un suero de conejo anti-LPPG durante 2 horas. Se realizaron cinco lavados a la membrana mediante movimiento rotatorio durante 25 minutos.

Se empleo un anticuerpo anti-conejo IgG (inmunoglobulina tipo G) con marcador de peroxidasa diluido 1:3000 en solución de bloqueo. Para el revelado se empleara el kit de detección *AP Conjugate substrate* (BioRad). Mediante esta técnica se llevo a cabo el revelado para poder posteriormente observar la inmunocaracterización de las LPPG.

### **8.2.7 Identificación de la LPPG por el método de Elisa**

Para la detección de la LPPG se empleó la técnica de Elisa directo con suero de conejo anti-LPPG. Se recubrieron las placas de fondo plano de 96 pozos para inmuno ensayo (Costar) con diferentes concentraciones de LPPG obtenida por los diferentes métodos de extracción, las cuales se emplearon disminuyendo en los pozos desde las concentraciones 2500 ng/ml hasta 0.25 ng/ml, en solución reguladora de carbonatos con pH 9.5 durante dos horas. Al concluir este tiempo, las placas se lavaron con PBS con 0.1% de Tween 20 para posteriormente bloquear los sitios inespecíficos con leche descremada sin grasa al 5% a 37 °C por 1 hora.

Se lavó usando PBS con 0.1% de Tween 20, para agregar diferentes diluciones, eligiendo como la que mejor mostraba el reconocimiento, la de 1:12 000 del suero de conejo antiLPPG en solución de bloqueo, fue incubado durante 90 minutos a 37 °C. Posteriormente se lavo las placas 5 veces, se le agregó en dilución 1:4000 en solución de bloqueo un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Invitrogen USA), incubando a 37 °C 90 minutos, después de ésto, fue lavado 8 veces y uno final con PBS sólo, con lo cual se terminó de eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos. Se le añadió 0.006 g de la molécula cromogénica orto-fenilendiamina 0.006 g a una solución de citratos pH 5.6 (12 ml) más 10 microlitros al 30 % de peróxido de hidrógeno, de esta solución fueron agregados 100 microlitros a cada pozo e incubo a temperatura ambiente durante un lapso de 10 minutos en un sitio lo más obscuro posible para permitir que se llevara a cabo la reacción, se detuvo la reacción con 10 microlitros de ácido sulfúrico 2.5 N e inmediatamente la placa se leyó en un espectrofotómetro de placas marca Dynex (Magellan Biosciense, WA, USA) a 492 nm (Walker, 1994).

### **8.2.8 Determinación de endotoxina**

Se determinó la presencia de endotoxina, contaminante en las LPPG, con el lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL) cromogénico QCL-1000 (Lonza, MD, USA). El lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus*, reacciona en presencia de endotoxina, al efectuarse esta interacción, activa una serie de enzimas de la cascada de coagulación.

Posteriormente se agrega un substrato cromogénico el cual en presencia de las enzimas de la cascada de coagulación, libera una molécula cromófora, lo que resulta en una solución amarilla que se mide en el espectrofotómetro a 405 nm (Maldonado-Bernal C, 2005; Lotter, 2009).

La correlación entre la concentración de endotoxina y absorbencia es lineal entre 0.1 y 1 unidades de endotoxina/ml (EU/ml), una unidad de endotoxina equivale a 0.1 ng de LPS, se maneja el LPS ya que es el principal contaminante de la LPPG. Mediante la grafica de la ecuación lineal, obtendremos la cantidad de endotoxina contenida en un microgramo de muestra, así como la cantidad de endotoxina obtenida en cada método de extracción de la LPPG.

### **8.2.9 Estimulación de macrófagos con LPPG de *E. histolytica***

Se obtuvo un cultivo primario de monocitos humanos a partir de concentrados leucocitarios del Banco de Sangre del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Se agrego 80 ml del concentrado leucocitario más 80 ml de PBS en un frasco, se homogeneizó, posteriormente se agregó 15 ml de Lymphoprep (Fresenius Kabi, USA) en 4 tubos cónicos de 50 ml (Corning) más 45 ml de la dilución del concentrado leucocitario para cada tubo procurando no mezclar las fases, se centrifugó a 2 500 rpm durante 40 minutos, posteriormente las células mononucleares se colectaron en pares, transfiriendo las células de dos tubos colocándolas en un tubo de 50 ml y llenándolo con PBS, se centrifugaron a 1 500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se repitió el lavado con PBS 2 veces

más a 1 000 rpm y 900 rpm, decantado el sobrenadante en cada lavado, el botón final se resuspendió en 10 ml de RPMI 1640 (GIBCO) suplementado.

Las células fueron contadas con hemocitómetro haciendo una dilución 1:100 con azul tripán. Para llevar a cabo el conteo de células, se toman 45 microlitros de azul tripán y se colocan en tubo cónico de 600 microlitros, se añaden 5 microlitros de las células resuspendidas en RPMI para posteriormente homogenizar y colocar 10 microlitros en el hemocitómetro (Invitrogen™ C10227).

Se colocó 1 ml de RPMI suplementado con SFB en cada uno de los 24 pozos de las 3 cajas para cultivo celular en suspensión y fueron añadidos 1 a  $3 \times 10^6$  mononucleares a cada uno de los pozos; mezclando por agitación en las cajas, después fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se le realizó posteriormente un lavado con PBS para retirar las células que no se habían adherido, se le colocó 2 ml de RPMI suplementado al 2 % con suero fetal bovino, se le dejó incubando durante 7 días para la diferenciación a macrófagos.

Ya que transcurrieron los días para la diferenciación a macrófagos, se observa si los cultivos son homogéneos, se les cambio el medio e incubó por 12 horas. Los estímulos se efectuaron: cultivando las células en medio solo, en presencia de 1000 ng/ml de LPS (Invitrogen), 2.5 µg/ml en peso de carbohidratos de LPPG extraída por el método A de la cepa C-26, 2.5 µg/ml en peso de carbohidratos de LPPG extraída por el método B de la cepa C-26, 2.5 µg/ml en peso de carbohidratos de LPPG HM1:IMSS como control positivo. Todos los estímulos se realizaron a los tiempos de 6, 12 y 24 horas, tras lo cual la placa se centrifugó a 5 minutos a 380 x g a 4 °C para evitar restos celulares en el sobrenadante, se colectó los sobrenadantes en alícuotas en tubos cónicos de 600 microlitros, los cuales fueron almacenados a -70 °C, hasta la cuantificación de interlucinas.

### **8.2.10 Cuantificación de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 en sobrenadante de macrófagos humanos por Elisa**

Mediante la técnica de Elisa cuantificaron las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 en los sobrenadantes obtenidos del cultivo de macrófagos humanos a través de los sistemas OptEIA™ (Pharmingen, CA, USA).

A cada pozo de una placa de 96 pozos (Costar) se le agregaron 100  $\mu$ l de anticuerpo de captura diluido en solución reguladora de carbonatos en una solución de 1:250, se dejó en reposo toda la noche a 4 °C y posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS al 0.5 % de Tween 20. Se le agregó 200  $\mu$ l de solución reguladora de bloqueo (PBS al 10 % de suero fetal bovino) durante 1.5 horas y se realizaron 4 lavados. Se colocaron 100  $\mu$ l de cada muestra inmediatamente después de haber sido descongeladas y resuspendidas, se colocaron las diferentes diluciones del estándar correspondiente de cada citocina, todas las muestras y las diluciones del estándar se colocaron por duplicado, después de 2 horas se lavaron cinco veces y se añadieron 100  $\mu$ l de una solución reguladora que contenía el anticuerpo de detección biotinilado y estreptavidina-peroxidasa en las cantidades en que indica el kit OptEIA™ (Pharmingen, CA, USA) (Alcántara Hernández, 2010). Después de 1 hora se realizaron 5 lavados, se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de orto-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno en solución reguladora de citratos y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Al concluir este tiempo, se le añadieron 15  $\mu$ l de una solución de ácido sulfúrico 2 N. La absorbencia se determinó a 490 nm, en el lector de placas de Elisa (Dynex), las concentraciones de las citocinas en las muestras se obtienen interpolando las absorbencias contra las concentraciones de las citocinas en la curva patrón (apéndice 4-6). Se graficó el tiempo de estimulación de los macrófagos contra la concentración en pg/ml de la citocina correspondiente.



## **9. Análisis estadístico**

Los experimentos de estimulación de macrófagos humanos se realizaron por triplicado, para determinar diferencias estadísticas se aplicó la prueba de ANOVA de un factor con la prueba de Dunnett en el programa GraphPad Prism 5. Se consideró diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

## 10. Resultados

### 10.1 Obtención de biomasa de *E. histolytica*

La cepa C-26 y HM1:IMSS se cultivaron en botellas de 175 cm<sup>2</sup>. Las amibas se cosecharon en fase de crecimiento logarítmico, las botellas de 175 cm<sup>2</sup> se inocularon a partir de botellas de 75 cm<sup>2</sup>, como se indica en la tabla 1.

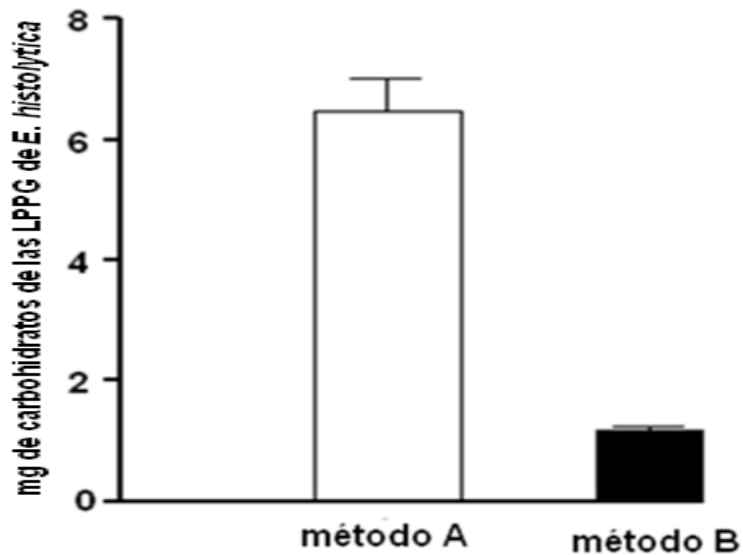
**Tabla 1.** Cantidades de trofozoítos obtenidos durante el cultivo de *E. histolytica* de la cepa C-26 y HM1:IMSS.

Recipiente	Volumen de medio	Origen del inóculo	Rendimiento C-26	Rendimiento HM1:IMSS
Tubo	12 ml	Tubo con confluencia aproximada 90% al	1x10 <sup>6</sup> amibas	1x10 <sup>6</sup> amibas
Botella 75 cm <sup>2</sup>	50 ml	Tubo con confluencia aproximada 90% al	8.0 ± 0.7 x 10 <sup>6</sup> amibas	8.6 ± 0.7 x 10 <sup>6</sup> amibas
Botella 175 cm <sup>2</sup>	70 ml	Botella de 75 cm <sup>2</sup>	19 ± 3 x 10 <sup>6</sup> amibas	21 ± 3 x 10 <sup>6</sup> amibas

Para cada método de extracción de la LPPG de la cepa C-26, se utilizaron 5.7 x 10<sup>8</sup> trofozoítos, por lo que fue necesario cultivar más de 60 botellas de 175 cm<sup>2</sup> de esta cepa de amibas.

## 10.2 Rendimiento en peso seco de LPPG de C-26

Se logró obtener a partir de  $5.7 \times 10^8$  trofozoítos de la cepa C-26 para cada método de extracción, la cantidad en peso seco de LPPG fue de 7 200 microgramos por el método A, y por el método B se obtuvieron 1 520 microgramos, se obtiene cerca de 5 veces más producto cuando se efectúa el método A, ya que el producto final contiene sales, se procederá a tomar como equivalencia el peso en carbohidratos en el rendimiento de LPPG (figura 8), ya que representa la mayor proporción de las molécula.



**Figura 8.** Comparación del rendimiento de extracción en peso seco de carbohidratos en las LPPG de *E. histolytica* de la cepa C-26. Se extrajo LPPG de *E. histolytica* por el método A y B a partir de  $5.7 \times 10^8$  trofozoítos.

## 10.3 Cuantificación de carbohidratos en las LPPG de *E. histolytica* obtenida por los métodos A y B

Para conocer la concentración de carbohidratos contenidos en la molécula de LPPG, se realizó la cuantificación de carbohidratos obtenidos por el método de antrona (tabla 2), empleando una curva estándar de D-Glucosa (apéndice 1), utilizando muestras concentradas de la extracción, en donde la procedente por el método A fue de 4.8 mg/ml y la LPPG por el método B fue de 3.6 mg/ml.

Tomando la ecuación de la recta:  $\mu\text{g de glucosa} = (\text{Absorbencia} - 0.0121) / 0.0068$  la cual tuvo una  $r^2 = 0.9972$  para el cálculo de la concentración de carbohidratos en las muestras.

**Tabla 2.** Concentración de carbohidratos en las LPPG de *E. histolytica* cepa C-26

Cepa C-26	Absorbencia	Desviación estándar	$\mu\text{g}$ Glucosa	$\mu\text{g/ml}$ en la muestra
Método A	0.3928	0.0459	55.997	4307.50
Método B	0.2609	0.01414	36.588	2814.53

Por el método A se puede obtener una mayor cantidad de LPPG al concluir la extracción, la proporción de carbohidratos de las LPPG obtenidas por el método A es cerca de **5 veces mayor** con respecto a la cantidad de LPPG obtenida por el método B.

#### 10.4 Cuantificación de proteínas en las LPPG

La cantidad de proteína contenida en las LPPG de C-26 obtenidas por los diferentes métodos de extracción, se determinaron a partir de la curva realizada por el método de ácido bicinconínico (BCA protein Assay, Thermo Scientific, IL, USA) interpolando las absorbencias obtenidas de las muestras concentradas de las LPPG. En el apéndice 2, se observa la curva estándar de albúmina sérica bovina utilizada para cuantificar la concentración de proteínas en las muestras (tabla 3).

**Tabla 3.** Concentración de proteínas en las LPPG de *E. histolytica* de la cepa C-26

C-26	Absorbencia promedio	Desviación estándar	Concentración $\mu\text{g/ml}$
Método A	0.715	0.011	402.62
Método B	1.153	0.025	733.41

**Tabla 4.** Cantidad total de proteínas y carbohidratos extraídos por los métodos A y B.

	µg proteínas	µg carbohidratos
Método A	603.93	6465.0
Método B	308.032	1183.0

Por el método A se puede obtener una mayor cantidad en peso de proteína al concluir la extracción de LPPG, la cantidad en peso de proteínas de la LPPG obtenida por el método A es cercano al “**doble**” de la cantidad de proteínas obtenida al concluir la extracción por el método B (Tabla 4).

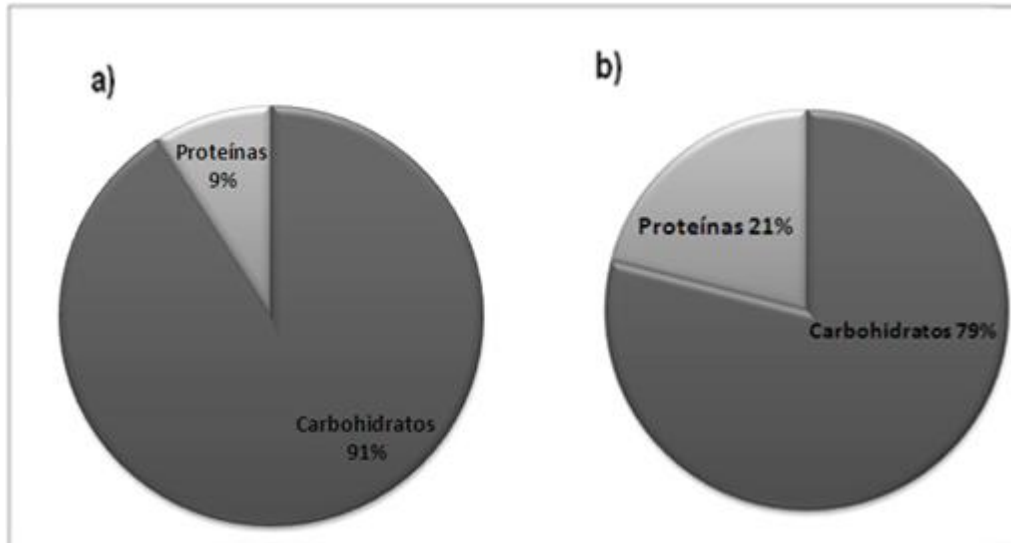
#### **10.5 Relación de proteína-carbohidratos de las LPPG de *E. histolytica* de C-26**

El porcentaje de proteínas en la LPPG obtenida por el método B fue de 20.67 %, y el porcentaje de proteínas en la LPPG obtenida por el método A correspondió al 8.54 % (tabla 5). Lo que implica que la LPPG obtenida por el método B contuvo cerca de 2.4 veces mayor contenido proteico a comparación con LPPG extraída por el método A. El tratamiento de cloroformo/metanol/agua (10:10:2) es el responsable de la diferencia apreciada en las concentraciones de proteína en las LPPG.

**Tabla 5.** Relación de proteínas en las LPPG de *E. histolytica* C-26.

Cepa C-26	proteínas LPPG ( µg/µl )	Carbohidratos LPPG (µg/µl )	Porcentaje de proteínas
Método A	0.40262	4.3075	8.54 %
Método B	0.73341	2.81453	20.67 %

En la relación de carbohidratos y proteínas de las LPPG de la cepa C-26 (Figura 9), se aprecia la diferencia en la proporción del contenido de proteínas en las LPPG obtenidas por los diferentes métodos de extracción.



**Figura 9.** Relación de carbohidratos-proteínas en las LPPG de C-26.

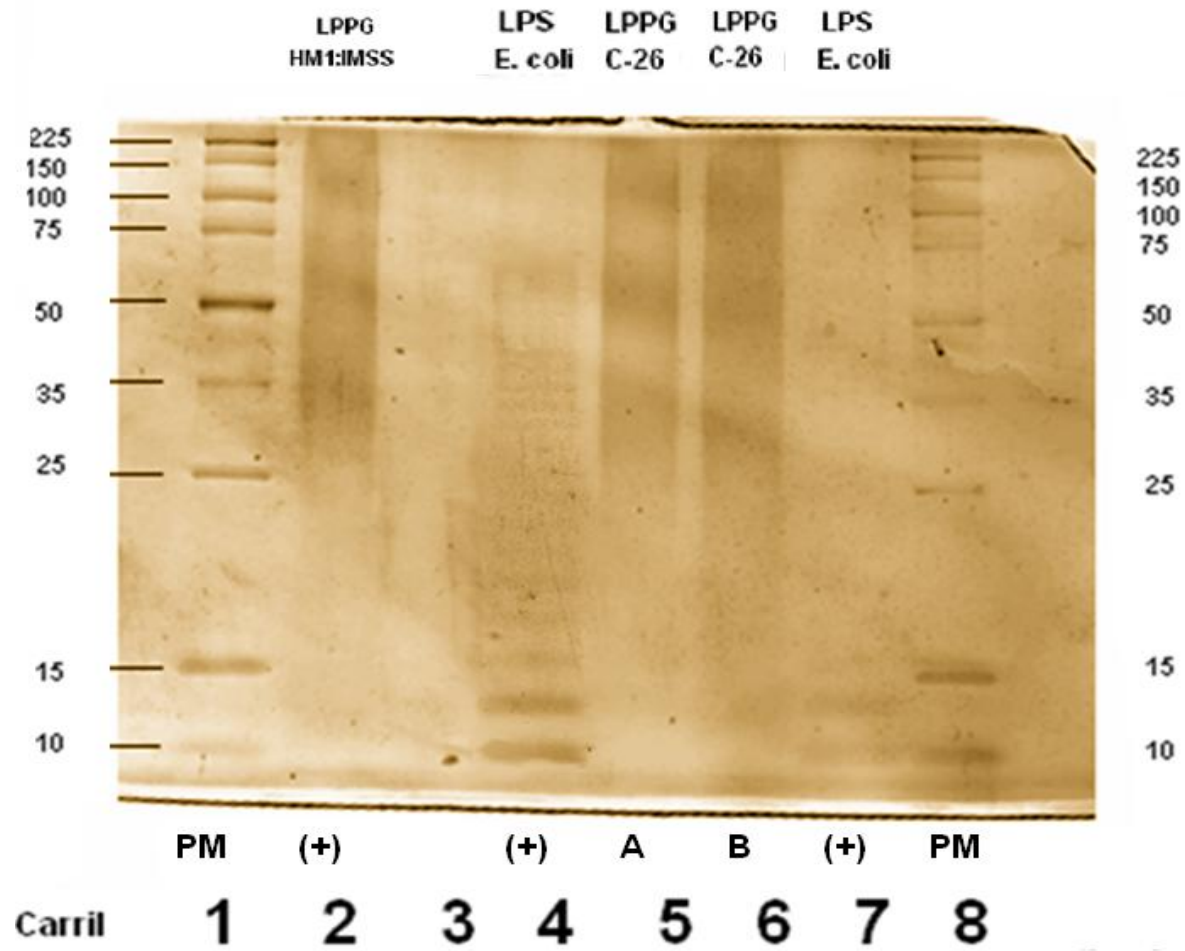
Relación de carbohidratos y proteína de las LPPG de: C-26 obtenida por los métodos de extracción A (a) y el método B (b).

### **10.6 Perfil electroforético de las LPPG de *E. histolytica* revelado por el método de tinción de plata**

El corrimiento electroforético se realizó a 50 volts el gel introductor y a 80 volts el gel separador, estas condiciones se realizaron de la misma forma y en las mismas condiciones en la Inmunocaracterización de las LPPG.

En la figura 10 se muestra el perfil electroforético de las LPPG reveladas por el método de tinción de plata en donde se utilizó un gel de poliacrilamida al 12 %. Los patrones de corrimientos observados en los carriles 2, 5 y 6, son característicos de la lipopéptidofosfoglicana de membrana de *E. histolytica* (Maldonado-Bernal, 2005; Gonzales-Roldán, 2008; Alcántara Hernández, 2010). En los pozos 5 y 6 se observa el

perfil de carbohidratos de las LPPG de C-26, el barrido fue de 25 a 225 kDa, y un barrido tenue de un peso mayor a 10 kDa. En el barrido de la LPPG obtenida de amibas de HM1:IMSS es más evidente el barrido mayor de 25 kDa y va hasta 225 kDa (figura 10). Se aprecia que el barrido es de forma polidispersa y distinta a la del LPS.



**Figura 10.** Caracterización de carbohidratos en gel de poliacrilamida.

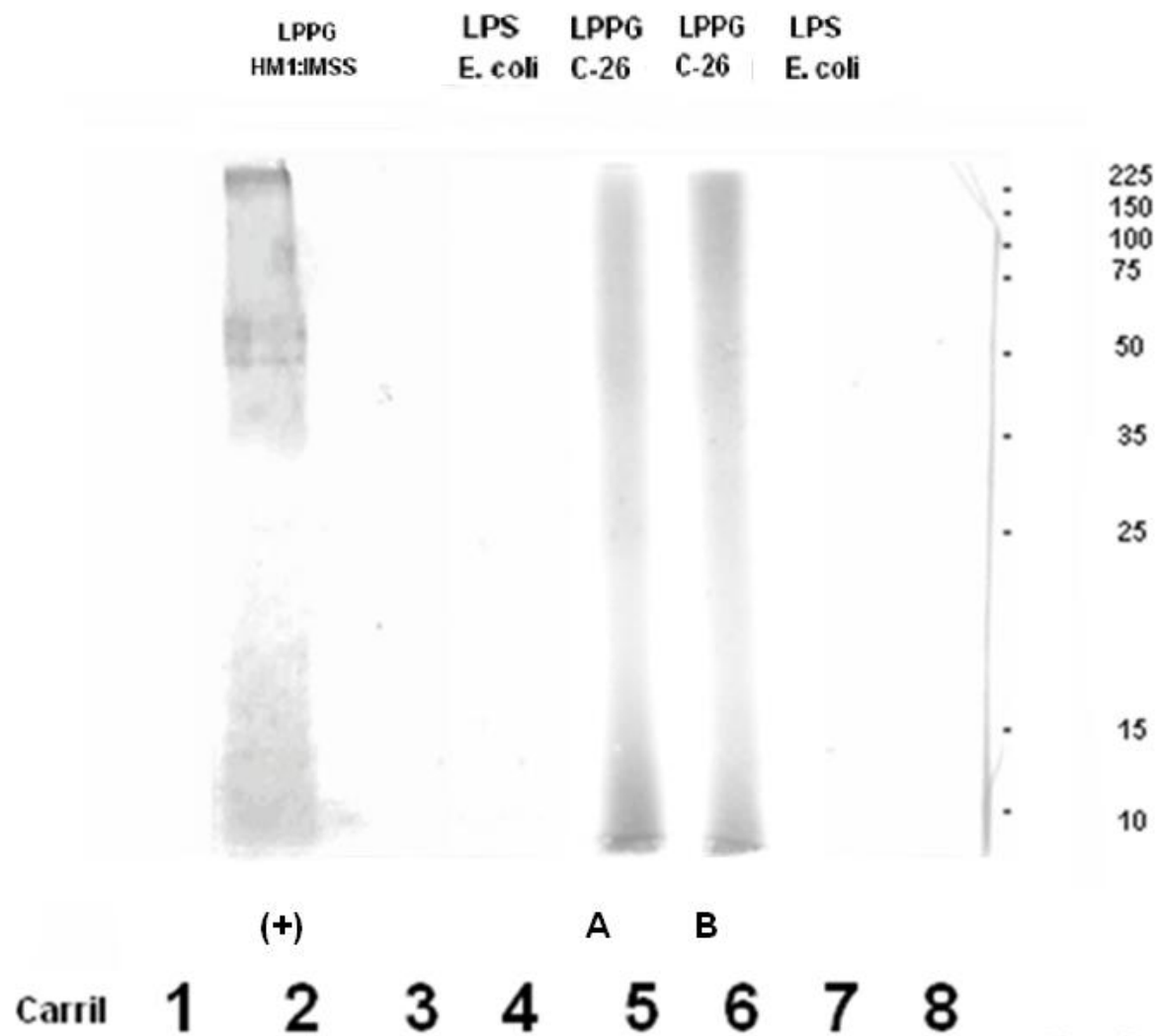
Se realizó la tinción de Plata al gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras. Carril 1 y 8 con marcador de peso molecular, carril 5 con 8 µg de LPPG C-26 extraída por el método A, carril 6 con 8 µg de LPPG C-26 extraída por el por el método B, como control de Lipopolisacárido (LPS *E. coli*) el carril 4 y 7 con 8 µg y 4 µg respectivamente, carril 2 control positivo 8 µg de LPPG HM1:IMSS, control negativo carril 3 solo buffer de carga.

### **10.7 Evaluación de la antigenicidad de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos mediante Inmunotransferencia**

Para evaluar la antigenicidad de la LPPG obtenida por ambos métodos se realizó una inmunotransferencia de las LPPGs obtenidas por los diferentes métodos y se reveló con un suero policlonal anti-LPPGEh. La Figura 11 se muestra el inmunoblot, la identificación del barrido de la LPPG de C-26 realizada por los anticuerpos IgG de conejo, son muy parecidos entre los perfiles observados de las moléculas obtenidas por los métodos A y el B, se aprecia que posee ligeramente mayor intensidad la LPPG obtenida por el método B en el rango de los pesos moleculares de 100 a 225 KDa, y la obtenida por el método A mostro una mayor intensidad en el barrido menor a 15 KDa.

Comparando el barrido de las LPPG procedente de la cepa de baja virulencia contra la LPPG de la cepa control, se mostraron con mayor intensidad el reconocimiento a LPPG de HM1:IMSS lo que indica que posee una mayor afinidad a los anticuerpos utilizados. La antigenicidad mostrada en el barrido electroforético difiere en la forma del barrido entre las LPPG de amibas virulentas con respecto a amibas de baja virulencia, encontrando que la LPPG de la cepa HM1:IMSS presenta un primer barrido intenso de 225 a 35 kDa aproximadamente (el cual es aún más intenso a 50 KDa) y un segundo barrido que va de más de 10 kDa y supera los 15 kDa. (Figura 11).



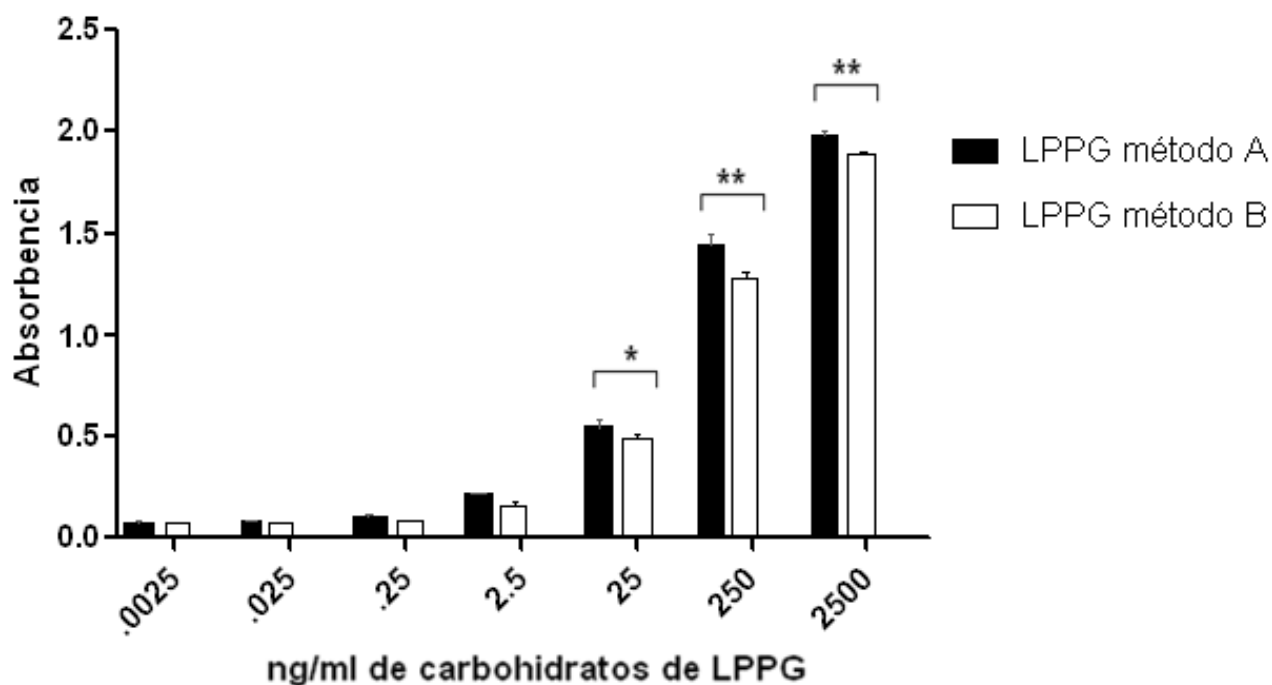


**Figura 11.** Inmunocaracterización de las LPPG de *E. histolytica* en PVDF. Carril 5 con 8  $\mu$ g de LPPG extraída por el método A de la cepa C-26, Carril 4 con 8  $\mu$ g de LPPG extraída por el por el método B de la cepa C-26, como control de Lipopolisacárido (LPS de *E. coli*) el carril 4 y 7 con 8  $\mu$ g y 4  $\mu$ g respectivamente, carril 2 control positivo 8  $\mu$ g de LPPG de la cepa HM1:IMSS.

### **10.8 Evaluación de la antigenicidad de la LPPG de *E. histolytica* obtenida por ambos métodos mediante Elisa**

Se realizó la técnica de Elisa indirecto con un suero policlonal de conejos LPPG. Se ensayaron las concentraciones en peso de carbohidratos de 2 500 ng/ml hasta 0.0025 ng/ml de LPPG C-26 extraída por el método A y por el método B, también se empleo LPPG de la cepa HM1:IMSS como control positivo. Se utilizaron diluciones del suero policlonal las cuales fueron 1:5000, 1:10 000, 1:12 000 (datos no mostrados); en la comparación de las absorbencias de las LPPG se observó como la curva en la que se apreciaron de mejor forma a la dilución del suero con anticuerpo policlonal a 1:10 000 en solución de bloqueo (5% de leche sin grasa en PBS).

En la figura 12 se observa que las absorbencias del reconocimiento entre las LPPG C-26 extraídas por los métodos A y B en donde no mostraron diferencias significativas entre ellas a bajas concentraciones (0.0025 y 2.5 ng/ml), y mostraron diferencia significativa a mayor concentración en los rangos de 25 a 2500 ng/ml. La concentración en que se apreció la mayor diferencia entre estas LPPG procedentes de C-26 y obtenidas por los diferentes métodos de extracción fue a los 250 ng/ml en donde el análisis estadístico de Anova de una vía con la prueba de Dunnet muestra la mayor diferencia estadística observada al comparar las absorbencias, siendo mayores las extraídas por el método A.



**Figura 12.** Detección de la LPPG de C-26 por la técnica de Elisa.

Se realizó la técnica de Elisa y fueron graficadas las absorbencias de las LPPG obtenidas por los métodos A y B, colocando 100 µl de las diluciones de 0.0025 ng/ml hasta 2 500 ng/ml en peso de carbohidratos en solución reguladora de carbonatos pH 9.5, se empleó una concentración de suero de conejo 1:10 000, y un anti conejo IgG con marcador de peroxidasa. Se aplicó la prueba de One-way ANOVA con la prueba de Dunnet considerando la diferencia significativa con \*:  $P \leq 0.05$  (significante), \*\*:  $P \leq 0.01$  (altamente significativa); \*\*\*:  $P \leq 0.001$  (muy significativa).

### 10.9 Determinación de endotoxina de la LPPG de *E. histolytica*

La contaminación de LPS en las preparaciones de LPPG fueron determinadas empleando el método cuantitativo de *Limulus lysate assay*. En el apéndice apéndice 3 se aprecia la curva obtenida por el método de LAL, la correlación entre la concentración de endotoxina y absorbencia es lineal entre 0.1 y 1 unidad de endotoxina/ml (UE/ml).

En las muestras de LPPG se obtuvieron concentraciones de endotoxina menor a 1 UE para la LPPG de la cepa C-26, lo que le atribuye la función biológica a la LPPG y se descarta que los resultados de la estimulación de macrófagos sea debido al LPS. Por cada 10 µg/ml de LPPG obtenida por el método fenol-agua se cuantifico 0.2 UE y por cada 10 µg/ml de LPPG extraída por el método fenol-agua modificado se cuantifico 0.088 UE (Tabla 6).

**Tabla 6.** Determinación de endotoxina en las LPPG de *E. histolytica* C-26

Método de extracción	Absorbencia	UE en 10 µg/ml	ng de LPS por µg de muestra
fenol-agua modificado	0.100	0.088	0.00088
fenol-agua	0.220	0.2	0.002

### 10.10 Niveles de citocinas en sobrenadantes de macrófagos humanos estimulados con las LPPG de *E. histolytica* (TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6)

Se observó que las LPPG obtenidas por diferentes métodos de la cepa C-26, activan a los macrófagos a la concentración de 2.5 µg/ml en peso de carbohidratos, las concentraciones de citocinas se obtuvieron a partir de una curvas estándar de citocina, las cuales se muestran en el apéndice 4, 5 y 6, se observó una tendencia a tener mayor concentración de estas citocinas en los cultivos de estimulados con LPPG proveniente de la cepa de mayor virulencia (control positivo de LPPG), debido a las bajas concentraciones de las citocinas producidas en las LPPG C-26 con 0.1 µg/ml, se utilizó una concentración

mayor (2.5 µg/ml) en peso de carbohidratos, a esta concentración, las LPPG inducen cantidades importantes de TNF-α e IL-6 (figura 13-15), niveles no detectables y semejantes a los basales en las concentraciones de IL-10 a las 6 horas (datos no mostrados), sobresaliendo a las 12 y 24 horas (figura 15), se comprobó que el sistema funciono adecuadamente mediante control positivo de LPS, el cual induce concentraciones mayores de estas citocinas con solo 1 µg/ml.

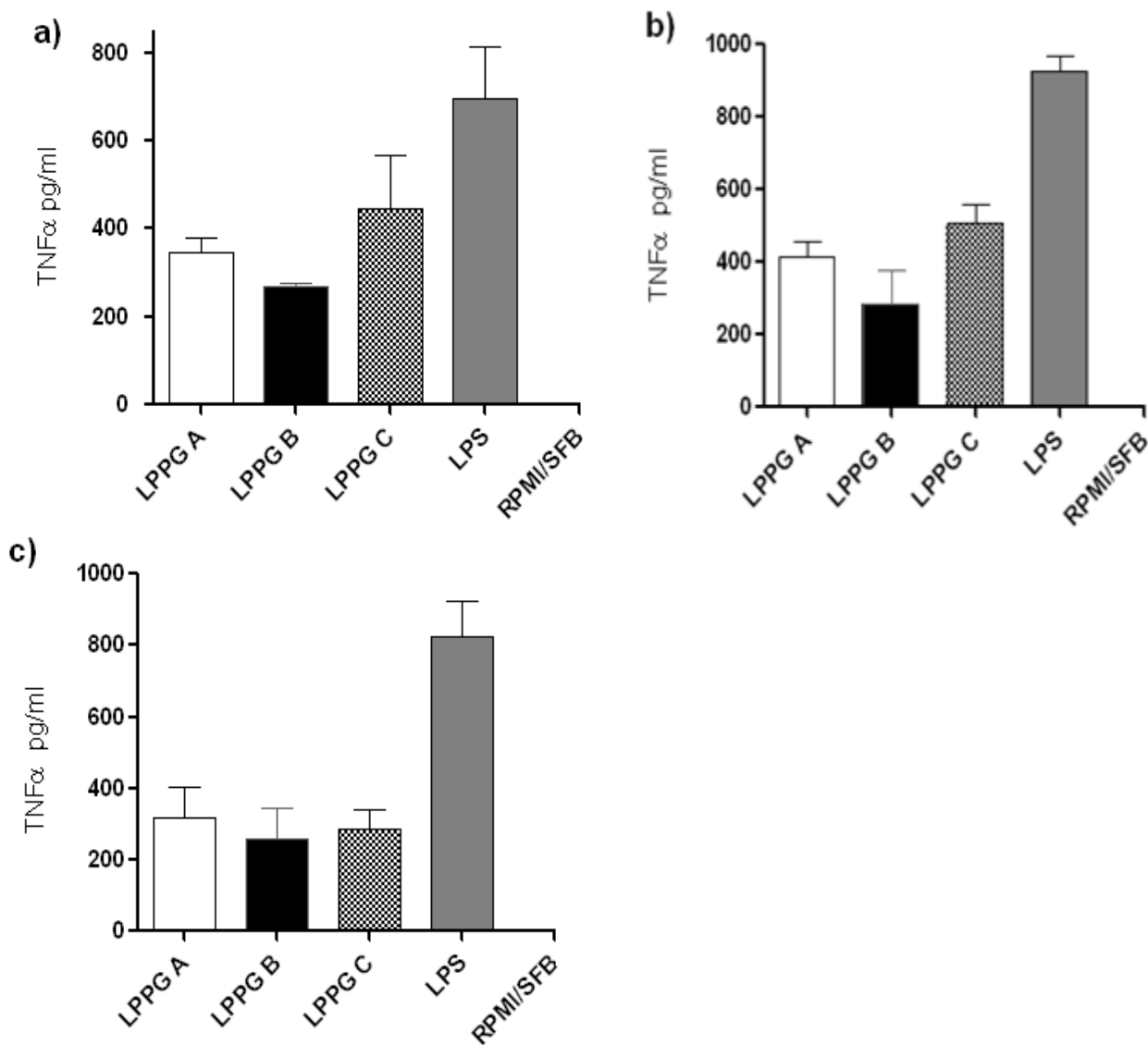
### **10.10.1 Niveles de TNF-α en sobrenadantes de Macrófagos humanos**

Los macrófagos estimulados con las LPPG de C-26 extraídas por el método A y el método B inducen la producción de la citocina proinflamatoria TNF-α, no mostrando diferencia estadística a las 6 horas pero con una tendencia a tener mayor concentración en los sobrenadantes estimulados por LPPG del método A con respecto a la del método B (figura 13a).

A las 12 horas se incrementó la concentración de TNF-α en los sobrenadantes de macrófagos estimulados, el incremento de la concentración de la citocina inducidas por las LPPG del método A y B no fue en la misma medida ya que se aprecia que aumentó la diferencia estadística en los niveles de TNF-α, aunque no llego a ser significativa. El control positivo de LPPG, el cual se extrajo por el método tradicional y de la cepa de alta virulencia HM1:IMSS indujo la secreción de concentraciones mayores de la citocina (figura 13b), este incremento fue en mayor medida el de los estímulos obtenidos por el método A y el método B. A las 24 horas los niveles de TNF-α en los sobrenadantes disminuyeron y la diferencia entre las concentraciones de la citocina inducida por los diferentes estímulos de LPPG se acorto (figura 13c), el control positivo de LPS en todos los tiempos mostro que induce a la secreción de una mayor concentración de TNF-α en los sobrenadantes, con una diferencia estadística significativa contundente y muy amplia comparándole con los niveles de citocina producidos en los estímulos de las LPPG.

Las LPPG extraídas por el método A y el método B inducen la producción de TNF-α en sobrenadantes de macrófagos *in vitro*, distinguiéndose la mayor diferencia estadística a

las 12 horas posteriores a la estimulación entre las LPPG de los métodos a comparar. No se detectaron niveles TNF- $\alpha$  en las células que no fueron estimuladas con los antígenos.



**Figura 13.** Niveles de TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de macrófagos humanos.

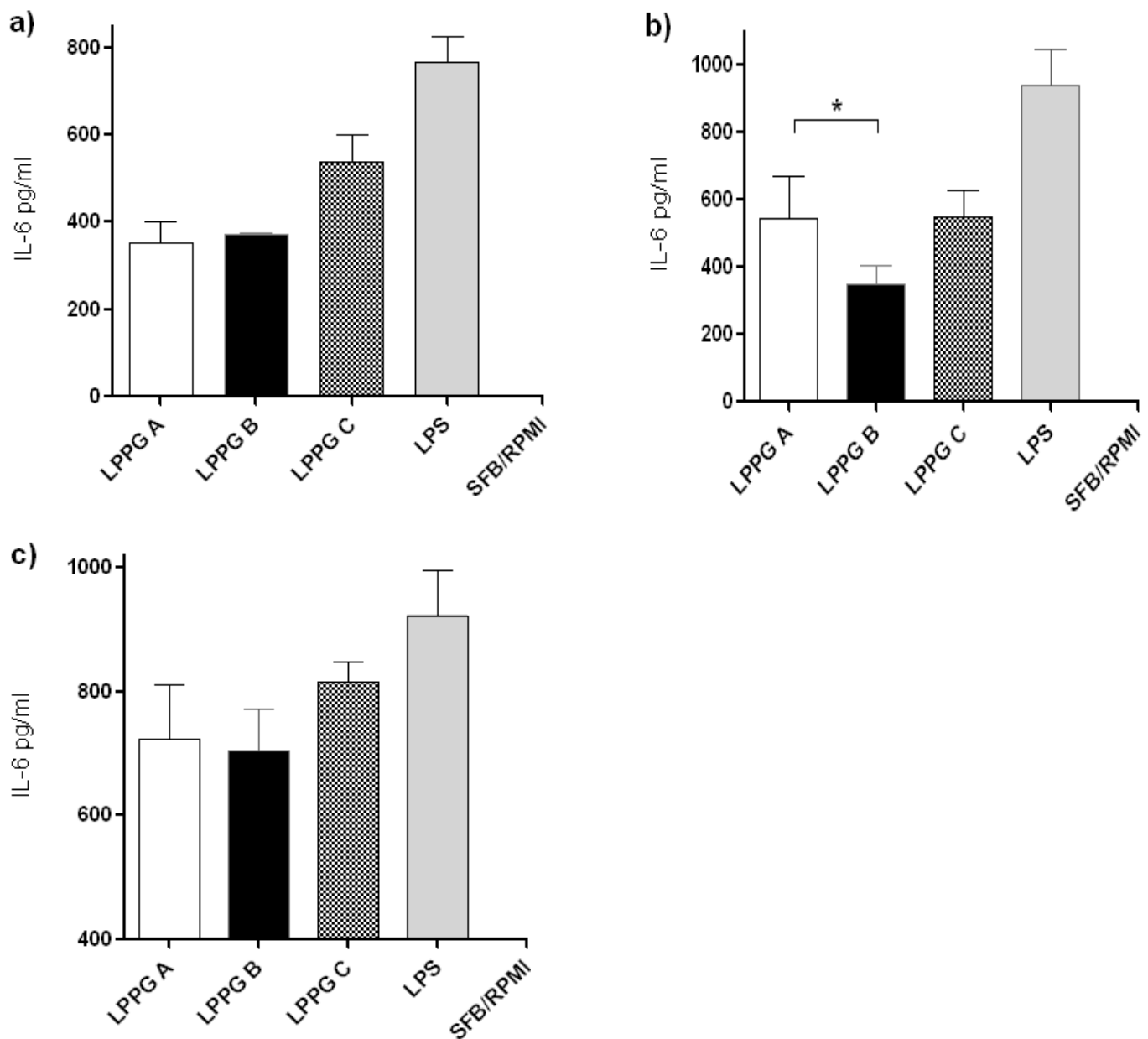
Se estimularon macrófagos humanos con 2.5  $\mu$ g/ml en peso de carbohidratos de las LPPG (LPPG A: cepa C-26 obtenida por el método A; LPPG B: cepa C-26 por el método B); 2.5  $\mu$ g/ml en peso de carbohidratos LPPG C (control positivo de LPPG cepa HM1:IMSS); 1  $\mu$ g/ml LPS (LPS de *E. coli* control positivo). A las 6 (a), 12 (b) y 24 (c) horas, se recolectaron sobrenadantes y se cuantificaron las concentraciones de TNF $\alpha$ . Fue aplicada la prueba de One-way ANOVA con la prueba de Dunnet considerando la diferencia significativa con \*:  $P \leq 0.05$  (significante).

### 10.10.2 Niveles de IL-6 en sobrenadantes de Macrófagos humanos

Los estímulos de LPPG inducen la producción de IL-6, no obstante, no se observó diferencia estadística entre las LPPG C-26 extraídas por el método A y el método B a las 6 horas, pero el control positivo de LPPG HM1:IMSS si induce la secreción de la citocina en niveles mayores (Figura 14a).

A las 12 horas de estimulación se aprecia que incrementan la concentración de la citocina en todas las LPPG, pero éste aumento es mucho mayor en la LPPG extraída por el método A, mostrando diferencia significativa con respecto al estímulo inducido por a LPPG del método B (la cual indujo niveles menores en todos los ensayos comparándola con la LPPG de método A), la diferencia estadística entre los estímulos de LPPG C-26 contra LPPG HM1:IMSS disminuyeron (Figura 14b). A las 24 horas los niveles de IL-6 de las LPPG aumentaron en todos los estímulos y no se apreció diferencia estadística significativa entre ellas, la diferencia estadística entre LPPG C-26 contra el control positivo de LPPG HM1::IMSS disminuyo en los últimos tiempos, se aprecio que a diferencia de las concentraciones de TNF- $\alpha$  las concentraciones de IL-6 continuaron aumentando desde las 6 horas hasta las 24 horas.

La LPPG procedente de cepas de alta virulencia induce a macrófagos humanos a la producción de una mayor cantidad de la citocina IL-6 *in vitro* con respecto a amibas de menor virulencia. El LPS induce a la producción de niveles muchos mayores de la citocina IL-6, pero los niveles de la citocina comenzaron a disminuir a las 24 horas, en comparación de los niveles que indujeron las LPPG los cuales fueron en aumento hasta estos tiempos (Figura 14c).



**Figura 14.** Niveles de IL-6 en sobrenadantes de macrófagos humanos.

Se estimularon macrófagos humanos con 2.5  $\mu\text{g/ml}$  en peso de carbohidratos de las LPPG (LPPG A: cepa C-26 obtenida por el método A; LPPG B: cepa C-26 por el método B); 2.5  $\mu\text{g/ml}$  en peso de carbohidratos LPPG C (control positivo de LPPG cepa HM1:IMSS); 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS (LPS de *E. coli* control positivo). A las 6 (a), 12 (b) y 24 (c) horas, se recolectaron sobrenadantes y se cuantificaron las concentraciones de IL-6. Fue aplicada la prueba de One-way ANOVA con la prueba de Dunnet considerando la diferencia significativa con \*:  $P \leq 0.05$  (significante).



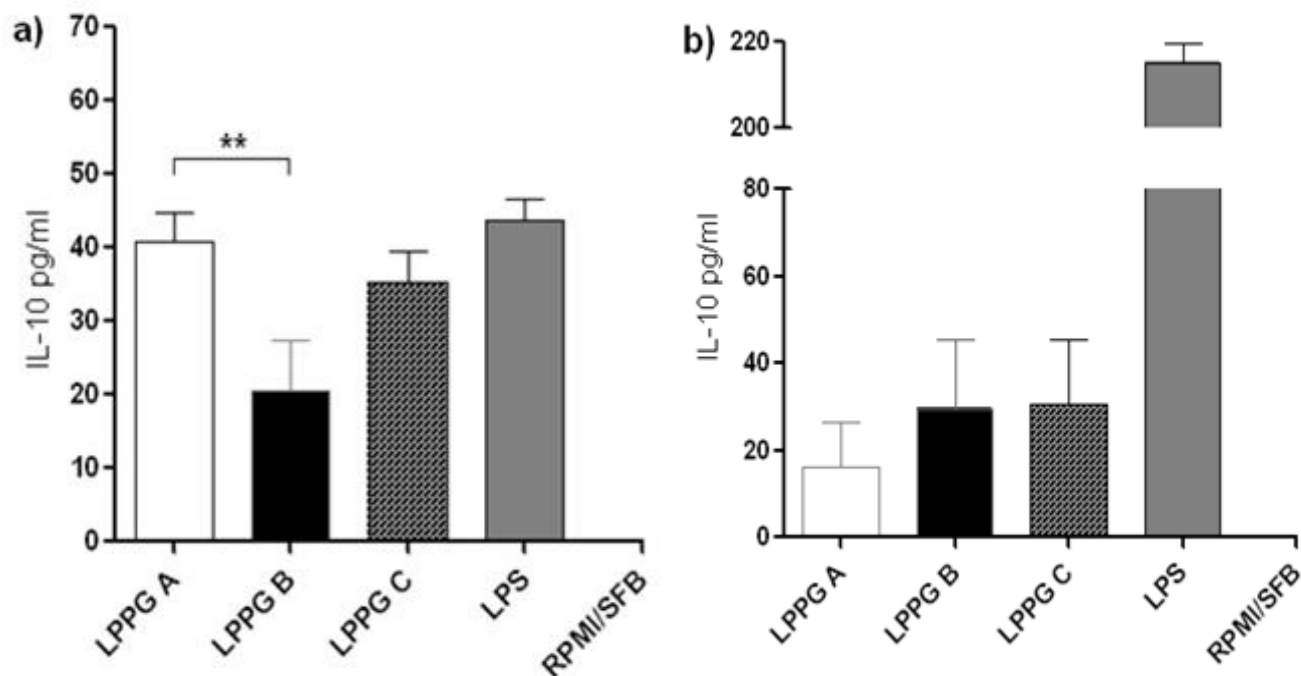
### 10.10.3 Niveles de IL-10 en sobrenadantes de Macrófagos humanos

Las LPPG de C-26 y HM1:IMSS inducen a los macrófagos humanos a la producción de niveles bajos de la citocina antiinflamatoria IL-10, los estímulos de las LPPG tanto de la cepa virulenta como de la de menor virulencia a las 6 horas no produjeron niveles detectables o distintos a los basales de la citocina, también no se detectaron niveles significantes del LPS a las 6 horas (datos no mostrados).

Se observa en la figura 15a diferencia estadística significativa entre las concentraciones de IL-10 producidas por los estímulos de LPPG C-26 obtenida por el método A con respecto al método B, en donde los estímulos de LPPG obtenida por el método B son los que indujeron la producción de menores cantidades de IL-10.

El control positivo de producción de IL-10, el cual se realizó estimulando con la endotoxina LPS, no induce a la secreción de niveles detectables de la citocina a las 6 horas, pero en cambio, a las 12 horas si se apreciaron concentraciones detectables de IL-10, las cuales fueron cercanas a las de las LPPG C-26 por el método A y las del control positivo de LPPG HM1:IMSS (la cantidad del estímulo de endotoxina LPS fue solo de 1µg/ml).

A las 24 horas de estimulación, los niveles tanto de las LPPG procedentes de la cepa de alta virulencia y baja virulencia no presentaron diferencia estadística entre ellos, en las concentraciones de la citocina no se observa un incremento significativo como el que se aprecia en los niveles de IL-10 inducidos por la endotoxina, el cual se incrementa considerablemente a las 24 horas, mostrando un comportamiento totalmente distinto en la producción de la citocina por los macrófagos inducidos con las LPPG (figura 15b), se aprecia claramente que la estimulación de las LPPG es distinta a la de la endotoxina LPS de *E. coli*.



**Figura 15.** Niveles de IL-10 inducida por las LPPG en macrófagos humanos.

Se estimularon macrófagos humanos con 2.5  $\mu\text{g/ml}$  en peso de carbohidratos de las LPPG (LPPG A: cepa C-26 obtenida por el método A; LPPG B: cepa C-26 por el método B); 2.5  $\mu\text{g/ml}$  en peso de carbohidratos LPPG C (control positivo de LPPG cepa HM1:IMSS); 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS (LPS de *E. coli* control positivo). A las 12 (a), 24 (b) horas se cuantificaron las concentraciones de IL-10 en sobrenadantes. Fue aplicada la prueba de One-way ANOVA con la prueba de Dunnet considerando la diferencia significativa con \*:  $P \leq 0.05$  (significante), \*\*:  $P \leq 0.01$  (altamente significativa).

## 11. Discusión

Son de gran importancia y un gran reto para los estudios de la inmunología, la respuesta inmunitaria, tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, inducida por antígenos de extractos microbianos o productos sintéticos que tienen efectos potenciales de adyuvantes o como vacunas que pueden contrarrestar el efecto de los organismos invasores, como por ejemplo el LPS y GPI derivados de microorganismos, entre otros, (Campos MA, 2001).

En este trabajo se compararon dos métodos de extracción del antígeno de membrana del protozoo *Entamoeba histolytica* llamada lipopéptidofosfoglicana, estos métodos son denominados como: método fenol-agua (método A) y el método fenol-agua modificado (método B). Estos métodos que se utilizaron para la extracción de la molécula son el método original, descrito por Isibasi y colaboradores (Isibasi *et al*, 1982), el cual es una adaptación del método empleado para la extracción de LPS de bacterias Gram negativas, y el segundo, es una modificación del método descrito por Isibasi (González-Roldan, 2008).

La utilización de la LPPG de la cepa HM1:IMSS de alta virulencia como control positivo en las estimulaciones de macrófagos, se debió de que esta cepa es capaz de producir absceso hepático amebiano en hígado de hámster y es la cepa de referencia internacional, por lo que se realizó la caracterización de LPPG de HM1:IMSS.

Al comparar las cantidades de LPPG extraídas, se obtuvo considerablemente una mayor cantidad de producto con el método original (método A). Ambas LPPG extraídas por los diferentes métodos presentaron menor contenido de proteínas con respecto a azúcares reductores, lo cual fue similar a lo reportado por otros autores (Maldonado-Bernal, 2005, Alcántara M, 2010; González-Roldan, 2008).

Ya que se partió con la misma cantidad de biomasa de la cepa de baja virulencia denominada C-26, se observa que los lotes obtenidos del método A y del método B no contienen las mismas proporciones de azúcares y proteína cuantificados, este dato está

ligado al tratamiento para la eliminación de lípidos, el cual consiste en ultracentrifugar la mezcla del botón seco de trofozoítos con las fases cloroformo/metanol/agua en donde se obtiene un botón del cual se extraerá la LPPG en el método B, ya que las LPPG son moléculas de un gran tamaño las cuales sufren de diversas modificaciones estructurales dependiendo de la etapa de vida del protozooario, así como de su virulencia, es posible que existan diferentes arreglos estructurales en una cepa de *E. histolytica*, debido a esto, los diferentes métodos de extracción pueden favorecer en distinta proporción la extracción de algunas de estos arreglos de las LPPG y esto se ve reflejado en el contenido de carbohidratos. Probablemente en el proceso de eliminación de lípidos, las moléculas de LPPG de mayor peso molecular sean las primeras en sedimentarse durante y en menor proporción lo hagan las de bajo peso molecular, de esta forma quedando cantidades importantes de LPPG “atrapadas” junto con otras moléculas de las amibas en la fase compuesta por metanol/agua, además de que también es posible que pierdan su porción lipídica, por lo que en este tratamiento se pierde una considerable cantidad de LPPG tanto de alto y menor peso molecular (en mayor cantidad las de bajo peso) ya que estas moléculas son hidrofílicas, en el perfil electroforético revelado en un inmuno blot empleando el reconocimiento por IgG, se apreció que por el método B existe una mayor reconocimiento a altos pesos moleculares (mayor 200 KDa) a comparación del método A en el que se muestra mayor intensidad a bajo peso molecular (menor a 15 KDa)(figura 10).

El perfil electroforético revelado por tinción de plata mostro que es semejante en barrido entre las LPPG del método A y B, y parecidos con el barrido de la LPPG del control positivo de la cepa HM1:IMSS, además, se puso en evidencia de la presencia de la molécula polisacáridica diferente al corrimiento de LPS de *E. coli* (figura 10) lo cual es semejante con lo descrito por otros autores (Lotter *et al* 2009., Maldonado *et al* 2000). La contaminación y probable respuesta celular con endotoxina en la molécula de estudio se descartó por los resultados del ensayo de *Limulus*, en los cuales las cantidades de endotoxina fueron mínimos y menores a la UE a las concentraciones de LPPG estudiadas. Se sabe que las LPPG son altamente relacionadas al grado de virulencia de la cepa de *Entamoeba histolytica*, por lo que debido a ello se presentan las diferencias del control positivo contra las LPPG C-26 en el inmunoblot, entre más virulenta sea la cepa, mayor

será el reconocimiento observado de las IgG hacia la LPPG, lo anterior es probable que se deba por la existencia de una mayor cantidad de sitios de reconocimiento (epítomos), ya que en todas las diluciones con las que se evaluó el reconocimiento de la LPPG mediante sueros de conejo que fueron inmunizados contra esta molécula, se observó diferencia estadística contundente entre las LPPG de cepa de baja virulencia y la de mayor virulencia, con datos en los que las absorbencias de la LPPG de HM1:IMSS siempre fueron mayores. El reconocimiento de LPPG C-26 obtenida por los diferentes métodos de extracción, mostraron diferencia estadística significativa en algunas diluciones empleando la prueba de One-way Anova con la prueba de Dunnet (Figura 12).

En la evaluación de la actividad biológica de las LPPG C-26 extraídas por los métodos A y el método B, se aprecia que por ambos métodos se puede obtener una molécula que es capaz de llevar a cabo la activación de macrófagos humanos *in vitro* y que esta activación induce a la producción de citocinas pro inflamatorias como lo son IL-6 y TNF- $\alpha$ , también la LPPG HM1:IMSS de alta virulencia mostró inducir a macrófagos a la producción de cantidades mayores de las citocinas proinflamatorias a comparación de las LPPG provenientes de trofozoítos con menor virulencia mostrados en este trabajo. Aunque mostraron activar e inducir a macrófagos las LPPG C-26 extraídos por los métodos A y B, a las 12 horas posteriores a la estimulación de las células se aprecia que aumenta la diferencia estadística, siendo una mayor concentración de las citocinas estimuladas con las LPPG extraídas con el método A (Figura 13, 14, 15). La activación y producción de las citocinas fue mucho mayor en los estímulos con la endotoxina LPS, en el que con menor cantidad de estímulo (1  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron suficientes para mostrar niveles muchos mayores de las citocinas y a diferencia de las LPPG, el LPS induce la producción de concentraciones importantes de IL-10 a las 24 horas, las LPPG no inducen a la secreción de altas concentraciones de esta citocina antiinflamatoria, y a las 6 horas no obtuvieron niveles detectables (Figura 15).

## 12. Conclusiones

Se puede obtener LPPG de *E. histolytica* tanto por el método A y el método B.

El rendimiento del método A es más eficiente para la obtención de carbohidratos y proteínas.

La LPPG de *E. histolytica* obtenida por el método A y por el método B presentan un perfil electroforético en donde el barrido polidisperso, revelado por tinción de plata mostró diferencias entre el rango de los pesos de 25 KDa hasta 10 KDa.

La LPPG de *E. histolytica* obtenida por el método A induce más eficientemente la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 en macrófagos humanos en comparación con la LPPG obtenida por el método B.

### **13. Perspectivas**

Ya que el método fenol-agua mostro el mayor rendimiento y fue el primer método que demostró la extracción de LPPG, además de que este antígeno es reconocida por células del sistema inmune como los son los macrófagos y no se observaron contaminantes en el inmuno blot, se recomienda utilizar este método para la extracción de LPPG en los siguientes estudios, y para llevar a cabo análisis estructurales de la molécula emplear el método modificado.

Sería interesante probar LPPG provenientes de cepas de amiba que posean alta virulencia, para emplearlas como posibles vacunas o adyuvante en modelos animales.

## 14. BIBIOGRAFIA

**Ackrers JP**, Mirelman D. **2006**. "Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis". *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 367-373.

**Acosta G**, Torres-Sanchez E, Meraz E, Isibasi-Araujo A, Kumate-Rodriguez J. **1986**. "[Detection of class IgA antibodies directed against a lipopeptidophosphoglycan of *E. histolytica* in samples of human colostrum]." *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. 17 Suppl 1:291-295.

**Akira S**, **2003**. "Mammalian toll-like receptors". *Curr. Opin. Immunol.* 15:5-11.

**Akira S**, Takeda K. **2004**. "Toll-like receptors signalling". *Nat. Rev. Immunol.* 4:499-511.

**Alcántara Hernández, M.** **2010**. "Evaluación de la respuesta inmune innata a la lipopéptidofosfoglicana de cepas de *Entamoeba histolytica* con diferentes grados de virulencia". Inmunología. Maestría en ciencias en inmunología. ENCB IPN. México.

**Bhattacharya A**, Ghildyal R, Bhattacharya S, Diamond LS. **1990**. "Characterization of a monoclonal antibody that selectively recognizes a subset of *Entamoeba histolytica* isolates". *Infect. Immunol.* 58:3458-3461.

**Bhattacharya A**, Prasad R, Sacks D. **1992**. "Identification and partial characterization of a lipophosphoglycan from a pathogenic strain of *Entamoeba histolytica*". *Parasitol.* 56:161-168.

**Brump E.** **1925**. "Estudio resumido de *Entamoeba dispar* no relacionada a amiba, un quiste cuatrinucleado, parásito del hombre". *Bull Acad. Med.* 94:943-952.

**Burnette WN.** **1981**. "Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Anal. Biochem.* 112:195-203.

**Calame KL**, Lin KI, Tunyaplin C. **2003**. "Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev. Immunol.* 167:416-423.



**Campos MA**, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassoa LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. **2001**. "Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinocitol anchors from a protozoan parasite". *J. Immunol.* 167: 416-423.

**Campos-Rodriguez R**, Díaz-Guerra O, Barranco-Tovar C, Isibasi-Araujo A, Kumate-Rodríguez J. **1986**. "Papel de la IgA en la eliminación de antígenos amibianos". *Arch. Inv. Méd. (Méx)*. 17:353-358.

**Campos R**, Jarillo A. **2005**. "The pathogenicity of *Entamoeba histolytica* is related to the capacity of evading innate immunity". *Parasite Immunol.* 27:1-8.

**Colligan J**, Kruisbeer A, Margulies D, Shevach E, Strober W.C. **2001**. "Current protocols in immunology". Ed. Wiley. National Institute of Health. Vol. 1. pp. 891-893.

**Comalada Vila Mónica**. 2002. Decisiones de los macrófagos: proliferar, activarse o morir. Departamento de fisiología. Doctor en Biología. Universidad de Barcelona.

**Cooper JF**, Levin J, Wagner HN Jr. **1971**. "Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of endotoxina". *J. Lab Clin. Med.* 78:138-148.

**Correa D**, Mandujano A, Medina Y. **2000**. "Manual de técnicas modernas en inmunología, teoría y práctica". Editorial El manual moderno. México. pp. 15-35.

**Descoteaux A**, Matlashewski G, Turco SL. **1992**. "Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan". *J. Immunol.* 149:3008-3015.

**Diamond LS**, Harlow DR, Cunnick CC. **1978**. "A new medium for the axénico cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431-432.

**Dubois M**. **1956**. "Colorimetric method of determination of sugars and related substances". *Analytical Chemistry*. 350.

**Fagarasan S**, Honjo T. **2000**. "T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*. 290:89-92.

**Ferguson MA. 1999.** “The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness”. *Biochim Biophys Acta*. 1455:327-340.

**Field MC, Menon AK, Cross GA. 1991.** “A glycosylphosphatidylinositol protein anchor from procyclic stage *Trypanosoma brucei*. Lipid structure and biosynthesis”. *ENMO J*. 10:2731-2739.

**Frederick JR, Petri WA. 2005.** “Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation”. *Glycobiology*. 15:35R-39R.

**García Pérez MH. 2000.** “Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia”. *Univ. Diag*. 1:31-41.

**Gómez JC, Cortés JA, Cuervo SI, Consuelo LM. 2007.** Amebiasis intestinal. *Infectio* 11(1): 36-45.

**Gómez NA, Previato JO, Zingales B, Mendonp L, DosReis GA. 1996.** “Down-Regulation of T Lymphocyte Activation *in vitro* and *in vivo* Induced by Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*”. *J. Immunol*. 156:628-635.

**González N. 2008.** “Análisis estructural de la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* y su papel en la activación de la respuesta inmune: reconocimiento por receptores TLR y presentación antigénica por CD1d”. México. ENCB IPN. pp. 63-79.

**González A, Wrigth SG. 1998.** “Disparate amoebae”. *Lancet*. 351:1672-1673.

**Gordon S, Taylor P. 2005.** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 5: 953-964.

**Groos MC, Cuello RA, Martínez RA, Greco CR, Henklein P, Schade R, Vivas AB. 2008.** Evaluación de la especificidad de anticuerpos policlonales aviarios y mamíferos anti-Factor Precoz de Preñez porcino. *Inmunología*. 27(1):1-10.

**Hajja AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. 2002.** “Human Toll-like receptor 4 recognizes host specific LPS modifications”. *Nat. Immunol*.3:354-359.

**Isibasi A**, Santa CM, Ramirez A, Kumate J. **1982a**. “[Immunochemistry of a lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HK-9 cultivated in axénico media, using the phenol-water method]”. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 13 Suppl 3:51-55.

**Isibasi A**, Santa Cruz M, Soto Montano X, Ramirez A, Kumate J. **1982b**. Localization of a lipopeptidophosphoglycan extracted by phenol-water from trophozoites of the HK-9 strain of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Méx)* 13 Suppl 3, 57-62.

**Isibasi A**, Santa CM, Cottieb M, Kumate J. **1986**. “[Purification of the polysaccharide portion of the lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of *Entamoeba histolytica*]”. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 17 Suppl 1:73-79.

**Isibasi A**, Blanco F, Arreguín C, Martínez G, Pelayo R, Orozco E, Kumate J. **1990**. “[Immunochemical differences in the surface polysaccharides obtained from *Entamoeba histolytica* strain HM1:IMSS and its virulent (C-A) and non-virulent (L-6) clones]”. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 21 Suppl 1:175-181.

**Kawai T**, Akira S. **2009**. “TLR signaling”. *Cell Death and Differentiation Nature Publishing Group*. **13**, 816-825.

**Leppie M**, Bruhn H, Hecht O, Grotzinger. **2005**. “Ancient weapons: the tree-dimensional structure of ameboporo A”. *Trends Parasitol*. 21:5-7.

**Li E**, Yang WG, Zhang T, Stanley SL Jr. **1995**. “Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis”. *Infect. Immun*. 63: 4151-4153.

**Lotter H**, Gonzalez-Roldan N, Lindner B, Winau F, Isibasi A, Moreno-Lafont M, Ulmer A, Holst O, Tannich E, Jacobs T. **2009**. “Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess”. *PLoS Pathog* 5:5.

**Ludvink J**, Shipstone AC. **1970**. “The ultrastructure of *Entamoeba histolytica*”. *Bull Health Organ*. 43:301-308.

**Machado NA**, Téllez GA, Castaño JC. **2006**. “Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas”. *Infection*. 10(3):186-197.

**Maldonado C**, Trejo W, Ramírez A, Carrera M, Sáncgez J, López C, Isibasi A. **2000**. “Lipophosphopeptidoglycan of *Entamoeba histolytica* induces an anti-inflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes”. *Arch. Med. Res.* 31:S71-S73.

**Maldonado-Bernal C**, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Rios N, Espinosa M, Becker I, Estrada I, Salazar RM, López C, Wagner H, Sánchez J. Isibasi A. **2005**. “The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4”. *Parasite Immunol.* 27:127-137.

**Marinets A**, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley SL, Duchene M. **1997**. “Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*”. *J. Exp. Med.* 186:1557-1565.

**Martínez A**. **1982**. “The biology of *Entamoeba histolytica*”. John Wiley y Sons. Chichester. England. pp. 161.

**McConville MJ**, Ferguson MA. **1993**. “The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes”. *J. Biochem.* 294: 305-324.

**Maldonado-Bernal C**, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Rios N, Espinosa M, Becker I, Estrada I, Salazar RM, López C, Wagner H, Sánchez J. Isibasi A. **2005**. “The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4”. *Parasite Immunol.* 27:127-137.

**Mbuh J**, Ntonifor H, Ojong J. **2010**. “The incidence, intensity and host morbidity of human parasitic protozoan infections in gastrointestinal disorder outpatients in Buea Sub Division”, Cameroon. *J Infect Dev Ctries* **4**, pp. 38-43.

**Messeter L**, Brodin T, Chester MA, Low B, Lundbland A. **1984**. "Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities; some superior to human polyclonal ABO reagents". *Vox Sang.* 46(4):185-194.

**Medzhitov R**, Janeway C Jr. **2000a**. "Innate immunity". *N. Engl. J. Med.* 343:338-344.

**Medzhitov R**, Janeway C Jr. **2000b**. "The Toll receptor family and microbial recognition". *Trends Microbiol.* 8:452-456.

**Miler SI**, Ernst RK, Bader MW. **2005**. "LPS, TLR4 and infectious disease diversity". *Nat. Rev. Microbiol.* 3:36-46.

**Moody S**, Becker S, Nuchamowitz Y, Mirelman D. **1997**. "Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids". *Parasitology.* 114:95-104.

**Moody S**, Patterson HJ, Mirelman D, McConville MJ. **2000**. "The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans". *J. Mol. Biol.* 297:409-420.

**Naik RS**, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockernhouse CF, Davidson EA, Gowda DC. **2000**. "Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis". *J. Exp. Med.* 192:1563-1576.

**Orlandi PA**, Turco SJ. **1987**. "Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan". *J. Biol. Chem.* 262:10384-10391.

**Orozco E**, Suárez MA, Sánchez T. **1985**. "Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS". *J. Parasitology.* 15(6):655-660.

**Ouattara M.** Silué K, N'Guéssan A, Yapi A, Barbara M, Raso G, Utzinger J, N'Goran E. **2008.** "Prevalence and polyparasitism of intestinal protozoa and spatial distribution of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* and *Giardia intestinalis* from pupils in the rural zone of Man in Côte d'Ivoire". *Sante* **18**, 215-222.

**Pérez Tamayo R.** **2006.** "Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas". Editado por Flisser A, Pérez-Tamayo R. Capítulo 36: Amibiasis. Editores de textos mexicanos. México. pp. 9-17.

**Petri WA Jr.** **2002.** "Pathogenesis of amebiasis". *Curr. Opinl. Microbiol.* 5:443-447.

**Pier GB,** Lyczak JB, Wetzler LM. **2004.** *Immunology, Infection, and Immunity.* ASM Press.

**Prasad R,** Tola M, Bhattecharya S, Sharma MP, Bhattecharya A. **1992.** "Recognition of *Entamoeba histolytica* lipophosphoglycan by a strain-specific monoclonal antibody and human immune sera". *Mol. Biochem. Parasitol.* 56:279-287.

**Ramos F,** Valdez E, Moran P, González E, Padilla G, Gómez A, Ramiro M, Melendro EI, Muñoz O, Clark CG, Ximenez C. **2000.** "Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population". *Arch. Med. Res.* 31:S34-S35.

**Ramos F,** Moran P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, DE León MC, Melendro EI, Valdez A, Ximenez C. **2005.** "High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73:87-91.

**Ramwani J,** Mishra RK. **1986.** "Purification of bovine striatal dopamine D-2 receptor by affinity chromatography". *J. Biol. Chem.* 261:8894-8898.

**Ravetch J,** Bolland S. **2001.** "IgG Fc receptors". *Annu. Rev. Immunol.* **19:** pp. 275–90.

**Richard C.** **2005.** "Secreted and cell-surface adhesive proteins in *Entamoeba histolytica*". *Expert in Molecular medicine.* 7: (13)1-19.

**Roberts CW,** Walker W, Alexander J. **2001.** "Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites". *Clin. Microbiol. Rev.* 14:476-488.

**Rothstein TL. 2002.** “Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one”. *J. Immunol.* 168:4257-4261.

**Rus H, Cudrici C, Niculescu F. 2005.** “The role of the complement system in innate immunity”. *Immunol Res* **33** (2): pp. 103–12.

**Sampalo A, López L. 1992.** “Anticuerpos monoclonales y grupos de diferenciación antigénicos: métodos de estudio y aplicaciones al diagnóstico clínico”. *Med. Clin. Rev.* 99:30-36.

**Sánchez G, Mújica V. 2009.** “Panorama epidemiológico de la amebiasis intestinal en México. Sistema Único de Información”. 26, pp. 1-4.

**Sargeant PG, Williams JE, Bhojnani R, Kumate J, Jimenez E. 1982.** “A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in México”. *Arch. Rev. Res. Med. (Méx)*. 13 Suppl 3:89-94.

**Schulte W, Scholze H. 1989.** “Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix”. *J. Protozool.* 36:538-543.

**Secretaria de Salud. 2001.** “Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad 2000. Secretaria de Salud, México D.F., pp. 15-32.

**Stanley SL Jr, Huizenga H, Li E. 1992.** “Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*”. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50:127-138.

**Stanley SL Jr. 2003.** “Amoebiasis”. *Lancet.* 361:1025-1034.

**Trevelyan WE, J. S. Harrinson. 1952.** “Studies on yeast metabolism y fractionation and microdetermination of cell carbohydrates”. *Biochem J.* 50:298-303.

**Tumang JR, Frances R, Yeo SG, Rothstein TL. 2005.** “Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors”. *J. Immunol.* 174:3173-3177.

**Underhill DM, Ozinsky A. 2002.** "Toll-like receptors: key mediators of microbe detection". *Curr. Opin. Immunol.* 14:103-110.

**Van Hal SJ, Fotedar R, Marriott D, Ellis JT, Harkness JL. 2007.** "Amoebiasis: current status in Australia". *Med. J. Aust.* 186:412-416.

**Vigilancia Epidemiológica semana 12. 2009.** "Casos por entidad federative de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo hasta la semana epidemiológica 12 del 2009.

**Vivanco H, Alpuche C, Wong I, Rocha LM, Rios N, Estrada I, Villasis MA, López C, Isibasi A. 2007.** "Lipopopeptidephosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late andosomes". *Parasite Immunol.* 29:467-474.

**Walker JM. 1994.** "Methods in molecular biology, basic protein and peptide protocols". Humana press. Totowa. NJ. pp. 461-466.

**Wesphal O, Jann K. 1965.** "Bacterial lipopolisaccarides: extraction with phenol-water and futher applications af the procedure". *Academic Press Inc.* New York. 5.

**Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, Ramírez-Saldívar I, Arriaga-Pizano L, Ferat-Osorio E, López-Macías C, Isibasi A. 2010.** The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 254521.

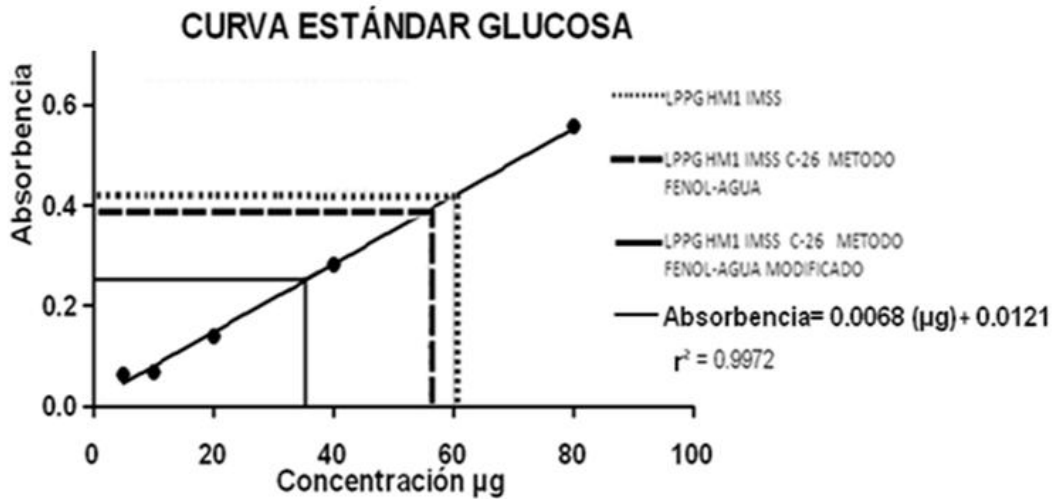
**World Health Organization. 1997.** "WHO/Pan American Healt Organization/ UNESCO report of a consulation of experts on Amoebiasis". *WklyEpidemiol rec WHO.* 72:97-99.

**Ximenez C. 2006.** "Epidemiology of amebiasis in México: a molecular approach". *Arch. Med. Res.* 37:263-265.

**Yau YC, Crandall I, Kain KC. 2001.** "Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserverd stool samples". *J. Clin. Microbiol.* 39:716-719.

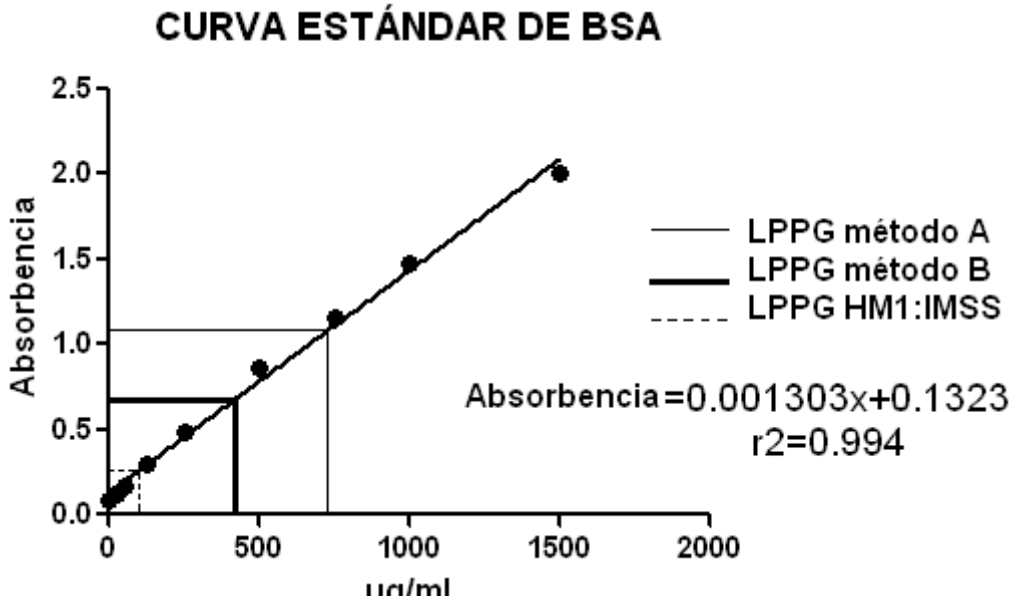


## 15. Apéndice

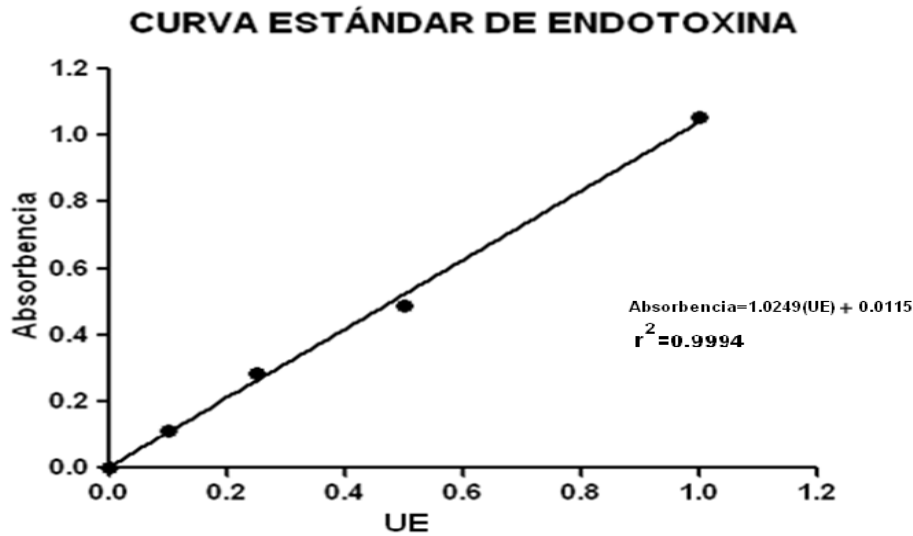


### Apéndice 1. Curva estándar de glucosa (método de antrona).

Curva de glucosa para la cuantificación de carbohidratos en las LPPG obtenidos de C-26 por los métodos de extracción fenol-agua (método A) y fenol-agua modificado (método B), cuantificación de carbohidratos en la LPPG de la cepa HM1:IMSS.

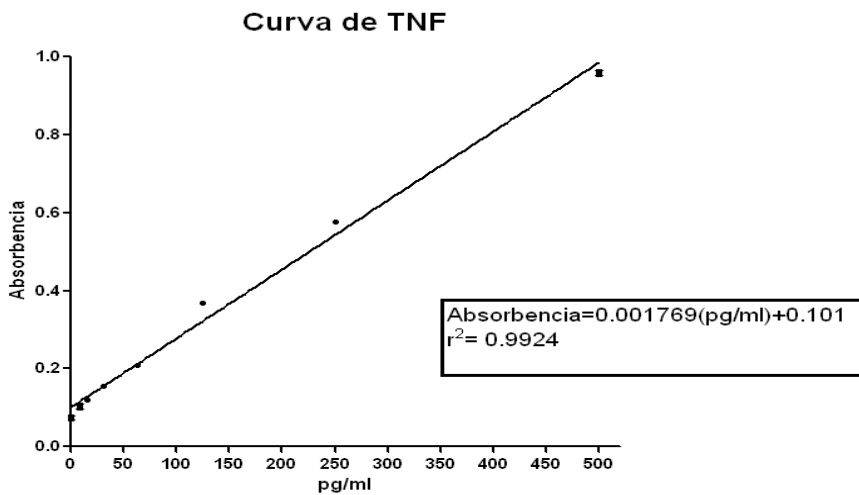


Apéndice 2. Curva estándar de albúmina sérica bovina (método de ácido bicinconínico). Se emplea la curva para la cuantificación de proteína en las LPPG extraída de C-26 por los métodos A y fenol-agua B. Cuantificación de proteína de la LPPG de la Cepa HM1:IMSS.



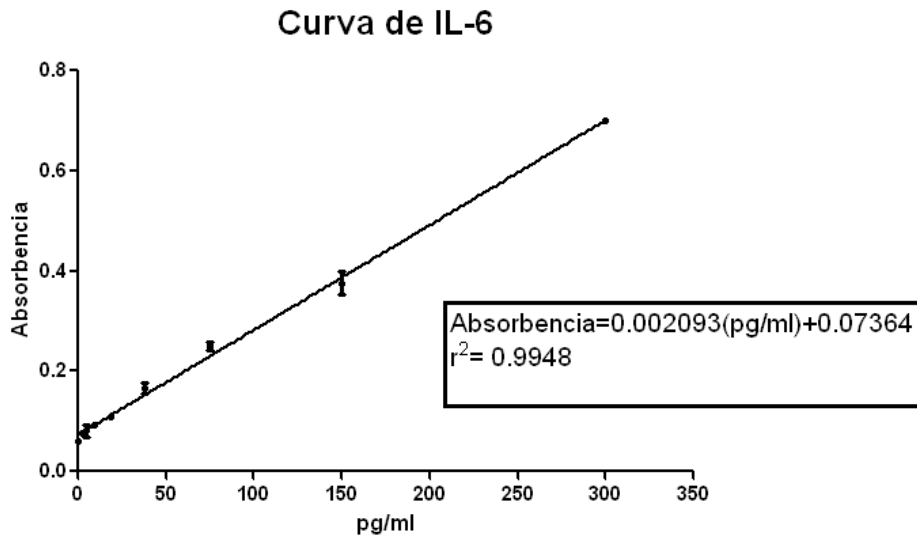
**Apêndice 3.** Curva estándar de LAL.

Curva para la cuantificación de endotoxina en las LPPG extraídas de las cepas de amibas en unidades de endotoxina (UE) en donde 1 unidad corresponde a 0.1 ng de endotoxina, para la realización de la curva se partió elaborando diluciones 1:2 de 1 UE.



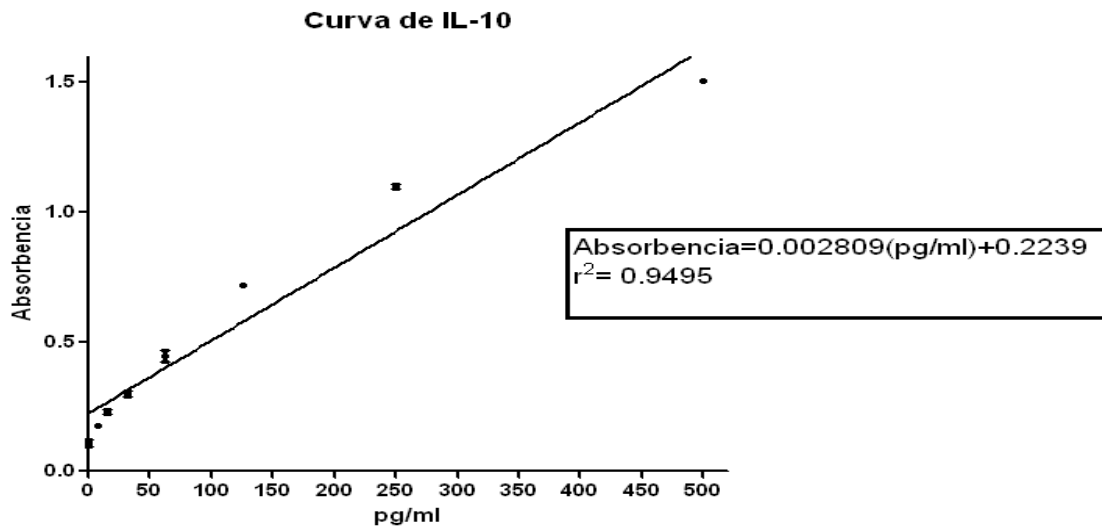
**Apêndice 4.** Curva estándar de TNF.

La curva de TNF fue elaborada utilizando la técnica de ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, empleando el kit Elisa OptEIA™ (Pharmingen, CA, USA), las concentraciones de TNF son de 500 pg/ml hasta 7.81 pg/ml.



**Apéndice 5.** Curva estándar de IL-6.

La curva de IL-6 fue elaborada utilizando la técnica de ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, empleando el kit Elisa OptEIA™ (Pharmingen, CA, USA), las concentraciones de IL-6 son de 300 pg/ml hasta 2.3 pg/ml.



**Apéndice 6.** Curva estándar de IL-10.

La curva de IL-10 fue elaborada utilizando la técnica de ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, empleando el kit Elisa OptEIA™ (Pharmingen, CA, USA), las concentraciones de TNF son de 500 pg/ml hasta 7.81 pg/ml.