



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

TÍTULO DEL TESIS.

Glicoconjugados de superficie presentes en trofozoítos de Entamoeba histolytica recién recuperados del absceso hepático en animales experimentales.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Fernández González Celia Dolores.



MÉXICO, D.F.2014.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS.

VOCAL: Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE.

SECRETARIO: Profesor: MARIA DEL ROSARIO LOPEZ VANCELL.

1er. SUPLENTE: Profesor: GLORIA GUTIERREZ VENEGAS.

2° SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO,
UNIDAD DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE MEDICINA.**

ASESOR DEL TEMA: MARÍA DEL ROSARIO LÓPEZ VANCELL _____

SUSTENTANTE: Fernández González Celia Dolores _____

**GLICOCONJUGADOS DE SUPERFICIE PRESENTES EN
TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* RECIÉN
RECUPERADOS DEL ABSCESO HEPATICO EN ANIMALES
EXPERIMENTALES.**

Tabla de contenido

GLOSARIO.....	vi
PRÓLOGO.....	viii
ASPECTOS GENERALES DE LA AMIBIASIS.....	10
EL AGENTE ETIOLÓGICO: <i>Entamoeba histolytica</i>	13
GLICOCONJUGADOS.....	21
Glicoproteínas.....	22
Glicosilación en <i>Entamoeba histolytica</i>	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
Hipótesis:.....	26
Objetivo:.....	26
METODOLOGÍA*.....	27
Cultivo amibiano.....	27
Obtención de los trofozoitos.....	28
Variedad virulenta (V):.....	28
Variedad no virulenta (NV):.....	28
Variedad recién recuperada de hígado de hámster (H):.....	29
Preparación de la muestra amibiana.....	29
Cuantificación de proteínas:.....	30
Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida: (SDS-PAGE).....	32
Determinación del peso molecular.....	34
Western-blot.....	35
Reacción por la cual se lleva a cabo el revelado.....	37
Purificación de glicoproteína por medio de cromatografía de afinidad.....	38
Western Blot o inmunotransferencia.....	39
Corte de la banda para secuenciar.....	41
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
Comparación de las terminales glicosídicas de los glicoconjugados presentes en <i>Entamoeba histolytica</i> cepa HM1: IMSS, variedades virulenta (V), no virulenta (NV) y recién extraída de hígado (H).....	42
Identificación del mismo patrón de glicosilación para tres muestras diferentes de trofozoitos recién recuperados de hígado.....	45
Determinación del peso molecular del glicoconjugado presente en la variedad H.....	46
Secuenciación del glicoconjugado.....	47

Purificación por cromatografía de afinidad.....	49
Identificación de la fracción 13 transferida con <i>Galanthus nivalis</i>	50
Identificación del glicoconjugado de interés.....	51
CONCLUSIONES.....	52
ANEXO 1: ESTADISTICAS DE AMIBIASIS EN MÉXICO COMPRENDIENDO EL PERIODO DE ENERO A OCTUBRE DEL 2013.....	54
ANEXO 2: EQUIPOS Y MATERIALES.....	55
OBTENCIÓN DE TROFOZOITOS:.....	55
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	56
ELECTROFORESIS.....	57
WESTERN-BLOT.....	59
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	61
ANEXO 3: CALCULOS.....	62
Calculo de volúmenes de inhibidores y PBS-A para el botón amibiano.....	62
ANEXO 4. SECUENCIACIÓN DEL GLICOCONJUGADO.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69

GLOSARIO.

AHA: Absceso hepático amibiano.

V: Virulenta.

NV: No virulenta.

H: Recién recuperada de hígado.

Ab: Anticuerpo.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

PBS-A: Buffer de fosfatos amibiano.

TYI-S-33: Trypticaseina, levadura, hierro y suero, ensayo 33.

SDS- PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio.

TBS: Buffer tris salino.

TBS-T20: Buffer tris salino con tween 20.

BS: Buffer de solubilización.

BL: Buffer de lavado.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

IA: Iodacetamida.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

APS: Persulfato de amonio.

TEMED: N, N, N, N Tetrametiletildiamina.

TRIS: Tris-hidroximetil- aminometano.

BSA: Albumina sérica bovina.

AP: Fosfatasa alcalina.

GNA: Aglutinina *Galanthus nivalis*.

SNA: Aglutinina *Sambucus nigra*.

MAA: Aglutinina *Maackia amurensis*.

PNA: Aglutinina *Peanut*

HRP: Peroxidasa de rabano.

M: Molar.

mM: Milimolar

μl: Microlitro.

μg: Microgramo.

kDa. Kilo Dalton.

nm: Nanómetro.

PM: Peso molecular

Rpm: Revoluciones por minuto.

ABS: Absorbancia.

MPM: Marcadores de Peso molecular.

CL: Control de lectina.

Df: Distancia que migra el frente del gel.

Dp: Distancia que migra una determinada proteína.

PRÓLOGO.

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis en el humano y es responsable de 100,000 muertes anualmente a nivel mundial. La infección con este parásito puede tener una evolución muy variable, manifestándose como una colonización asintomática o diarrea, colitis, absceso hepático o enfermedad metastásica amibiana. Este amplio espectro de la infección se debe en parte a factores del hospedero, desde su estado general de salud, hasta factores genéticos; factores medioambientales y factores atribuibles al parásito.

Aunque el tratamiento de la amibiasis invasiva con metronidazol es bastante efectivo, éste tiene la desventaja de los efectos colaterales, así como la necesidad del uso de medicamentos adicionales para curar la infección en un 40-60% de los pacientes. Si bien la resistencia al metronidazol no ha sido referida, se han obtenido *in vitro* clonas resistentes al mismo; de ahí la preocupación de que emerja la resistencia a dicho medicamento. Por otra parte, la morbilidad y mortalidad causadas por la amibiasis indican que la terapia disponible es insuficiente.

Se han logrado grandes avances sobre esta enfermedad gracias a la posibilidad de cultivar amibas axénicamente. La cepa HM1: IMSS proveniente de cultivos axénicos puede en potencia producir abscesos hepáticos (AHA) en animales experimentales, sin embargo, la virulencia del parásito decae cuando se le cultiva axénicamente por períodos prolongados y para que ésta no se pierda, las amibas deben inyectarse en animales experimentales para producir AHA y ser recuperadas de las lesiones producidas y reiniciar el cultivo.

La investigación en el campo se ha enfocado al estudio del parásito. Así, en los últimos años se ha buscado correlacionar algún factor de virulencia o molécula con la capacidad de la amiba para producir daño, se han llevado a cabo estudios comparativos de proteómica y genómica entre las dos especies que colonizan al humano: *E. histolytica* y *E. dispar*; así como entre cepas con diferente grado de virulencia de *E. histolytica*: Rahmman y HM1: IMSS. Sin embargo, no hay estudios

enfocados al análisis de moléculas expresadas en las amibas que "recién se han recuperado de abscesos de hígado".

En esta tesis se llevó a cabo un análisis de la naturaleza de los azúcares terminales en los glicoconjugados de superficie presentes en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* recién recuperados del absceso hepático en hámsters.

ASPECTOS GENERALES DE LA AMIBIASIS.

Los humanos hemos venido conviviendo con parásitos desde tiempos remotos, tanto macroscópicos como microscópicos (1), siendo los segundos de nuestra elección y fijándonos en el protozoo *Entamoeba histolytica*, parásito que en el humano causa la amibiasis.

La amibiasis se considera una enfermedad relevante a nivel mundial, la OMS reporto años atrás que anualmente en el mundo hay 500 millones de personas infectadas, el 1% de éstas desarrollan algún tipo de amibiasis fulminante (ya sea a nivel intestinal o extraintestinal) causando la muerte de aproximadamente 100,000 individuos (42), estas cifras no han variado mucho en la actualidad, por lo cual es considerada la tercera parasitosis con mayor mortalidad después de la malaria y la esquistosomiasis (17). En México, desde enero hasta octubre del año 2013 se reportaron 296,501 casos de amibiasis intestinal en toda la República (54).

La adquisición de esta patología es vía oral, por la ingesta de quistes maduros (tetranucleados) que pueden estar presentes en los alimentos, agua potable, o fómites (objetos que puedan llevarse a la boca); estos se contaminan al ser manejados con las manos sucias de personas portadoras de la parasitosis, que no cuentan con la costumbre de lavarse las manos después de ir al baño, o por la acción de insectos, como moscas y cucarachas que entran en contacto con heces y luego con los alimentos u objetos (5). Por ello la población de los países en vías de desarrollo es la que presenta mayor número de casos, ya que sus hábitos de higiene tanto personales como el modo de manejar los alimentos no son los adecuados, sin embargo la amibiasis también se llega a presentar en países desarrollados.

*Anexo 1, se muestran las estadísticas de amibiasis intestinal en México reportada en abril del 2013.

La amibiasis fue definida por vez primera por Schaudinn, en 1903 como: la infección producida en el humano por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* (20), enfermedad que se caracteriza por generar lesiones a nivel intestinal (amibiasis intestinal) y que genera síntomas inespecíficos como diarrea frecuente no muy intensa de 5 a 8 evacuaciones en veinticuatro horas en donde las heces son poco líquidas y pueden tener gran cantidad de moco y en ocasiones sangre, esto se alterna con periodos de estreñimiento y puede existir pujo y tenesmo (sensación de defecar), no presenta fiebre en general (31), y en algunos casos puede invadir y causar lesiones en otros órganos como hígado, cerebro, pulmones y piel (amibiasis extraintestinal)(50).

El absceso hepático amibiano (AHA) es la complicación más frecuente. En 1890 Osler y colaboradores realizaron la primera descripción del AHA y la colitis, en un médico que falleció; de este estudio Councilman y Lafleur publicaron una monografía sobre la patología de la amibiasis en la que introdujeron los términos de disentería amibiana y absceso hepático amibiano (28).

El AHA es la lesión producida en hígado por la invasión de *E. histolytica* desde un foco intestinal cuyas lesiones son tan profundas que involucran los vasos sanguíneos, haciendo más factible que los trofozoitos lleguen al hígado por circulación porta, una vez estando ahí estos se establecen para comenzar a lesionar y destruir el tejido hepático, el cual se necrosa y forma un material pastoso y de color chocolate, que aumenta de tamaño con el tiempo (31). Los síntomas más característicos son: fiebre, dolor abdominal localizado en el cuadrante superior derecho, ya que dicho lóbulo recibe la mayor parte de la circulación portal, por lo cual es el más afectado, y puede referirse o no a un cuadro diarreico previo. La frecuencia de AHA es de 1 mujer por 4 o 6 hombres, entre una edad de 20 a 50 años (52).

Los únicos animales susceptibles de sufrir amibiasis extraintestinal son el hombre, ciertos primates en cautiverio (como el mono araña), el hámster y el jerbo (24), se usan hámsters como modelos experimentales porque son más susceptibles que los jerbos a adquirir AHA. En ratas por el sistema del complemento se eliminan los trofozoitos tempranamente (aproximadamente a las 6 horas) y en los ratones por la falta de infiltrado inflamatorio (quimiotaxis de polimorfonucleares) los elimina a las 24 horas (7, 45).

El diagnóstico de la amibiasis intestinal se basa en estudios coproparasitológicos, en seriación de tres (2), donde se puede visualizar a través del microscopio de luz la fase móvil (trofozoito) de este patógeno, en infecciones no muy severas se observa la fase inmóvil (quiste). Mientras que para la amibiasis extraintestinal el diagnóstico se basa en estudios imagenológicos como radiografías, tomografías, ecografías y resonancia magnética (17).

Los medicamentos disponibles para el tratamiento antiamebiano se dividen en dos categorías; los que ejercen su acción de forma tisular (derivados del 5-nitroimidazol, el más empleado es el metronidazol), empleándose en casos de amibiasis sintomática y extraintestinal, y los que actúan en la luz del colon (dicloroacetamidas como el teclozán) que son empleados en casos asintomáticos y como complemento de los anteriores. Ambos actúan contra los trofozoitos de tal forma que se previene la formación de quistes, evitando la reinfección de los pacientes (5, 29).

EL AGENTE ETIOLÓGICO: *Entamoeba histolytica*.

Después de ser nombrada muchas veces por científicos dedicados a su estudio como Lösch: *Amoeba coli*, Councilman y Lafleur: *Amoeba dysenteria*, Brumpt: *Entamoeba dispar*, Schaudinn decidió llamarla: *Entamoeba histolytica*, por ser productora de lisis tisular (28), para posteriormente darle la taxonomía mostrada en la tabla 1 (29).

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Superclase	Sarcodina
Clase	Rhizopodea
Familia	Entamoebidae
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>Histolytica</i>

Tabla 1: clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica*

Este parásito cuenta con dos fases en su ciclo de vida:

El quiste, descrito en 1893 por Quincke y Roos (28), que es la forma de resistencia del parásito, en ésta permanece inmóvil, es redondo u oval con un tamaño entre 10 y 25µm se desarrolla cuando los factores del intestino delgado ya no son adecuados para su fase móvil. En su forma quística, puede contener de uno a cuatro núcleos, los que tienen de uno a tres núcleos se consideran la forma prequística y son muy sensibles a los cambios externos por lo cual no sobreviven mucho tiempo después de ser evacuados. Por otra parte si cuenta con cuatro núcleos se le denomina quiste maduro, éste es resistente por semanas a temperaturas menores a 37°C y desecación,

permaneciendo viable hasta por catorce días (51), motivo por el cual es la fase infectante (fig. 1).

La formación de quistes maduros sucede exclusivamente en la luz del colon, nunca en el medio ambiente o en otros tejidos (5).

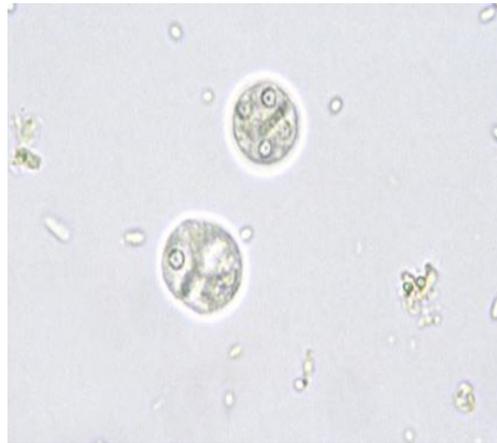


Figura. 1 Micrografía, por microscopio de luz, la muestra fue fijada con formaldehído, donde observamos dos quistes de *E. histolytica*, un quiste con un solo núcleo y uno tetranucleado.

El trofozoíto, es la fase móvil, conformada por una célula pleomórfica, cuyo aspecto y movilidad es sensible al pH, cambios de temperatura, osmolaridad y potencial redox, se multiplica por fisión binaria, con un tamaño aproximado entre 10 y 60 μm ; está constituido por una membrana citoplasmática que se divide en ectoplasma (porción externa) de apariencia hialina, retráctil y casi sin granulaciones y que al prolongarse forma los pseudópodos (permitiendo movilidad al protozoo), y endoplasma (porción interna) que tiene una estructura granular fina que contiene a las vacuolas y vesículas; la membrana está recubierta por una capa delgada de glicoproteínas. El trofozoíto cuenta con un núcleo esférico constituido por un cúmulo de cromatina pequeño y puntiforme, en el centro, éste último se encuentra encerrado en una cápsula llamada cariosoma o endosoma. También presenta cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear, distribuida en forma homogénea (fig.2).

El trofozoíto se nutre por fagocitosis a expensas de los tejidos lisados y hematíes, ayudándose de los pseudópodos (2).

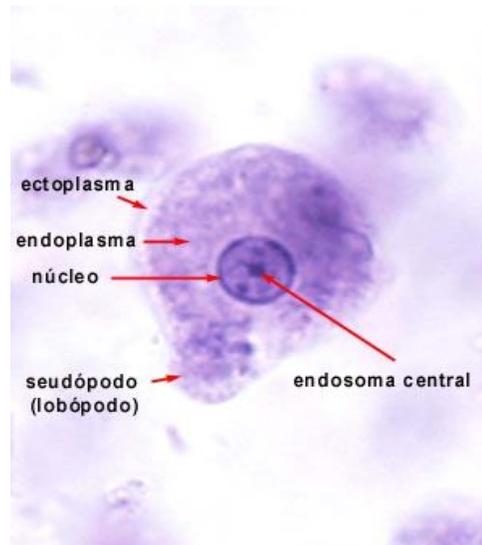


Figura 2. Micrografía en microscopio óptico, donde se muestran la fase móvil de *E. histolytica*: el trofozoíto con tinción de hematoxilina férrica 40x.

En 1919 Dobell describió el ciclo de vida de *E. histolytica* en el humano, mediante cultivos de una cepa amibiana obtenida de un mono, con base en cuatro formas sucesivas: el trofozoíto, el prequiste, el quiste y la amiba metaquística fig. 3 (52).

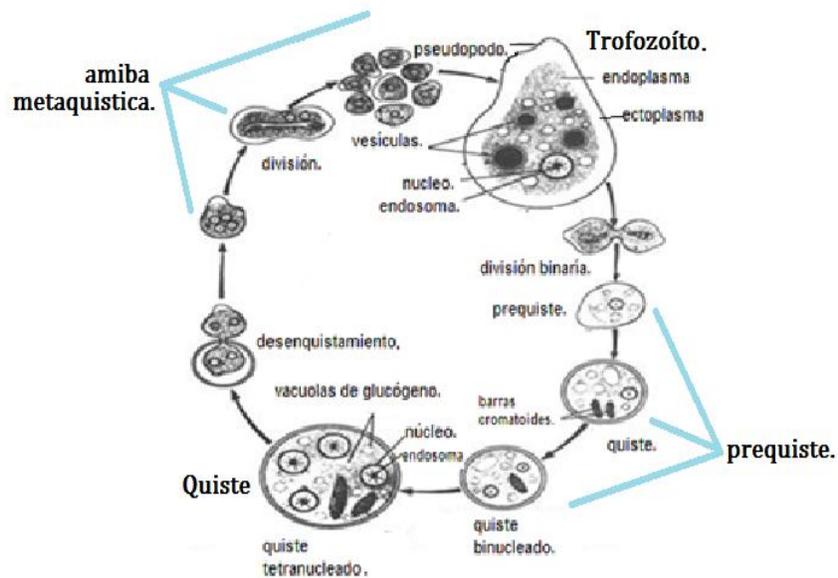


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *E. histolytica* descrito por Dobell.

El ciclo de vida del parásito inicia cuando los quistes maduros son ingeridos por los humanos, estos sufren la acción de los jugos digestivos los cuales debilitan la pared del quiste; en el intestino delgado se rompen y dan origen a amibas metaquística, las cuales conservan el mismo número de núcleos que la forma inmóvil; una vez en la luz del colon cada núcleo da paso a dos trofozoitos con ocho núcleos cada uno de estos se rodean de una porción de citoplasma, para generar ocho trofozoitos; una vez establecidos en la luz del colon y cuando las condiciones del medio no son favorables, estos empiezan a inmovilizarse y formar una cubierta resistente, conformada por quitina, la cual encierra su único núcleo junto con vacuolas de glucógeno como almacén de energía, su metabolismo no cesa y es por eso que puede llegar a madurar (formar cuatro núcleos), estos salen junto con las heces, para volver a iniciar el ciclo (fig.4).

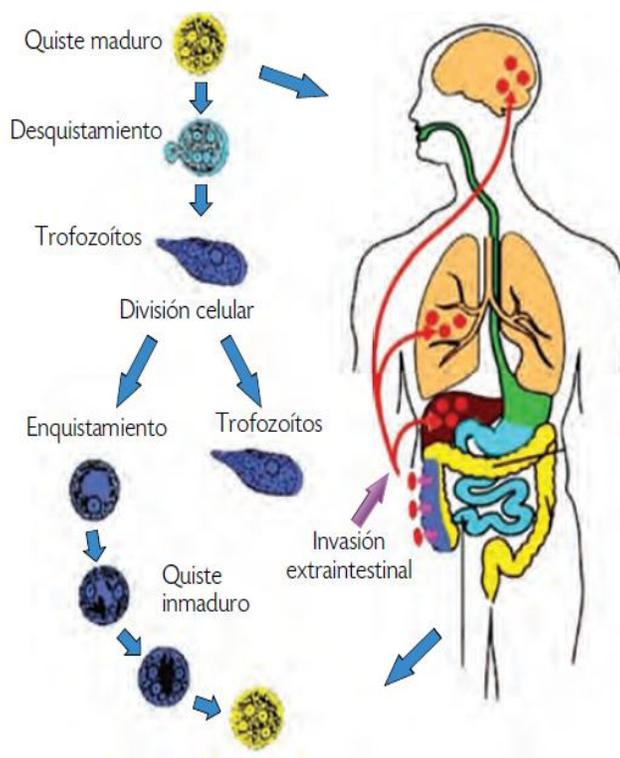


Figura. 4 Esquema del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* en el humano.

A pesar de conocer el agente etiológico de la amibiasis, éste es difícil de identificar si sólo se analiza su morfología, ya que *Entamoeba dispar* tiene un increíble parecido morfológico con *E. histolytica* (fig. 5), aunque genómicamente diferenciable por su rRNA, esto es, son dos especies distintas (6).

En el año de 1925 Brumpt, basado en observaciones clínicas y con ayuda de estudios experimentales en gatos, indicó la existencia de un complejo de especies morfológicamente iguales pero con diferente capacidad de producir infección (*Entamoeba dysenteriae*, hoy conocida como *E. histolytica*) y la otra no generaba sintomatología (*E. dispar*) (28), en ese entonces esta hipótesis fue rechazada, pero retomada en 1993 por Diamond y Clark, que adicionaron resultados bioquímicos, inmunológicos y genéticos, llegando a la misma conclusión, y siendo aceptada por la OMS en 1997 (52), por lo cual al realizarse estudios coproparasitarios se reportan el complejo *E. histolytica/E. dispar*. A la fecha, el diagnóstico diferencial sólo se puede llevar a cabo mediante PCR.

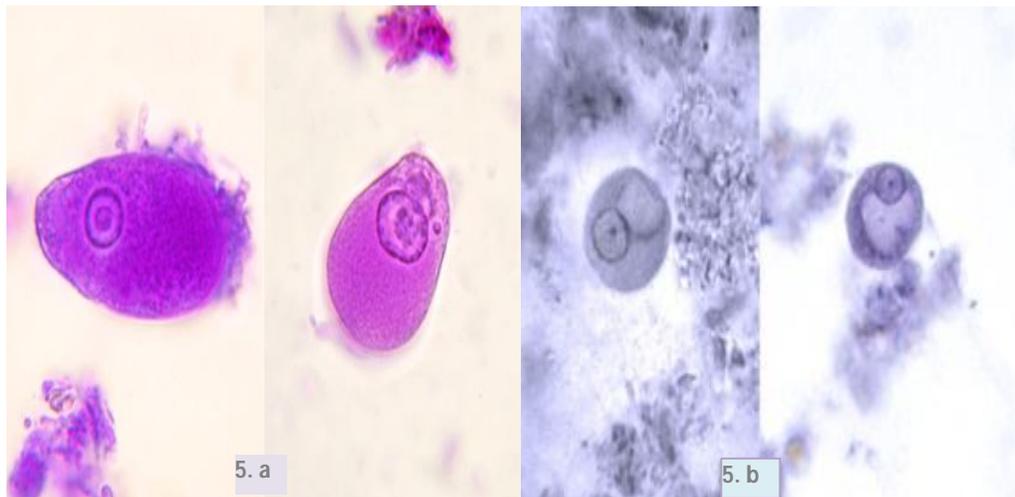


Figura 5. Micrografías de microscopio de luz. Donde se muestra las similitudes morfológicas entre *E. histolytica* y *E. dispar* en ambas fases parasitarias: trofozoitos con tinción de Bailenger (5.a) y quistes teñidos con hematoxilina (5.b).

Pero el complejo *E. histolytica*/ *E. dispar* no es el único capaz de colonizar el intestino grueso, también existen otras amibas capaces de colonizar a pesar de que no causen daño alguno, como: *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba bütschlii*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* y *Entamoeba polecki*, (fig 6)(13). Todas éstas diferenciables de las otras dos ya se por su tamaño, por ejemplo el trofozoito de *E. hartmanni* mide de 5 a 10 µm o por el número de nulceos que presenten como *E. coli* presenta 8 nucleos.

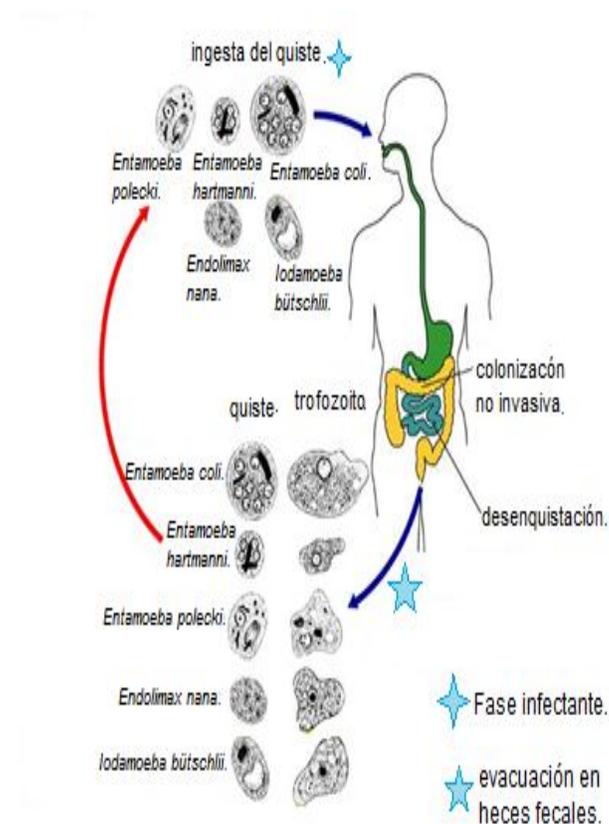


Figura 6. Esquema de ciclo de vida de los diferentes tipos de amibas que pueden colonizar el intestino delgado.

Gracias a la posibilidad de cultivar de manera axénica a las amibas (permitir el estudio *in vivo* e *in vitro* del parásito sin la asociación de ningún tipo de bacteria), introducida por L. Diamond y cols. en 1961 (28), la investigación en el campo de la amibiasis ha logrado grandes avances. Hoy en día, en los laboratorios en donde se estudia la amibiasis se utilizan diferentes cepas o aislados de la especie de *E. histolytica* (52), que manejan diferente grado de virulencia como KU1 y HM1: IMSS, ésta última es muy utilizada en laboratorios de investigación a nivel mundial y es la primera aislada de forma axénica de un paciente hospitalizado en Centro Médico Nacional IMSS en

1967(25). Existen otras cepas que son no virulentas, por ejemplo: *E. histolytica* cepa Rahman, aislada de un paciente asintomático (18). Gracias al cultivo axénico de estas cepas se han logrado realizar estudios que nos permiten entender mejor los mecanismos que lleva a cabo el protozoario para invadir el intestino grueso.

Los trofozoitos han desarrollado un proceso de invasión muy elaborado, basándose en tres pasos básicos: colonización, reducción/disrupción de la mucosa y citólisis, en el cual expresan y secretan algunas proteasas (fig. 7), lo que les permite adherirse al epitelio, degradar la matriz extracelular y producir citólisis de las células epiteliales para penetrar dentro de la mucosa; además, fagocitan activamente bacterias y desechos de las células del huésped que les sirven de alimento (44).

Entre los factores de virulencia descritos para este parásito se encuentran:

1. Moléculas que participan en la adhesión:

La lectina Gal/GalNAc de 260 kDa, mediadora de adherencia al epitelio intestinal, ya que se unen los residuos expuestos terminales de la Gal-GalNAc con las glicoproteínas de la mucosa intestinal (26), estas moléculas son responsable de la citotoxicidad directa que causa el parásito en los hepatocitos, reflejada *in vitro* por los cambios morfológicos (vacuolización) y la presencia de núcleos picnóticos típicos del fenómeno apoptótico, lo que demuestra que tiene una participación mayor en la patogénesis del absceso hepático (18).

La adhesina EhADH112 está involucrada directamente en la ingestión de las células diana por los trofozoitos. Por esto se considera que es una fagosina (proteína involucrada en la fagocitosis) (13).

La lectina de 220 kDa, la cual además de aglutinar eritrocitos humanos se ha demostrado que es clave en la eritrofagocitosis característica de *E. histolytica* (44).

2. Enzimas:

Las proteasas de cisteína se consideran moléculas responsables del daño tisular producido por la ameba (8), éstas pertenecen a la superfamilia de la papaína, y hasta el 2003 se habían encontrado 20 genes en este protozoo que codifican para estas enzimas, de las cuales *in vitro* tres son las responsables del más del 90% de la actividad enzimática: EhCP1, EhCP2 y EhCP5 (21).

3. Los amiboporos:

Que son una familia de proteínas, con 3 isoformas y conformada por péptidos con aproximadamente de 77 residuos de aminoácidos, formadoras de poros, con un peso molecular de 8kDa, capaces de formar canales de iones en membranas lipídicas (16).

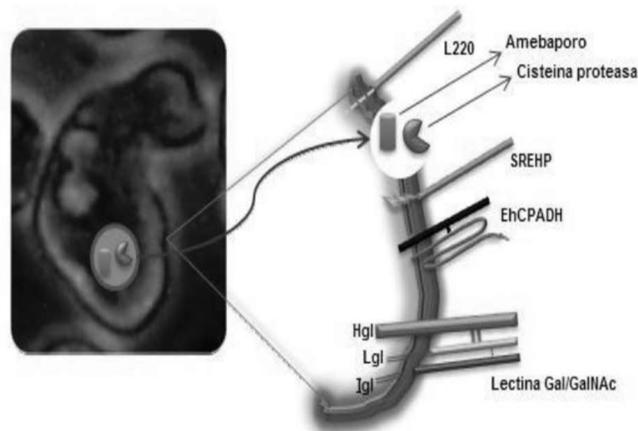


Figura. 7. Esquema de las proteínas expresadas/secretadas por el trofozoitos de *E. histolytica* consideradas factores de virulencia.

Aunque numerosas moléculas han sido propuestas como factores de virulencia, muy poco se ha estudiado respecto a las terminales glicosídicas de los glicoconjugados de este parásito y la relación de estas en la virulencia del mismo. Puesto que en este trabajo se hizo un análisis de los glicoconjugados del trofozoito de *E. histolytica* a continuación se presentan las generalidades de estas macromoléculas.

GLICOCONJUGADOS.

Las células, de todos los organismos, expresan glicoconjugados (47), que les ayudan a desarrollar funciones esenciales para ellos, por ejemplo en bacterias, virus, hongos y protozoos, patógenos, éstos inician una serie de pasos para invadir al hospedero, en el caso de *E. histolytica* el glicoconjugado más estudiado es la lectina Gal/GalNAc, que como se mencionó anteriormente está involucrada en la adhesión a las células blanco.

Los glicoconjugados, son moléculas conformadas por mono, oligo o polisacáridos, referidos como glicanos (42), los más comunes son: galactosa, glucosa, manosa, fucosa, ácido N-acetilneuramínico, N-acetilgalactosamina, xilosa y N-acetilglucosamina, que están unidos covalentemente a una proteína (glicoproteína) o a un lípido (glicolípido).

Su rol biológico se divide en dos categorías:

- Propiedades de estructura y modulación de glicanos
- Reconocimiento específico de los glicanos con otras moléculas
 - a) Comúnmente glicanos unidos a proteínas (GBPs), dividiéndose en
 - (1) GBPs intrínseca: reconoce glicanos del mismo organismo, esto mediante la interacción célula-célula
 - (2) GBPs extrínseca, reconociendo glicanos de diferente organismo, por la interacción relación simbiótica, en su mayoría dada por adhesinas, aglutininas y toxinas provenientes de microorganismos patógenos.

Los glicanos también pueden aprovechar las propiedades intrínsecas de las proteínas con el fin de funcionar en el tráfico, adhesión y señalización de la célula que los expresa, éstos usualmente interaccionan con receptores de proteínas, mejor conocidos como lectinas, y éstas sirven para identificar a los glicanos por su alta afinidad que presentan a los oligosacáridos presentes. Ambos tipos de glicoconjugados se encuentran en la superficie celular de la membrana plasmática.

Glicoproteínas.

Las glicoproteínas expresan diferentes contenidos de carbohidratos, el cual fluctúa desde un 1% hasta el 80% del peso total, en general a las que contienen un 4% se les conoce como mucoproteínas, con la característica de que expresan una gran viscosidad (3) y que pueden cumplir varias funciones mencionadas en la tabla 2. Además las glicoproteínas son secretadas en los fluidos biológicos, como el suero, y previenen que la matriz extracelular se solubilice.

Hormonas	Anticuerpos
Proteínas receptoras	Enzimas
Proteínas de transporte	Proteínas de adhesión celular
Proteínas de identificación celular	Proteínas de estabilidad estructural

Tabla 2. Algunas de las funciones que desempeñan las glicoproteínas.

Existen 2 tipos de enlace para este tipo de moléculas: las que poseen enlaces O- glucosídicos, es decir enlace al grupo –OH presente en la serina, treonina y un azúcar como la N-acetilgalactosamina (GalNAc-Ser [Tr]) y las que poseen enlaces N- glucosídicos, estos involucran una unión al nitrógeno de la amida presente en la asparagina con N-acetilglucosamina (GlcNAc-Asn), (fig.8). Estas uniones se dan por enlace covalente.

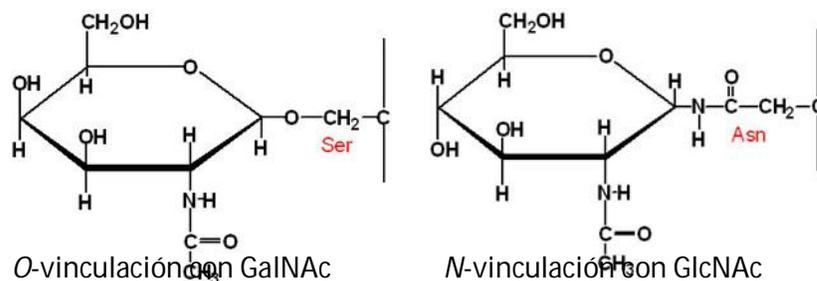


Figura 8. Representación de los enlaces de las glicoproteínas.

La síntesis de los N-glicanos es una vía metabólica compleja, que incluye pasos enzimáticos, llevándose a cabo en tres compartimientos celulares: en el citoplasma, retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Este proceso se puede resumir en tres fases: En el citosol se forma el compuesto nucleótido-azúcar, generalmente, guanosinadifosfato-manosa (GDP-Man), pero también puede ser UDP-glucosa y UDP-N-acetilglucosamina. Este compuesto se une al dolicolfosfato (Dol-P) y de esta manera ingresa al retículo endoplásmico, donde por medio de glucosiltransferasas específicas se agregan secuencialmente distintos glicanos, hasta formar un oligosacárido, esta molécula es tomada por el complejo enzimático oligosacaridiltransferasa, que reconoce la secuencia formada por los aminoácidos Asparagina-X-Serina o Asparagina-X-Treonina, donde X es cualquier aminoácido (excepto prolina) y lo transfiere al N amino de la asparagina. Esta proteína glicosilada es procesada en el RE y en el aparato de Golgi sufre modificaciones mediante la eliminación de residuos de glucosa y manosa, y la adición de otras moléculas, como ácido siálico, N-acetilglucosamina, fucosa o galactosa (42).

La biosíntesis de los O-Glicanos se produce principalmente en el aparato de Golgi sobre la proteína ya sintetizada. No existe una secuencia específica de aminoácidos, el paso inicial de la formación de enlaces O, es con la transferencia de UDP-GalNAc directamente a una serina o treonina, provenientes de una proteína, seguida de la adición de otros azúcares, con la ayuda de glicosidasas y lípidos con función de ligandos.

Glicosilación en *Entamoeba histolytica*.

El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, indica que los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* se caracterizan por una aparente ausencia de los organelos citoplásmicos típicos, como mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y un citoesqueleto microtubular, presentes en otras células eucarióticas. Sin embargo, existen en la literatura varios estudios relativos a la ultraestructura del parásito en los que se describen vesículas y sacos muy similares a la estructura típica de retículo endoplásmico y de aparato de Golgi (9, 22, 46); y se ha reportado que dichas estructuras vesiculares sufren alteraciones tras el contacto con algunos componentes de matriz como la fibronectina (19), o compuestos tóxicos liberados por células del sistema inmunológico como el óxido nítrico (NO) (38).

Por otra parte, se ha demostrado que los trofozoitos de *E. histolytica* llevan a cabo funciones como: modificaciones postraduccionales, entre las que se encuentran N-glicosilación (36), la O-glicosilación (40) y el tráfico de proteínas hacia diferentes compartimentos subcelulares y a la membrana plasmática (4,15,32,37); además, el recambio de componentes de superficie es muy activo en este parásito, lo que requiere una síntesis activa de lípidos de membrana, proceso que en otras células se lleva a cabo en retículo endoplásmico.

Aun cuando no hay un consenso en cuanto a la ultraestructura de los elementos que participan en los procesos relacionados a la formación de glicoconjugados, no cabe duda de que esta actividad es muy importante y se lleva a cabo en estructuras membranosas en el citoplasma del trofozoíto de *Entamoeba histolytica*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En un intento por conocer más a fondo la patogenicidad de *E. histolytica* se han llevado a cabo estudios comparativos a nivel proteómico y genómico entre ésta y otras especies como: *E. dispar* (no patógena para el humano), e incluso entre diferentes cepas como HM1: IMSS (virulenta) y Rahman (no virulenta) con la finalidad de encontrar diferencias entre ellas que justifiquen la diferente patogenicidad. Sin embargo, finalmente se trata del análisis de dos especies o dos cepas distintas.

Entre los grupos de investigación en el campo de la amibiasis es bien conocido el hecho de que el cultivo axénico prolongado de trofozoitos de *E. histolytica* HM1: IMSS hace que éstos pierdan su virulencia (la capacidad de inducir en animales experimentales abscesos hepáticos amibianos). Este inconveniente se resuelve pasando a las amibas por el hígado de animales de manera que, al generar abscesos hepáticos éstas se recuperan de las lesiones y se cultivan axénicamente por un corto tiempo, volviendo a pasarse de manera rutinaria (aproximadamente cada 15 días) por hígado, con lo que se mantiene la virulencia.

Esta aparente desventaja ha permitido que algunos grupos lleven a cabo estudios comparativos entre la variedad virulenta y no virulenta de una misma cepa (MH1: IMSS) de *E. histolytica* (18, 25).

Lo anterior implica que las amibas recuperan o mantienen su virulencia en el hígado del animal; si bien una vez colectadas de los abscesos y establecido su cultivo axénico éstas han recuperado la virulencia, también conforme pasa el tiempo en cultivo dichos trofozoitos amibianos comienzan a perderla. En este trabajo analizamos una muestra de trofozoitos en cultivo axénico lo más próximo a su recuperación del absceso, a los que llamamos "recién recuperados" del absceso hepático en animales experimentales, y comparamos los glicoconjugados expresados en éstos con respecto a los de las variedades virulenta y no virulenta.

Nos preguntamos si hay diferencias en los glicoconjugados de superficie (diferencias que probablemente se tradujeran en diferentes grados de adhesión) entre los trofozoitos recién recuperados de hígado con respecto a los de la variedad virulenta y no virulenta, todos ellos provenientes de la misma cepa.

Para contestar este problema nuestra hipótesis de trabajo fue.

Hipótesis:

EL COMPONENTE GLICOSÍDICO DE LOS GLICOCONJUGADOS PROVENIENTES DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS "RECIÉN RECUPERADOS DE HÍGADO" ES DIFERENTE AL DE LAS VARIEDADES "VIRULENTE" Y "NO VIRULENTE"

Y para probar esta hipótesis nos planteamos el siguiente objetivo

Objetivo:

ANALIZAR EL COMPONENTE GLICOSÍDICO TERMINAL DE LOS GLICOCONJUGADOS PROVENIENTES DE AMIBAS RECIÉN RECUPERADAS DE HÍGADO COMPARARLO CON EL DE LA VARIEDAD VIRULENTE Y NO VIRULENTE.

METODOLOGÍA*:

Cultivo amibiano.

Se define virulencia como la capacidad que tienen entre $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS para generar diversos abscesos hepáticos en 4/4 hámsters (*Mesocricetus auratus*) de sexo indistinto con un peso aproximado de 100 g (7).

Por lo cual los trofozoitos de la variedad virulenta se mantienen como tal, pasándolas por el hígado de hámster y el cultivo se vuelve a comenzar a partir de las lesiones, el proceso se realiza extirpando el hígado del animal, mismo que se fracciona en pequeños pedazos que se colocan en cajas estériles con medio tripticaseina, levadura, hierro y suero ensayo 33 (TYI-S-33) con antibiótico a 37°C, durante los tres días siguientes, con un cambio de medio de cultivo con antibiótico por día, esto para asegurarse que durante el periodo posterior a estos tres días, las amibas se mantengan de forma axénica, y se retire el suplemento de antibióticos; a partir de la axenización el cultivo se expande cada 72 horas. Por lo general se utilizaban trofozoitos provenientes de cultivos de entre siete y quince días desde su recuperación del AHA. En el caso de las amibas virulentas y no virulentas éstas siempre se utilizaron en la fase estacionaria, es decir a las 72 horas de cultivo.

Siguiendo un esquema similar (aunque nunca se pasaron por hígado) las amibas de la variedad no virulenta se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 a 37°C, expandiendo el cultivo cada 72 horas. Cabe destacar que el crecimiento de esta variedad es más lento con respecto a la virulenta.

*Soluciones y materiales ver anexo 2, cálculos ver anexo 3.

Obtención de los trofozoitos.

Variedad virulenta (V):

Estas amibas se mantienen virulentas pasándose por hígado de hámster de manera rutinaria aproximadamente cada 15 días, para obtener los trofozoitos empleados, se realizó el siguiente procedimiento.

Se inocularon 4 hámster, de sexo indistinto y con un peso aproximado entre 100 y 120 gramos, a los cuales se les anestesia con pentobarbital (8.3 mg/ml), por vía intraperitoneal en una dosis de 400 μ l / 150 gramos de peso de hámster. El inóculo se administró por vía porta y oscilo entre 5×10^5 – 1×10^6 de trofozoitos contenidos en 200 μ l de buffer de fosfatos amibiano (PBS-A), después de 7 días de haber sido inoculados, son sacrificados por sobredosis de éter, para extraer los hígados que presentan lesiones y macerarlos para depositarlos en botellas de 25ml con medio de cultivo TYI-S-33 con antibiótico, e incubar a 37 °C, por 4 días, esto para mantener un cultivo de amibas sin asociación de otros microorganismos, que comprendería a nuestro periodo de axenización.

Al séptimo día de estar en cultivo y con 72 horas de crecimiento, se contaban por el método de Neubauer, y se bajaron a 3000 rpm durante 5 minutos por centrifugación, obteniendo un botón de trofozoitos en orden de 10×10^6 células, resuspendidas en PBS-A, que posteriormente serán tratados.

Variedad no virulenta (NV):

Los trofozoitos de la variedad no virulenta, se han mantenido en cultivo axénico en medio TYI-S-33, durante varios años, bajo las condiciones de cambio de medio cada 72 horas, incubando a 37°C.

Para la obtención de nuestra muestra; el cultivo de trofozoitos tenía que contar con 72 horas, y fue tratada igual que la variedad virulenta.

Variedad recién recuperada de hígado de hámster (H):

Como lo indica el nombre, las amibas de este grupo se encontraban lo más cerca posible del día de su recuperación de las lesiones causadas en los hígados de los hámsters.

Tratamos 12 hámsters con las mismas características que los de la variedad virulenta, estos fueron inoculados y las amibas se obtuvieron de igual forma que se describió anteriormente. Para su periodo de axenización se realizaba 3 cambios de medio TYI-S-33 con antibióticos cada 4 horas en el primer día, al segundo se realizaba un cambio de medio a las 12 horas se realizaba el último cambio solo con medio sin antibiótico, al tercer día obteníamos el botón amibiano.

La razón de inocular un mayor número de animales, es porque se realizan varios cambios de medio al día, evitando que los trofozoitos tengan un mayor tiempo en su fase logarítmica y no llegando a la fase estacionaria, 72 horas.

Preparación de la muestra amibiana.

Los botones amibianos obtenidos, de las tres variantes, eran resuspendidos en PBS-A para centrifugar por 3 min a 3000 rpm, esto se realizó por duplicado para después llevar el botón al volumen adecuado para mantener una proporción de 10×10^6 trofozoitos/500 μ l constituido por: inhibidores de proteasas como Iodacetamida 50 mM y EDTA 10 Mm y PBS-A.

Una vez llevadas al volumen y homogenizada la muestra, se provocaba lisis celular por medio de un impacto de temperatura, introduciendo los tubos eppendorf en nitrógeno líquido (-210°C) por 4 minutos y descongelando en baño María (30°C), este procedimiento se realizó por triplicado, almacenándose a -20°C para su posterior análisis.

Cuantificación de proteínas:

La cuantificación de proteínas totales provenientes de los trofozoitos, se llevó a cabo por el método de ácido bicinconínico (Micro BCA™ ProteinAssay, de Pierce No. de cat.2323). Este método se basa en la unión de 2 moléculas de ácido bicinconínico (BCA) con una de ión cuproso (Cu^{1+}), el cual se obtiene de la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) por medio de las proteínas contenidas en el medio alcalino generado por los reactivos (fig. 9).

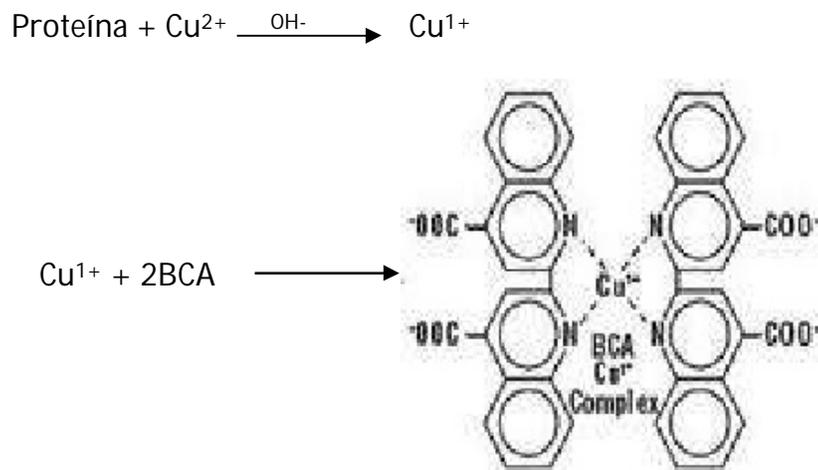


Figura 9. Se esboza la reacción que se lleva a cabo en la cuantificación de proteínas, que se desarrolla en dos etapas, la reducción del ión cúprico y la formación del complejo entre el ácido bicinconínico y el ión cuproso, que da la coloración de este método.

La curva patrón se realizaba con diferentes concentraciones de Albumina Sérica Bovina (BSA), partiendo de 0 μg hasta 20 μg , estas concentraciones se obtenían de un stock de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA (tabla 3), la relación empleada de concentración de BSA y reactivo de trabajo es 1:1 (1 ml), esta misma relación se manejaba con las muestras problemas amibianas.

El reactivo de trabajo se conforma de 50% de solución A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 y $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$), 48% de solución B (ácido bicinónico) y 2% de solución C ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Tubo	Concentración de BSA (μg)	Volumen del stock de BSA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (μl)	Volumen de agua (μl)
1	0	0	1000
2	0.5	2.5	997.5
3	1	5	995
4	2.5	12.5	987.5
5	5	25	975
6	10	50	950
7	20	100	900
8	40	200	800

Tabla 3. Preparación de diluciones a partir del stock de BSA.

Para las muestras amebianas se realizaba una dilución inicial de 1:10, de la cual obteníamos 2 muestras; una de 1:100 μl y otra de 1:10 μl .

Después de tener preparadas las muestras estas se metían a baño María a 60 grados por una hora, se dejaban enfriar para que alcanzaran temperatura ambiente e inmediatamente se leía la absorbancia, en celda de cuarzo con 700 μl de muestra; en el espectrofotómetro ajustado a 562nm.

Una vez realizadas las lecturas, se realizaba una regresión lineal con las absorbancias obtenidas de la curva patrón y se extrapolaban para obtener las concentraciones de nuestras muestras a través de la ecuación de la recta.

Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: (SDS-PAGE).

Este método es muy empleado para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. Ya que se basa en la separación de las moléculas cargadas y explota diferencias en movilidad debido a su peso molecular.

Se forma un gel de poliacrilamida/bis-acrilamida, formando nuestra base inerte que es estable en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica y actúa como un tamiz molecular retardando el movimiento de macromoléculas grandes mientras que las pequeñas se pueden mover libremente, conformado por un gel separador con una concentración de 7.5% con un volumen aproximado de 5 ml que se deja gelificar por unos 30 minutos y el gel concentrador que está al 5% y utilizando 1 ml de esta solución en este se forman los pozos que sirven de receptáculos para las muestras y esperando 20 min a que gelifique, esto se hace entre 2 placas de vidrio con 1 mm de grosor.

La muestra que se inyectó en el gel contiene 100 µg de proteína y dicho volumen no debe ser mayor a 12 µl ya que se debe adicionar el mismo volumen de buffer cocktail y esto evita que las muestras no se traspasen entre pozos. Dicho buffer entre otros compuestos contiene SDS que actúa como nuestro agente desnaturalizante que ayuda a romper interacciones hidrofóbicas y carga a las proteínas de forma negativa para facilitar su movimiento desde el cátodo al ánodo haciendo que las proteínas existentes en la muestra adapten una estructura simple y con carga negativa por lo cual su separación se basará en el tamaño, y azul de bromofenol que nos ayudara a visualizar el avance de moléculas a través de nuestro gel. La mezcla se calienta por 5 minutos en baño María para asegurarnos que la proteína pierda su estructura secundaria.

Se montaban en la cámara para electroforesis, llenando el espacio entre los geles con buffer de corrida al igual que el espacio que se generaba entre las placas y el tanque contenedor, para depositar las muestras se descartaba el primer y último pozo ya que esto nos ayuda a no desproporcionar el corrimiento de la muestra a la hora de transferirla (fig. 10), se dejaba correr a 10 watts que ejerce un campo eléctrico que permitía el arrastre de los aniones hacia el cátodo, deteniendo el tiempo cuando las muestras se observaban en el borde del gel.

MPM: marcadores de peso molecular

H: recién recuperada de hígado.

V: virulenta.

NV: no virulenta.

Cp: control positivo de glicoconjugado

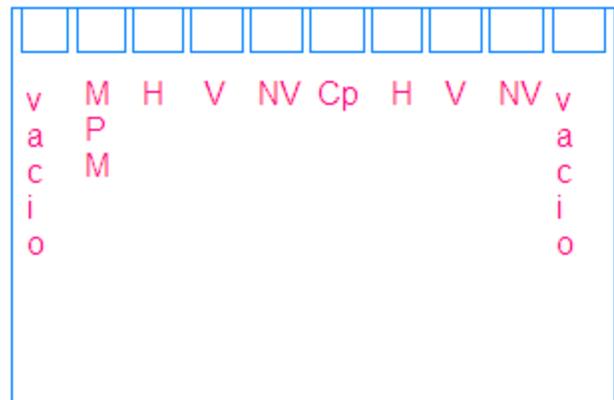


Figura 10. Representación de cómo fueron colocadas las muestras en los geles de poliacrilamida, este patrón se siguió con todas las muestras.

Determinación del peso molecular.

Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido, esto a partir de un gel teñido con Coomassie. Para ello se compara el Rf de la proteína problema con el de las proteínas de referencia cuyo peso molecular se conoce.

El Rf es el parámetro experimental asociado a esta técnica, y se define como:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por cierta proteína de la muestra.}}{\text{Distancia recorrida por el frente de avance.}}$$

El frente de avance del gel se determina por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, como puede ser el colorante azul de bromofenol. Se mide la distancia recorrida por el frente de avance (Df) y de cada proteína (Dp), fig. 11, el RF es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular conocido, estos son graficados en papel semilogarítmico ($x = Rf$, $y = \log PM$) y se obtiene el peso molecular de la proteína de interés interpolando mediante una regresión lineal.

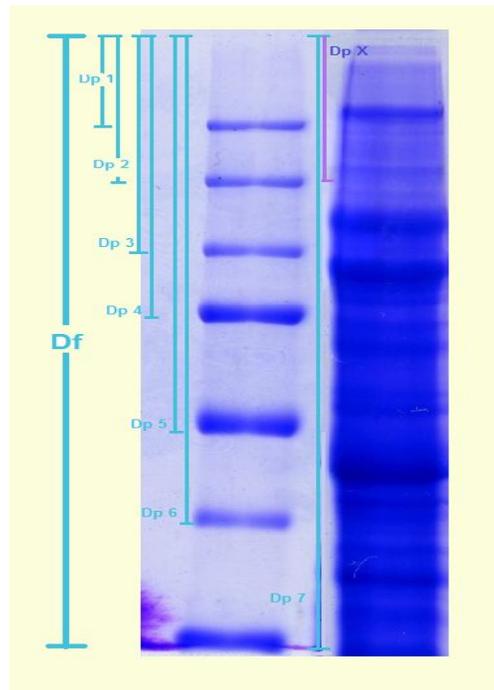


Figura 11. Gel de poliacrilamida, donde se corrió la muestra H que nos ayudó a calcular el peso del glicoconjugado de interés.

Western-blot.

Se empleó la técnica de western-blot para determinar las terminales glicosídicas de los componentes proteicos presentes en los trofozoitos, por medio de la transferencia de las moléculas que queremos y que se encuentran separadas por peso molecular (SDS-PAGE) hacia una membrana adsorbente para que dichas terminales sean identificadas por anticuerpos específicos.

Una vez obtenido el gel de SDS-PAGE se equilibraba en buffer de transferencia para eliminar las sales del buffer de corrida, también se deja equilibrar la membrana para asegurar la unión ya que una humectación brusca puede generar burbujas de aire evitando la transferencia de las moléculas hacia la membrana, por un periodo de 15 minutos en cuarto frío (6°C) así se evitara un calentamiento excesivo del aparato de transferencia, una vez transcurrido este tiempo, se armaba un sándwich donde las bases son constituidas por papel filtro humedecido en buffer de transferencia, sobre uno de ellos se coloca la membrana de nitrocelulosa y sobre esta el gel de poliacrilamida y por último el otro papel filtro húmedo, realizando un poco de presión para eliminar burbujas de aire, este "sándwich" se coloca en el aparato de transferencia (Trans-Blot® SD, BIO-RAD), de tal forma que el papel que soporta la membrana quede hacia el ánodo y el gel hacia el cátodo, con el mismo principio de generar un campo eléctrico para empezar la migración de las moléculas contenidas en el gel hacia nuestra membrana, ajustada a 20 volts y se dejaba por 45 minutos.

Una vez concluido el tiempo, se procedía a tratar la membrana, ésta se dividía en dos partes (fig. 12) la fracción que contenía los marcadores de peso molecular y las muestras NV, V y H se teñía con Ponceau que servirá como control de carga, el otro fragmento se trataba con 4 aglutininas: *Galanthus nivalis* (GNA), *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA) y *Peanut* (PNA), esta porción contiene el control glicoproteico positivo para las lectinas empleadas: para: GNA es carboxipeptidasa Y, SNA es transferrina, MAA es fetuina y para PNA es asialofetuina.

La mitad de la membrana se dejó en solución bloqueadora al 10%, por toda la noche en agitación a 6°C, para que al día siguiente esta se revelara como se indica en el siguiente párrafo.

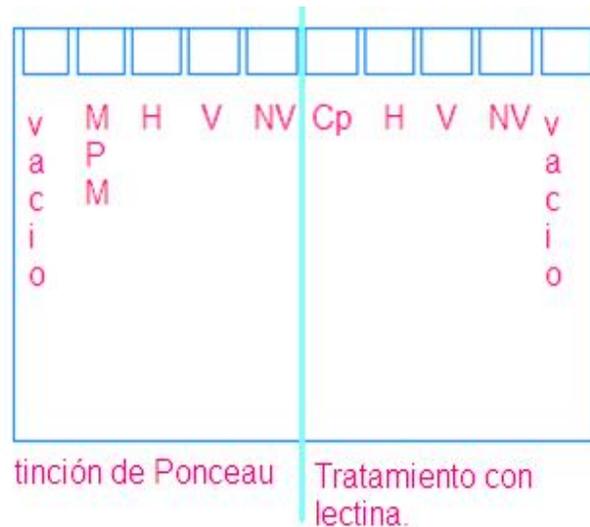


Figura 12. Representación de cómo se trató la membrana, una vez finalizada la transferencia. MPM marcadores de pesos moleculares, H variedad recién extraída de hígado, V variedad virulenta, NV variedad no virulenta, Cp control positivo.

La membrana, ya bloqueada se lavó dos veces con 25ml de TBS por diez minutos cada vez, después se lavó con buffer 1, en seguida se incubó con las aglutininas de las lectinas de interés que están acopladas a una molécula de digoxigenina, al volumen indicado para GNA y SNA 5µl, para PNA 50µl y MAA 25µl en 5 ml de buffer 1, se deja incubando por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante, después de este tiempo se lavaba por 10 minutos 3 veces con TBS, en seguida se adicionaba 5 ml de una solución 1:100 de un anticuerpo anti-digoxigenina-AP en TBS por 60 minutos en las mismas condiciones de incubación anterior, este anticuerpo reconocerá a nuestra molécula de digoxigenina y está adaptado a una molécula de fosfatasa alcalina (AP), para finalizar se lava con TBS por 10 minutos 3 veces más, para dar paso al revelado este se crea agitando la membrana sumergida en 5ml de buffer 2 que contiene 100µl de solución de revelado compuesta por nitro azul de tetrazolio y 5 bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (NBT/BCIP) hasta observar una coloración violácea, deteniendo la reacción sumergiendo la membrana en agua destilada, por unos cuantos minutos.

Reacción por la cual se lleva a cabo el revelado.

La solución de revelado compuesta por nitro azul de tetrazolio y 5 bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (NBT/BCIP) reacciona gracias a que la fosfatasa alcalina, que esta acoplada al anticuerpo secundario, libera el grupo fosfato del BCIP y por oxidación de NBT se forma el 5,5'dibromo-4,4'dicloro- índigo White (DDIW) y el formazán que es la forma reducida del NBT y que se caracteriza por ser un compuesto de color violeta intenso e insoluble (fig. 13).

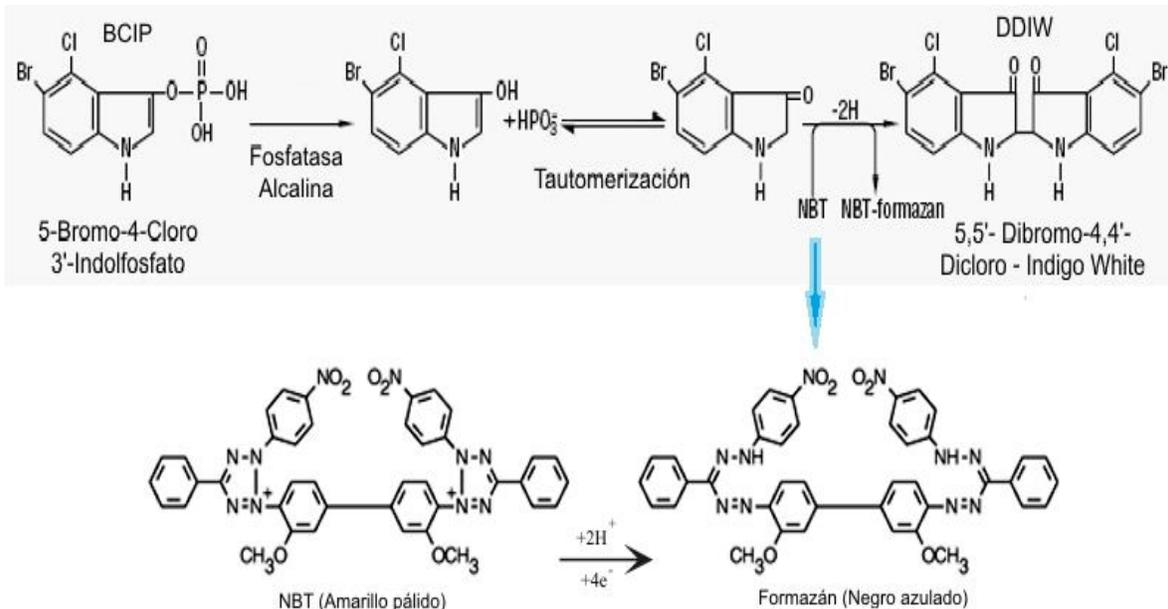


Figura13. Representación de la reacción que se lleva a cabo por la solución de revelado gracias a la unión de los anticuerpos empleados para reconocer nuestras terminales glicosídicas.

Purificación de glicoproteína por medio de cromatografía de afinidad.

Para llevar a cabo la purificación de los glicoconjugados con terminales de manosa, utilizamos la lectina *Galanthus nivalis* acoplada al soporte de agarosa SIGMA L877-2ml, La muestra amibiana se preparó primero lisando un botón amibiano de 65.05×10^6 trofozoitos, generados en 24 hámsters, al principio fueron inhibidos con Iodacetamida y EDTA, adicionando PBS-A para conservar la relación de 10×10^6 trofozoitos/ 500 μ l, sometidos a congelación-descongelación (tres veces). Esta muestra (25) se solubilizo en un buffer constituido por tris/HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, IA 50 mM, EDTA 10 Mm y n-Octilglucosido 3% denotado como buffer de solubilización (BS) la muestra se dejó en agitación en batch por una hora a 4°C, para después centrifugar a 53,035 rpm por una hora más y se realizó una cuantificación de proteína con el sobrenadante*.

Un volumen de 15 ml de muestra con una concentración de proteína de 8.2 mg se dejó incubando en "batch", con un volumen de 2 ml agarosa/lectina la cual cuenta con una capacidad de unión de 10 mg/ml, durante toda una noche a 6°C con balanceo suave, se prefirió dejar por más tiempo para mejorar la interacción de los glicoconjugados con la lectina, ya que se contaba con un volumen de muestra casi ocho veces mayor que el de la columna.

El "batch" entonces se montó en una columna de vidrio econocolumn de BIO-RAD, se lavó con 10 veces su volumen de Buffer de lavado para retirar las partículas que no se unieron a nuestra columna, se eluyó con 15 ml de una solución de metil α -D manopiranososa 0.5M (38), se cerró el sistema durante unos 40 minutos y se colectaron 15 fracciones de 1 ml. A las fracciones obtenidas se les realizo una cuantificación de proteína*.

La fracción que presento mayor contenido de proteína fue la número 13 y esta fue analizada por western-blot con la aglutinina de GNA, para cerciorarnos que las moléculas presentes en dicha fracción correspondieran a los glicoconjugados con terminaciones ricas en manosa y que se encontrara la proteína de interés.

*Anexo 3

Western Blot o inmunotransferencia

Por otro lado para la identificación de nuestro glicoconjugado de interés, se empleó el uso de dos anticuerpos: una vez obtenida la membrana, se dejó en agitación constante en buffer tris salino con tween 20% (TBS-T20) con leche al 5% durante una hora para bloquear los lugares donde no se había adherido nada y evitar resultados erróneos, se continuo lavando con TBS-T20 por 30 minutos en intervalos de 10 minutos donde realizaba un cambio de solución, después se incubo con el anticuerpo primario, uno fue el anticuerpo antilectina amebiana fracción 22 (Ab 22), el otro fue anticuerpo anti receptor de fibronectina de *Entamoeba histolytica* (Ab anti- β 1EhFNR) (41) (amablemente donado por la Dra. Patricia Talamás) esto se dejó interactuar por dos días en agitación constante a 6°C, al tercer día se iniciaban los lavados de membrana con TBS-T20 por una hora con intervalos de 10 minutos a temperatura ambiente, después se incubaba por una hora con el anticuerpo secundario, Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo y anticuerpo policlonal de cabra anti igG de ratón, respectivamente y ambos cuentan con una peroxidasa de rábano (HRP), al finalizar este tiempo se lavan las membranas por dos horas con el mismo buffer y al mismo intervalo de tiempo. Una vez concluidos los lavados, esta membrana se reveló en cuarto oscuro con una solución reveladora 1:1 de peróxido y luminol, este procedimiento consistía en humedecer la membrana con los 2 ml de solución reveladora esta se colocaba entre dos acetatos limpios, sobre ella el papel fotográfico y cerrábamos la cámara de revelado, el tiempo de espera fue 1 min para el Ab 22 y 5 min para el Ab anti- β 1EhFNR.

Para que ocurra la luminiscencia es necesario activar al luminol. Esto ocurre preparando una solución acuosa de luminol con un agente oxidante, como el peróxido (H_2O_2), y un hidróxido que proporcione un medio básico. En presencia de estas sustancias la oxidación del luminol ocurre lentamente, mediante la secuencia de reacciones. En un primer paso, la base atrapa los hidrógenos unidos a los átomos de nitrógeno. Luego, la reacción del dianión resultante con oxígeno molecular (paso 2) permite el intercambio de las amidas por los correspondientes ésteres, mediante una

adición cíclica. Este paso está muy favorecido dado que se forma nitrógeno molecular, un muy buen grupo saliente debido a su mínima reactividad. El peróxido formado, muy inestable, se rompe (paso 3), dando lugar al anión 3-aminofталato (34). Sin embargo, tal ruptura del peróxido produce esta molécula en estado excitado. Esto origina que, cuando la molécula alcanza su estado basal, libera energía en forma de luz, de una coloración azul. La peroxidasa que está unida al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (fig. 14).

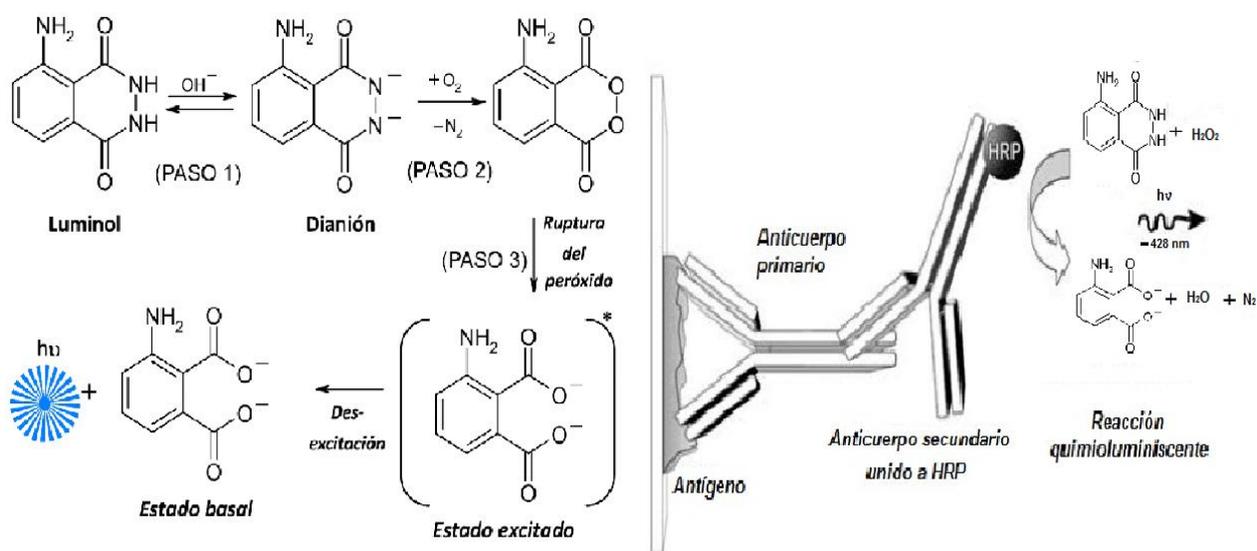


Figura 14. Esbozo de la reacción de quimioluminiscencia. Donde observamos los pasos descritos al igual que la interacción de la peroxidasa de rábano acoplada a los anticuerpos.

Corte de la banda para secuenciar.

Una vez identificada la banda existente en los lisados totales de trofozoitos de la variedad H y no presente en V y NV se decidió mandar a secuenciar. Esta banda se obtuvo al realizar un SDS-PAGE con un lisado total amibiano de la variedad H, una parte de este gel fue teñido por Coomassie y la otra fracción se empleó para realizar un western-blot para ayudarnos a reconocer la banda de interés, una vez obtenida la membrana se comparó con el gel y la membrana y se identificó la banda concordante a la altura del marcador de peso molecular de 150 kDa (fig. 15).

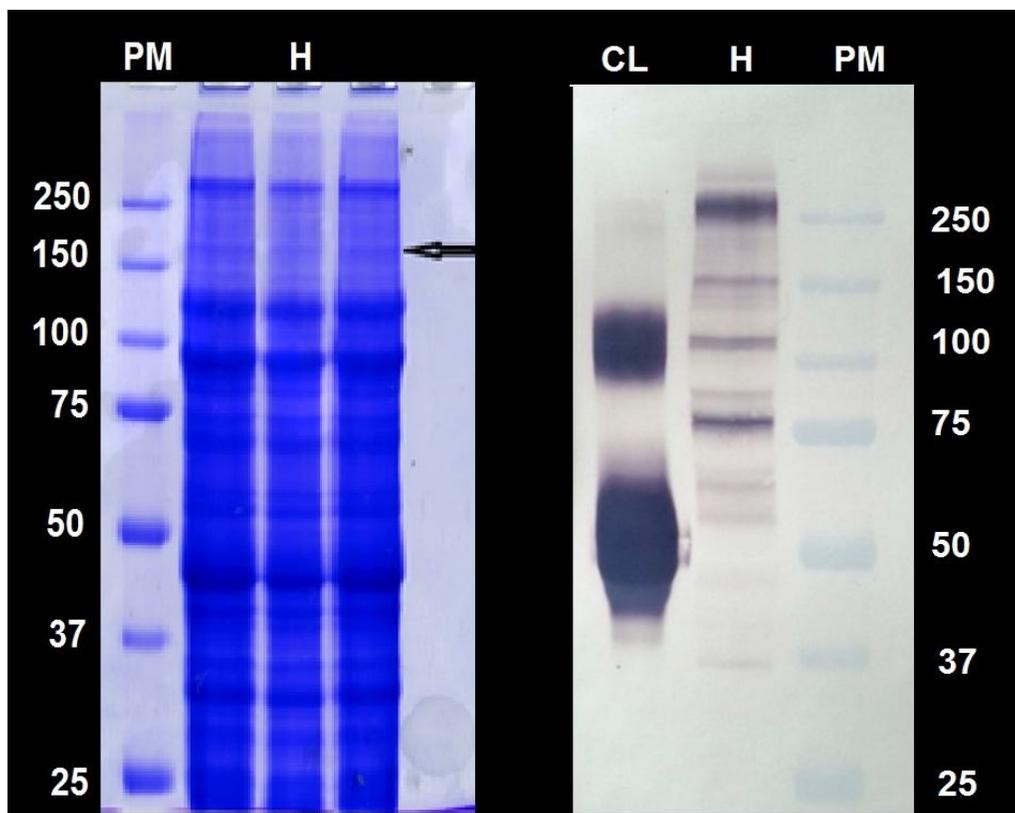


Figura 15. Del lado izquierdo se observa la fracción del gel SDS-PAGE de un lisado total amibiano de trofozoitos recién recuperados de abscesos hepáticos y que fue teñido con Coomassie y del lado derecho se muestra la membrana de nitrocelulosa que nos ayudó a identificar la banda de interés.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Comparación de las terminales glicosídicas de los glicoconjugados presentes en *Entamoeba histolytica* cepa HM1: IMSS, variedades virulenta (V), no virulenta (NV) y recién extraída de hígado (H).

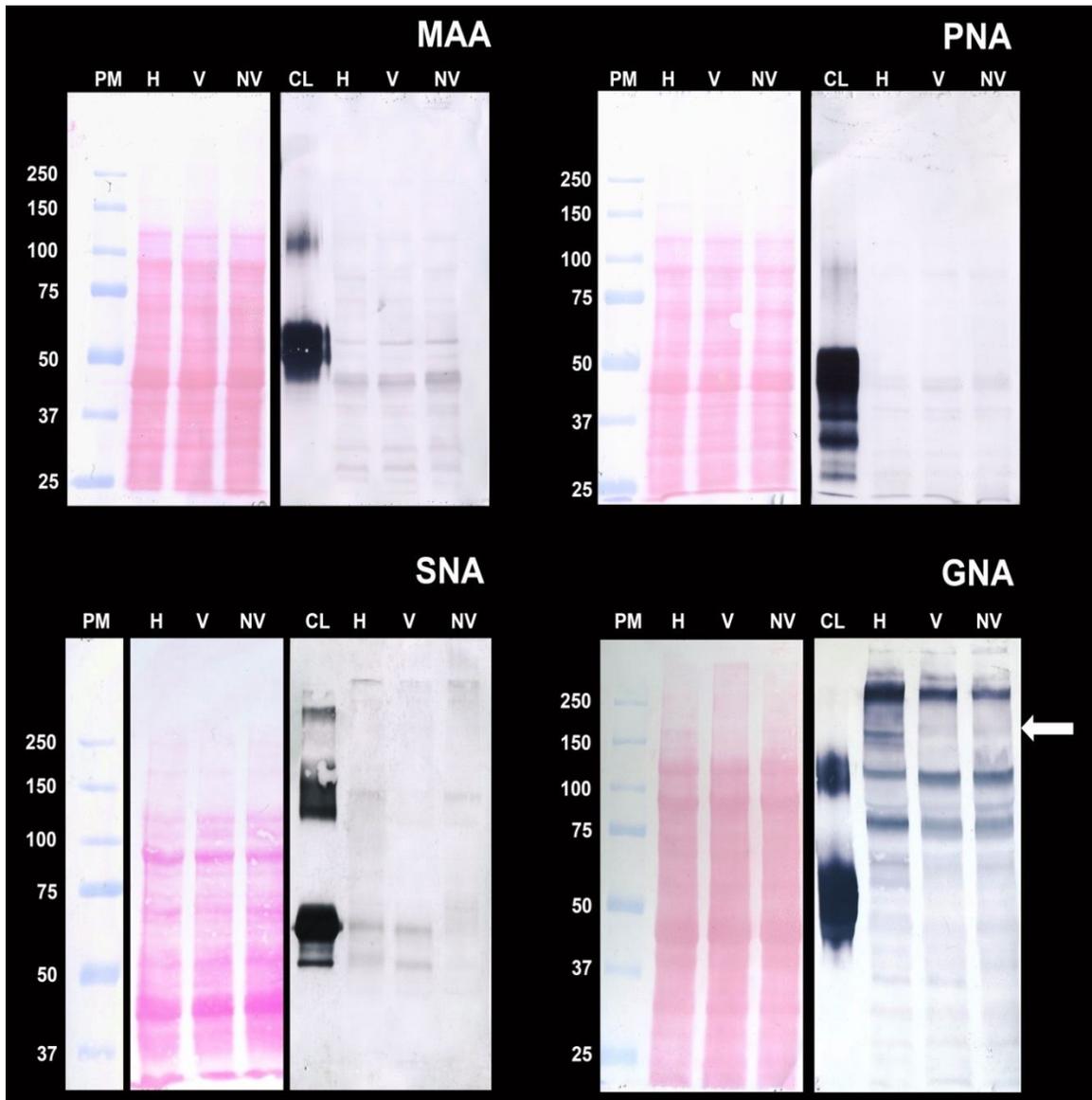
En la figura 16 se presenta la transferencia del lisado total del botón amibiano proveniente de cada una de las tres diferentes muestras analizadas. Se muestra una membrana representativa aunque el procedimiento se hizo por triplicado para tres muestras de amibas de las variedades empleadas, que nos ayudaron a ver si existe diferencia en las terminales glicosídicas, de las variedades manejadas.

Las lectinas empleadas fueron las siguientes:

- MAA (*Maackia amurensis*) que reconoce ácido siálico unido a galactosa en posición 2-3. Fig. 16a.
- PNA (*Peanut*) indica enlaces de galactosa 1-3 N-acetilgalactosamina. Fig. 16b.
- SNA (*Sambucus nigra*) identifica ácido siálico con unión 2-6 a galactosa. Fig. 16c.
- GNA (*Galanthus nivalis*) confirma la presencia de enlaces manosa-, manosa, en posición 1-3, 1-4 y 1-6. Fig. 16d.

16a

16b



16c

16d

Figura.16: Imagen de Western blot de los lisados totales de trofozoitos de *E. histolytica*, recién recuperados de hígado (H), virulenta (V) y no virulenta (NV), tratadas con las cuatro diferentes lectinas, las muestras se encuentran por duplicado. En el panel izquierdo, por tinción de Ponceau, se observan los marcadores de peso molecular seguidos por las muestras H, V y NV como control de carga, en el panel de la derecha las mismas muestras fueron tratadas con la lectinas específicas, se analizaron con: aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA) 16 a, aglutinina de *Peanut* (PNA) 16 b, aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) 16 c y aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) 16 d, todos etiquetados con digoxigenina, y después con Fragmentos de anticuerpos policlonales de oveja específicos Fab anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, para que se revelen con NBT/BCIP, el primer carril corresponde al control positivo para cada lectina: fetuina para MAA, asialofetuina para PNA, transferrina para SNA y carboxipeptidasa Y para GNA, seguido por H, V y NV. Con flecha indicamos la presencia de un glicoconjugado exclusivo de H.

En todos los casos se cargó la misma cantidad de proteína por muestra, de manera que la intensidad en el color de la membrana revelada con NBT sí es significativa y fue mayor en el caso de GNA, es decir que la mayoría de los glicoconjugados en la amiba presentan residuos de manosa. Es evidente en este caso la presencia de una banda correspondiente a un glicoconjugado (indicado por una flecha blanca en la figura 16 d) en el caso de la muestra proveniente de las amibas recién recuperadas de hígado; misma que no se observa en las otras dos muestras. En la misma figura 16d podemos observar las muestras teñidas con Ponceau para cada una de las variedades, de manera tenue se distingue una banda con un peso molecular cercano a 150 kDa en la muestra de las variedades virulenta y no virulenta y ésta misma es mucho más evidente en el caso de las recién recuperadas de hígado. Lo anterior nos permite especular que si bien el péptido de 150 kDa está en todas las variedades solamente en la variedad H se encuentra glicosilado con residuos de manosa.

Identificación del mismo patrón de glicosilación para tres muestras diferentes de trofozoitos recién recuperados de hígado.

La figura 17 muestra el análisis de tres muestras distintas, provenientes de trofozoitos recién recuperados de hígado, que fueron transferidas y posteriormente tratadas con la lectina GNA. El patrón de glicosilación de la variedad H se repite exactamente igual para las tres muestras distintas y se observa claramente en cada una de ellas el glicoconjugado que se señaló en la figura 16, ubicándolo con un peso molecular aproximadamente de 150 KDa, a pesar de que provenga de muestras diferentes.

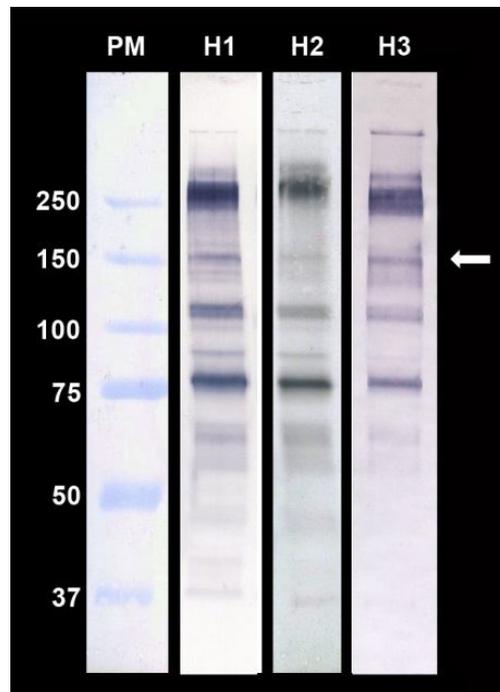


Figura. 17 Imagen de western blot, de las tres muestras diferentes de la variedad H, donde se indica con una flecha que el glicoconjugado está presente en las tres. El tratamiento de estas membranas es el descrito de la figura 16.

Determinación del peso molecular del glicoconjugado presente en la variedad H.

Los datos de la tabla 4 se obtuvieron de las mediciones hechas en el gel de la figura 11 (sección de Métodos). En la tabla 4 se indican los pesos moleculares correspondientes a marcadores de peso molecular así como su el respectivo Rf para cada uno de ellos.

Marcador de peso molecular (kDa)	250	150	100	75	50	37
log pesos moleculares	2.397940	2.176091	2	1.875061	1.698970	1.568201
Df (cm)	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1
Dp (cm)	1	1.55	2.4	3.1	4.4	5.4
RF	0.163934	0.254098	0.393442	0.508196	0.721311	0.885245

Tabla 4. Valores obtenidos para la variedad H, por medio de un gel teñido con Coomassie.

Para el logaritmo de cada peso molecular de cada uno de los marcadores se ingresó el correspondiente Rf y se obtuvo la pendiente de la recta ($m = -1.087$) así como el valor de la ordenada al origen ($b = 2.482$) y a partir de esta ecuación determinamos el logaritmo del peso molecular del péptido de interés, donde el valor de Dp es de 1.6 cm por lo cual su RF es de 0.2623, sustituyendo los valores en nuestra ecuación de la recta donde en las ordenadas se grafican los logaritmos de los pesos moleculares y en las abcisas los valores de los Rf:

$$Y = mx + b \rightarrow Y = -1.087 \times 0.2623 + 2.482 = 2.196$$

Como este resultado está en logaritmo, para obtener el peso molecular de la proteína de interés se debe obtener el anti log de 2.196, dándonos como resultado un peso de 157.35 kDa.

Secuenciación del glicoconjugado.

Teniendo ya bien determinado el peso molecular del glicoconjugado la banda correspondiente al mismo se cortó del gel tal como se indicó en la sección de Métodos (fig.15). Esta banda se llevó a secuenciar al Departamento de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

El resultado indicó la presencia de dos péptidos, uno de ellos correspondía a un peso molecular cercano al que habíamos determinado, la búsqueda en el Gene Bank para coincidencias con *E. histolytica* HM1: IMSS indicó un 100% de identidad con la cadena pesada de clatrina de *E. histolytica* HM1: IMSS; con un número de acceso: [103484580](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/103484580), un peso molecular de 183.73 kDa, con un punto isoeléctrico de 5.3 y una longitud de 1622 residuos.

Se anexa la secuencia completa de la cadena pesada de clatrina y se indica en rojo las secuencias intermedias determinadas en el Laboratorio de Proteómica.

MAIRPPIQIK	EVVKLDRFVK	PESIGFTTVS	IEGDKHFTVL	EKGEEKRVRI	FHNNKINSPD	SRSCAADFAI	MHPTKQIMAV
AAGTTVQMLI	PSAAPKKIVD	RHSELAASQI	IGYKIDPTEK	WVAILALLQK	NNEIVGKIQL	FSIEKNASQI	IDGYAASFYN
YKFDGASQAS	VMFAFAQKFP	SPRLGLIEVI	KGDPARQNVN	TVIDIPIQPQ	QQQADFMVGL	VVSVKYETIL	LVSRMGYIYG
FYSGDGLTFF	QGRVIDDIVF	LTAYNQSTDG	VTVVGKKGVV	TNIYIEGDKL	VPFICNGLKN	VGLGCKIAAR	CNLPGADDIF
VERFNALLNA	GQIREAALIA	ANSPGELIRN	ANTINKLSQM	QAQPGQNPPL	FLYFATILES	SSLNALEGFT	LIQLLIPQNK
LPAVEAWIVN	DKIECSEKAG	DLVKPYDQRL	ALMIYSKAHA	TGKVVQSLAE	MGQSDKIVAY	CERAGFSPDY	LQILQQILPA
SGEAAKAYAA	SLIQKGYDE	LDMISIIDLF	ARYRYLKEIT	ALILDTLDGD	NEQYANIQTK	VLEMNLIAP	QIADTIFEND
MLKHFDHNRI	GKLCEQAGLF	KRALQIFEQF	DDIRRVLAHA	SAIPPELIE	SFRKLEPEQA	ILVLQDLLRT	NPRGNLQIII
KILLEFHTGL	GDDKVIDLLQ	KFDCWEGLFY	FLSQIVNTTN	DKMVVFYIE	ACARSGQFQE	LARVVQENDV	YDPKEVKEFL
KNAKIADQIP	FIIVCDKHGY	VEEMTQYLYQ	NGNHRFIEAY	VKKINPMNTP	KVVGALLDCG	CGEDIYIQLI	NAVGGICPAD
ELIKTCESRN	RLIILLPWLE	QRLSEGPSDV	SLHTALAKVY	VDQGKDAEFK	LNNDMYYDSL	IVGKYCEDRD	PYLSYICYKR
KNLDDDELIDV	TNRHNLFKYQ	AKYLVEREDL	DLWNKVLTEE	NEHRKSVVEQ	VIHTALPECT	DPNQILKTVQ	AFLQNDLPND
LIDLLDKLVS	QNPEYSTNPT	LQKLLIQTSI	KAAPNRVMDY	IRKLNLDYDPK	EIAMDVLLQH	IKDLTRAKDF	ADKAKKDILY
KKLGEAQLDE	LKVKDAHSL	MKAKDISLRS	RVIDIAESDG	SYEDLINYLL	MCKEETKDMM	VETELLYCYA	KLKKNDEIEN
FLKTANCANL	TSIAERCYNE	ELYGAAKILY	TSLNNYIKLA	SCLLKLKDYA	GAVEAAKKAN	STRTWKEVTF	ACIDAKEFTL
AQETGINILM	AGDEITELVY	YYEKNELYDQ	VIELLEAGLK	IENVHVSMT	ELAILYSKYK	EEKLYDYLKQ	YVAKIQCQKV
IPTVNMNQW	KELVFLYVQV	DQVKAIETMI	SYPDDCFDHQ	LMKELLVNVP	RIDMIYKAES	YYLAEKPEKV	NEMLIAVAHR
CDHTQVISIA	RKEKDLKTIR	EYLLYCLDLN	NDSVNEALID	LFIDGDGAKS	LKSIEKNTN	FNKTGLANRL	KVHEDVEFRK
IAAYLYSRFD	DDAMEIAKKS	KDEEKVTDLL	NFFVEQDKKE	AFGNCLNVCY	DYVPTEVALE	LGYKNKLMQ	TMPFMCKKMK
DTNDRIKKE	QAEKDRQNAK	KEPQLAQQDT	PFGMLALPAA	PGMMPMQPM	GGMGMNQPM	PGMAPSVQPQ	TAMGGMGMMN
QPMPGMPMG	AAAPTNGEF	IF					

Aun cuando en la literatura no encontramos indicios de que la cadena pesada de clatrina este glicosilada es importante mencionar que ésta es muy importante en el “sorteo” de proteínas lisosomales en algunas células eucarióticas, y en mamíferos las enzimas lisosomales que están asociadas a la clatrina con frecuencia están unidas a residuos de manosa; probablemente en la amiba la cadena pesada de clatrina también

este asociada a proteínas ricas en residuos de manosa y probablemente esté relacionado con una mayor fagocitosis por parte de los trofozoitos de la variedad H. La estructura así como el número de oligosacáridos pegados a las proteínas pudieran ser “factores clave” en el proceso de eritrofagocitosis de la amiba.

El otro péptido correspondía a una proteína hipotética de *E. histolytica* HM1: IMSS con un número de acceso de: [56473295](#) con un peso molecular de 208.23 kDa, un punto isoeléctrico de: 5.6 y una longitud de: 1801 residuos. Se anexa a continuación la secuencia completa de dicho péptido y en rojo las secuencias internas determinadas por el Laboratorio de Proteómica.

MSSFFPFLTA	DDFNKSHSLV	HELLKHGKFH	AASAVMKELY	KKNDKSWVIS	LLINLCNGAV	PSTWNATEDI	PSVFHLAWLS
FLLYKSFKDS	SEKSDESLFT	LDLVGVEKKI	HFGILLVDAL	FPITDIPEDR	KRYFTSFYAI	VNDPSVAHLG	QEEVQFLCEG
LQKNPVHFG	LCQELVKLVN	ENDLVTANVL	IAYLDTFNSL	LSQEDYNTLY	QVLRVLINVN	ERYDKTFDSL	FTLFLNNSEF
CFNQTPKLN	TSILQSLFLS	GSHFFYHFLE	LYRTQCSSFS	KTLFNTPVLT	DSTSNLYNDQ	SIFWKLYYKS	TVYNNEHVLL
TPYKTALDAI	DEVARKHTLA	ESDSEIQRH	MNILGHYFNR	LVPVLILEIA	EKYPRNLKII	ELLISLSKEN	TSNDKLNQWN
TLSSSEKIKVL	KFHLILCNKL	TEMNVQTIHP	MLLLVGKYSL	PYIMLHHTGV	LEHLDELQL	IEENDAYKSI	FSNDYAMLKC
IKYVNDLHNS	FSNSLGETST	LLRSTFGEVL	HSLNEKQJIS	FVQLVLYEIF	QSQPNVESVR	TVLSYNSSVI	SQEFKQMKF
LLHRLNTLSS	LPFVEDPLTL	FLSDSDTLLS	LSLSRHIP	LDILDPPASQ	SLITYSQMNT	LLQKGLPAKE	FIEALLAVPN
ATKVDQLAML	LEAIHTYPE	NSIEFFAECE	KFIDENTPKE	LTDVHQLFKK	IYTSGYTLTS	YTRLLSEDP	HYTFENINIL
KEASNRKQL	FDNSGNVEIK	AEEKELKEIQ	TLLFQAPVYD	KTIKFVEYLL	KLNHMQEYW	ELWNCKSTCA	IQLIQTISPQ
QIVDYLFPEK	HEIGAEMEC	ELFRIDLFGS	IVYSILIEKT	RKLDSTQTL	LHDMGRDDLA	IVFALFSVDP	TNFKIPVFDI
EIINSLPETL	RQFVEMKLTQ	YRELESANFP	GNGEFNVSNF	LYSMEAFKVL	LDPVSGGNEK	FHDTMANYYL	SKADYTNAYS
HAVQTKSKDL	VEKIVTLQLT	ELLNKRTATN	NLFDEIFAVL	IRISNPQKRL	IQTVKVEEQ	VYSQNCWKL	FNECVSEISL
DNFPANLKQM	YDKTNLIHQI	EMVLEVKEID	INVNTVDLLL	QKKYRLAYD	CLSFQPAPK	DKEKHIVTA	IYVILDGDSQ
EEASEFVSYM	SSKRTDILKI	IEECVQKNRG	QSKLSINDIL	SKFSGLRDEE	FLLAFAKETT	QYYDNFENN	LVGGYSQLFN
NLKEIYSQAP	TLEMGRICRY	ENCLNVANQL	QSEVLSREKS	RNMVCLVYQL	LQYFEELLTE	EECKNETLKN	MKTAKMDHLKQ
LVRVYFTLMT	TTHFTSGIPF	HTLFTNTEIA	KSLHSELHDK	SVFRKNDALA	IGECLGLDNV	PVLMTSFYET	LQQKQYQAR
DVFDQLKEKV	DKPLLMEIVE	NIYMEIGKNT	KFGDNASCQM	LVNFISNPKS	VPNKLNGKSQ	GLAAPENIKQ	PDEQWLQIKQ
QIIDNKNSRK	TRGQHTWDS	EAKYQFQFCP	CEKHKQWIVN	KYIVEGEFEK	AFVYALEEPV	KLSENAAFQT	VYLPALLDNK
QYQIMKETLK	KLKDTHQEDI	THLLDFLEKN	ELWDIYLDIT	LQIELYKAY	MGSSKYFNTI	PFTDIGKRKE	VLGLIDKIE
RCGNVIDRAK	HTMMVKKYGA	QERMELLS	MKKVDEGLAR	VNVFDLKSTT	DVATIAEYFF	EKRRLQLLHE	IINAVLSSPN
DDETAPKTA	EYLELIEVA	KEPELLDFLK	QNTSLTDEQK	ADLIFKAVRT	KFKGKPEKLI	AAIPSDLKQI	QVNVLEKYQ
DALKVAKNS	PTNVRALRDM	LASSNDPNAQ	KVLAQCEKLL	R			

Puesto que el peso molecular de este péptido es mucho mayor que el que buscamos (alrededor de 157 kDa) es muy probable que se trate de una contaminación de un fragmento que corrió con un peso molecular similar al de nuestro péptido de interés; dicha contaminación podría corresponder a un fragmento de un péptido de un peso de 208 kDa. Apoyando esta idea se puede ver claramente como las secuencias intermedias determinadas por Proteómica corresponden a solo un tramo de la secuencia completa de este péptido hipotético.

Purificación por cromatografía de afinidad.

Queríamos saber de los glicoconjugados presentes en el lisado total proveniente de los trofozoitos recién recuperados de hígado cuales provenían de membrana; por ello la muestra que se preparó correspondía a una fracción membranosa y ésta se pasó por una columna de cromatografía de afinidad que tenía acoplada *Galanthus nivalis*. De las fracciones eluidas de esta columna, con α -D metil manopiranososa, la que presento mayor concentración de proteína fue la fracción 13*. En la figura 18 se muestra el análisis electroforético de dicha fracción: se observan varias bandas entre las que se encuentra una con el peso molecular calculado para la banda de interés, muy cercano a 150 kDa. Lo anterior sugiere que el glicoconjugado característico de los trofozoitos H es un glicoconjugado de membrana. Como era de esperarse también se observa una banda con un peso aproximado de 260 kDa que como corroboramos más adelante corresponde a la lectina Gal/GalNAc, que como ya sabemos es un glicoconjugado rico en manosa que se encuentra en la membrana plasmática.

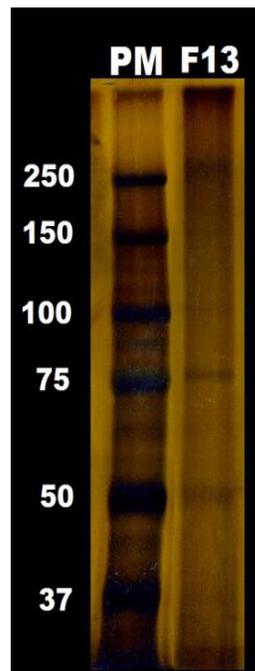


Figura. 18. Patrón electroforético de los glicoconjugados obtenidos por cromatografía de afinidad con GNA, a partir de las proteínas existentes en las membranas de los trofozoitos de la variedad H y eluidas con α -D metilmanopiranososa. El gel se tiñó con plata, en el primer carril están los marcadores de peso molecular y en el carril continuo las bandas contenidas en la fracción 13 (F13).

*Esta curva se muestra en el anexo 3

Identificación de la fracción 13 transferida con *Galanthus nivalis*.

Para corroborar que todos los componentes presentes en la fracción 13 habían sido retenidos específicamente en la columna por su contenido de manosa se llevó a cabo la transferencia de dicha fracción y se trató con la lectina GNA como se indicó en la sección de Métodos. En la figura 19 se observa claramente que los componentes de esta fracción son reconocidos por GNA. Se destaca en la figura con una flecha el glicoconjugado de 150 kDa característico de los trofozoitos recién recuperados de hígado. Cabe mencionar que en este Lectin-blot aparecen más bandas que las que se vieron en el análisis electroforético del inciso anterior; es muy probable que péptidos que se encontraran en muy baja concentración para su detección con plata en el gel hayan sido detectados por la lectina en el Lectin-blot. Sabemos que el límite de detección de la tinción de plata oscila en el orden de nanogramos, sin embargo en la literatura no hay un dato similar para el límite de detección mediante lectin-blot aunque Haselbeck, A. (14) refiere que éste depende de la lectina en cuestión así como del glicoconjugado.

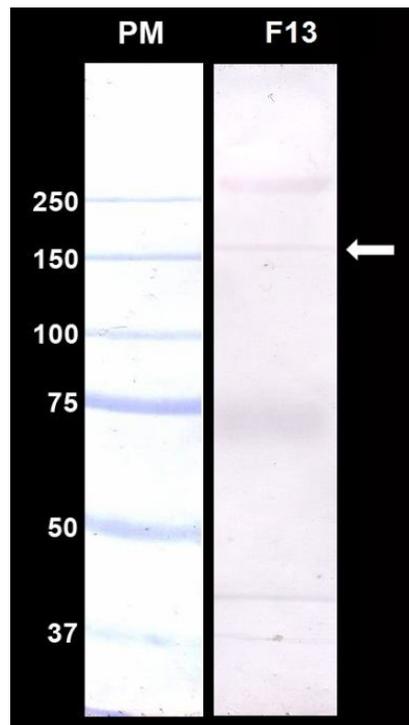


Figura.19. Imagen de la membrana de nitrocelulosa, western blot de la fracción 13 tratada con la lectina GNA, donde se puede corroborar que los glicoconjugados purificados y presentes en la fracción 13 son ricos en terminales manosa.

Identificación del glicoconjugado de interés.

Una proteína de membrana de alrededor de 150 kDa ampliamente estudiada es la cadena intermedia del complejo de lectina presente en trofozoitos de *E. histolytica*, esta cadena corresponde al receptor de fibronectina descrito por Talamas y col (41) (β 1EhFNR); nos preguntamos si el componente de 150 kDa presente en la fracción 13 no correspondía a este péptido, para ello se llevó a cabo una inmunotransferencia de la fracción 13 en la que se utilizó un anticuerpo un monoclonal anti- β 1EhFNR, también se confirmó la presencia de la lectina Gal/GalNAc con la ayuda de un anticuerpo policlonal anti-Gal/GalNAc (Ab 22) y. En la figura 20 se observa que el glicoconjugado de alrededor de 260 kDa presente en la fracción 13 corresponde a la lectina Gal/GalNAc; sin embargo el péptido de 150 kDa característico de los trofozoitos recién recuperados e hígado no corresponde al receptor de fibronectina o cadena intermedia.

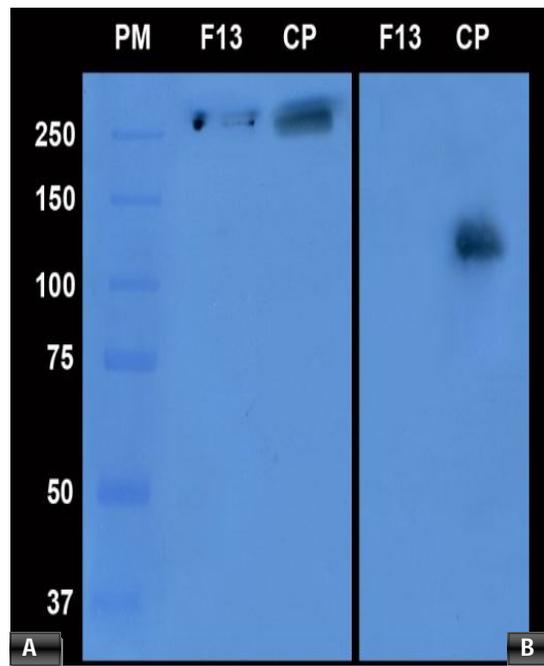


Figura.20. Western blot, donde la fracción 13, obtenida por cromatografía de afinidad para GNA y transferida en membrana de nitrocelulosa, que fue tratada con A: anticuerpo policlonal de conejo anti lectina amebiana (Ab 22), como el anticuerpo primario y el secundario fue anticuerpo de cabra anti IgG-HRP de conejo; y B: anticuerpo monoclonal de conejo anti- β 1 Receptor de fibronectina de *Entamoeba histolytica* (β 1EhFNR) que tuvo como secundario un anticuerpo de cabra anti IgG-HRP de ratón, ambas membranas fueron reveladas por sustrato de quimioluminiscencia .CP corresponde al control positivo para cada uno de los dos anticuerpos (el anticuerpo anti lectina amebiana, correspondiente a un lisado total de trofozoitos de *E. histolytica*; y del lado derecho el Cp es una muestra semi pura de *E. histolytica* para β 1EhFNR).

CONCLUSIONES.

1. Como era de esperarse para un parásito los glicoconjugados en cualquier de las tres variedades son ricos en manosa más que en otros azúcares.

Esta conclusión se basa de los resultados obtenidos en el análisis con las cuatro lectinas: MAA, PNA, SNA y GNA.

2. Los trofozoitos recién recuperados de las lesiones en hígado de hámster tienen un glicoconjugado rico en manosa, de alrededor de 150 kDa, que no está presente en los trofozoitos de la variedad virulenta (que llevan más tiempo en cultivo asténico) ni en los de la variedad no virulenta (que ya llevan años en permanente cultivo axénico).

Esta conclusión surge del análisis de las tres variantes de trofozoitos con las diferentes lectinas.

3. Este glicoconjugado proviene de los trofozoitos H y no de las células del tejido hepático del hámster.

Esta conclusión se basa en el hecho de que el glicoconjugado está presente en tres muestras distintas del lisado total de trofozoitos recién recuperados de las lesiones en hígado de hámster.

4. Este glicocojugado se localiza en membrana.

Esta conclusión se basa en el hecho de que el glicoconjugado de 150 kDa está presente en la fracción purificada mediante cromatografía de afinidad de GNA y para dicha purificación se partió de una muestra de membrana. El que se localice en membrana nos permite especular en la posibilidad de que sea relevante en el proceso de adhesión de los trofozoitos recién recuperados de hígado.

5. Con el análisis de los glicoconjugados que constituyen a la fracción 13 se corrobora que el glicoconjugado de 150 kDa es rico en manosa.

Esta conclusión surge del análisis de la fracción 13 con GNA.

6. El glicoconjugado de 150 kDa no corresponde a la cadena intermedia del complejo de la lectina Gal/GalNAc.

Esta conclusión se basa en el hecho de que el anticuerpo anti- β 1EhFNR no reconoció la banda de 150 kDa (en la fracción 13) proveniente de los trofozoitos recién recuperados de hígado.

7. Existe la posibilidad de que el glicoconjugado corresponda a la cadena pesada de clatrina.

A pesar de que existe una diferencia en el peso molecular de ambas proteínas y que la secuenciación no fue del 100% pura, ya que contenía otro péptido, existe la posibilidad de que se trate de la cadena pesada de clatrina con ciertas modificaciones, una de ellas estar glicosilada. Para afirmar este resultado se deberá hacer un análisis de dicha banda purificada, una opción de esto sería realizar una electroforesis bidimensional.

Cabe destacar que cada muestra de trofozoitos recién recuperados de hígado de hámster provenían de cuando menos 12 o 14 animales y era difícil conseguirlos ya que en ese momento el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental no estaba produciendo estos animales.

ANEXO 1: ESTADÍSTICAS DE AMIBIASIS EN MÉXICO COMPRENDIENDO EL PERIODO DE ENERO A OCTUBRE DEL 2013.

Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades
Casos probables de Amebiasis intestinal (A06.0-A06.3, A06.9) por fuente de notificación
Estados Unidos Mexicanos 2013
Población General

Estado	Institución									Total
	Salud	IMSS-Ord	ISSSTE	IMSS-Op	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	Otras	
Aguascalientes	1 013	1 372	174	S.R.	0	S.R.	17	S.R.	854	3 430
Baja California	479	1 182	204	11	S.R.	S.R.	10	11	205	2 102
Baja California Sur	520	714	313	S.R.	S.R.	S.R.	16	0	S.R.	1 563
Campeche	1 808	626	306	391	0	305	0	281	9	3 726
Coahuila	1 037	2 705	275	75	0	S.R.	1	S.R.	450	4 543
Colima	775	250	250	S.R.	103	S.R.	45	2	253	1 678
Chiapas	9 232	2 765	1 118	9 701	S.R.	3	0	9	743	23 571
Chihuahua	932	1 426	666	1 020	S.R.	S.R.	18	S.R.	278	4 340
Distrito Federal	3 396	3 588	2 004	29	219	39	112	214	473	10 074
Durango	1 546	733	281	33	0	S.R.	1	0	184	2 778
Guanajuato	3 263	1 722	822	1	S.R.	77	1	S.R.	586	6 472
Guerrero	19 262	2 741	4 151	178	S.R.	S.R.	20	5	0	26 357
Hidalgo	9 541	2 217	2 640	1 719	4	103	0	S.R.	47	16 271
Jalisco	3 630	4 385	414	39	241	1	203	0	1 757	10 670
México	8 926	12 021	361	182	2 425	S.R.	93	S.R.	2 659	26 667
Michoacán	965	2 185	776	798	S.R.	S.R.	0	2	S.R.	4 726
Morelos	2 103	2 714	838	110	S.R.	S.R.	83	S.R.	S.R.	5 848
Nayarit	2 008	1 007	1 420	304	275	S.R.	0	0	215	5 229
Nuevo León	874	2 171	397	54	S.R.	3	91	S.R.	421	4 011
Oaxaca	11 788	3 413	1 827	7 560	101	85	179	6	484	25 443
Puebla	5 519	4 685	867	6 311	7	55	0	S.R.	1 354	18 798
Querétaro	1 247	1 419	174	0	0	S.R.	0	S.R.	743	3 583
Quintana Roo	2 859	2 297	672	S.R.	S.R.	S.R.	0	5	6	5 839
San Luis Potosí	2 498	1 701	560	1 015	S.R.	5	20	S.R.	206	6 095
Sinaloa	3 104	3 923	1 337	450	134	8	21	125	421	9 523
Sonora	732	1 811	117	0	S.R.	S.R.	7	33	830	3 530
Tabasco	7 066	1 732	875	S.R.	S.R.	75	0	50	1 901	11 699
Tamaulipas	2 077	1 026	455	258	0	27	348	5	91	4 287
Tlaxcala	1 197	1 867	185	5	94	S.R.	0	S.R.	93	3 441
Veracruz	5 134	6 915	1 043	7 797	61	303	68	105	12	21 438
Yucatán	8 551	3 484	321	1 280	106	S.R.	1	122	134	13 999
Zacatecas	1 507	915	1 527	468	39	S.R.	4	S.R.	310	4 770
TOTAL GLOBAL	124 589	81 712	27 370	39 789	3 809	1 089	1 359	975	15 809	296 501

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud/Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades

S.N.- Sin notificación de casos

S.R.- Sin representación de la institución en la entidad federativa

ANEXO 2: EQUIPOS Y MATERIALES.

OBTENCIÓN DE TROFOZOITOS:

Buffer de fosfatos amibiano (PBS-A):

Solución A: Fosfato de sodio monobásico ($\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$) 0.15M 250ml

Solución B: Fosfato de sodio dibásico (HPO_4Na_2) 0.15 M 500ml

Se titula la solución B con A hasta obtener un pH de 7.2 (buffer de fosfatos)

Después se mezclan 100ml de este buffer de fosfatos con 500 ml de NaCl 0.18 M, aforándose a 1000ml.

Fosfato de sodio monobásico $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$, SIGMA lote 052k0167 PM 120.0 g/mol.

Fosfato de sodio dibásico, HPO_4Na_2 , BAKER ANALYZED lote E414533828-20 PM 141.96g/mol.

Cloruro de sodio, NaCl, Merck lote K32232604 329 PM 58.44

Beckman Φ 50 pH Meter.

Inhibición de trofozoitos amibianos.

Proporción requerida: 10×10^6 células/500 μ l

Iodacetamida, SIGMA, Iodacetamida cristalina, PM 184.9g/mol.

EDTA, SIGMA, Acido etilendiaminotetracético, PM 380.2g/mol.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Reactivo de trabajo consta de

Micro BCA™ Reagent A: Carbonato de sodio Na_2CO_3 , bicarbonato de sodio NaHCO_3 , tartrato de sodio e hidróxido de sodio $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ (MA) 50%.

Micro BCA™ Reagent B: 4% de ácido bicinconínico en agua (MB) 48%.

Micro BCA™ Reagent C: 4% sulfato cúprico pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MC) 2%.

El porcentaje asignado a cada reactivo es en referencia al volumen total a preparar y este se refiere al número de muestras en total más uno.

Albumina sérica bovina 98-99% SIGMA No. A-7030.

Precision AI STAINLESS STEEL WATER BATH model 180.

Perkin EIMER LAMBDA Bio UV/VIS Spectrometer.

Vortex Genie 2 Allied Fisher Scientific.

ELECTROFORESIS.

Acrilamida, 99.9%, Bio-Rad 100g, cat # 161-0100.

Bis N-N' - metilamida- bis-acrilamida, Bio-Rad 50g, cat # 161-0201.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 98.5%, SIGMA 1k, L4509.

Tris, Trizma base, SIGMA, T-1503.

Ácido clorhídrico reactivo analítico, HCl, Tecsiquim, CT042.

Persulfato de amonio (APS), Bio-rad 10g, # catalogo 161-0700.

N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, SIGMA 50ML, T -8133.

Glicerol, J.T.Baker, Glicerol anhídrido, $HOCH_2CHOHCH_2OH$, PM 92.10.

Marcadores de peso molecular, Bio-rad, # catalogo 161-0373.

Aparato de electroforesis Mini PROTEAN® 3Cell, BIO-RAD.

Gel concentrador 5%	volumen (ml)
Acrilamida/bis-acrilamida (30%/0.8%).	1.66
Agua desionizada.	5.7
Tris/HCl 0.5M pH 6.8.	2.5
SDS 10%.	0.1
APS.	0.0335
TEMED.	0.015

Gel separador 7.5%	volumen (ml)
Acrilamida/bis-acrilamida (30%/0.8%).	3.75
Aguades ionizada.	5.7
Glicerol.	1.6
Tris/HCl 1.5M pH 8.8.	3.75
SDS 10%.	0.15
APS.	0.05
TEMED.	0.015

Buffer cocktail.	volumen (ml)
Agua desinoizada.	4.8
Tris/HCl 0.5M pH 6.8.	1.2
Glicerol.	1
SDS 10%.	2
Azul de bromofenol 0.1%.	0.5

Buffer de corrida	Concentración en un litro.
Tris.	0.25 M
Glicina.	0.192 M
SDS. 10%	0.1% (v/v)

WESTERN-BLOT.

Membrana de nitrocelulosa Biorad (No. de cat.162-0115).

DIG Glycans Differentiation Kit, cat. No. 11210238001. Conformado por:

GNA: Aglutinina de *Galanthus nivalis* marcado con digoxigenina.

SNA: Aglutinina de *Sambucus nigra* marcado con digoxigenina.

MAA: Aglutinina de *Maackia amurensis* marcado con digoxigenina.

PNA: Aglutinina de *Peanut* marcado con digoxigenina.

Fragmentos Fab de anticuerpos policlonales de oveja, anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina.

Control de glicoproteína para GNA: Carboxipeptidasa Y.

Control de glicoproteína para SNA: Transferrina.

Control de glicoproteína para MAA: Fetuina.

Control de glicoproteína para PNA: Asialofetuina.

Reactivo de bloqueo.

Solución de Ponceau S.

Trans-blot SD, Semi-Dry Transfer cell, Bio-Rad.

Buffer de transferencia	concentración final en 1litro
Tris.	25mM
Glicina.	192mM
Metanol.	20% (v/v)

Buffer Tris Salino (TBS)	concentración
Tris/HCl pH 7.5	0.05M
NaCl	0.15M

Buffer 1	concentración en TBS
MgCl ₂	1 mM
MnCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM

Buffer 2	concentración
Tris/HCl pH 9.5	0.1 M
MgCl ₂	0.05 M
NaCl	0.1 M

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

N – octy- β -D- Glucopiranoside, C₁₄H₂₈ O₆, SIGMA, lot. 22H5021.

Lectin from *Galanthus nivalis* (snowdrop) - Agarose L8775- 2 ml 062M4043 SIGMA-ALDRICH.

Methyl- α - D- mannopyranoside, M6882 – 25G SIGMA.

Buffer de solubilización.	concentración
Tris/HCl pH 8.	50mM
NaCl.	150mM
N-octilglúcosido 3%.	0.50%
IA.	50Mm
EDTA.	10mM

buffer de lavado	concentración
Tris/HCl pH 8.	50mM
NaCl.	150mM

Solución de elución	concentración
Tris/HCl pH 8.	50 mM
NaCl.	150 mM
Metil α -D- manopiranososa	0.5 M

ANEXO 3: CALCULOS.

Calculo de volúmenes de inhibidores y PBS-A para el botón amibiano.

Trofozoitos proporcionados: 38.5×10^6 variedad recién recuperada de hígado.

Proporción requerida: 10×10^6 células/500 μ l por lo cual se ajustara a un volumen de 1,925 μ l.

El volumen del pellet se calcula por comparación con otro tubo eppendorf.

IODACETAMIDA (IA).

Concentración del stock 1000mM concentración requerida 100mM.

Empleando la fórmula de $C_1V_1=C_2V_2$, se sustituyen los valores.

$(1000\text{Mm})(V_1) = (100\text{mM})(1,925\mu\text{l})$ y despejando nuestra incógnita nos queda

$V_1 = (100\text{mM})(1,925\mu\text{l}) / (1000\text{Mm}) = 190\mu\text{l}$ de Iodacetamida.

EDTA.

Concentración del stock 1000mM concentración requerida 10mM

Empleando la fórmula de $C_1V_1=C_2V_2$.

$(1000\text{Mm})(V_1) = (10\text{mM})(1,925\mu\text{l})$

$V_1 = (10\text{mM})(1,925\mu\text{l}) / (1000\text{Mm}) = 19\mu\text{l}$ de EDTA.

PBS-A.

Este se calcula con la resta de los volúmenes ocupados por el botón y los inhibidores al volumen total

$$V_{\text{PBS-A}} = T_{\text{Total}} - (V_{\text{IODACETAMIDA}} + V_{\text{EDTA}} + V_{\text{BOTON}})$$

$$V_{\text{PBS-A}} = 1,925\mu\text{l} - (190\mu\text{l} + 19\mu\text{l} + 160\mu\text{l}) = 1531\mu\text{l de PBS-A}$$

Estas cantidades se repartían en tubos eppendorf de tal forma que quedaran con el mismo volumen, para esta muestra se repartió en 2 tubos con un volumen de 962.5 μl cada uno. Todos los volúmenes menores a un mililitro eran medidos con micro pipetas de acuerdo al volumen requerido.

Lo mismo se realizó para los siguientes volúmenes.

Virulentas.

2- agosto-2012 13.5x10⁶ amibas en un pellet de 120 μl .

8- octubre-2012 40.5x10⁶ amibas en un pellet de 310 μl .

No Virulentas.

2- agosto-2012 18x10⁶ amibas en un pellet de 130 μl .

8- octubre-2012 62.8x10⁶ amibas en un pellet de 400 μl .

Recién recuperadas de hígado.

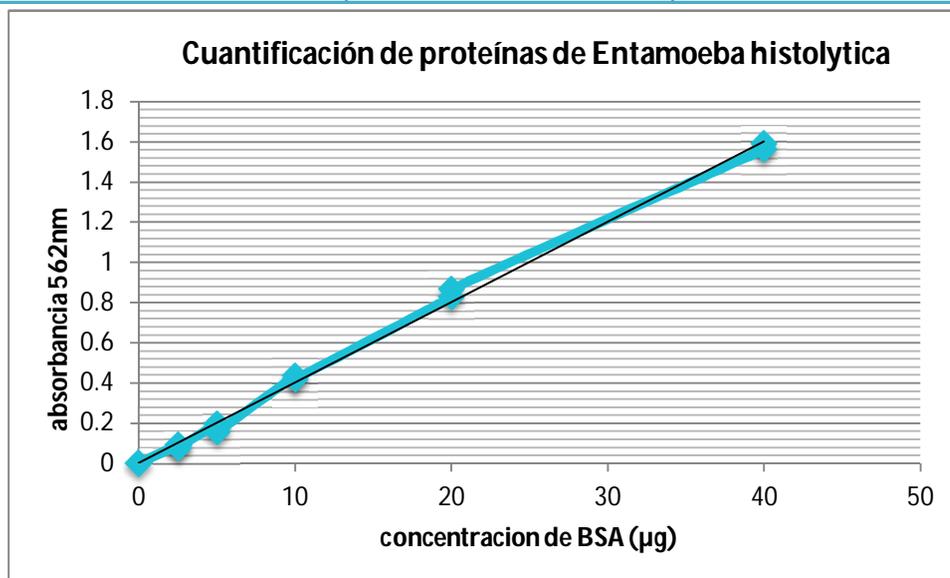
22- agosto-2012 38.5x10⁶ amibas en un pellet de 160 μl .

11- octubre-2012 20.5x10⁶ amibas en un pellet de 130 μl .

7-febrero-2013 15x10⁶ amibas en un pellet de 55 μl .

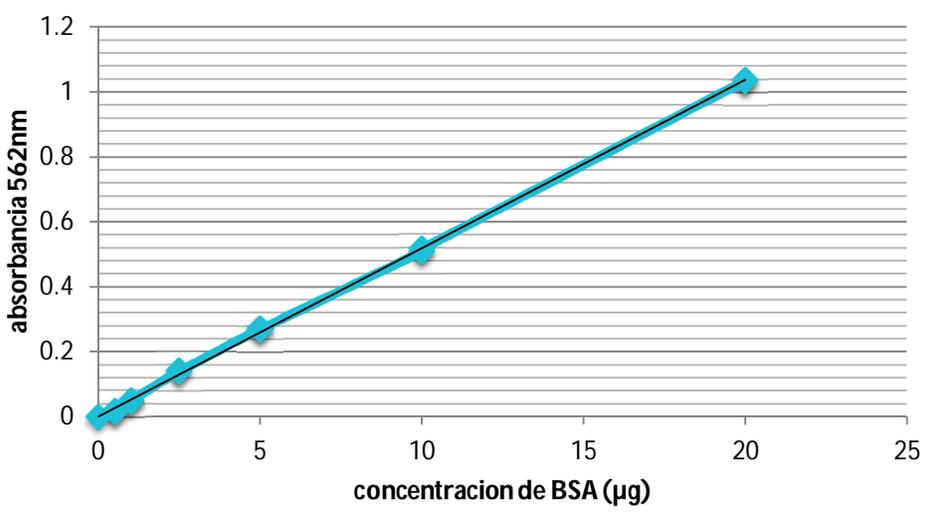
1-Mayo-2013. 65.05 x10⁶amibas en un pellet de 100 μl .

28-ago-12		
concentración de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	absorbancia (562nm)	
0	0	
2.5	0.09	
2.5	0.079	
5	0.193	
5	0.158	
10	0.435	
10	0.42	
20	0.829	
20	0.867	
40	1.563	
40	1.59	
m	0.039965992	
b	0.002661017	
r²	0.998388861	
muestra	absorbancia (562nm)	concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
virulenta	0.501	12469.07568
no virulenta	0.624	15546.69224
hígado	0.84	20951.28718



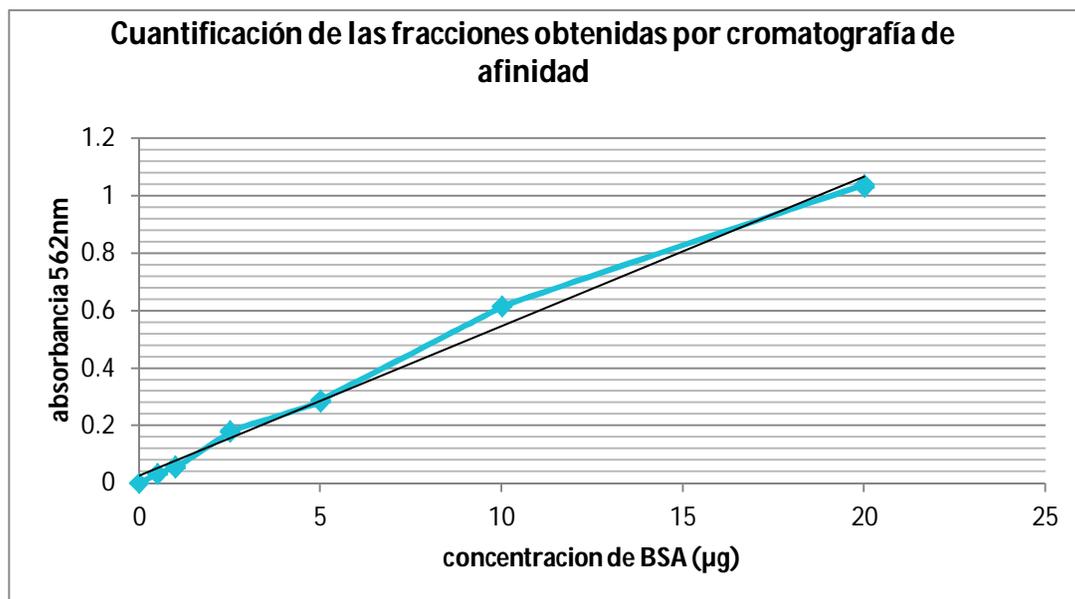
03-may-13		
concentración de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	absorbancia (562nm)	
0	0	
0.5	0.017	
0.5	0.015	
1	0.047	
1	0.049	
2.5	0.141	
2.5	0.139	
5	0.271	
5	0.269	
10	0.508	
10	0.516	
20	1.035	
20	1.038	
m	0.051829146	
b	0.000178972	
r	0.999749964	
muestra	absorbancia	concentración (μg)
hígado	0.283	5456.795096

Cuantificación de proteínas extraídas de trofozoítos de *E.histolytica* variedad H



03-may-13	Columna1
concentración de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	absorbancia (562nm)
0	0
0.5	0.034
0.5	0.03
1	0.06
1	0.054
2.5	0.178
2.5	0.181
5	0.282
5	0.289
10	0.613
10	0.616
20	1.038
20	1.029
m	0.05210134
b	0.026161191
r²	0.995389875

Fracción	absorbancia (562nm)
1	0.04
2	0.048
3	0.409
4	0.714
5	0.686
6	0.675
7	0.681
8	0.701
9	0.683
10	0.701
11	0.786
12	0.706
13	1.165
14	0.727
15	0.743
16	0.688
solución de elución	0.74



Se eligió la fracción 13, ya que se vio que la solución de elución presentaba una absorbancia, sin contener proteínas, por lo cual el cálculo fue el siguiente:

$$\text{Abs} = \text{fracción 13} - \text{solución de elución} = 1.165 - 0.740 = 0.425$$

Por lo cual, con ayuda de la ecuación $Y = mx + b$, y despejando x obtendremos la concentración de dicha fracción.

$$X = (y - b) / m.$$

Por lo cual, sustituyendo los valores, nos quedaría

$$X = (0.425 - 0.026161191) / 0.05210134 = 7.65\mu\text{g}$$

Pero esto estaba contenido en 20 μl y nosotros tenemos 1000 μl , por lo cual la concentración en ml es de 380 $\mu\text{g/ml}$.

ANEXO 4. SECUENCIACIÓN DEL GLICOCONJUGADO.

La secuenciación se realizó en el IBT/UNAM por el grupo del doctor Cesar V. F. Batista, el cual nos proporcionó una breve reseña del tratamiento que recibió la muestra, el cual consiste en la reducción con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodacetamida y digerida "in gel" con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatografo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) con "splitter" (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher., San Jose, CA) con un sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución (Calmix) de 10 moléculas calibrantes, que permiten determinaciones con exactitudes mejores que 5 ppm (partes por millón). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100% de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1%) en 120 minutos sobre una columna capilar PicoFritProteopep 2C18 75 µm ID x 50 mm (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-InducedDissociation) y HCD (High energyCollisionDissociation) donde solamente los iones con carga 2⁺ y 3⁺ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1⁺, superiores a 4⁺ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizaron de forma dependiente del escaneo total de iones segundo las carga pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (*m/z*), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizada la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 15 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrofotométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI a través de los programas Mascot y ProteinProspector.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Becerril, Marco Antonio.**: Capitulo 1 Historia de la Parasitología. Parasitología Médica. México D.F.: McGraw-hill Interamericana, 2^{da} edicion 2008. 1-6.
2. **Becerril, Marco Antonio.** Capitulo 4 AMEBIASIS. Parasitología Médica. México D.F. McGraw-hill Interamericana, 2^{da} edicion 2008. Pag. 15-21.
3. **Boninski R. C.** *Bioquímica*.: Person Educación.6ta edicion, 1998.
4. **Bredeston L. M., Caffaro C. E., Samuelson J. and Hirschberg C. B.**: Golgi and Endoplasmic Reticulum Functions Take Place in Different Subcellular Compartments of *Entamoeba histolytica*. Boston, Massachusetts. The Journal of Biological Chemistry. 2005. **Vol. 280**. Pp.32168-32176.
5. **Botero David y Retrepo Marcos.**: Capitulo 2 Amibiasis intestinal Parasitosis humanas. Incluyendo animales venenosos y ponzoñosos. Corporacion para Investigaciones Biologiacas, Medellin Colombia, 2012, 5^{ta}.edicion. Pag. 37-77.
6. **Bruchhaus I., Jacobs T., Leippe M. & Tannich E.**:*Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. Mol Microbiol. 1996. **Vol. 22**. Pp.255-263.
7. **Carranza R. P., Santiago M. M. G., Guzmán D. N.E., Vargas V. J., Lozano G. G., Ventura J. J., Balderas R. I., Morán M. J. y Gandolfi A. J.**: Precision-cut hamster liver slices as an ex vivo model to study amoebic liver abscess. Monterey, Nuevo leon. Experimental parasitology. 2010. **Vol. 126**. Pp. 117-125.
8. **Carranza R. P., Santiago M. M. G., Guzmán D. N. E., Vargas V. J., Lozano G. G., Viveros V. E., Ortiz L. R., Morán M. J. y Jay G. A.**: Induction of virulence factor, apoptosis, and cytokines in precision-cut hamster liver slices infected with *Entamoeba histolytica*. Monterey, N.L. Experimental Parasitology. 2012. **Vol. 132**. Pp. 424-433.

9. **Chávez M. B., Espinosa C. M., Castañón G. and Martínez .P. A.:** Ultrastructural Evidence of Smooth Endoplasmic Reticulum and Golgi-Like Elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. México. Archives of Medical Research. 2000. **Vol. 31**. Pp. S165–S167.
10. **CHENG X. J., HUGHES M. A., HUSTON C. D., LOFTUS B., GILCHRIST C., LOCKHART L. A., GHOSH S., MILLER S. V., MANN B. J., PETRI W. A. JR. AND TACHIBANA H.:** Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. Charlottesville, Virginia. Infection and Immunity. 2001. **Vol. 69**. Pp. 5892-5898.
11. **Clark C. G., Alsmark U. C. M., Tazreiter M., Saito-N. Y., Ali V., Marion S., Weber C., Mukherjee C., Bruchhaus I., Tannich E., Leippe M., Sicheritz P. T., Foster P. G., Samuelson J., Noe'l C. J., Hirt R. P., Embley T. M., Gilchrist C. A., Mann B. J. Singh, U., Ackers J. P., Bhattacharya S., Bhattacharya A., Lohia A., Guillén N., Duchene M., Nozaki T. and Hall N.:** *Structure and Content of the Entamoeba histolytica Genome*. Londres. Advances in Parasitology. 2007. **Vol. 65**. Pp. 51-190.
12. **Frederick R. M. and Timothy E. M.:** Endocytic Recycling., New York, New York, USA. Nature Publish Group. 2004. **Vol. 5**. Pp. 121-132.
13. **García R. G., Rodríguez M.A., Ocadiz R., Martínez L. M.C., Arroyo R., González R. y Orozco A. E.:** *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface proteina. México, D.F. Mol. Microbiol. 1999. **Vol. 33**. Pp. 556-568.
14. **Haselbec A., Schickaneder E., Eitz H., and Hösel W.:** Structural Characterization of Glycoprotein Carbohydrate Chains by Using Digoxigenin-Labeled Lectins on Blots. Germany. Analytical Biochemistry. 1990. **Vol. 191**. Pp. 25-30.

15. **Juárez P., Sanchez L. R., Stock R. P., Olvera A., Ramos M. A. and Alagón A.:** Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. México, Cuernavaca, Mor. Mol Biochem Parasitol. 2001. **Vol. 116.** Pp. 223–228.
16. **Leippe M., Andrá J., Nickel R., Tannich E., Hans J. and Eberhard M.:** Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore bacterial cytoplasmic membranes. Hamburg, Germany. Mol Microbiol. 1994. **Vol. 14.** Pp. 895-904.
17. **López M. C., Quiroz. D. A. y Pinilla. A. E.:** Diagnóstico de amebiasis intestinal y extraintestinal. Colombia, Bogotá. Acta Medica Colombiana. 2008. **Vol. 33.** Pp.75-86.
18. **López V. R., Arreuín E. A. R., González C. A., Néquiz A. M., García de Leon M.C., Olivos G. A., López V. D. y Pérez T. R.:** *Entamoeba histolytica*: Expression and localization of Gal/GalNAc lectin in virulent and no-virulent variants from HM1:IMSS strain. México, D.F. Experimental Parasitology. 2010. **Vol. 125.** Pp. 244-250.
19. **Manning C. R., Carbajal E. M. and Meza I.:** Secretory Pathway Activation by Interaction of *Entamoeba histolytica* Trophozoites with Fibronectin. México. Parasitology Today. 2000. **Vol. 31.** Pp. S153–S154.
20. **Martínez P. A.** The biology of *Entamoeba histolytica*. México. D.F. Research Studies Press. 1982. Pag. 1-158.
21. **Matthiesen J., Bär A. K., Bartels A. K., Marien D., Ofori S., Biller L., Tannich E., Lotter H. and Bruchhaus I.:** Overexpression of Specific Cysteine Peptidases Confers Pathogenicity to a Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* Clone. Germany, Hamburg. MBio. 2013. **Vol 4.** Pp. 1-11.

22. **MAZZUCO A., BENCHIMOL M. and DE SOUZA W.:** Endoplasmic Reticulum and Golgi-like Elements in *Entamoeba*. Brazil, Rio de Janeiro. Micron. 1997. **Vol. 28.**Pp. 241-247.
23. **Nozaki T. and Nakada T. K.:** Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Japan. Parasitol. Res. 2006. **Vol. 98.** Pp. 179-183.
24. **Olivos G. A., Saavedra E., Nequiz A. M. y Pérez T. R.:** Amibiasis: Mecanismos moleculares de la patogenicidad de *Entamoeba histolytica*. México. D.F. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 2011. **Vol. 54.** Pp. 10-20.
25. **Pacheco Y. J., Campos R. R., Rojas H. S., Serrano L. J. J., Rivera A. V., Villa T. S., Martínez P. A., Tsutsumi V. y Shibayama M.:** Differential expression of surface glycoconjugates on *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. México. Parasitology International. 2009. **Vol. 58.** Pp. 171-177.
26. **Pacheco Y. J., Rondán Z. A., Shibayama M. y Campos R.R.:** Daño a los hepatocitos por lectina inhibible por D-GALACTOSA/N-Acetil D-GALACTOSAMINA de *Entamoeba histolytica*. México, D.F. Rev. del Centro de Inv. (Mex). 2006. **Vol. 7.** Pp. 13-20.
27. **Perez T. R., Montfort I., Olivos G. A., Ramos E., Nequiz M. y Tello E.:** Amibiasis hepática. México, D.F. Rev. Gastroenterol Mex. 2006. Vol. 71. Pp. 47-68.
28. **Pinilla A. E., López M. C. y Viasus D. F.:** Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. Chile. Rev Med Chile. 2008. **Vol. 136.** Pp. 118-124
29. **Ponce G. F. y Martínez D. R. A.:** Taxonomía y filogenia del género *Entamoeba*. Una revisión histórica. España Madrid. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 2010. **Vol. 69.** 5-37.
30. **Ralston K. S. and Petri W. A. Jr.** The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? Roberto Docampo. *Essays in Biochemistry*.

Molecular Parasitology. Londo.: portland presslimited publishing innovation., 2011.

31. **Ramiro M. H., Morán P. y Ximénez G. Cecilia:** Amibiasis: la enfermedad, su diagnostico y tratamiento. México. D.F. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. 2013. **Vol. 64.** Pp. 26-33.
32. **Ramos M. A., Mercado G. C., Salgado L. M., Sanchez-L. R., Stock R. P., Lizardi P. M. and Alagón A.:** *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. México, Mor Cuernavaca. Mol Biochem Parasitol. 1997. **Vol. 88.** Pp.225-235.
33. **Ruscetti T., Cardelli J. A., Niswonger M. L., and O'Halloran T. J.:** Clathrin Heavy Chain Functions in Sorting and Secretion of Lysosomal Enzymes in *Dictyostelium discoideum*. Lousiana. The Journal of Cell Biology. 1994. **Vol. 126.** pp. 343-352.
34. **Salgado G. y Navarrete J.:** QUIMIOLUMINISCENCIA ELECTROGENERADA DEL LUMINOL USANDO ELECTRODOS DE BAJO COSTO. Santiago, Chile. Quim. Nova. 2006. **Vol. 29.** Pp. 381-384.
35. **Salgado M., Villagómez C. J. C., Rocha R. R., Sabanero L. M., Ramos M. A., Alagón A., López R. E. and Sánchez-L. R.:** *Entamoeba histolytica*: Biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions. México. Experimental Parasitology. 2005. **Vol. 110.** Pp.363–373.
36. **Sánchez L. R.:** El proceso de N-glicosilación de proteínas en *Entamoeba histolytica*. México, Cuernavaca Mor. Revista latinoamericana de Microbiología. 2006. **Vol. 48.** Pp. 70-72.
37. **Sánchez R., Alagón A., and Stock R. P.:** *Entamoeba histolytica*: intracellular distribution of the proteasome. Mexico, Cuernavaca, Morelos. Experimental Parasitology. 2002. **Vol. 102.** Pp. 187-190.

38. **Santi-R. J., Smith S., Weber C., Pineda E., Chau H. C., Saavedra E., Olivos G. A., Rousseau S., Agnés D. M., Yves C. J. and Guillén N.:** Endoplasmic Reticulum Stress-Sensing Mechanism Is Activated in *Entamoeba histolytica* upon Treatment with Nitric Oxide. Francia Paris. PLoS ONE. 2012. **Vol. 7.** Pp. 1-11.
39. **Shibuya N., Goldstein I. J., Van D. E. J. M. and Peaumans W. J.:** Binding Properties of a Mannose-specific Lectin from the Snowdrop (*Galanthus nivalis*) Bulb. Michigan. The Journal of Biological Chemistry. 1987. **Vol. 263.** Pp. 728-734.
40. **Stanley S. L. Jr., Tian K., Koester J. P. and Li.E.:** The Serine-rich *Entamoeba histolytica* Protein Is a Phosphorylated Membrane Protein Containing O-Linked Terminal N-Acetylglucosamine Residues. St. Louis, Missouri. The Journal of Biological and Molecular Biology. 1995. **Vol. 270.** Pp. 4121-4126.
41. **Talamás R. P., Hernández V. I. and Rosales E. J. L.:** A $\beta 1$ integrin-like molecule in *Entamoeba histolytica*. México. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1994. **Vol. 88.** Pp. 596–599.
42. **Taylor Maureen E. and Drickamer Kurt.** *Introduction to Glycobiology.* Oxford New York. OXFORD UNIVERSITY PRESS. 2^{da} edición. 2011.
43. **Teixeira J. E. & Huston. C. D.:** Participation of the Serine-Rich *Entamoeba histolytica* Protein in Amebic Phagocytosis of Apoptotic Host Cells. Burlington. Infection and Immunity. 2007. **Vol. 76.** Pp.959-966.
44. **Trejo S. J. y Castaño O. J. C.:** Virulence Factors of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Colombia. Revista Infectio. 2009. **Vol. 13.** Pp. 100-110.
45. **Tsutsumi V and Shibayama M.:** Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. México, D.F. Arch Med Res. 2006. **Vol. 37.** Pp. 210-220.
46. **Vaithilingam A., Teixeira J. E. and Huston C. D.:** Endoplasmic reticulum continuity in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica.*, Burlington, Vermont. Communicative & Integrative Biology. 2008. **Vol. 1.** Pp. 172-174.

47. **Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi C. R., Hart G. W. and Etzler M. E.:** *Essentials of Glycobiology*. United States of American. : Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2009.
48. **Voigt H. and Guillén N.:** New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. Paris, Francia. Cellular Microbiology. 1999. **Vol. 1.** Pp 195-203.
49. **Ximénez C., Cerritos R., Rojas L., Dolabella S., Morán P., Shibayama M., González E., Valadez A., Hernández E., Valenzuela O., Limón A., Partida O. y Silva F. E.:** Human Amebiasis: Breaking the Paradigm. México, D.F. International Journal of Enviromental Research and Public Health. 2010. **Vol. 7.** Pp. 1105-1120
50. **Ximénez C., Morán P., Ramos F. y Ramiro M.:** Amibiais intestinal: estado actual del conocimiento. México, D.F. Medicina Interna de México. 2007. **Vol. 23.** Pp. 398-407
51. **Ximénez G. C., Morán P. y Ramiro M.:** ¿Es la amibiasis un problema de salud pública?. México, D.F. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. 2013. **Vol. 64.** 16-25.
52. **Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A. y Gómez A.:** Reassessment of the epidemiology of amebiasis. México, D.F. Infeccctions. Genetics an Evolution. 2009. **Vol. 9.** Pp. 1023-1032
53. **Zaman Viqar.** Atlas a color de parasitología clínica. 2da edicion. Editorial medica panamericana. 1988. Pag. 15-49.
54. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>
55. Gene bank <http://www.rcsb.org>