



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

T E S I S

**Evaluación de la lipopéptidofosfoglicana (LPPG)
de *Entamoeba histolytica* en la generación de
anticuerpos protectores contra el absceso
hepático amibiano**

Que para obtener el Título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
García de la Rosa María Teresa



Directora de tesis: Dra. Martha Martínez Salazar
Asesora: Mtra. Yolanda Flores Cabrera

CIUDAD DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI a cargo del Dr. Armando Isibasi Araujo.

La ponente recibió una beca correspondiente al programa de Ayudantes de Investigador Nacional Nivel III o Emérito del SNI por parte de CONACYT con el número de expediente de investigador 1971 y con el número de expediente de la ayudante 12954.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi Araujo por ser una persona clave en mi desarrollo académico, por el tiempo dedicado y por brindarme la oportunidad de ser parte de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica que está a su cargo.

A mi directora de tesis, la Dra. Martha Martínez Salazar, por los conocimientos transmitidos y la paciencia para la realización de éste trabajo.

A mi asesora de tesis, la Mtra. Yolanda Flores Cabrera, por aceptar ser parte de éste proyecto y brindarme su apoyo para cumplir una meta personal.

A mis profesores de la carrera que fueron un impulso en más de una ocasión durante mi paso por la Facultad y en especial a mis sinodales por tomarse el tiempo para revisar dicho trabajo.

Al Dr. Alfonso Olivos y al Biol. Mario Nequiz de hospital General, por su colaboración al otorgarnos la cepa de *Entamoeba histolytica* y las observaciones histológicas.

A los responsables del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM ubicado en Hospital General. El Sr. Ricardo Vargas, el MVZ. Daniel Sánchez y el Biol. Guillermo Ramos por su apoyo en los experimentos relacionados con el manejo de animales.

A Dafne Baltazar Sandoval por su apoyo con el procesamiento de las biopsias para la obtención de los cortes histológicos, pero sobre todo por su amistad.

A los integrantes de la UIMEO: Ceci, Rubí y Karla y sobre todo al Dr. Salvador Vázquez Vega por su colaboración y apoyo a lo largo de éste trabajo y a la M en C. Patricia Sánchez por su ayuda para la obtención de las imágenes digitales.

A mis compañeros de la UIMIQ: Oscar, Alex, Rubí y Laura por todas las enseñanzas, el apoyo, su tiempo y los momentos gratos y complicados.

DEDICATORIAS

A mis padres primeramente por darme la oportunidad de ser parte de este mundo y porque a pesar de todo me han brindado su apoyo y confianza principalmente para que esta última etapa de mi carrera pudiera llegar a su fin. Los quiero mucho.

A mi hermano por haberme impulsado a ser alguien en la vida, capaz de lograr mis propios objetivos y aunque no siempre me lo demostrases de la mejor manera aprendí mucho de ti principalmente al inicio de este camino, te quiero mucho hermano.

A mi tía Ercilia y mi tío Miguel, dos personas esenciales en muchas etapas de mi vida, por escucharme, por estar ahí para mí y porque muy probablemente sin su apoyo el día de hoy yo no estaría aquí.

A mi prima Yoltzi por haber sido como una hermana y haber estado conmigo en los momentos más divertidos desde pequeñas y los más complicados también a lo largo de mi vida.

A mis amigos que me acompañaron en diversos momentos y me impulsaron a seguir adelante: Yadira, Mariana, Tania, Erick, Nancy, Araceli, Jorge, Vane, Armando y Víctor.

A mis amigos de la Facultad: Beto, Nash, Karelym, Mariana, Memo, Bianca, Claudia, Elizabeth y Eduardo por todas las aventuras, recuerdos y momentos de estrés que compartimos durante el tiempo que estuvimos juntos.

A mis amigos del Universum: Ale, Silvia, Lola, Luis Roberto y Gabba por ayudarme sobre todo al final para que no me rindiera, por sus palabras en los momentos difíciles, gracias amigos.

A Oscar, integrante de la UIMIQ, por haber formado parte durante toda mi estancia desde que llegue por primera vez a esta unidad de Investigación.

A mis amigos de la UIMIQ: Alex, Rubí y Laura por su ayuda en este recorrido.

A Araceli, secretaria de la UIMIQ, quien me apoyó siempre con mis trámites administrativos.

A Dani por ser mi compañero y estar presente en este camino.

A mi hija Raquel por ser la personita clave de mi vida, por regalarme una sonrisa todos los días y recordarme que hay mucho por que luchar, hacer y aprender a diario. Te amo mi niña.

Todo se puede hacer en esta vida si realmente lo queremos y deseamos con el corazón.

**Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.**

**Un esfuerzo total
es una victoria completa.**

Mahatma Gandhi

Índice

Lista de figuras-----	X
Lista de tablas-----	X
Abreviaturas-----	XII
1. Introducción-----	1
2. Marco teórico-----	2
2.1 Epidemiología-----	2
2.2 Clasificación de amibiasis-----	3
2.3 Tratamiento contra la amibiasis-----	3
2.4 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> -----	4
2.5 Factores de patogenicidad y virulencia de <i>E. histolytica</i> -----	6
2.6 Patrones Moleculares Asociados a Patógenos y su vinculación con los parásitos-----	7
2.7 Características químicas de <i>E. histolytica</i> y la LPPG-----	9
2.8 Respuesta inmune y <i>E. histolytica</i> -----	11
2.8.1 Inmunidad innata-----	12
2.8.2 Inmunidad adaptativa-----	13
2.8.3 Anticuerpos protectores-----	14
3. Planteamiento del problema-----	17

4. Hipótesis-----	17
5. Objetivos-----	18
5.1 General-----	18
5.2 Particulares-----	18
6. Material y métodos-----	19
6.1 Diseño-----	19
6.2 Población-----	19
6.3 Variables-----	19
6.4 Métodos-----	20
6.4.1 Diagrama de flujo-----	20
6.4.2 Preparación de medio de cultivo TYI-S33-----	21
6.4.3 Cultivo axénico de trofozoitos-----	21
6.4.4 Extracción y purificación de LPPG de <i>E. histolytica</i> -----	22
6.4.5 Cuantificación de azúcares reductores-----	23
6.4.6 Cuantificación de proteínas-----	24
6.4.7 Determinación de endotoxina-----	26
6.4.8 Detección de LPPG por SDS-PAGE-----	27
6.4.9 Tinción amoniacal de plata-----	28
6.4.10 Producción de anticuerpo policlonal-----	29
6.4.11 Análisis de la producción de anticuerpos-----	30
6.4.12 Producción de abscesos hepáticos amibianos-----	38
6.4.13 Detección de la formación del AHA-----	38

6.4.14	Cinética de la formación de absceso hepático amibiano para la detección de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> -----	38
6.4.15	Análisis histológico de las biopsias hepáticas-----	39
6.4.16	Inducción de inmunización pasiva-----	45
6.4.17	Evaluación de protección contra el AHA-----	46
6.5	Análisis estadístico-----	46
7	Resultados-----	47
7.1	Cultivo axénico de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> y obtención de LPPG-----	47
7.2	Caracterización de la LPPG-----	47
7.3	Análisis de la identificación de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> mediante un anticuerpo policlonal anti-LPPG-----	49
7.3.1	ELISA -----	50
7.3.2	Inmunofluorescencia -----	51
7.3.3	Citometría de flujo -----	52
7.4	Formación del AHA por trofozoitos de <i>E. histolytica</i> -----	53
7.5	Cinética del desarrollo de los AHA-----	55
7.6	Detección de la presencia de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> en cortes histológicos provenientes de la cinética para la formación del AHA-----	56
7.7	Estandarización de inmunocitoquímica con trofozoitos de <i>E. histolytica</i> para el análisis inmunohistoquímico de las biopsias hepáticas-----	58
7.8	Detección de la presencia de trofozoitos en cortes histológicos de la cinética para la formación del AHA por medio de IHQ-----	58

7.9	Evaluación de la protección contra la formación del AHA generada por inmunización pasiva-----	61
7.10	Análisis histológico de biopsias hepáticas posteriores a la inmunización pasiva -----	63
7.11	Análisis estadístico-----	64
8	Discusión y conclusiones -----	65
9	Perspectivas-----	72
10	Anexos-----	73
11	Referencias-----	82

Lista de figuras

1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.
2. Estructura parcial de la LPPG de *E. histolytica* de la cepa HM1: IMSS, aislada originalmente de un paciente con AHA.
3. Estructura propuesta de EhPIa y EhPIb. La única diferencia entre EhPIs es la acilación del inositol en la posición 2 en el EhPIb.
4. Cultivo axénico de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.
5. Electroforesis en SDS-PAGE al 12% revelada por tinción de plata.
6. Determinación del reconocimiento de LPPG por el antisuero policlonal murino anti-LPPG.
7. Determinación del título de anticuerpos del antisuero policlonal murino anti-LPPG.
8. Resultados de la IFI con diferentes diluciones del antisuero anti-LPPG.
9. Detección por CF de trofozoitos de *E. histolytica* mediante el antisuero policlonal murino anti-LPPG.
10. Identificación de trofozoitos de *E. histolytica* por ICQ.

Lista de tablas

1. Curva patrón de glucosa.
2. Cuantificación de glucosa en muestras de LPPG.
3. Curva patrón de BCA.
4. Cuantificación de proteínas en muestras de LPPG.
5. Curva estándar con *E. coli* O55:B5.
6. Preparación de muestras problema para LAL.

7. Esquema de la placa de ELISA con diluciones seriadas de antígeno y antisuero.
8. Esquema de la placa de ELISA con antígeno constante y diluciones seriadas de antisuero.
9. Esquema de trabajo para citometría de flujo.
10. Esquema de trabajo para la cinética de formación de AHA.
11. Esquema de inmunización pasiva.
12. Desarrollo de la formación del AHA.
13. Detección de la formación de AHA.
14. Tinción de HE, PAS y GG de cortes histológicos de la cinética para formación del AHA.
15. Detección de los trofozoitos por IHQ en los cortes histológicos de la cinética para formación del AHA.
16. Distribución de los grupos de ratones para inmunización pasiva.
17. Evaluación de la protección contra la formación del AHA generada por inmunización pasiva con suero policlonal anti-LPPG.
18. Detección de trofozoitos de *E. histolytica* en biopsias de AHA murinos mediante diferentes tinciones.

Lista de abreviaturas

Abs	Absorbancia
Abs 1	Absorbancia 1
Abs 1 C	Absorbancia 1 corregida (Abs 1 – Abs blanco)
Abs 2	Absorbancia 2
Abs 2 C	Absorbancia 2 corregida (Abs 2 – Abs blanco)
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AHA	Absceso hepático amibiano
AP	Fosfatasa alcalina
BCA	Ácido bicinconínico
Bd	Bidestilada
BSA	Albúmina sérica bovina
CF	Citometría de flujo
DAB	Diaminobencidina
EhPIa	Fragmento a de fosfoinositol de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhPIb	Fragmento b de fosfoinositol de <i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
EU	Unidades de Endotoxina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal/GalNAc	Galactosa/N-Acetil-Galactosamina
GG	Gomori Grocott
GPI	Glicosil fosfoinositol

g	Gramo
h	Hora
HE	Hematoxilina y eosina
HK-9: NIH	Histolytica Korea-9: National Institutes of Health
HM-1: IMSS	Histolytica México-1: Instituto Mexicano del Seguro Social
HRP	Peroxidasa de rábano
hz	Hertz
ICQ	Inmunocitoquímica
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferón-gamma
IH	Intrahepática
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
iny	Inyectable
IV	Intravenosa
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramo
L	Litro
LAL	Lisado de Amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i>
LPG	Lipofosfoglicana

LPPG	Lipopéptidofosfoglicana
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
μL	Microlitro
mL	Mililitro
NaIO ₄	Metaperyodato de sodio
NF-kappa B	Factor de transcripción nuclear kappa B
ng	Nanogramo
NK	Natural killer
nm	Nanómetro
PAMP's	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PBS	Solución buffer de fosfatos
PM	Peso molecular
PRR	Receptor de patrones de reconocimiento
P	Pastilla
rpm	Revoluciones por minuto
Sb	Sobrenadante
SBA	Suero bovino adulto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio
SSF	Solución Salina Fisiológica
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α

1. Introducción

La amibiasis es una enfermedad intestinal causada por el parásito *Entamoeba histolytica*, el cual es capaz de producir desde amibiasis intestinal o extraintestinal hasta absceso hepático amibiano, mortal para los pacientes; a pesar del incremento en las medidas de higiene, continua siendo un problema de salud pública importante alrededor del mundo. Ya que hasta la fecha no se ha encontrado una medida preventiva ni un tratamiento 100% eficaz contra las formas invasivas de amibiasis resulta muy relevante buscar alternativas para erradicar las infecciones por *E. histolytica*.

El sistema inmune innato es capaz de reconocer una amplia variedad de moléculas conservadas y distribuidas en los microorganismos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) los cuales son reconocidos mediante los receptores de patrones de reconocimiento (PRR's) y de los receptores tipo toll (TLR's). *Entamoeba histolytica* presenta en la superficie de su membrana diferentes antígenos reconocidos como PAMP's, uno de los más importantes es la molécula lipopéptidofosfoglicana (LPPG).

La LPPG es reconocida tanto por el sistema inmune innato como por el adaptativo según se ha documentado con diversos trabajos del grupo de investigación del Dr. Isibasi y cols; éstos antecedentes nos permiten suponer que la inoculación de un suero policlonal anti-LPPG en modelo murino será capaz de proteger de la formación de absceso hepático amibiano a través de un procedimiento de inmunización pasiva.

2. Marco teórico

2.1 Epidemiología

La amibiasis es una enfermedad causada por el parásito *Entamoeba histolytica*, protozoo que infecta a los seres humanos y posee tasas de morbilidad y mortalidad importantes, sobre todo en países tropicales, donde su prevalencia va del 50% al 80% mientras que en los países industrializados es solo del 1%. La amibiasis es responsable de 40,000 a 110,000 muertes y aproximadamente 500 millones de personas se infectan en el mundo anualmente.¹ Solo en el 2010 se reportaron 10 millones de casos de disentería y absceso hepático amibiano (AHA) a nivel mundial.²

La amibiasis se clasifica como uno de los padecimientos con tasas de mortalidad más elevadas en el mundo precedida solo por malaria y esquistosomiasis y como causante de parasitosis intestinal es superada únicamente por criptosporidiosis.²

La amibiasis es un problema de salud pública sin resolver, endémica en México y una de las primeras 20 causas de enfermedad. Su epidemiología varía de acuerdo a la zona geográfica y las condiciones sociodemográficas.³

Aunque en los últimos años la incidencia de amibiasis en nuestro país ha disminuido significativamente gracias al incremento en las medidas de higiene y al uso de agentes terapéuticos efectivos,¹ el número de casos de amibiasis intestinal reportados en el 2015 fue de 255,368 (211.04/100,000 habitantes) donde la mayor incidencia se registró en los niños de 1 a 4 años con 47,030 casos.^{3,4} Por otra parte los datos obtenidos de abscesos hepáticos amibianos durante el 2015 fueron de 586 casos (0.48/100 000 habitantes), donde el rango de edad más afectado fue de 25 a 44 años.⁴

2.2 Clasificación de amibiasis

La infección por *Entamoeba histolytica* puede ser sintomática o asintomática y en la mayoría de los individuos predomina la forma asintomática, sin embargo las infecciones sintomáticas son más severas, las formas clínicas de la amibiasis intestinal incluyen: colonización de la mucosa, colitis ulcerosa (la más frecuente) apendicitis amibiana, megacolon tóxico, disentería amibiana fulminante y ameboma de colon. La infección por *E. histolytica* puede diseminarse a través de la vena porta del hígado y provocar absceso hepático amibiano, siendo la forma más frecuente y grave de la amibiasis extraintestinal, aunque también pueden afectarse el pulmón, corazón, cerebro, piel y genitales.^{5,6} La diseminación de un absceso hepático hasta el pericardio es la complicación más peligrosa, la extensión del absceso a pleura es una complicación relativamente frecuente, la peritonitis se produce por perforación de una úlcera del colon o por ruptura de un absceso, el absceso cerebral es una manifestación poco frecuente.

El absceso hepático se caracteriza por un dolor agudo en el hipocondrio derecho y fiebre o bien un dolor subagudo en el que predomina la pérdida de peso y es menos frecuente el dolor abdominal y la fiebre. La probabilidad de que coexistan las manifestaciones extraintestinales y la disentería amibiana es muy poca.⁷

2.3 Tratamiento contra la amibiasis

El tratamiento en caso de amibiasis intestinal asintomática consiste en la administración de amebicidas como el sulfato de paramomicina y el furoato de diloxanida; en caso sintomático o extraintestinal se administra metronidazol y algún amebicida luminal.¹

Aunque el fármaco de elección contra el absceso hepático amibiano y otras formas de amibiasis intestinal graves es el metronidazol, se ha comprobado que éste genera múltiples reacciones secundarias a nivel gastrointestinal, sistema nervioso central y periférico, desórdenes psiquiátricos, trastornos visuales, raramente agranulocitosis, neutropenia, trombocitopenia y altera las pruebas de funcionamiento hepático.⁸ En modelos murinos el metronidazol ha resultado mutagénico y carcinogénico, por otro lado se ha reportado resistencia en *E. histolytica* al metronidazol a una concentración de 1.7 mg/L.⁹

2.4 Ciclo de vida de *E. histolytica*

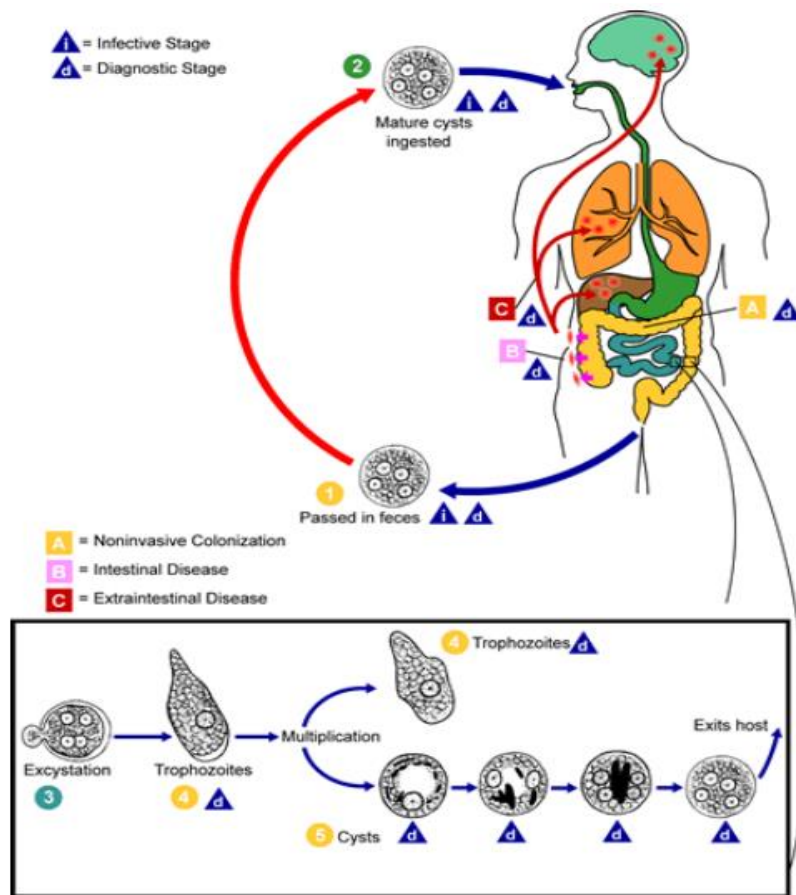
El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica*, su vía de transmisión es fecal-oral y su ciclo de vida consta de dos fases: una quística y otra de trofozoito, el quiste representa la forma infectante, se elimina por medio de las heces contaminando el agua, los alimentos y de esta manera la infección se transmite de persona a persona.⁷

Después de la ingestión de los quistes maduros, estos atraviesan el estómago, donde sobreviven a la acción de los jugos gástricos y a las enzimas hidrolíticas, la ruptura del quiste o desenquistamiento tiene lugar en la región del íleon terminal dando origen a un estado metaquístico conformado por ocho núcleos donde por división citoplásmica se dará origen a ocho trofozoitos, los cuales son móviles, tienen capacidad de migrar, se adhieren e invaden la mucosa intestinal y se multiplican por fisión binaria en el colon. En la luz del intestino los trofozoitos se inmovilizan y se transforman en prequistes que son una forma de quiste joven, es la fase donde adquieren una cubierta de quitina, poseen 1 o 2 núcleos, cuerpos

cromatínicos y vacuolas de glucógeno, en esta parte del ciclo no hay presencia de reproducción ni movimiento, al desaparecer los cuerpos de cromatina, la cubierta de quitina y formarse los 4 núcleos es que se le asigna el nombre de quiste maduro tetranucleado que es la fase infectiva y diagnóstica de la amibiasis.^{7, 10}

En el caso de que los trofozoitos den origen a una invasión intestinal, las adhesinas del parásito son necesarias para lograr la adherencia a las células epiteliales de la mucosa del hospedero.

Los trofozoitos son rápidamente destruidos en el medio ambiente mientras que los quistes pueden permanecer fuera del hospedero semanas e incluso meses dependiendo de las condiciones de humedad; aunque pueden destruirse a temperaturas extremas (-5 °C y 40 °C).⁷



(Division of Parasitic Diseases, 2003)

Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*⁷

2.5 Factores de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica*

La patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para producir daño, al grado de patogenicidad se le conoce como virulencia. Los factores de patogenicidad favorecen la invasión del hospedero causando la enfermedad mediante la evasión de sus defensas.¹¹

E. histolytica es un patógeno poderoso que provoca la lisis, muerte y destrucción del tejido del hospedero a través de varios factores de patogenicidad y virulencia como la adhesión de trofozoitos a las células del hospedero, fagocitosis de células tanto del hospedero como de bacterias, destrucción del tejido por enzimas amibianas, toxinas y poros amibianos (amebaporos).^{6, 12, 13}

La invasión amibiana inicia con la adhesión de los trofozoitos a las células epiteliales del intestino y es mediada por un receptor de tipo lectina presente en la membrana de la célula. Una adhesina de 112 kDa parece ser la responsable de la adherencia en la cepa patógena ya que dicha molécula no se encuentra en las cepas no patógenas. Otras moléculas que también participan en la adhesión de los trofozoitos son: una adhesina de 220 kDa y galactosa/N-Acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) que se une a lectina y es capaz de conferir efecto citotóxico y protección contra el ataque por complemento.^{12, 13, 14, 15}

La fagocitosis es regulada por adhesinas y por vías de señalización de control de la estructura del citoesqueleto y tráfico vesicular.¹²

Los trofozoitos también causan daño a las células del hospedero y la matriz extracelular a través de la acción de amebaporos, que son fosfolipasas amibianas y enzimas proteolíticas (endopeptidasas y proteinasas de cisteína y serina,

proteinasas ácidas y neutras, colagenasas, histolisinas, amebapain y catepsina B).^{1, 6, 13, 15}

Entamoeba histolytica presenta en su superficie de membrana, otras moléculas que representan importantes factores de patogenicidad y virulencia como: el glicolípido lipofosfoglicana (LPG) y el lipopolisacárido de lipopéptidofosfoglicana (LPPG); ya que se ha reportado que cepas no virulentas tienen una expresión reducida de ambas moléculas (LPG y LPPG).^{1, 15, 16} Tanto la LPPG como la LPG constituyen los principales antígenos protectores en la superficie de las cepas patógenas, aunque también se ha encontrado una glicoproteína de 35 kDa; todas estas moléculas se han detectado mediante la producción de anticuerpos en modelos murinos y con anticuerpos presentes en el suero de pacientes con AHA.^{15, 17, 18}

Sin embargo la virulencia de los trofozoitos de *E. histolytica* disminuye gradualmente cuando se cultivan en forma axénica por lo que es necesario reactivar la virulencia a través de la inducción de abscesos hepáticos amibianos en modelos animales como el hámster.¹⁸⁻²⁰

2.6 Patrones Moleculares Asociados a Patógenos y su vinculación con los parásitos

Los patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés "PAMP's") son moléculas altamente conservadas que se encuentran tanto en protozoarios como en helmintos. La lipofosfoglicana (LPG) y la lipopéptidofosfoglicana (LPPG) son esenciales para la supervivencia y virulencia del parásito por lo que se consideran PAMP's; dichas moléculas se hallan ligadas al glicosilfosfatidilinositol (GPI) el cual se encuentra insertado en la membrana plasmática ²¹

La LPG en *Leishmania sp* está involucrada en la adhesión intestinal y la protección contra las hidrolasas presentes en algunos insectos, induce la producción de óxido nítrico y citosinas proinflamatorias por macrófagos en el hospedero, también es un activador de TLR 2 (receptor tipo toll 2) en células NK (natural killer).^{1, 22}

En el *Plasmodium sp* las moléculas ancladas a GPI son requeridas para la inducción de respuesta proinflamatoria que ayuda a promover su patogénesis.¹

En *Trypanosoma cruzi* han sido aisladas de su superficie varias glicoproteínas ancladas a GPI ligadas a mucina con residuos añadidos de ácido siálico que es de vital importancia para su supervivencia e infectividad; el GPI anclado y purificado señala a través de TLR 2 e induce la producción de IL-12 (interleucina-12), TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral alpha) y óxido nítrico por macrófagos murinos.^{1, 22}

En cuanto a *Toxoplasma sp*, la molécula de GPI anclada activa TLR 4 mientras que glicanos y fosfolípidos activan a TLR 2 y TLR 4.¹

En *Schistosoma mansoni* se induce la maduración de células dendríticas por lípidos que contienen lisofosfatidilserina.²²

Como parte fundamental de la molécula de LPPG de *E. histolytica* se encuentra el GPI, el cual está involucrado con la activación de linfocitos.⁵

Actualmente se sabe que la LPPG presente en *E. histolytica* es reconocida a través de TLR 2, TLR 4 y TLR 6 lo cual resulta en la activación de NF- κ B y producción de IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF- α de monocitos humanos; con ello se establece que la LPPG es un PAMP de *E. histolytica* que induce la activación de la inmunidad innata.^{5, 22}

2.7 Características químicas de *Entamoeba histolytica* y la LPPG

Los primeros antígenos de polisacáridos descubiertos en la amiba *E. histolytica* revelaron la presencia de los siguientes carbohidratos: manosa, glucosa, galactosa, glucosamina y galactosamina. Al continuar con la extracción de moléculas polisacáridas de los trofozoitos se demostró la presencia de LPPG.^{20, 23, 24}

La lipopéptidofosfoglicana fue descrita por primera vez por Isibasi y colaboradores en los trofozoitos de la amiba, y se extrajo por el método de fenol-agua modificado por Isibasi.²⁰ Entre las principales características de la LPPG se encuentra su composición química: contiene glucosa, galactosa, manosa, xilosa, fucosa y otros azúcares representando el 85% de la molécula. En cuanto a los residuos de aminoácidos se encontró que los más abundantes son ácido aspártico y ácido glutámico, estando en menor cantidad metionina, tirosina, cisteína e histidina y únicamente como trazas la arginina constituyendo el 8% del total de la molécula, el 2.5% corresponde a los lípidos y el 1% a los fosfatos.^{1, 20, 22, 23, 24}

Debido a que la parte de polisacáridos y la parte lipídica de la molécula de LPPG no se han podido separar adecuadamente se llegó a la conclusión de que tanto los lípidos como los polisacáridos son parte integral del antígeno ya que ambas presentan actividad inmunogénica.²⁴

Se ha logrado esclarecer que la antigenicidad de la molécula de LPPG rica en polisacáridos no se pierde bajo la acción física del calentamiento, congelamiento ni liofilización, soporta los tratamientos enzimáticos y químicos pero su poder antigénico se ve afectado con el tratamiento de NaIO_4 , lo que sugiere una constitución rica en polisacáridos, evidenciando que tanto los azúcares como los lípidos son importantes como determinantes antigénicos.²⁴

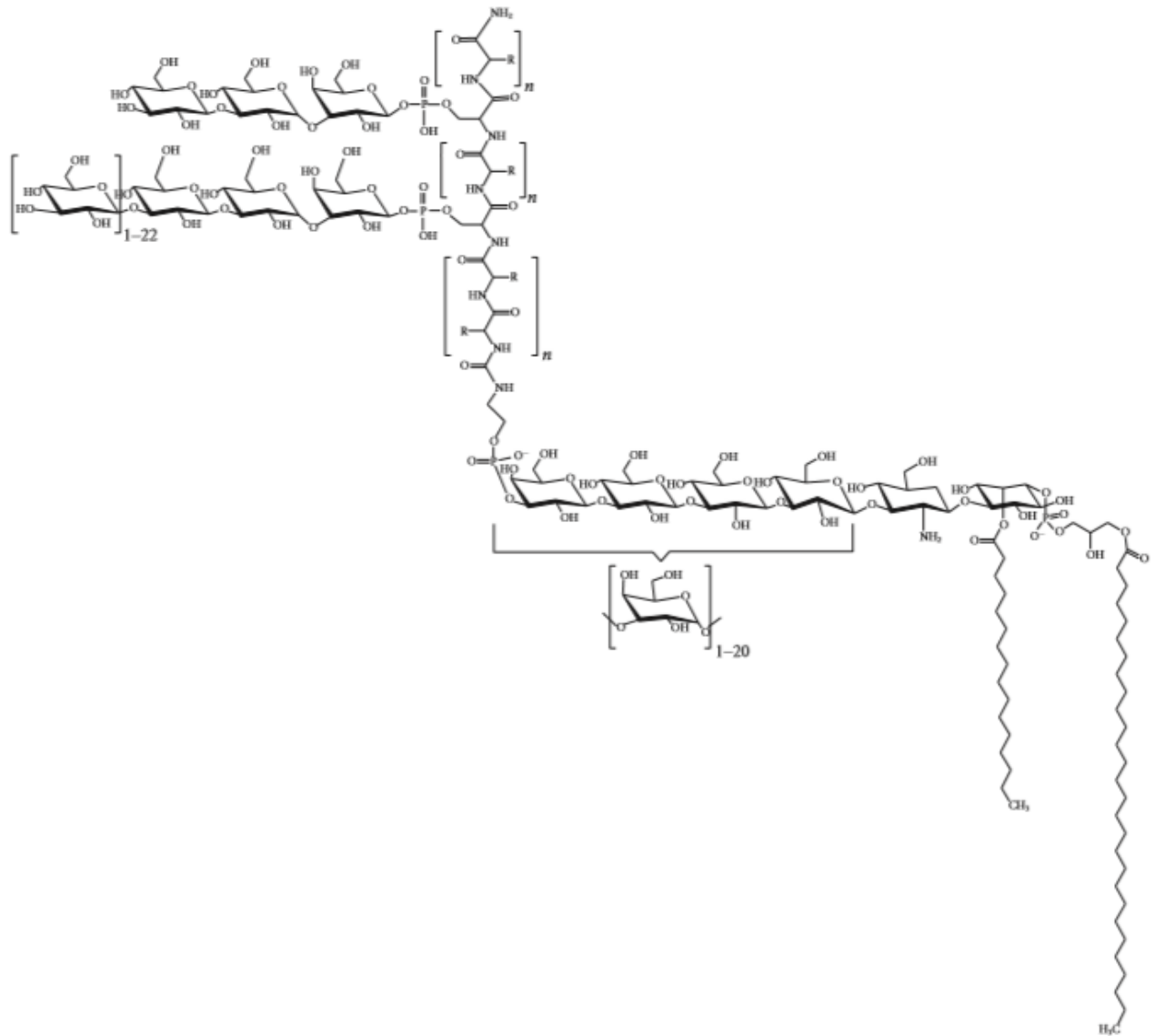


Figura 2. Estructura parcial de la LPPG de *E. histolytica* de la cepa HM1: IMSS, aislada originalmente de un paciente con AHA.¹

Para determinar la composición química más detallada de *E. histolytica* se realizó una escisión por deaminación con ácido nitroso lo que permitió la detección de dos moléculas: EhPIa (fosfatidilinositol de *E. histolytica* fragmento a) y EhPIb (fosfatidilinositol de *E. histolytica* fragmento b), se descubrió que ambas moléculas

se componen de glicerol, inositol y una cadena de ácidos grasos, siendo esta última más larga en el fragmento EhPIb, posteriormente se demostró que la porción activa de la LPPG se encuentra en ese fragmento ya que tiene la capacidad de inducir la producción de INF- γ .⁵

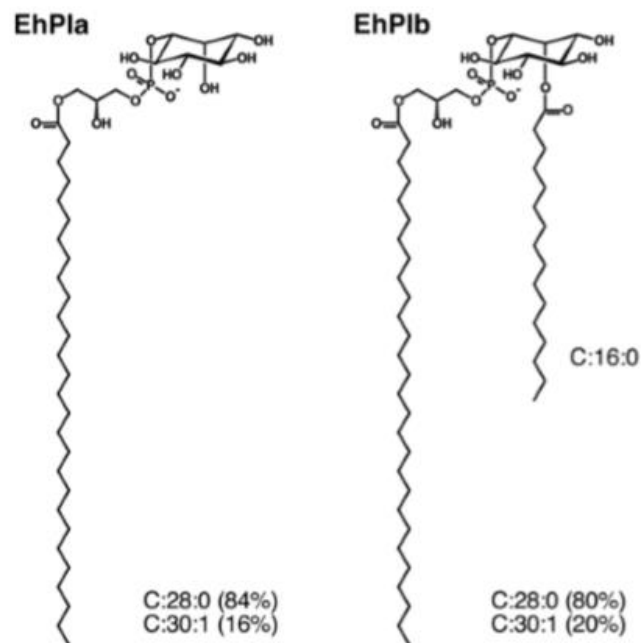


Figura 3. Estructura propuesta de EhPIa y EhPIb. La única diferencia entre EhPIs es la acilación del inositol en la posición 2 en el EhPIb.⁵

2.8 Respuesta inmune y *Entamoeba histolytica*

Inmunidad, significa protección contra patógenos, principalmente enfermedades infecciosas; la inmunidad implica una reacción a sustancias extrañas (microorganismos y macromoléculas como proteínas y polisacáridos) sin que dicha reacción tenga una repercusión fisiológica o patológica.

La respuesta inmune se clasifica en dos grandes ramas; la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.²⁵

2.8.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es el prototipo de la respuesta inmediata cuando se tiene contacto con cualquier agente extraño, no es duradera ni específica para un microorganismo patógeno, es mediada principalmente por macrófagos que son la primera línea de defensa.²⁶

La barrera de defensa más importante contra el parásito *E. histolytica* es la mucosa intestinal.^{25, 27} Los neutrófilos son las primeras células que infiltran las lesiones necróticas causadas por *E. histolytica* en el intestino y el hígado, es ahí donde los neutrófilos también son lisados por los trofozoitos. Las enzimas y especies reactivas de oxígeno producidas por los neutrófilos incrementan el daño provocado por los factores de patogenicidad de la amiba al tejido, estos efectos generan un proceso inflamatorio severo en las células del hospedero.^{19, 28, 29}

Las proteínas, las glicoproteínas y los polisacáridos de diversos agentes patógenos funcionan como antígenos capaces de ser reconocidos por el sistema inmune.²⁶

El sistema inmune del hospedero detecta en primera instancia los antígenos de superficie en la membrana de los trofozoitos de *E. histolytica*.^{15, 17, 24} Uno de estos antígenos es el polisacárido que se encuentra tanto en la cepa de *E. histolytica* HK-9: NIH como en la HM-1: IMSS, el cual es reconocido por el suero de pacientes con amibiasis lo que enfatiza su importancia inmunológica en su relación hospedero-parásito.²⁰

Los antígenos de superficie de los patógenos (PAMP's) son reconocidos mediante receptores de patrones de reconocimiento (PRR's) siendo los principales los tipo toll (TLR's).^{1, 22} La molécula LPPG por encontrarse en la superficie del trofozoito señala a través de TLR 2, TLR 4 y TLR 6; induce la producción de IFN- γ (citocina

que activa macrófagos e incrementa la respuesta citotóxica de las células T) por células NKT's y de algunas otras citocinas como IL-10, IL-12p40.^{5, 22, 30}

2.8.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa constituye una respuesta tardía, es específica por la producción de anticuerpos contra un agente patógeno o sus productos en particular y presenta memoria inmunológica; la inmunidad innata desencadena la inmunidad adaptativa y en conjunto proporcionan un sistema de defensa notoriamente eficaz.²⁶

El grupo de Isibasi y colaboradores ha caracterizado y comprobado que la LPPG genera anticuerpos específicos anti-LPPG analizando el suero de pacientes con amibiasis intestinal, con absceso hepático amibiano así como suero de diversos modelos animales que han sido inmunizados previamente, ello se ha demostrado por medio de inmunofluorescencia indirecta, hemólisis pasiva, inmunodifusión radial y contrainmunolectroforesis.^{16, 20, 23, 24, 27}

Se ha reportado que la respuesta inmune de *E. histolytica* con antígeno total de amiba genera títulos elevados de anticuerpos ante el AHA y escasos ante la amibiasis intestinal.²³ La inoculación de un antígeno amibiano genera una respuesta capaz de involucrar a tres de las inmunoglobulinas: IgA, IgM e IgG mientras que la inmunización sistémica con antígeno amibiano en la mucosa intestinal es útil para conferir inmunidad local anti-amiba.²⁷

La LPPG es una molécula capaz de activar complemento y producir anticuerpos de la clase IgA secretora.^{31, 32} En recién nacidos se ha encontrado protección contra *E. histolytica* sugiriendo la presencia de anticuerpos específicos transmitidos

transplacentariamente y por inmunidad pasiva debido a la presencia de anticuerpos IgA anti-LPPG encontrados en calostro de voluntarias sanas.³³

Tanto la IgA secretora como la IgG inhiben la absorción de antígenos intraluminales, por lo que son importantes en la defensa contra las infecciones por enterobacterias, es probable que en la amibiasis exista un mecanismo similar debido a la presencia de anticuerpos anti-amiba producidos localmente, lo que evitaría la adherencia de los trofozoitos a las células epiteliales y por ende la invasión a la mucosa intestinal.^{14, 27}

La inhibición de la adherencia de los trofozoitos se da por dos mecanismos: uno inespecífico a través de los carbohidratos y otro específico que involucra el sitio activo que reconoce determinantes antigénicos presentes en la superficie de los trofozoitos de *E. histolytica*.¹⁴

Las características inmunológicas de la LPPG nos permiten proponerla como una molécula que potencialmente tendrá la capacidad de proteger a los ratones contra el desarrollo de absceso hepático amibiano.

2.8.3 Anticuerpos protectores

La inmunización, es la administración de un agente a un organismo para generar una respuesta inmune. Si el agente es quien provoca que el organismo monte la respuesta inmune se habla de inmunización activa y el organismo será capaz de responder de nuevo ante dicho agente, por lo que se trata de una respuesta adaptativa; si el propio agente es el que aporta la protección se trata de inmunización pasiva.

El agente empleado para la inmunización activa es un inmunógeno cuyas características son: ser extraño al organismo, tamaño molecular grande, epítomos reconocidos por células T y B, tener carga y ser susceptible al procesamiento y presentación antigénica por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las proteínas suelen ser buenos inmunógenos mientras que los carbohidratos, fosfolípidos, ácidos nucleicos o moléculas pequeñas (haptenos) se pueden usar como inmunógenos unidos a proteínas transportadoras.

En la inmunización pasiva no hay respuesta inmune por parte del organismo y su acción protectora sólo se mantiene mientras el anticuerpo permanece en el organismo, de forma natural es un proceso que ocurre durante el embarazo y la lactancia. La inmunización es la base de las vacunas frente a patógenos.³⁴

Para evaluar la inmunidad protectora conferida por medio de la vacunación se requiere de 3 pasos esenciales: primero desencadenar una respuesta mediante la inmunización estimulando la producción de anticuerpos por la administración de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, productos o derivados de dichos microorganismos, en segundo lugar que tanto los individuos inmunizados como los no inmunizados sean expuestos al agente infeccioso y por último la prevalencia y la gravedad del individuo inmunizado se compara con la evolución de los testigos no inmunizados.²⁶

Se ha descrito el efecto citopatogénico del anticuerpo sobre el trofozoito de *E. histolytica* y la activación de la vía clásica y alterna del complemento por las amibas mediante sistemas *in vitro*, posteriormente se investigó cómo es que sucede en sistemas *in vivo* empleando diversos modelos animales provocándoles lesiones a los hámsters a nivel hepático; histológicamente el daño tisular se caracteriza por el

predominio de los fenómenos inflamatorios y reparadores sobre la necrosis con restos celulares en la periferia, escasas células inflamatorias de tipo agudo y crónico mientras que en el área de necrosis hay proliferación de fibroblastos y ocasionales cúmulos pequeños de histiocitos entre el tejido necrótico y fibroso.^{19, 28, 31, 32}

El papel de la respuesta inmune en la patogénesis de la amibiasis demostró que el suero de pacientes infectados puede neutralizar la virulencia de cultivos de *E. histolytica* y que el suero puede conferir inmunidad pasiva anti-amiba en hámsters.^{31, 35}

3. Planteamiento del problema

Entamoeba histolytica es un protozoo causante de amibiasis intestinal y amibiasis extraintestinal, principalmente absceso hepático amibiano, dicho parásito ha provocado hasta hoy día numerosos decesos alrededor del mundo. No existen procedimientos preventivos que protejan de la infección por *E. histolytica* o que impidan la formación de absceso hepático amibiano en modelos murinos. Por lo anterior, en este proyecto se pretende inducir la protección contra la formación del absceso hepático amibiano a través de la inmunización pasiva con el antisuero policlonal murino anti-LPPG.

4. Hipótesis

La inmunización con un antisuero policlonal anti-LPPG tendrá la capacidad de prevenir la formación de absceso hepático amibiano en modelos murinos inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* en el lóbulo hepático.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Impedir la formación de absceso hepático amibiano en ratones C57BL/6 inmunizados con antisuero policlonal anti-LPPG.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener el cultivo axénico de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.
- Extraer, purificar y caracterizar la molécula de LPPG.
- Producir un antisuero policlonal contra LPPG.
- Analizar la especificidad del antisuero policlonal.
- Administrar por vía intravenosa en ratones C57BL/6 el antisuero policlonal.
- Generar el absceso hepático amibiano con trofozoitos de *E. histolytica* inoculando directamente en el lóbulo hepático de ratones C57BL/6.
- Evaluar la respuesta de los ratones y determinar si hay o no protección contra el absceso hepático.

6. Material y métodos

6.1 Diseño

Experimental y longitudinal.

6.2 Población

25 ratones C57BL/6.

Criterios de inclusión: machos en edad de 6 a 8 semanas.

Criterios de exclusión: ratones que no se observen en condiciones normales (mordidos).

Criterios de eliminación: ratones que durante el experimento mueran o requieran ser sacrificados.

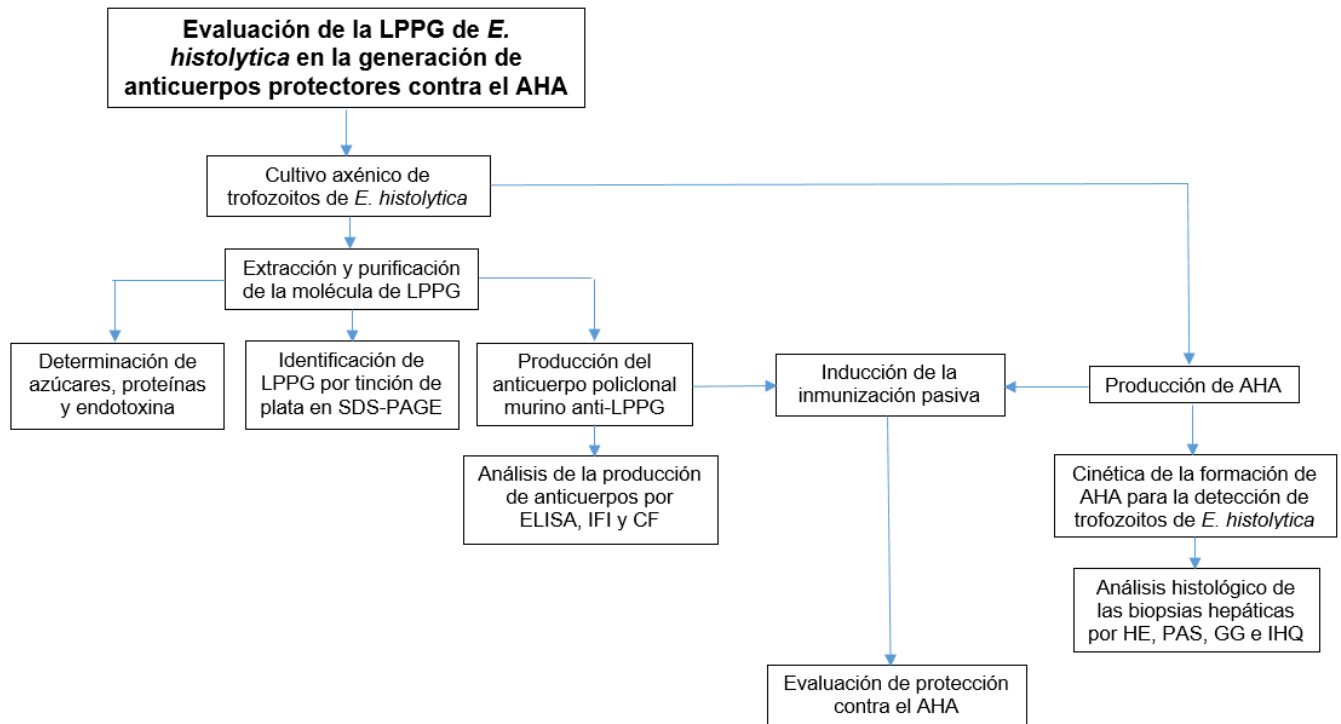
6.3 Variables

Variables independientes: número de ratones, cantidad de amibas administradas, concentración de antisuero administrado.

Variables dependientes: número de abscesos formados.

6.4 Métodos

6.4.1 Diagrama de flujo



6.4.2 Preparación de medio de cultivo TYI-S33

El medio de cultivo TYI se suplementó con suero bovino adulto (SBA) añadiendo por cada 100 mL de medio 10 mL de suero previamente mezclado con vitaminas Diamond, 2 mL por cada 10 mL de suero. Se añadió antibiótico (penicilina más estreptomicina) al 1%.³⁶ Ver anexo 1.

6.4.3 Cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica*

El cultivo axénico de los trofozoitos se llevó a cabo en medio TYI-S33 a una temperatura de 35.5 ± 0.5 °C.^{5, 22} La propagación de los trofozoitos se realizó al obtenerse una confluencia igual o mayor al 85%; se ejecutaron pases en forma de escalamiento (tubos de ensaye a cajas de cultivo de 40 mL, cajas de 80 mL, tubos de vidrio de 150 mL y tubos o cajas de 250 mL), al momento de llegar a la fase logarítmica de crecimiento del cultivo (24 a 72 h) se procedió a realizar la cosecha. Los trofozoitos se colocaron en hielo durante 10 minutos, posteriormente el medio de cultivo se decantó completamente a tubos Falcon de 50 mL que se centrifugaron a 1 500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó y el botón se lavó con PBS, se realizaron 2 ciclos de centrifugación a 1 500 rpm durante 7 minutos, en el último lavado se resuspendió el botón con PBS y se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL, en este paso se contaron los trofozoitos con una cámara de Neubauer y se procedió a centrifugarlos a 1 700 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se pesó la biomasa húmeda, por último se resuspendió el botón en 3 mL de PBS, se registraron los datos del número de trofozoitos y peso de la biomasa. Se conservó a -70 °C hasta su extracción.^{15, 20, 22} Ver anexo 2.

6.4.4 Extracción y purificación de LPPG de *E. histolytica*

A la biomasa húmeda se le efectuó control microbiológico para garantizar su esterilidad en medios LB, Mc Conkey, agar sangre y papa dextrosa.

Se realizó la ruptura de membrana de los trofozoitos mediante 4 ciclos de congelamiento (-70 °C, 30 min) y descongelamiento (37 °C, 30 min), con el fin de garantizar una mejor ruptura se realizaron 3 ciclos de 15 golpes con la ayuda de un homogeneizador; la suspensión obtenida se centrifugó a 430 g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se decantó y ultracentrifugó a 150 000 g durante 1 hora a 4 °C, el botón se resuspendió en PBS y se congeló para su posterior liofilización. El producto seco se pesó para proceder con la extracción.

La extracción de la molécula de LPPG se realizó por el método de fenol-agua modificado por Isibasi: el producto liofilizado se resuspendió en 5 mL de agua inyectable y se pasó a un tubo de teflón al que se le añadieron lentamente 5 mL de fenol al 90% previamente incubado a 68 °C. Se realizaron 3 ciclos de extracción con fenol-agua: se incubó a 68 °C por 30 min con agitación a 200 rpm, se pasó a un baño de hielo durante 30 min y se centrifugó a 11 000 g por 30 min a 4 °C; durante cada una de las extracciones se recuperó cuidadosamente la fase acuosa y se pasó a otro tubo de teflón que al final se centrifugó bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se dializó contra agua inyectable a 4 °C en agitación constante hasta que se encontró libre de fenol, lo que se monitoreo midiendo la absorbancia de fenol en un espectrofotómetro a 285 nm. El dializado se ultracentrifugó a 150 000 g por 2 horas a 4 °C y se congeló a -70 °C.

La fracción de interés de la molécula de LPPG obtenida de pastilla-sobrenadante (P-Sb) se liofilizó y resuspendió en 1 mL de agua inyectable para la determinación posterior de azúcares, proteínas y endotoxina.²⁴ Ver anexo 3.

6.4.5 Cuantificación de azúcares reductores

La determinación de carbohidratos se realizó por el método de antrona en H₂SO₄ concentrado. El fundamento de la detección, es la reacción de los carbohidratos y sacáridos. Los oligosacáridos y polisacáridos por acción del ácido son hidrolizados a monosacáridos por hidrólisis del enlace glicosídico provocando su deshidratación y la consecuente formación de un anillo de tipo furfural, los cuales se condensan con compuestos aromáticos produciendo complejos de color verde con un máximo de absorbancia a 620 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de carbohidratos presentes en la muestra.

La reacción colorimétrica cumple con la ley de Lambert y Beer en el rango de concentración entre 10 y 100 mg/mL de glucosa, cuya sensibilidad se encuentra entre 3 y 5 µg.³⁷⁻³⁹ Ver anexo 4.

La curva patrón de glucosa y de las muestras se realizó por duplicado.

No. tubo	Solución patrón de glucosa (10 mg/mL)			H ₂ O bd (µL)	Antrona (mL)	[] de glucosa (µg/mL)
	0.01 (µL)	0.1 (µL)	1.0 (µL)			
1	x	x	X	500	1.0	0.0
2	250	x	X	250	1.0	5.0
3	x	50	X	450	1.0	10.0
4	x	100	X	400	1.0	20.0
5	x	200	X	300	1.0	40.0
6	x	x	40	460	1.0	80.0

Tabla 1. Curva patrón de glucosa

No tubo	Muestra (µL)	H ₂ O bd (µL)	Antrona (mL)
1	50	450	1.0
2	100	400	1.0

Tabla 2. Cuantificación de glucosa en muestras de LPPG

Los tubos se taparon con canicas y se llevaron a punto de ebullición por 10 minutos a baño María; se midió su absorbancia a 660 nm y se graficó la curva patrón de azúcares reductores para poder calcular la concentración de los mismos en las muestras problema en µg/mL con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de azúcares reductores/mL} = \frac{G \cdot V_s}{V_p \cdot V_m}$$

Donde:

G = µg de azúcares leídos en la curva patrón

V_s = volumen final en mL de la solución patrón

V_p = Volumen final en mL de la muestra problema

V_m = volumen utilizado de la muestra en mL (0.025, 0.05, 0.1 mL)

6.4.6 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron con el kit comercial (BCA protein Assay, Thermo Scientific, USA) con el método de microplaca y el reactivo de ácido bicinconínico.

Su fundamento consiste en la reducción del cobre de Cu⁺² a Cu⁺; el Cu⁺² reacciona ante la presencia de una proteína y un pH alcalino elevado formando el Cu⁺. El Cu⁺² se une a los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico para que posteriormente el ácido bicinconínico quele los iones de Cu⁺ y se forme el complejo

de color púrpura. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la longitud de onda para la detección de éste complejo es de 562 nm, sin embargo se puede leer dentro de un rango de 540 a 590 nm. Es un método con una alta sensibilidad que va de 125 a 2 000 µg/mL; es compatible con detergentes caótrofos y solventes orgánicos, pero no con agentes reductores.

El kit cuenta con dos reactivos: el A y el B; el A contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.1 M de hidróxido de sodio, y el B consta de sulfato cúprico al 4%. La curva patrón de proteínas se realizó según el kit de BCA con albúmina sérica bovina (BSA) que se encuentra a una concentración de 2 mg/mL.⁴⁰⁻⁴²

Pozo	Concentración (µg/mL)	BSA 2 mg/mL (µL)	SSF (µL)
1A	2000	60	0
1B	1500	45	15
1C	1000	30	30
1D	750	22.5	37.5
1E	500	15	45
1F	250	7.5	52.5
1G	125	3.75	56.25
1H	25	0.75	59.25
2A	0	0	60

Tabla 3. Curva patrón de BCA

Pozo	P-Sb dil 1:5 (µL)	SSF (µL)
2B	12	48
2C	12	48

Tabla 4. Cuantificación de proteínas en muestras de LPPG

De cada uno de los puntos de la curva y de las muestras se colocaron 10 μL por duplicado en una placa de poliestireno de 96 pozos y se le añadieron 200 μL de la solución de trabajo (50 partes del reactivo A por 1 parte del reactivo B). La placa se agitó por 30 segundos, se incubó durante 30 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 540 nm.

6.4.7 *Determinación de endotoxina*

La ausencia de contaminación bacteriana (LPS) en las muestras de LPPG se evaluó mediante la cuantificación de endotoxina bacteriana con el método LAL (lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*). Este método utiliza un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) de *L. polyphemus* que en presencia de endotoxinas provoca que ciertos factores presentes en el LAL activen una cascada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico artificial incoloro, tras la escisión se genera paranitroanilina (pNA), colorante amarillo que absorbe a una longitud de onda de 405 nm. A mayor concentración de endotoxina en la muestra más rápido se produce la pNA. La concentración de endotoxina se registra como EU/mL (una unidad de endotoxina equivalente a 0.1 ng de lipopolisacárido). La correlación entre concentración de endotoxina y absorbancia es lineal dentro del intervalo de 0.1 y 1 EU/mL.⁴³⁻⁴⁵

Tanto la curva estándar como las muestras de LPPG se prepararon por triplicado, la mezcla de reacción se incubó a 37 °C.

Estándar	[] EU/mL
Blanco	---
1	0.01
2	0.1
3	1.0
4	10
5	100

Tabla 5. Curva estándar con *E. coli* O55:B5

Muestra	[] (µg/mL)
1	10
2	1

Tabla 6. Preparación de muestras problema para LAL

Los tubos se agitaron en un vórtex durante 1 minuto, posteriormente se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos 100 µL del estándar o de la muestra y se colocó en un lector de placas marca Lonza modelo ELX808LBS con número de serie 252958 y software Winkqcl versión 4.0 en el cual se midió la absorbancia a 405 nm.

6.4.8 Detección de LPPG por SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para poder observar la movilidad del contenido proteico. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Su principio consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel o de algún tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño. Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas debido a su transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una amplia variedad de compuestos químicos.

En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1.4 g SDS/g proteína. La relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas por lo que van a ser separadas en el gel poroso con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.^{46, 47} Ver anexo 5 y 6.

Se preparó un gel separador al 12%, una vez polimerizado se agregó el gel concentrador al 4%, posteriormente se colocó el sistema en la cámara de electroforesis con el buffer de corrida y se recorrió el gel a 90 volts por 15 minutos. De la fracción de interés de LPPG se tomaron 8 μ L, se le añadieron 2.4 μ L de buffer de carga y se desnaturalizó por 5 minutos a 100 °C; la muestra y el marcador de peso molecular se cargaron en el gel. La electroforesis se corrió durante 2 h a 90 volts; una vez completada la electroforesis el gel se sacó del buffer de corrida y se colocó en solución fijadora durante toda la noche para poder continuar con la tinción de plata al día siguiente.

6.4.9 *Tinción amoniaca de plata*

El nitrato de plata tiene la característica de producir una coloración caramelo (café claro) o negro, sin embargo, algunas proteínas tienen colores característicos, como las lipoproteínas que tienden a colorearse azul y algunas glicoproteínas aparecen amarillas, caramelo o rojo. El efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata. Ésta tinción es un método sumamente sensible

para la detección de cantidades mínimas de proteína capaz de revelar concentraciones que van de los 2 a los 5 ng.⁴⁸ Ver anexo 7.

Al día siguiente de haber corrido la electroforesis se prosiguió con la tinción para lo cual se desechó la solución fijadora y se agregó solución nueva durante 90 minutos, se continuó con 2 lavados de 10 minutos cada uno con solución de lavado seguidos de 2 lavados más de 10 minutos cada uno con agua inyectable, se colocó la solución de oxidación por 1 minuto y se hicieron 2 lavados con agua inyectable de 1 minuto cada uno, se adicionó la solución de impregnación por 2 horas y se lavó con agua inyectable por 10 segundos, finalmente se añadió la solución reveladora hasta la obtención de señal con una intensidad adecuada (4 minutos aproximadamente), se detuvo la reacción con solución de paro por 2 minutos y por último se dejó el gel en agua inyectable.

6.4.10 Producción de anticuerpo policlonal

El manejo de animales se hizo con estricto apego a la norma de cuidado y manejo de animales.^{49, 50}

La generación del anticuerpo policlonal se llevó a cabo con 10 ratones Balb/c hembras de 6 a 8 semanas; 3 días antes de comenzar el esquema de inmunización se realizó una sangría de aproximadamente 600 µL por ratón con el fin de obtener suero preinmune.

El esquema de inmunización se realizó con base en la concentración de carbohidratos para poder determinar la cantidad de LPPG necesaria que se debía administrar a cada ratón. Se tomaron 30 µL de la fracción de LPPG cuya concentración fue de 1314.16 µg/mL, se le añadieron 770 µL de SSF para un

volumen total de 800 μ L que se dividió en 4 alícuotas (cada una con 200 μ L), a cada una de esas alícuotas se le agregaron 800 μ L de SSF y 1 000 μ L de adjuvante de Freund (en la primera inmunización se ocupó adjuvante completo de Freund mientras que para la segunda y tercera inmunización se empleó adjuvante incompleto de Freund). La dosis para cada inoculación fue de 160 μ L por ratón, equivalente a una concentración de 1 μ g de azúcares u 87 ng de proteínas.

El día cero del esquema de inmunización se consideró cuando se administró la primera inmunización, el día 27 y 35 se suministró el segundo y tercer reto respectivamente (todas las inoculaciones se administraron por vía intraperitoneal). Por último al día 42 se procedió a la obtención de sangre total de cada uno de los ratones; ¹⁵ todas las muestras sanguíneas obtenidas se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos con la finalidad de separar el suero para posteriormente realizar el análisis de la detección de anticuerpos.

6.4.11 Análisis de la producción de anticuerpos

➤ ELISA

La generación de anticuerpos se analizó por el método de ELISA. Ver anexo 8.

El método de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima) se basa en una reacción antígeno anticuerpo y consta de dos características: 1) tanto los antígenos como los anticuerpos son capaces de ser adsorbidos en una fase sólida sin perder su reactividad inmunológica, y 2) los antígenos y los anticuerpos son capaces de ligarse a una enzima formando un conjugado que en presencia de un sustrato específico produce una reacción colorimétrica identificable con ayuda de un espectrofotómetro, dicho conjugado presenta actividad inmunológica y enzimática

simultáneamente. Existen varios tipos de ELISA, este trabajo se realizó con base en el método indirecto por lo que será el que se explique a continuación.⁵¹⁻⁵³

La primera fase consiste en la unión del antígeno o el anticuerpo a la fase sólida dándose la adsorción de la molécula proteica a la placa de poliestireno.

La segunda fase propicia la unión antígeno-anticuerpo (factores como la temperatura, el pH y la fuerza iónica deben ser controlados).

En la tercera fase el conjugado enzimático puede estar constituido por un antígeno, un anticuerpo o un anti-anticuerpo capaz de unirse covalentemente a una enzima (peroxidasa de rábano).

La cuarta fase es el revelado; la actividad enzimática y la liberación de un producto coloreado evidencian la reacción antígeno-anticuerpo visible y medible mediante espectrofotometría.⁵⁴⁻⁵⁶

La primera prueba de ELISA que se realizó fue para detectar el reconocimiento de la LPPG por los anticuerpos del antisuero policlonal anti-LPPG. Como antígeno se ocupó la alícuota obtenida de la extracción de LPPG de pastilla-sobrenadante a una concentración de 10 µg/mL (según la cuantificación de carbohidratos); para la detección del anticuerpo se utilizó el suero obtenido en el esquema de inmunización y se comenzó con una dilución de 1:100. Los controles negativos incluyeron: suero preinmune obtenido en el esquema de inmunización y en el otro no se adicionó antígeno; para el control positivo se empleó un antígeno de porinas y como anticuerpo su suero respectivo, el cual se había probado previamente.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	[] Ag µg/mL	Diluciones del suero									C neg		C pos
		100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	---	---	---
A	10												
B	5												
C	2.5												
D	1.25												
E	0.625												
F	0.312												
G	0.156												
H	0.078												

Tabla 7. Esquema de la placa de ELISA con diluciones seriadas de antígeno y antisuero

En todos los pozos de la placa se adicionaron 100 µL de buffer de carbonatos excepto en la fila A y la columna 12. El antígeno se preparó en buffer de carbonatos y se colocaron 200 µL en los pozos 1-10 de la fila A y se realizaron diluciones seriadas de 100 µL hasta la fila H. En el pozo 11A se colocaron solamente 100 µL de buffer de carbonatos y en todos los pozos de la columna 12 se colocaron 100 µL de porinas a una concentración constante de 10 µg/mL; la placa se incubó a 37 °C por 1 hora para la fijación del antígeno y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se decantó la solución fijadora y se colocó en toda la placa solución de bloqueo durante 1 h a 37 °C, se realizaron lavados de la placa: 4 lavados con solución de lavado y 2 más con agua destilada, se escurrió y se continuó con la fijación del anticuerpo primario: se adicionaron 200 µL del antisuero anti-LPPG a una dilución 1:100 en toda la columna 1 y se realizaron diluciones seriadas con 100 µL hasta la columna 9; en el pozo 10A se colocaron 200 µL de suero preinmune a una dilución 1:100 y se hicieron diluciones seriadas con 100 µL hasta el pozo 10H. En el pozo 11A se colocaron 200 µL de la dilución 1:100 del mismo antisuero anti-LPPG y se realizaron diluciones seriadas de 100 µL hasta el pozo 11H y en el pozo

12 A se colocaron 195 μL de solución de bloqueo más 5 μL de antisuero anti-porinas (control positivo) y se realizaron diluciones seriadas con 100 μL hasta el pozo 12H, la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora y se procedió a realizar los lavados de la misma manera en que se hizo anteriormente, por último se colocaron en toda la placa 100 μL del anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano) a una dilución 1:4 000 y se incubó a 37 °C por 1 h; se realizaron nuevamente los lavados, el revelado se llevó a cabo con la solución reveladora en oscuridad durante 30 minutos y se paró la reacción añadiendo 10 μL de solución de H_2SO_4 2.5N a toda la placa. Las absorbancias se leyeron a una longitud de onda de 492 nm.

La segunda placa de ELISA se realizó con el mismo antígeno que la placa anterior, pero en esta ocasión la concentración se mantuvo constante (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) considerando los resultados obtenidos en la primera placa. Las diluciones del antisuero se iniciaron en 1:100 y los controles tanto negativos como el positivo se realizaron de la misma manera.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	[] Ag $\mu\text{g}/\text{mL}$	Diluciones del suero									C neg		C pos
		100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	---	---	---
A	1.25												
B	1.25												
C	1.25												
D	1.25												
E	1.25												
F	1.25												
G	1.25												
H	1.25												

Tabla 8. Esquema de la placa de ELISA con antígeno constante y diluciones seriadas de antisuero

➤ Inmunofluorescencia

La fluorescencia es una propiedad de algunas moléculas, que al ser irradiadas con energía electromagnética emiten una radiación característica que puede cuantificarse.

La IF permite identificar microorganismos en muestras clínicas, es capaz de detectar la presencia de un anticuerpo específico en el suero o bien anticuerpos contra antígenos presentes en la superficie de células y tejidos. Ésta técnica consiste en una reacción antígeno-anticuerpo que se hace visible por la incorporación de un anticuerpo fluorescente, usualmente isotiocianato de fluoresceína (FITC) o tetrametil rodamina, una vez que la reacción se ha llevado a cabo se expone a la luz ultravioleta para producir fluorescencia a través de fluorocromos (moléculas capaces de absorber luz a una determinada longitud de onda y emitir otra diferente), sus espectros de excitación y emisión varían según el tipo de fluorocromo ya que su capacidad de absorber fotones de alta energía procedente de la radiación UV o del espectro visible provoca una redistribución de los electrones de las moléculas fluorescentes. Hoy en día es un procedimiento muy utilizado debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad.⁵⁴⁻⁵⁶

Existen dos tipos de inmunofluorescencia, la directa y la indirecta; ésta última consiste en detectar en el suero un anticuerpo específico tras la exposición a un microorganismo, para ello se fijan tejidos o células a un portaobjetos y se tratan con un antisuero anti-antígeno; para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se añade una anti-inmunoglobulina marcada con un fluorocromo. Si el antígeno conocido fijado al portaobjetos aparece fluorescente significa que hay anticuerpos específicos contra el antígeno.^{22, 52, 53.}

La inmunofluorescencia realizada fue de tipo indirecta, se ocupó como anticuerpo primario el antisuero policlonal anti-LPPG para probar la presencia de un reconocimiento específico, como anticuerpo secundario se empleó un conjugado de FITC acoplado a un anti-IgG de ratón en cabra para evidenciar la reacción Ag-Ac. En 3 cajas Petri, se colocó un portaobjetos en cada una, a cada caja se le añadieron aproximadamente 15 mL de medio TYI-S33 y 5 mL de trofozoitos de *E. histolytica* provenientes de un cultivo con una confluencia del 85%, se incubaron a 35 °C durante 48 h con el fin de lograr su adherencia en la laminilla, posteriormente se realizaron dos lavados de los portaobjetos con PBS previamente filtrado y se fijaron los trofozoitos con formaldehído al 4% por 10 minutos. Se colocaron 300 µL del anticuerpo primario de suero anti-LPPG con una dilución 1:50, 1:100 y PBS respectivamente en cada una de las cajas y se dejó incubando en una cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS, se colocó el anticuerpo secundario a una dilución 1:100 en cada una de las laminillas y se incubó durante 2 h, se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a su observación con un microscopio Olympus Provis AX70 y se obtuvieron las imágenes de cada laminilla con una cámara digital Olympus DP70.

➤ Citometría de flujo

La CF es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Entre los parámetros que se pueden medir por CF debido a la conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales, se encuentran las

estructuras de superficie celular y del citoplasma, así como la distribución de determinantes antigénicos y receptores, sitios de unión a lectinas y la identificación de subpoblaciones celulares.

Se fundamenta en la capacidad de los compuestos fluorescentes (fluorocromos) para excitarse al absorber luz y emitirla a una longitud de onda superior; los citómetros son capaces de producir un rayo láser que genera la reflexión y la refracción de la luz que puede incidir sobre las células y poseen distintos detectores: uno que determina el tamaño de la célula por medio de la reflexión, otro que establece la morfología o complejidad celular a través de la refracción y uno o más detectores de luz que recogen la luz emitida por los fluorocromos.^{56, 58}

La suspensión de células pasa por vibración a través de un contenedor en forma alineada de una en una por delante del haz luminoso dispersando la luz debido a su propia densidad y a su emisión fluorescente, las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora.⁵⁶

Los fluorocromos son sustancias que se unen de forma covalente a los anticuerpos sin alterar su unión con el antígeno haciéndose visible la generación de la reacción antígeno-anticuerpo, en la actualidad existe una nueva generación de éstos como Alexa Flúor y dye light flúor que son más fotoestables, brillantes y menos sensibles al pH que otros fluorocromos de excitación y emisión comparable.⁵⁶

Los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* se detectaron por citometría de flujo en presencia de un antisuero policlonal anti-LPPG y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 595 para evidenciar el reconocimiento de los trofozoitos por el anticuerpo policlonal.^{22, 54.}

Los trofozoitos se incubaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, el botón se lavó con PBS y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, el botón se resuspendió en PBS para ajustar la concentración de trofozoitos a 1×10^5 en 50 μL .

Se prepararon 3 diluciones del anticuerpo primario (anti-LPPG) 1:10, 1:100 y 1:200 manteniendo siempre el volumen entre 50 y 60 μL , los tubos se prepararon como se muestra en la tabla 9. Después de añadir el anticuerpo primario todos los tubos se incubaron en hielo por 30 minutos, se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, el sobrenadante se decantó y se añadieron 48 μL de PBS y 2 μL de anticuerpo secundario según el cuadro, se procedió a lavar todos los tubos con 1 mL de PBS, se centrifugó siguiendo las mismas condiciones y se analizó el número de eventos en un citómetro FACSAria versión IIU con el software EuroFlow versión 1.8.

Los primeros 3 tubos corresponden a los controles negativos: el tubo 1 y 2 determinan la inespecificidad del anticuerpo primario y secundario respectivamente y el tubo 3 la autofluorescencia de los trofozoitos.

Tubo	Trofozoitos 1×10^5 50 μL	Anticuerpo 1° Diluciones			Anticuerpo 2°
		1:10	1:100	1:200	
1	---	Si	---	---	---
2	---	---	---	---	Si
3	Si	---	---	---	---
4	Si	Si	---	---	Si
5	Si	---	Si	---	Si
6	Si	---	---	Si	Si

Tabla 9. Esquema de trabajo para citometría de flujo

6.4.12 *Producción de abscesos hepáticos amibianos*

Para generar los abscesos hepáticos se emplearon ratones machos de 6 a 8 semanas de la cepa C57BL/6.

Previo a la cirugía se anestesió a los ratones por vía intraperitoneal con ketamina/xylazine con una dosis de 150 mg/kg de peso y se administraron 260 μ l a cada ratón. La generación del absceso hepático amibiano se realizó mediante una cirugía de laparotomía en la que se inocularon en el lóbulo hepático inferior 1×10^6 trofozoitos de *Entamoeba histolytica* en un volumen de 100 μ L.⁵⁹⁻⁶³

6.4.13 *Detección de la formación del AHA*

Se generaron los abscesos hepáticos amibianos como se especificó en el punto anterior y se realizó un seguimiento de los ratones mediante una cirugía de laparotomía del día 1 al día 4 cada 24 horas para detectar en que momento el absceso presentaba el mayor tamaño.

6.4.14 *Cinética de la formación de abscesos hepáticos amibianos para la detección de trofozoitos de E. histolytica*

La evolución de los AHA generados como se describió en el punto 6.4.11 se evaluó de la siguiente manera: se sacrificó a los ratones en los tiempos especificados en la tabla 10 y se prosiguió con una cirugía de laparotomía con el fin de tomar una biopsia del hígado proveniente del sitio de inoculación o de la región del absceso. Los tejidos se fijaron en una solución de formalina al 10%. Todas las biopsias se identificaron y guardaron por separado en cápsulas de inclusión.⁶⁴

Grupos	Núm. de ratones	Núm. de ratones con inoculación intrahepática 1x10⁶ trofozoitos (100 µL)	Núm. de ratones con SSF intrahepática (100 µL)
6 horas	3	2	1
12horas	3	2	1
24 horas	3	2	1
48 horas	3	2	1
72 horas	3	2	1

Tabla 10. Esquema de trabajo para la cinética de formación de AHA

6.4.15 *Análisis histológico de las biopsias hepáticas*

Las biopsias hepáticas fueron procesadas durante toda la noche en un procesador automático de tejidos 1000 Shandon, el cual consiste en fijar con formol al 10% con buffer a un pH de 7.4, deshidratar con diferentes concentraciones de etanol: 96% (3 cambios), absoluto (4 cambios), aclarar el tejido con xilol (2 cambios) e infiltrar en parafinas (2 cambios); los tejidos permanecieron en cada solución por 1 h, de modo que todo el proceso tardó 12 h. Posteriormente se incluyeron y se realizaron cortes de 3 a 4 µm con un micrótopo Leica RM 2155.

Con el fin de evidenciar la presencia de los trofozoitos en las biopsias y determinar que son los causantes de la formación del absceso hepático amibiano utilizamos diferentes tinciones: HE, PAS, GG e IHQ. Para las tres primeras los cortes se colocaron en laminillas estándar y para la tinción por IHQ se colocaron en laminillas electrocargadas.⁶⁵

Los cortes histológicos para las tinciones de HE, PAS y GG se desparafinaron en la estufa a 45 °C por 40 minutos y se colocaron en xilol durante 2 min dos veces, se hidrataron con etanol a diferentes concentraciones: absoluto, 96% y 70% durante 2

min cada uno y se lavaron con H₂O destilada. Posteriormente se llevaron a cabo las tinciones correspondientes.⁶⁴

➤ Tinción con hematoxilina y eosina

La tinción de HE es la más utilizada y considerada de rutina para la observación de estructuras celulares a través del microscopio óptico. Ésta tinción emplea como primer colorante la hematoxilina: colorante básico y catiónico que posee carga eléctrica positiva, a los colorantes básicos también se les denomina nucleares por tener afinidad hacia los ácidos nucleicos, por lo tanto forma una reacción basófila que tiñe los núcleos de color azul o púrpura. El colorante de contraste es la eosina: colorante sintético ácido y aniónico con carga eléctrica negativa, se le considera un colorante citoplasmático por ser capaz de unirse a las proteínas plasmáticas debido al grupo funcional básico localizado en el extremo de la cadena de aminoácidos, genera una reacción ácida que tiñe los citoplasmas de color rosado.^{64, 66}

La técnica consistió en colocar las laminillas en el colorante de hematoxilina de Harris por 10 min, se lavaron con H₂O destilada por 3 s, se colocaron en agua amoniacal otros 5 s, se lavaron con H₂O destilada por 3 s y se contratiñeron con eosina por 5 s, se lavaron con H₂O destilada por 3 s, se deshidrataron los tejidos empleando las mismas concentraciones de etanol ocupadas en la hidratación y por último se colocaron en 2 cambios con xilol para su aclaramiento. Finalmente se montaron todas las laminillas con resina sintética.^{66, 67}

➤ Tinción con ácido peryódico de Schiff

La tinción de PAS utiliza como colorante la fucsina básica que tiñe la membrana basal conformada de polisacáridos, principalmente glucógeno, mucopolisacáridos y mucina; es capaz de visualizar elementos infecciosos como parásitos y hongos por su contenido rico en polisacáridos. El ácido peryódico oxida las uniones carbono-carbono de los carbohidratos, los grupos hidroxilo y amino primarios o secundarios se convierten en dialdehídos capaces de reaccionar con el reactivo de Schiff, responsable de la coloración rosa-púrpura provocada por la unión de leucofucsina con dialdehídos, los núcleos se contrastan tiñéndolos con hematoxilina.⁶⁸

El método consiste en colocar las preparaciones en ácido peryódico por 5 min, lavar con H₂O destilada, añadir el colorante de Schiff por 20 min, virar con H₂O destilada caliente por 5 min y se contratiñeron con hematoxilina de Harris por 5 min, se lavaron con H₂O destilada y se pasaron por alcohol ácido al 1%, se colocaron en agua amoniacal por 3 segundos y se volvieron a lavar con H₂O destilada; se llevó a cabo desde la hidratación hasta el montaje de igual manera que en la tinción de HE.^{64, 67, 68}

➤ Tinción de Gomori-Grocott

La tinción de GG se emplea principalmente para la tinción de hongos por presentar una pared celular rica en polisacáridos, sin embargo se decidió emplear esta tinción por que los trofozoitos también están constituidos de polisacáridos en su membrana celular. El ácido crómico oxida los polisacáridos transformándolos en aldehídos, los cuales son reducidos por los iones de plata, en presencia de soluciones alcalinas forman plata metálica con los grupos aldehído, lo cual permite la examinación visual

de los polisacáridos; el cloruro de oro funciona para dar tonalidad a los cortes, además de que deposita el oro en el sitio donde se encuentra la plata reducida y la intensifica por generarse una conjugación, por último el verde claro brillante funciona como contraste y pronuncia aún más los organismos de tinción positiva.⁶⁹ La técnica de tinción consistió en colocar las laminillas 1 h en ácido crómico, se lavaron con H₂O destilada, se dejaron 1 min en bisulfito de sodio y se introdujeron en la solución de plata de Grocott de 30 a 40 min a 45 °C en la estufa, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se enjuagaron nuevamente con H₂O destilada y se colocaron en cloruro de oro por 30 segundos, se pasaron por tiosulfato de sodio con baños y se enjuagaron con H₂O destilada, se contratiñeron con verde claro brillante por 5 min y se procedió con la deshidratación y el montaje como en las tinciones anteriores.⁶⁷

➤ Tinción por inmunohistoquímica

La IHQ corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que utiliza la reacción antígeno-anticuerpo para evidenciar una variedad de antígenos utilizando anticuerpos marcados que asocian la visualización microscópica de detalles tisulares y celulares con la detección de moléculas concretas.⁷⁰

La técnica de inmunohistoquímica o inmunocitoquímica puede emplear diferentes marcajes; en éste trabajo se abordará la metodología inmunoenzimática en la cual el estudio histopatológico o citológico emplea un anticuerpo secundario específico previamente marcado con una enzima que puede transformarse en un sustrato visible capaz de unirse al anticuerpo primario específico para un antígeno presente en la célula o el tejido. El reactivo de diaminobencidina que contiene H₂O₂ reacciona

con la peroxidasa de rábano que se encuentra acoplada al anticuerpo secundario y al haber una reacción Ag-Ac se forma un precipitado de color marrón que evidencia dicha unión.

La IHQ permite el estudio de tejidos procedentes de biopsias, autopsias o material citológico, existen diversas técnicas dependiendo del tipo de anticuerpo: mono o policlonal; de la muestra: fijada, congelada o fresca; y la localización del antígeno: superficie, nuclear o membrana citoplasmática.

Las muestras que presentan antígenos de superficie o receptores nucleares se recomiendan congelarlas o fijarlas brevemente con acetona, cloroformo o una mezcla de estos. La fijación debe ser rápida para evitar la autólisis, se puede retrasar el proceso exponiendo el tejido a una temperatura de 4 °C o colocando la muestra en soluciones conservadoras.⁷⁰⁻⁷³

La técnica para los tejidos incluidos en parafina es la siguiente: desparafinación seguida de hidratación, exposición antigénica o recuperación antigénica con un pretratamiento con solución recuperadora (DIVA: solución buffer que es inducida por calor para la recuperación de antígenos embebidos en parafina y fijados en formalina, la finalidad de calentar los cortes histológicos es para restaurar la conformación del antígeno, se emplea a una dilución 1:10),⁷⁴ posteriormente se bloquea la actividad enzimática endógena con H₂O₂ al 0.9%, se adiciona el anticuerpo primario (en este trabajo se empleó el anticuerpo policlonal anti-LPPG a dilución 1:50), se lava y adiciona el anticuerpo secundario (MACH 2 double stain 2: conjugado cabra anti-ratón ligado al polímero de peroxidasa de rábano (HRP) y el conjugado cabra anti-conejo ligado al polímero de fosfatasa alcalina (AP), ambos son anticuerpos secundarios que reaccionan con las cadenas pesadas y ligeras de

las IgG en ratón y conejo respectivamente),⁷⁵ por último el revelado de la reacción se realiza por medio de un cromógeno para diferenciar entre las áreas tisulares inmunoteñidas de las que no se tiñeron (cromógeno DAB: 3,3'-diaminobenzidina y DAB buffer sustrato: buffer HCl-Imidazol pH 7.5, contiene H₂O₂ y un agente antimicrobiano; se utiliza a una dilución 1:20),⁷⁶ contratinción con hematoxilina, deshidratación y montaje con resina sintética.^{64, 70}

La técnica para IHQ se estandarizó previamente con la tinción de trofozoitos de *E. histolytica* para después trabajar los tejidos de biopsias hepáticas.

Los trofozoitos se colocaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min a 4 °C, el botón se resuspendió en 5 mL de PBS y se centrifugó bajo las mismas condiciones, se volvió a resuspender el botón con 1.5 ml de PBS y se transfirió a un tubo eppendorf el cual se centrifugó a 2 500 rpm por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y se añadieron 500 µL de solución encapsuladora.

En cada extremo de la laminilla electrocargada se colocaron 50 µL de la suspensión de trofozoitos. La laminilla se secó en la estufa a una temperatura de 37 °C por aproximadamente 5 min, se introdujo en acetona fría y bajo refrigeración por 10 min, se prosiguió con la hidratación pasando el portaobjetos por etanol al 90%, 70%, 50% y H₂O destilada por 5 min en cada cambio. La laminilla se colocó en un vaso coplin con solución recuperadora y se calentó en olla de presión por 20 min a 120 °C, se enfrió hasta llegar a temperatura ambiente, se lavó 2 veces con H₂O destilada por 5 min y se añadió H₂O₂ al 0.9% por 5 min, se lavó nuevamente 2 veces con H₂O destilada por 5 min y se añadieron 100 µL del anticuerpo primario por 24 h a 4 °C en cámara húmeda; se realizaron 5 lavados con PBS de 5 min cada uno y se agregaron 100 µL del anticuerpo secundario y se incubaron por 45 min a

temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavó 2 veces con PBS por 5 min y se añadieron 80 µL de solución reveladora. Por último se contratiñó por 1 min, se deshidrató con etanol al 70% y se montó con resina sintética.

Los tejidos procedentes de las biopsias se tiñeron por IHQ; primeramente se desparafinaron las laminillas durante toda la noche a 60 °C, al día siguiente se colocaron en xilol por 10 min, se hidrataron con etanol a diferentes concentraciones de la misma manera como se procesaron los trofozoitos y la técnica se continuó del mismo modo hasta el montaje de la preparación.

Para finalizar se observaron todas las preparaciones con un microscopio óptico y posteriormente se tomaron las imágenes más representativas en un microscopio Olympus Provis AX70 con una cámara digital Olympus DP70.

6.4.16 Inducción de inmunización pasiva

La inmunización pasiva se realizó con el anticuerpo policlonal anti-LPPG administrándolo por vía intravenosa en la vena caudal de los ratones 24 horas antes de generar el absceso hepático amibiano.¹⁵ Se manejaron 6 grupos de ratones.

Grupos	Núm. de ratones	Inmunización pasiva (Anti-LPPG 50 µL)	Inoculación intrahepática 1x10⁶ trofozoitos (100 µL)	SSF 50 µL (IV) 100 µL (IH)
1 Control negativo	3	-----	-----	Sí Sí
2 Control positivo	5	-----	Sí	Sí ----
3	5	Dil 1:10	Sí	----
4	4	Dil 1:50	Sí	----
5	4	Dil 1:100	Sí	----
6	4	Dil 1:400	Sí	----

Tabla 11. Esquema de inmunización pasiva

Después de 24 h de la inoculación del antisuero anti-LPPG se llevó a cabo la inducción de los abscesos hepáticos amibianos mediante la administración de trofozoitos de *E. histolytica* para posteriormente establecer si hay o no protección en los ratones generada por la inmunización pasiva.

6.4.17 Evaluación de protección contra el AHA

La determinación de la formación de abscesos hepáticos amibianos se realizó mediante un seguimiento en los ratones los días 4, 6 y 9 para observar la aparición de lesiones en el hígado.

Los días 4 y 6 se analizaron dos ratones de cada grupo, uno de ellos se sacrificó para obtener una biopsia del absceso o de la región de inoculación y al otro ratón se le mantuvo con vida para observar la evolución del daño hepático. Al día 9 se sacrificaron los dos ratones restantes de cada grupo para la obtención de la biopsia hepática.

Todas las biopsias fueron procesadas como se mencionó en el punto 6.4.13 para la obtención de cortes histológicos los cuales se someterían posteriormente a diversas tinciones con el fin de evidenciar la presencia de trofozoitos de *E. histolytica* y diferencias morfológicas.

6.5 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico descriptivo.⁷⁷

7 Resultados

7.1 Cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica* y obtención de LPPG

Se realizó el cultivo axénico de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1: IMSS. Los trofozoitos se cosecharon al obtener una confluencia mayor al 85%, cada cosecha se congeló hasta recolectar un total de 4 g de biomasa húmeda, equivalente a 1.16×10^8 trofozoitos libres de contaminación. Ver figura 4. Con la biomasa se llevó a cabo la extracción de la molécula de lipopéptidofosfoglicana (LPPG), de la cual se obtuvo la fracción de interés correspondiente a pastilla-sobrenadante (P-Sb) para realizarle posteriormente todas las pruebas de calidad con la finalidad de determinar su pureza y así poder continuar con los experimentos.



Figura 4. Cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica*

7.2 Caracterización de la LPPG

La molécula de LPPG purificada se sometió a las pruebas bioquímicas y de calidad que se detallan a continuación.

La cuantificación de carbohidratos por el método de antrona y de proteínas por el método de BCA establecieron las siguientes concentraciones: 1314.16 $\mu\text{g/mL}$ y 117.857 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, la determinación de endotoxina reportó un valor de 0.01 EU/mL. Ver anexo 8.

Para corroborar la presencia de la LPPG obtenida se realizó un gel de poliacrilamida al 12%, en el carril 1 se cargó el marcador de pesos moleculares y en el carril 2 se cargaron 8 μL de muestra equivalentes a 10.51 μg (concentración con base en la cuantificación de carbohidratos), el corrimiento electroforético se evidenció por medio de la tinción de plata. En el gel se observó el bandeo polidisperso característico de un polisacárido como se ha reportado previamente para la molécula de LPPG con un peso molecular entre 35 y 250 kDa, según se muestra la figura 5.

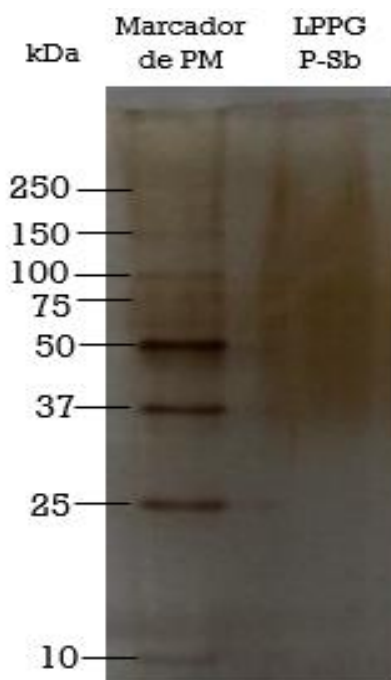


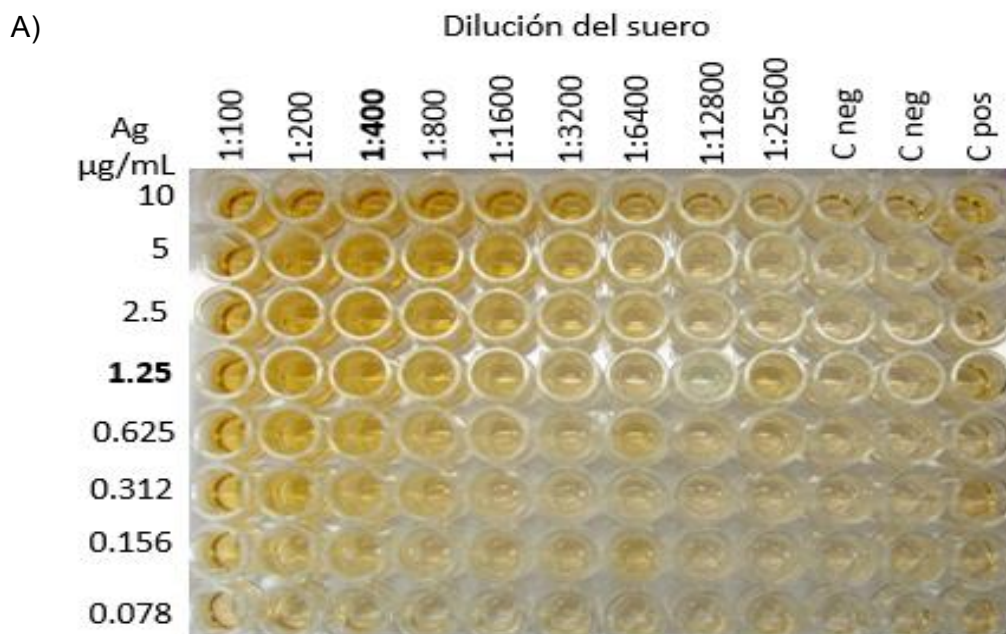
Figura 5. Electroforesis en SDS-PAGE al 12% revelada por tinción de plata. Carril 1: Marcador de PM. Carril 2: Muestra de LPPG de P-Sb (8 μL equivalentes a 10.51 μg según la cuantificación de CHO'S)

7.3 Análisis de la identificación de trofozoitos de *E. histolytica* mediante un anticuerpo policlonal anti-LPPG

Se inocularon 10 ratones Balb/c cada uno con 160 μ L de LPPG equivalentes a 1 μ g de carbohidratos u 87 ng de proteínas para obtener el antisuero policlonal anti-LPPG y ulteriormente analizarlo por los siguientes métodos de inmunodetección: ELISA indirecta, inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. Ver anexo 10.

7.3.1 ELISA

El primer ensayo de ELISA que se realizó fue para evaluar el suero policlonal obtenido a partir de la inmunización con LPPG y determinar la cantidad óptima de antígeno y anticuerpo con el antisuero; se colocaron diluciones seriadas de antígeno y de antisuero comenzando con 10 μ g/mL y una dilución de 1:100 respectivamente. Se determinó que la concentración de antígeno y la dilución del suero anti-LPPG óptimas fueron 1.25 μ g/mL y 1:400 correspondientemente. Ver figura 6.



B) **Diluciones seriadas del antisuero anti-LPPG con diferentes concentraciones de antígeno**

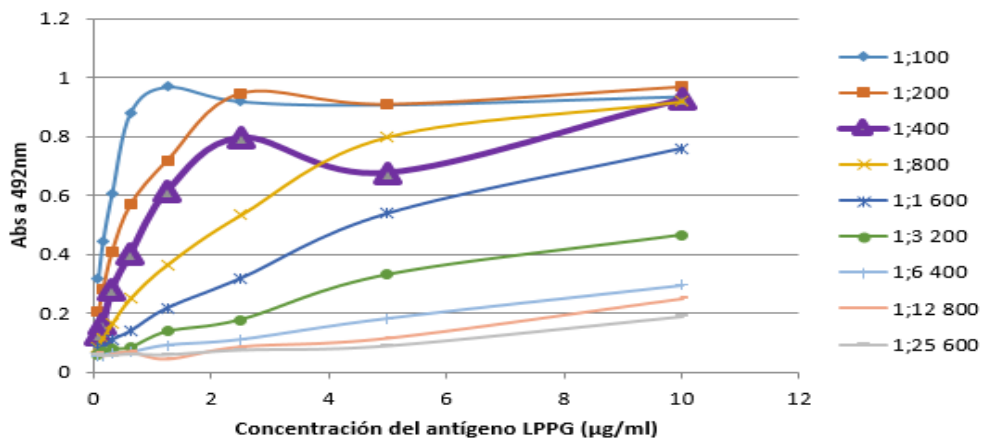


Figura 6. Determinación del reconocimiento de LPPG por el antisuero policlonal murino anti-LPPG. A) Placa de ELISA con dilución seriada de antígeno y de antisuero. B) Representación gráfica de la concentración del antígeno contra la absorbancia de cada una de las diluciones del antisuero.

Posteriormente se realizó un segundo ensayo de ELISA donde se empleó una concentración constante de antígeno (1.25 µg/mL) y las mismas diluciones del suero para corroborar la dilución óptima. Ver figura 7.

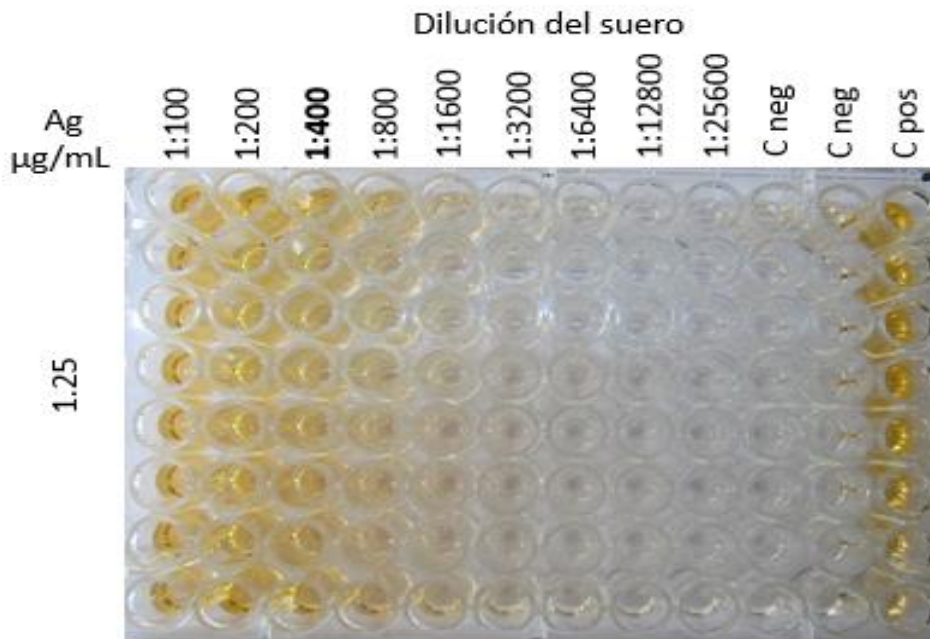


Figura 7. Determinación del título de anticuerpos del antisuero policlonal murino anti-LPPG. Placa de ELISA con una concentración de antígeno de 1.25 µg/mL y diluciones seriadas del antisuero.

7.3.2 Inmunofluorescencia

Para comprobar que el suero policlonal anti-LPPG obtenido en ratones Balb/c reconocía específicamente a los trofozoitos de *E. histolytica* realizamos un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Dicho procedimiento nos permitió observar la fluorescencia en la membrana de los trofozoitos; sitio de la localización de la molécula LPPG cuando los trofozoitos se incubaron con diluciones 1:50 y 1:100 del antisuero policlonal, en el caso del control negativo que se procesó sin antisuero no se observó fluorescencia. Ver figura 8.

Inmunofluorescencia Indirecta

Trofozoitos de *E. histolytica* marcados con el suero anti-LPPG

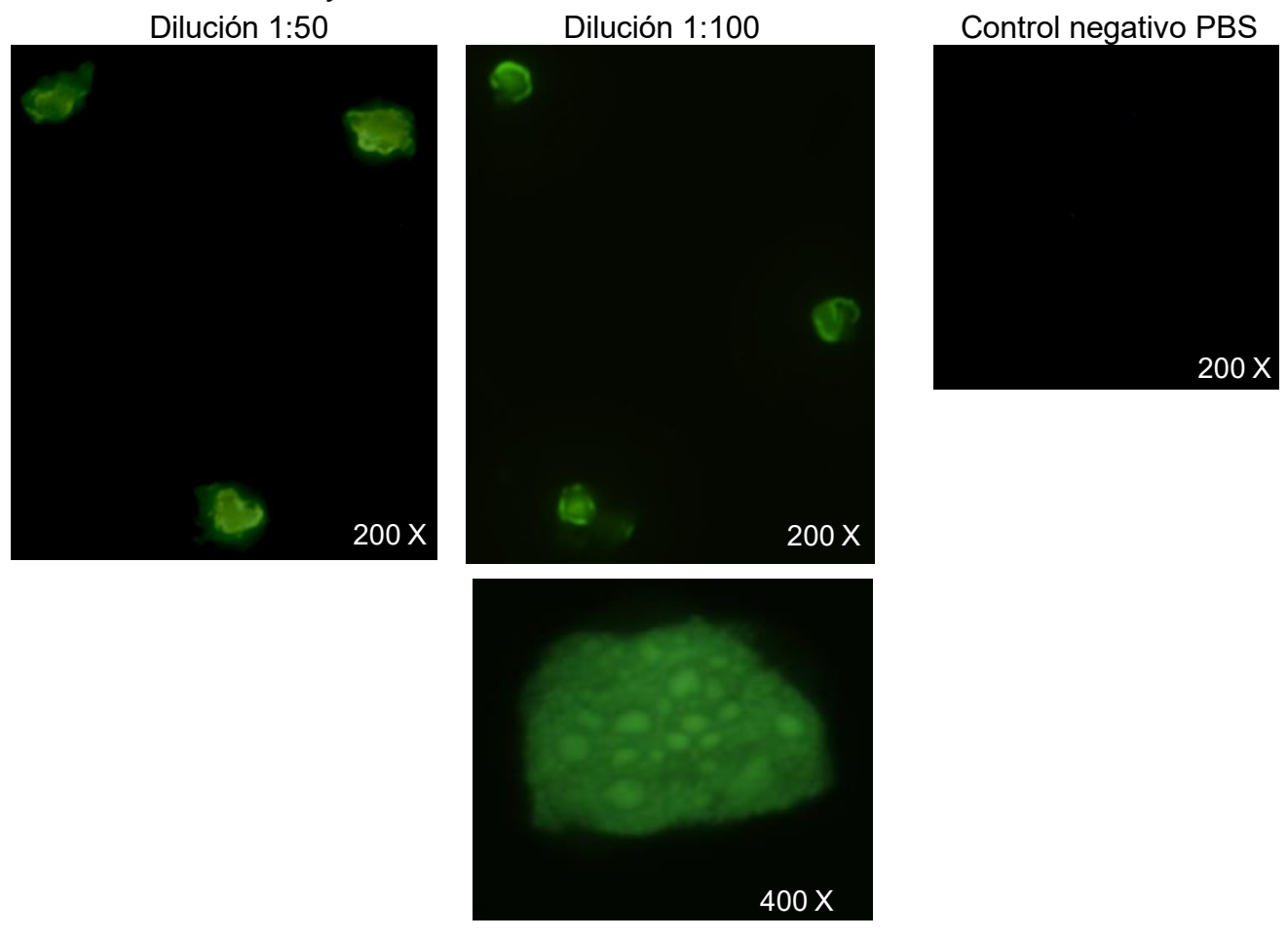


Figura 8. Resultados de la IFI con diferentes diluciones del antisuero anti-LPPG

7.3.3 Citometría de flujo

Otro ensayo que utilizamos para confirmar la presencia de la molécula de LPPG en la membrana de los trofozoitos de *E. histolytica* fue la citometría de flujo empleando el antisuero policlonal anti-LPPG que generamos. Se analizaron al menos 10 000 eventos por muestra correspondiente a cada una de las diluciones del antisuero. En la figura 9 se observa un desplazamiento hacia la derecha donde se encuentran las muestras (trofozoitos, más anticuerpo primario con las diferentes diluciones y anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Rojo Texas), en comparación con los controles negativos. El desplazamiento es más marcado con la dilución 1:10 del antisuero anti-LPPG evidenciando un mayor reconocimiento entre dicho antisuero y los trofozoitos.

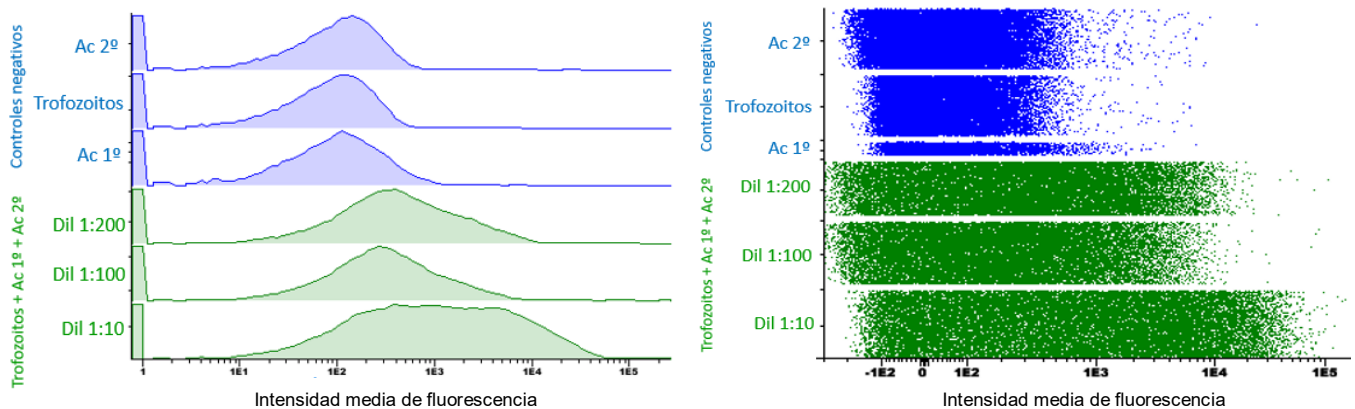


Figura 9. Detección por CF de trofozoitos de *E. histolytica* mediante el antisuero policlonal murino anti-LPPG. A) Representación a través de un histograma del reconocimiento de los trofozoitos con diluciones 1:10, 1:100 y 1:200 del antisuero anti-LPPG. B) Representación por una gráfica de puntos de los trofozoitos y el antisuero anti-LPPG.

7.4 Formación del AHA por trofozoitos de *E. histolytica*

Para generar la formación del AHA se administraron 1×10^6 trofozoitos en el lóbulo hepático de ratones C57BL/6 sacrificando a un animal cada 24 h hasta el momento en que se observó el absceso de mayor tamaño; el análisis de la tabla 12 muestra el desarrollo de los abscesos en días consecutivos donde se puede evidenciar dentro de los círculos de color amarillo que el absceso con mayor desarrollo se dio al cuarto día de la post-inoculación. En los controles negativos únicamente se administró SSF por lo que no muestran formación de AHA.

Formación del AHA

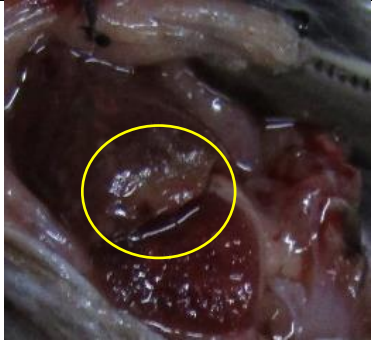

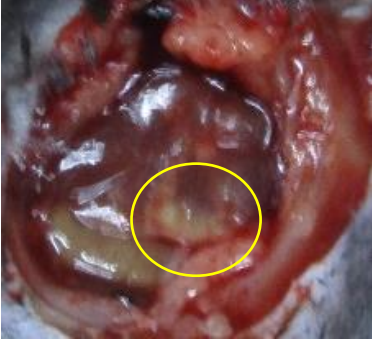


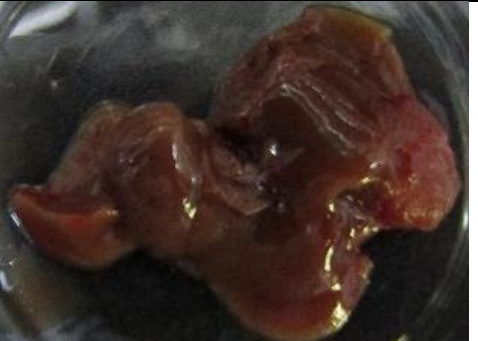


Día	Control positivo	Control negativo
1		
2		
3		
4		

Tabla 12. Desarrollo de la formación del AHA

7.5 Cinética del desarrollo de los AHA

Para detectar la presencia de trofozoitos de *E. histolytica* en las lesiones hepáticas se realizó una cinética para el desarrollo de abscesos hepáticos amebianos.

Formación de abscesos

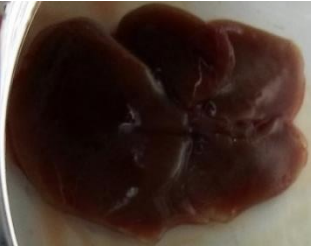

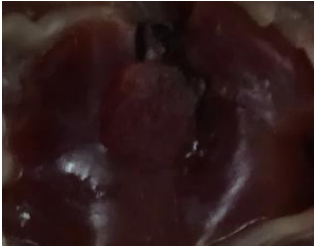










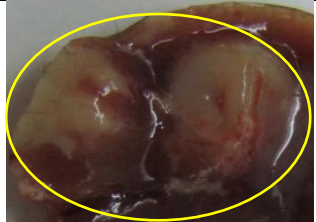
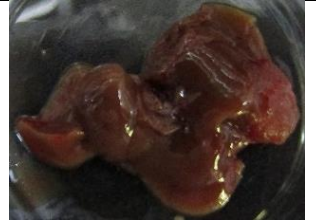
Ratón	Trofozoitos		SSF Control negativo
	1	2	
6 horas			
12 horas			
24 horas			
48 horas			
72 horas			

Tabla 13. Detección de la formación del AHA

7.6 Detección de la presencia de trofozoitos de *E. histolytica* en cortes histológicos provenientes de la cinética para la formación del AHA

Para determinar que *E. histolytica* es la causante de la formación de las lesiones hepáticas después de la administración de 1×10^6 trofozoitos se obtuvieron biopsias del sitio de inoculación y se realizaron los cortes histológicos para posteriormente evidenciarlos mediante tinciones con HE, PAS y GG.

En la tabla 14 se muestran las imágenes donde se puede observar la presencia de los trofozoitos con todas las tinciones desde las 6 horas, sin embargo aunque a las 12 h no se observan trofozoitos se puede apreciar el daño hepático y células inflamatorias, a las 24 se pueden detectar nuevamente trofozoitos y una proliferación importante de células inflamatorias; a las 48 h tampoco se observaron trofozoitos pero a las 72 h se ve un incremento importante tanto de trofozoitos como de células inflamatorias.

Tinción de los cortes histológicos para la cinética de la formación del AHA

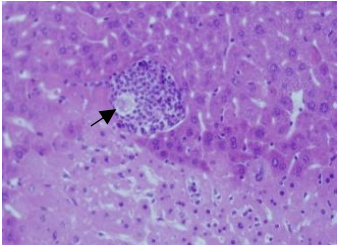
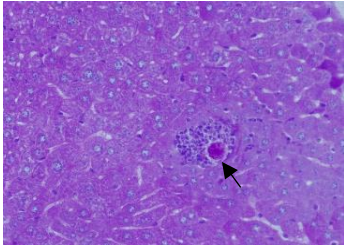

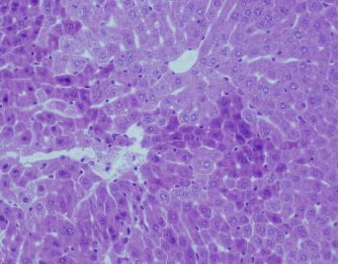
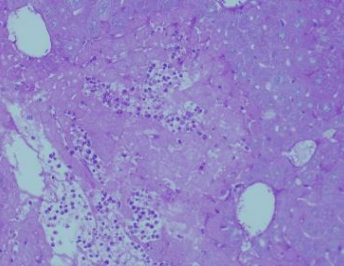
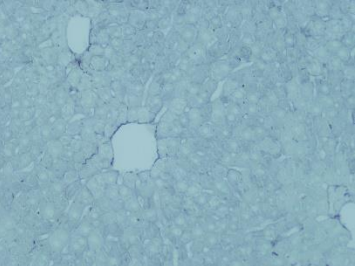
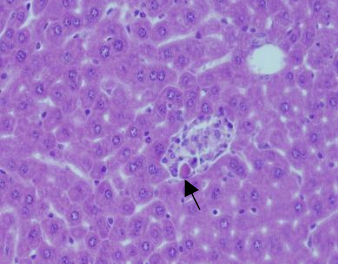
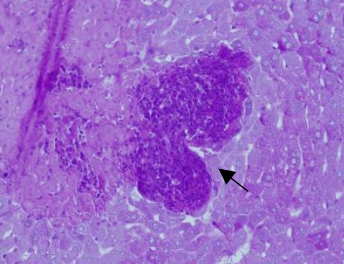
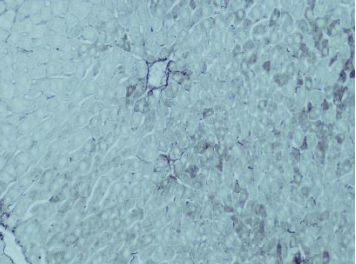
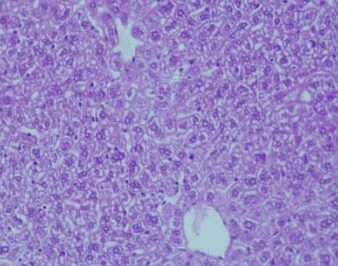
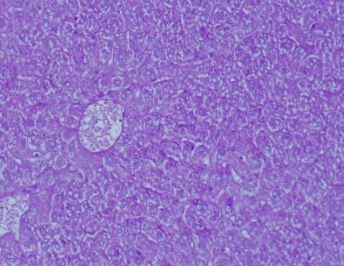
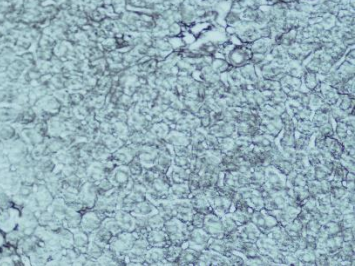
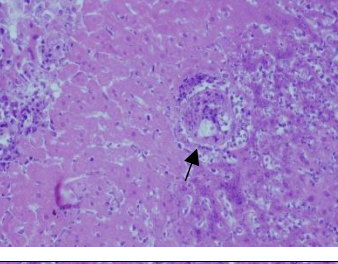
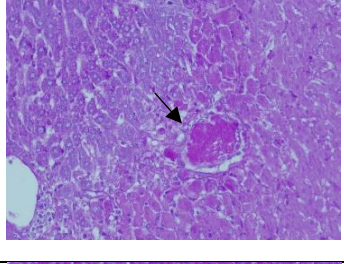

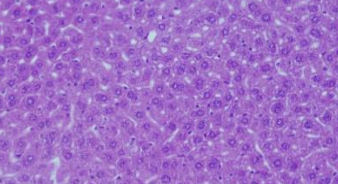
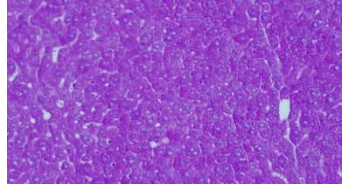
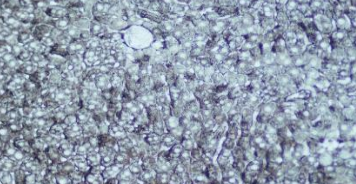
Tinción	HE	PAS	GG
6 horas			
12 horas			
24 horas			
48 horas			
72 horas			
Control Neg SSF			

Tabla 14. Tinción de HE, PAS y GG de cortes histológicos de la cinética para formación del AHA. Aumento 200 X.

7.7 Estandarización de inmunocitoquímica con trofozoitos de *E. histolytica* para el análisis inmunohistoquímico de las biopsias hepáticas

Se realizó una tinción inmunoenzimática para los trofozoitos de *E. histolytica*, en el control positivo se observa una señal color marrón debido a la reacción de los trofozoitos marcados con el suero anti-LPPG y el anticuerpo secundario acoplado a diaminobencidina, en el control negativo únicamente se observan los trofozoitos teñidos de color azul por la contratinción con hematoxilina. Ver figura 10.

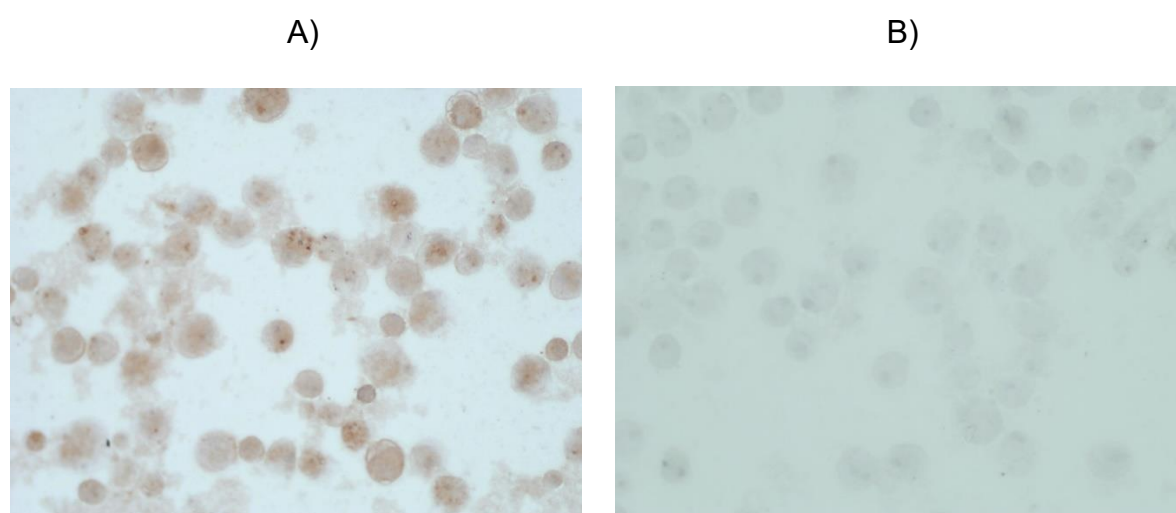


Figura 10. Identificación de trofozoitos de *E. histolytica* por ICQ. Aumento 200 X
A) Control positivo. B) Control negativo

7.8 Detección de la presencia de trofozoitos en cortes histológicos de la cinética para la formación del AHA por medio de IHQ

La inmunohistoquímica se realizó con los mismos cortes histológicos de las biopsias hepáticas provenientes de la cinética, el tejido se colocó en laminillas electrocargadas para llevar a cabo el procedimiento. En la tabla 15 se indican con una flecha de color negro los trofozoitos de *E. histolytica* presentes a las 6, 12, 24 y 72 horas, todas las muestras del lado izquierdo del cuadro fueron teñidas con el

anticuerpo primario anti-LPPG y el anticuerpo secundario los controles negativos de la inmunohistoquímica se muestran a la derecha del cuadro en los cuales se omitió el anticuerpo primario por lo que a pesar de que se logran observar células inflamatorias los trofozoitos no son visibles. Los ratones sin AHA (controles negativos) se inocularon con SSF.

Cortes histológicos de AHA teñidos por IHQ

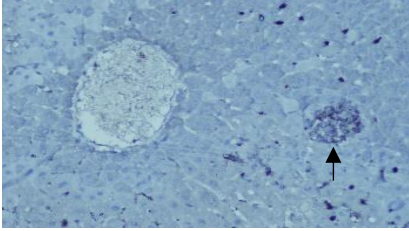
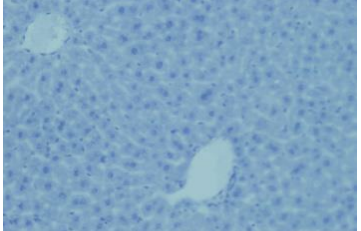
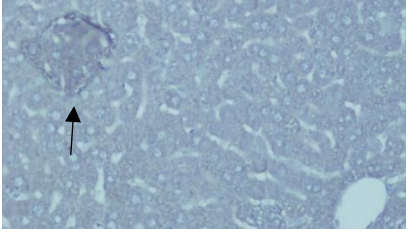
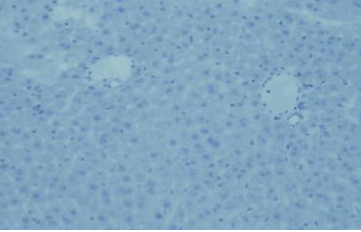
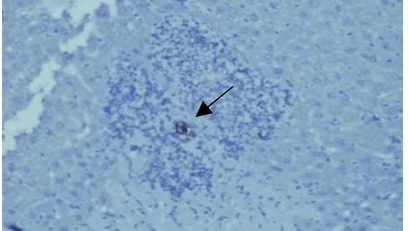
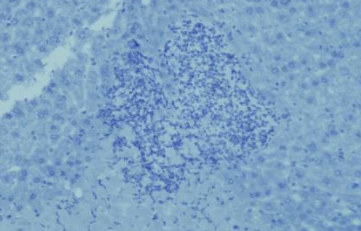
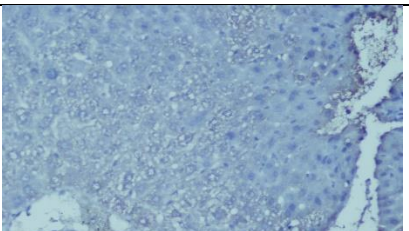
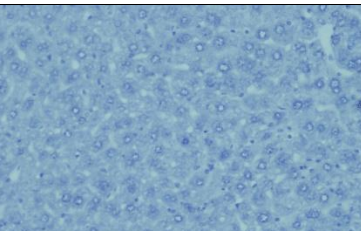
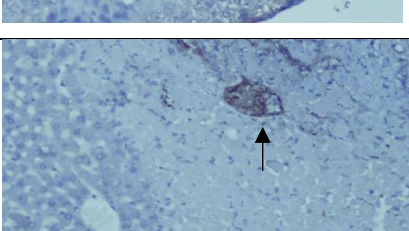
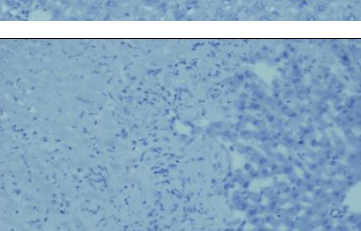
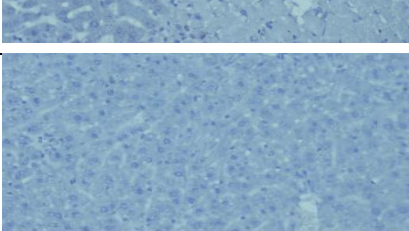
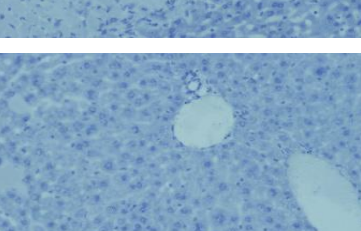
Tiempo	IHQ	Control neg (^s /Ac primario)
6 horas		
12 horas		
24 horas		
48 horas		
72 horas		
Control Neg AHA		

Tabla 15. Detección de los trofozoitos por IHQ en los cortes histológicos de la cinética para formación del AHA. Aumento 200 X.

7.9 Evaluación de la protección contra la formación del AHA generada por inmunización pasiva

Se partió de un lote de 25 ratones distribuidos en 6 grupos de la siguiente manera.

Ratones	Inmunización pasiva (Vía IV en vena caudal)	Inoculación intrahepática 1×10^6 de trofozoitos	Decesos en cirugía
5	Anti LPPG dil 1:10	Si	2
4	Anti LPPG dil 1:50	Si	0
4	Anti LPPG dil 1:100	Si	0
4	Anti LPPG dil 1:400	Si	0
5	Solución salina	Si	1
3	Solución salina	Solución salina	0

Tabla 16. Distribución de los grupos de ratones para inmunización pasiva.

De los ratones inmunizados pasivamente e inoculados a las 24 h con 1×10^6 trofozoitos se obtuvieron biopsias a los días 4, 6 y 9 del sitio de inoculación intrahepática para determinar si hubo o no protección a través de la inmunización del antisuero anti-LPPG.

En la tabla 17 se presentan las imágenes de los ratones sacrificados según el día indicado. Todos los ratones empleados como controles positivos desarrollaron el AHA más evidente el día 4 como lo habíamos determinado previamente. Como muestran los resultados de las imágenes del día 4 todos los ratones del grupo inmunizado con la dilución 1:10 de anti-LPPG fueron protegidos contra el desarrollo de AHA. En el caso de los grupos de las diluciones 1:50 y 1:100 solamente un ratón de cada grupo desarrolló un pequeño absceso y en el caso de los ratones inoculados con la dilución 1:400 todos resultaron protegidos. Con respecto a los días 6 y 9 en ningún ratón se evidenció la generación de absceso. En los controles

negativos a los cuales se les administró SSF vía IV e IH, ninguno presento alteraciones visibles.

Inmunización pasiva




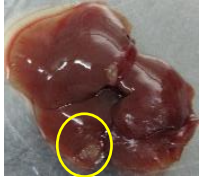
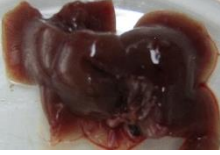




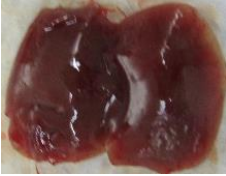


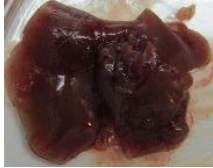









Día	4	6	9	
Control positivo				
Anti-LPPG dil 1:10				
Anti-LPPG dil 1:50				
Anti-LPPG dil 1:100				
Anti-LPPG dil 1:400				
Control Negativo				

Tabla 17. Evaluación de la protección contra la formación del AHA generada por inmunización pasiva con suero policlonal anti-LPPG.

7.10 Análisis histológico de biopsias hepáticas posteriores a la inmunización pasiva

De las biopsias hepáticas obtenidas después de la inmunización pasiva se realizaron cortes histológicos para detectar la presencia de trofozoitos en el AHA por medio de las siguientes tinciones: HE, PAS, GG e IHQ; sólo se muestran las imágenes más representativas donde se observaron trofozoitos o cambios histológicos bien definidos. En el día 4 aún se detecta la presencia de los trofozoitos en las biopsias provenientes de ratones que fueron empleados como controles positivos, sin embargo al día 6 y 9 a pesar de presentar el AHA ya no se observan trofozoitos y solamente se aprecia un cambio en la histología cuando se compara con el control negativo al cual únicamente se le administró SSF por vía IV e IH.

Tinción de tejidos hepáticos

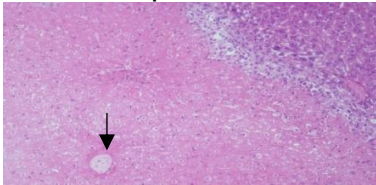
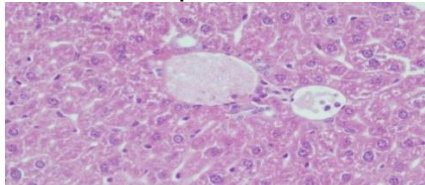
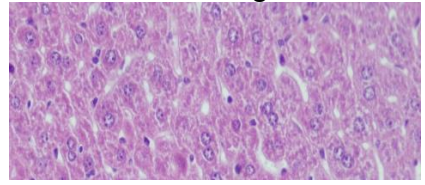
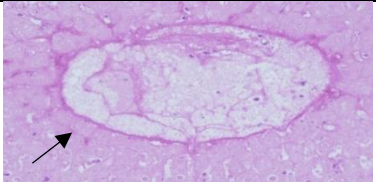
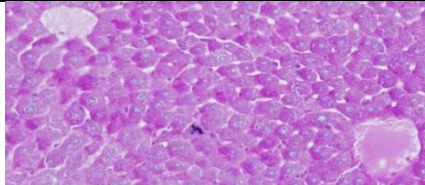
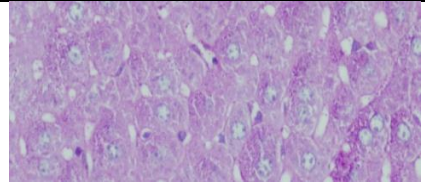
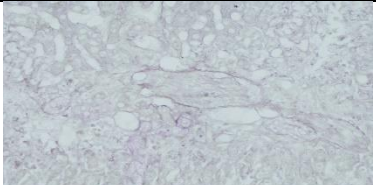
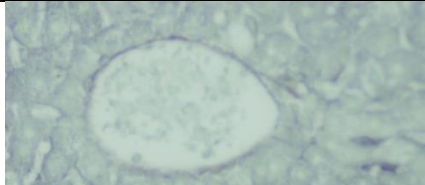
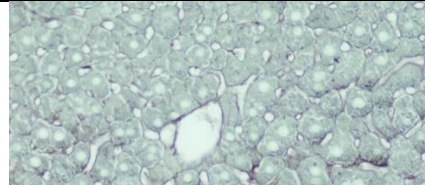
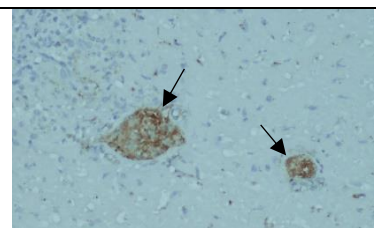
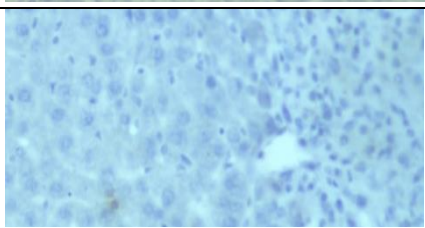
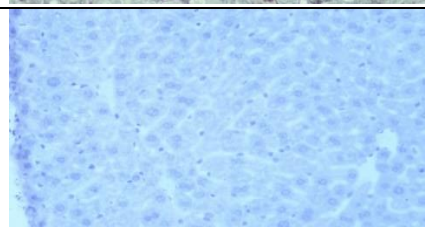
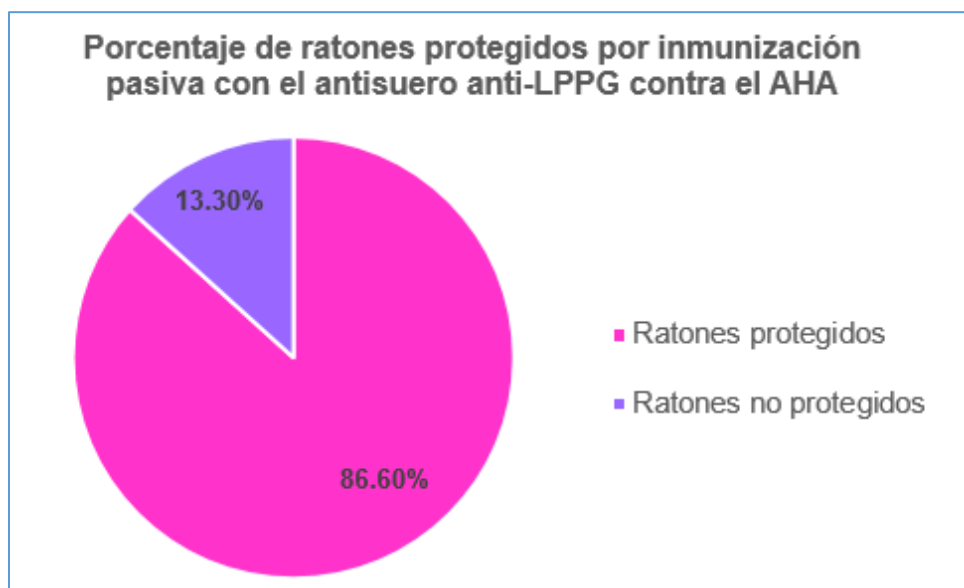
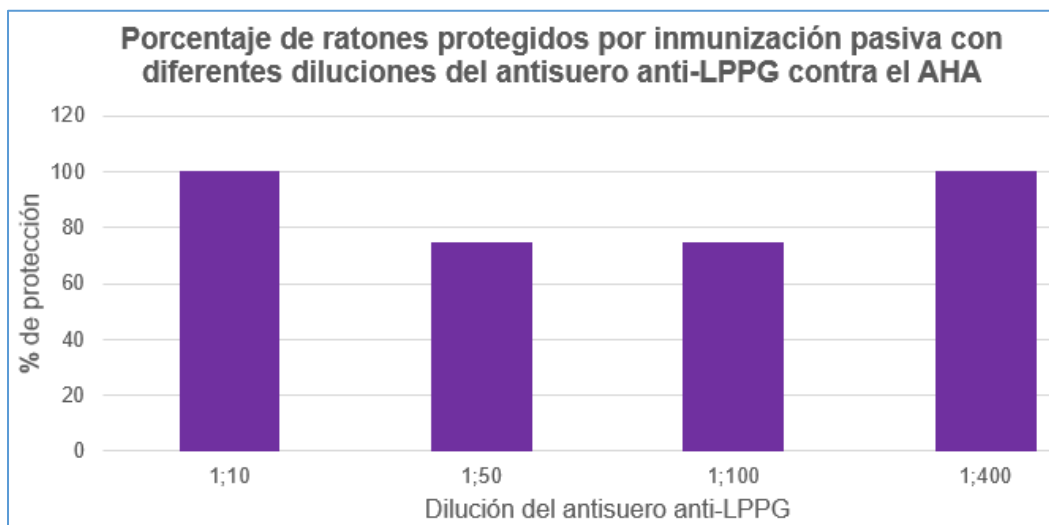
Tinción	Control positivo día 4	Control positivo día 6	Control negativo
HE			
PAS			
GG			
IHQ			

Tabla 18. Detección de trofozoitos de *E. histolytica* en biopsias de AHA murinos mediante diferentes tinciones. Aumento 200 X

7.11 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico descriptivo a través de una gráfica de barras para comparar el porcentaje de protección obtenido después de la administración de cada una de las diluciones del antisuero anti-LPPG. La segunda gráfica representa el porcentaje de ratones protegidos del AHA considerando el total de los animales que fueron inmunizados pasivamente con el antisuero anti-LPPG.⁷⁷



8 Discusión y conclusiones

El parásito *Entamoeba histolytica* es el causante de amibiasis intestinal y extraintestinal, siendo el absceso hepático amibiano la complicación más frecuente y grave; a nivel mundial continúa siendo un problema de salud pública por presentar altas tasas de mortalidad y morbilidad. Por lo anterior es necesario seguir investigando formas de protección contra dicho protozooario por lo que el objetivo de éste trabajo fue determinar si la inmunización pasiva de un antisuero policlonal anti-LPPG es capaz de proteger contra el desarrollo de absceso hepático amibiano (AHA) en un modelo murino.

A partir del cultivo axénico de trofozoitos de *E. histolytica* se obtuvo la molécula LPPG la cual se caracterizó mediante la cuantificación de carbohidratos y proteínas, con el ensayo de Limulus se descartó la presencia de endotoxina (contaminación bacteriana), posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en un gel de poliacrilamida donde se observó el bandeo polidisperso característico de la LPPG como se ha observado en trabajos previos.

Con la finalidad de llevar a cabo el esquema de inmunización pasiva se produjo el antisuero policlonal murino anti-LPPG mediante la administración de LPPG en ratones Balb/c, los anticuerpos obtenidos se analizaron por tres métodos diferentes de inmunodetección: ELISA indirecta, inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. Con éstos resultados se determinó el reconocimiento de los trofozoitos de *E. histolytica* por el antisuero policlonal anti-LPPG y se confirmó la especificidad y sensibilidad del antisuero a través de cada uno de los métodos.

Por otra parte se estandarizó un modelo de generación de abscesos hepáticos amibianos, en el cual se inocularon trofozoitos de *E. histolytica* intrahepáticamente

en ratones C57BL/6 y se determinó el tiempo necesario para la observación de los abscesos, nuestros resultados indican que a partir del día 1 es posible ver la formación del AHA, sin embargo es hasta el día 4 que el tamaño del absceso es significativo.

Con el propósito de demostrar que el daño hepático fue generado por la infección con los trofozoitos de *E. histolytica* inoculados y no por un efecto bacteriano o inflamatorio se procedió a detectar a los trofozoitos en los abscesos hepáticos amibianos mediante cortes histológicos teñidos por diferentes técnicas. Debido a las discrepancias entre diversos autores en cuanto al tiempo óptimo para la detección de trofozoitos en los cortes histológicos de lesiones hepáticas generadas por la inducción del absceso hepático amibiano se decidió realizar una cinética para el desarrollo del AHA; ya que reportes previos han establecido que la detección de trofozoitos es posible hasta las 72 horas nosotros decidimos iniciar el seguimiento desde las 6 hasta las 72 horas.

Los resultados de la cinética revelaron que los abscesos hepáticos amibianos a las 6 y 12 horas no son apreciables a simple vista, sin embargo a las 24 y 48 horas si lo son y a las 72 horas la formación del AHA es evidente. Posteriormente para detectar los trofozoitos realizamos las siguientes tinciones: HE, PAS, GG e IHQ. A pesar de que las tinciones de HE y PAS son las técnicas más reportadas en la mayoría de los artículos, la detección de los trofozoitos es complicada para observadores poco experimentados, por lo que decidimos incorporar la tinción de GG, la cual tiñe fundamentalmente polisacáridos, sin embargo esta tinción tampoco resultó la más adecuada para los objetivos de éste trabajo por lo que finalmente incorporamos la tinción por IHQ por ser una técnica específica y más sensible que

podría evidenciar a los trofozoitos de forma clara mediante la utilización de nuestro antisuero policlonal anti-LPPG generado anteriormente.

Para efectuar la tinción por inmunohistoquímica fue necesario estandarizar la técnica por inmunocitoquímica con los trofozoitos de *E. histolytica* y el antisuero policlonal murino anti-LPPG con el fin de identificar específicamente trofozoitos en los cortes histológicos de los AHA generados.

Los resultados de los tejidos provenientes de las biopsias hepáticas, denotaron que aunque con todas las tinciones se pueden identificar entre las zonas con morfología normal en el parénquima hepático y las regiones con daño e infiltrado inflamatorio, los trofozoitos se lograron detectar mejor con la tinción por IHQ, así mismo con esta tinción se lograron observar los cambios en la morfología de los trofozoitos a lo largo del tiempo, mientras que con la tinción de HE y PAS los trofozoitos no son tan evidentes o claros; respecto a la tinción de GG a pesar de que nos permitió observar diferencias en la histología hepática entre los ratones infectados y los controles negativos no resultó funcional para la detección de trofozoitos.

La IHQ resultó ser muy útil para ubicar las zonas donde estaban los trofozoitos y posteriormente localizarlos en las tinciones por HE y PAS, por otro lado nos permitió descubrir que no obstante que algunos autores reportan que a las 96 horas post inducción del AHA no se pueden detectar trofozoitos en el tejido hepático, nosotros logramos detectarlos con esta técnica.

Una vez obtenidos la molécula de LPPG, el antisuero policlonal murino anti-LPPG, estandarizado el modelo de formación del absceso hepático amibiano y la confirmación de la generación de los abscesos por la inoculación de los trofozoitos de *E. histolytica* se procedió a la realización del esquema de inmunización pasiva

con el antisuero policlonal anti-LPPG para evaluar la protección contra el desarrollo del absceso hepático amibiano en ratones C57BL/6.

A pesar de la existencia de terapias farmacológicas con metronidazol y otros compuestos de nitroimidazoles que son eficaces para tratar parásitos invasivos se ha documentado la presencia de efectos secundarios, además de que son fármacos que resultan costosos, no están disponibles en todos los países y en las últimas décadas la resistencia a los antibióticos ha ido en aumento. Por ello el desarrollo de una vacuna y la introducción de programas de vacunación en países en vías de desarrollo representan una alternativa necesaria.^{78, 79}

Hoy en día existen muchas vacunas de uso rutinario para prevenir las enfermedades infecciosas más frecuentes principalmente en niños, de igual modo se han ido implementando vacunas para proteger a las personas que viajan a lugares donde existen enfermedades que en su país de origen no se presentan así como a las personas que por su ocupación pueden ser más susceptibles a determinados agentes infecciosos.⁸⁰

La inmunización contra agentes infecciosos para inducir una respuesta inmune protectora puede conseguirse activa o pasivamente.⁸⁰ La inmunización pasiva se ha utilizado ampliamente para tratar y prevenir enfermedades en animales y seres humanos,^{80, 81} consiste en la administración de anticuerpos protectores preformados cuya característica más importante es proveer protección inmediata de tipo sistémico, no depende de la respuesta inmune del hospedero, no presenta memoria inmunológica y se le considera de vida corta ya que la protección permanece únicamente mientras el anticuerpo se encuentra en el organismo y su efecto puede ir de días a meses.^{79, 82} Entre las cualidades más importantes que presentan los

anticuerpos son su capacidad para interactuar con el sistema inmune a través de su región Fc lo cual inactiva patógenos o células infectadas, pueden desencadenar la cascada del complemento e interactuar con las células inmunes y mediar la muerte celular, así como promover la fagocitosis y generar la destrucción del patógeno.⁸²

Entre algunas de las moléculas que se han evaluado como candidatas a vacuna para evitar la formación del absceso hepático amibiano y que se encuentran presentes en los trofozoitos de *E. histolytica* están: la lectina Gal/GalNAc, el antígeno de 29 kDa, una proteína rica en serina SREHP y vacunas con DNA.⁷⁸

La inmunización intraperitoneal activa en gerbos con la molécula Gal/GalNAc purificada ha generado un índice de protección del 86% en los animales inmunizados.⁸³ Con el antígeno de 29 kDa, un alquil hidroperóxido reductasa, se ha obtenido una protección del 54% en hámsters.⁷⁸ La inmunización intradermal directa con la molécula SREHP rica en serina indujo una protección del 100% en gerbos.⁷⁸

La vacunación activa con KLH-170CR2-PEP5 en gerbos inmunizados intraperitonealmente originó una protección del 33% mientras que la inmunización pasiva con anti-KLH-170CR2-PEP5 en ratones SCID fue protectora en un 66.7%.⁸⁴

La administración de SREHP-MBP recombinante resultó ser protectora en un modelo murino con una efectividad del 80% mientras que en el modelo de gerbo la eficacia fue sólo del 60%.⁸⁵ Por otra parte se han probado diversas fracciones de proteínas recombinantes de la molécula Gal/GalNAc para inmunizar activamente gerbos, con la fracción R170PR se obtuvo un índice de protección del 37.5% mientras que con la fracción R170CR2 fue del 62.5%, para comparar la protección de éstas fracciones proteicas realizaron una inmunización pasiva en ratones SCID,

en los cuales con el antisuero anti-r170PR y anti-170CR2 se obtuvo una protección del 37.5 y 53.3% respectivamente.⁸⁶ Otra de las fracciones de Gal/GalNAc empleadas para la protección del AHA ha sido el dominio CRD que en inmunización activa en gerbos ha otorgado una protección menor en relación con la inmunización pasiva con el anti-CRD.⁸⁷ La inmunización pasiva en ratones SCID con el anticuerpo monoclonal EH5 indujo una protección del 91.7%.¹⁵

Sin embargo, aunque la molécula LPPG resulta una candidata atractiva para la producción de una vacuna por ser una molécula de superficie con capacidad inmunogénica y con implicaciones importantes en la patogénesis de amibiasis por *E. histolytica* lo que se ha demostrado con la detección de anticuerpos contra dicha molécula en pacientes con amibiasis intestinal y con absceso hepático amibiano no se ha utilizado como antígeno. Por lo que este protocolo de inmunización pasiva para evitar la formación del AHA con el antisuero policlonal murino anti-LPPG es relevante.

Lo más importante de los resultados con la inmunización pasiva en ratones C57BL/6 con el antisuero anti-LPPG es que la protección fue efectiva en el 100% de los ratones que fueron inoculados con la dilución 1:10 del antisuero. Lo que representa un índice de protección mayor al reportado en la mayoría de los trabajos anteriores. A pesar de que con las diluciones 1:50 y 1:100 se obtuvo un índice de protección del 75% el resultado también es relevante porque los AHA que desarrollaron los ratones fueron significativamente menores. Aunque el efecto protector con la dilución 1:400 fue del 100% necesitamos corroborar éste resultado en un trabajo próximo dado que ésta fue la menor concentración de anticuerpos anti-LPPG administrados a los ratones.

El análisis general del esquema de inmunización pasiva con el antisuero policlonal murino anti-LPPG revela un porcentaje de protección del 86.6%, considerando que de 15 ratones a los que se les indujo el AHA, 13 resultaron protegidos ya que no generaron en ningún día absceso hepático amibiano; y no obstante los ratones que desarrollaron AHA resultaron parcialmente protegidos puesto que el tamaño del absceso fue significativamente menor comparado con los AHA de los controles positivos.

Los resultados de éste trabajo de tesis establecen un buen precedente para continuar con el proyecto de desarrollo de vacunas contra infecciones por *E. histolytica* empleando otros modelos animales y distintas vías de inmunización.

9 Perspectivas

- Realizar un esquema de inmunización activa en un modelo murino para observar la diferencia entre los dos tipos de protección.
- Desarrollar el esquema de protección en un modelo de hámster por ser éste un animal más sensible a la infección por *E. histolytica*.
- Cuantificar la producción de anticuerpos para determinar la presencia de los distintos isotipos de inmunoglobulinas.
- Evaluar el perfil de citocinas.
- Evaluar la presencia de memoria inmunológica.

10 Anexos

10.1 Preparación de medio de cultivo TYI (2 L)

Cantidad (g)	Reactivo
73.2	Peptona biotriptasa
24.4	Glucosa
4.88	Cloruro de sodio
1.48	Fosfato monobásico de potasio
2.48	Fosfato dibásico de potasio
2.48	L-cisteína
0.48	Ácido ascórbico
0.06	Citrato férrico de amonio
2 L	Agua inyectable

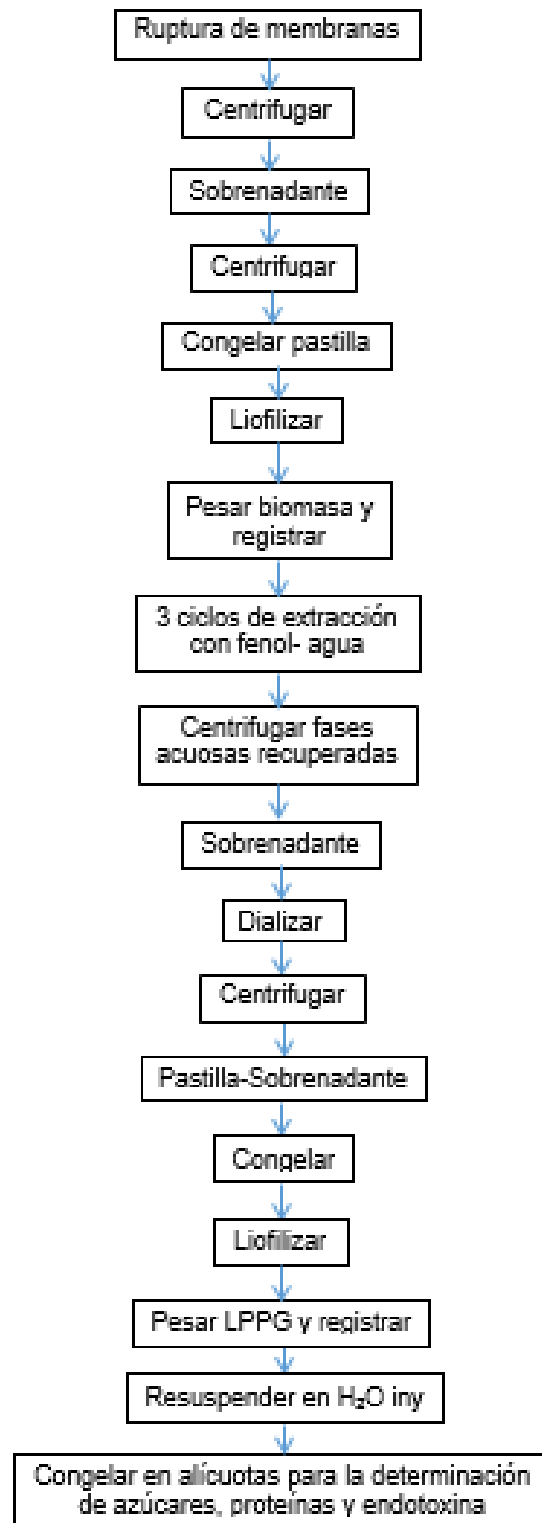
NOTA:

Se ajusta el pH a 6.8, se afora y se esteriliza por autoclave, se almacena hasta por 4 meses a -20 °C.

10.2 Preparación de PBS 1X (1 L) pH=7.35±0.1

Cantidad (g)	Reactivo
0.2	Cloruro de potasio
8.0	Cloruro de sodio
0.2	Fosfato de potasio monobásico
1.15	Fosfato de sodio dibásico
1 L	Agua destilada

10.3 Diagrama de flujo del método de extracción con el método de: fenol-agua modificado por Isibasi.



10.4 Antrona al 0.2% en H₂SO₄ concentrado

Pesar 0.05 g de antrona y adicionar 25 mL de H₂SO₄ concentrado muy lentamente y mezclar con ayuda de una pipeta durante 2 minutos.

Este reactivo se prepara hasta el momento de uso en un tubo cónico protegido de la luz.

10.5 Reactivos para SDS-PAGE

Solución	Nombre de la solución	Reactivos	Cantidad	pH
A	Acrilamida/Bis-acrilamida	Acrilamida	30 g	----
		Bis-acrilamida	0.8 g	
		H ₂ O destilada	100 mL	
B	TRIS-BASE	TRIS-BASE	12.11 g	8.8
		H ₂ O destilada	100 mL	
C	SDS	SDS	10 g	----
		H ₂ O destilada	100 mL	
D	TRIS-BASE	TRIS-BASE	6 g	6.8
		H ₂ O destilada	50 mL	
E	Buffer de carga 4X	Solución C	4 mL	----
		Solución D	2 mL	
		2-mercapto	400 µL	
		Glicerol	4 mL	
		Rojo de fenol	100 µL	
F	Buffer de corrida 4X	Glicina	57.6 g	----
		TRIS-BASE	12 g	
		Solución C	40 mL	
		H ₂ O destilada	1000 mL	

NOTA:

Los reactivos A, B y D se almacenan en frascos ámbar y a 4 °C.

Los reactivos C, E y F se almacenan a temperatura ambiente.

Los reactivos E y F se diluyen a una concentración 1X para su uso en la técnica.

10.6 Preparación de geles SDS-PAGE (cantidades para 2 geles)

Gel separador al 12% (10 mL)		Gel concentrador al 4% (4 mL)	
Cantidad	Reactivo	Cantidad	Reactivo
Solución A	4 mL	Solución A	520 µL
Solución B	3.75 mL	Solución D	493 µL
Solución C	100 µL	Solución C	40 µL
H ₂ O destilada	2.095 mL	H ₂ O destilada	2.88 mL
Temed	15 µL	Temed	5 µL
Persulfato al 10%	40 µL	Persulfato al 10%	50 µL

10.7 Soluciones para tinción amoniacal de plata

Solución	Nombre de la solución	Reactivos	Cantidad	Volumen final
1	Solución fijadora	Etanol (70%)	43 mL	100 mL
		Ácido acético	10 mL	
		H ₂ O inyectable	47 mL	
2	Solución de lavado	Etanol (70%)	29 mL	100 mL
		H ₂ O destilada	71 mL	
3	Solución de oxidación	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0.012 g	100 mL
		H ₂ O inyectable	100 mL	
4	Solución de impregnación	AgNO ₃	0.102 g	50 mL
		H ₂ O inyectable	50 mL	
5	Solución reveladora	Na ₂ CO ₃	2.32 g	100 mL
		Solución 3	6.25 mL	
		Formaldehído (37%)	25 µL	
		H ₂ O inyectable	100 mL	
6	Solución de paro	TRIS-Base	4 g	100 mL
		Ácido acético	4 mL	
		H ₂ O inyectable	96 mL	

NOTA:

Los reactivos 1, 3, 4 y 5 deben prepararse en recipientes protegidos de la luz.

El reactivo 4 se prepara hasta el día en que va a ser empleado.

10.8 Reactivos para ELISA

Solución	Nombre de la solución	Volumen final	Reactivos	Cantidad	pH
1	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X	1 L (aforar)	Cloruro de potasio	0.2 g	7.35 ±0.1
			Fosfato monobásico de potasio	0.2 g	
			Cloruro de sodio	8.0 g	
			Fosfato dibásico de sodio	1.16 g	
			H ₂ O destilada	1 L	
2	Solución amortiguadora de carbonatos	1 L	Bicarbonato de sodio	7.0 g	9.5
			Carbonato de sodio	2.8 g	
			H ₂ O destilada	1 L	
3	Solución amortiguadora de citratos	1 L	Ácido cítrico·H ₂ O	4.1 g	5.6
			Citrato de sodio·2H ₂ O	29.0 g	
			H ₂ O destilada	100 mL	
4	Solución de bloqueo/dilución PBS-leche	100 mL	Leche descremada en polvo	5.0 g	----
			Tween 20 al 0.05%	50 µL	
			PBS	100 mL	
5	Solución de lavado (Tween 20 al 0.1%)	500 mL	Tween 20	500 µL	6.8
			H ₂ O destilada	250 mL	
			PBS	250 mL	
6	Solución reveladora de OPD	10 mL	Solución 2	10.0 mL	----
			OPD	0.006 g	
			Peróxido de hidrógeno	10 µL	
7	Ácido sulfúrico 2.5N	100 mL	H ₂ SO ₄ concentrado	6.9 mL	----
			H ₂ O destilada	93.0 mL	

NOTA:

El reactivo 4 debe ser utilizado el mismo día en que se prepara.

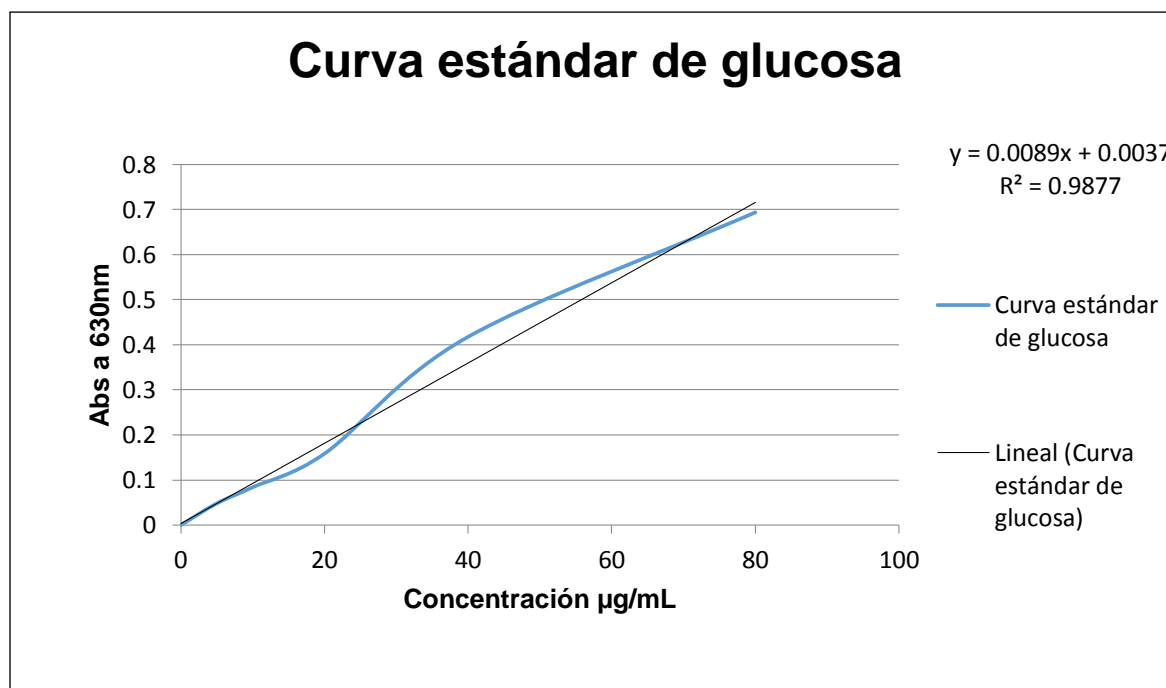
El reactivo 6 se prepara hasta el momento de uso.

10.9 Gráficas de caracterización de la LPPG

10.9.1 Curva patrón de carbohidratos por el método de antrona

Lecturas de la cuantificación de azúcares reductores a 630 nm					
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Abs 1	Abs2	Abs1 C	Abs2 C	Abs prom
0	0.076	0.063	0	0	0
5	0.11	0.125	0.034	0.062	0.048
10	0.164	0.143	0.088	0.08	0.084
20	0.232	0.224	0.156	0.161	0.1585
40	0.501	0.473	0.425	0.41	0.4175
80	0.775	0.751	0.699	0.688	0.6935

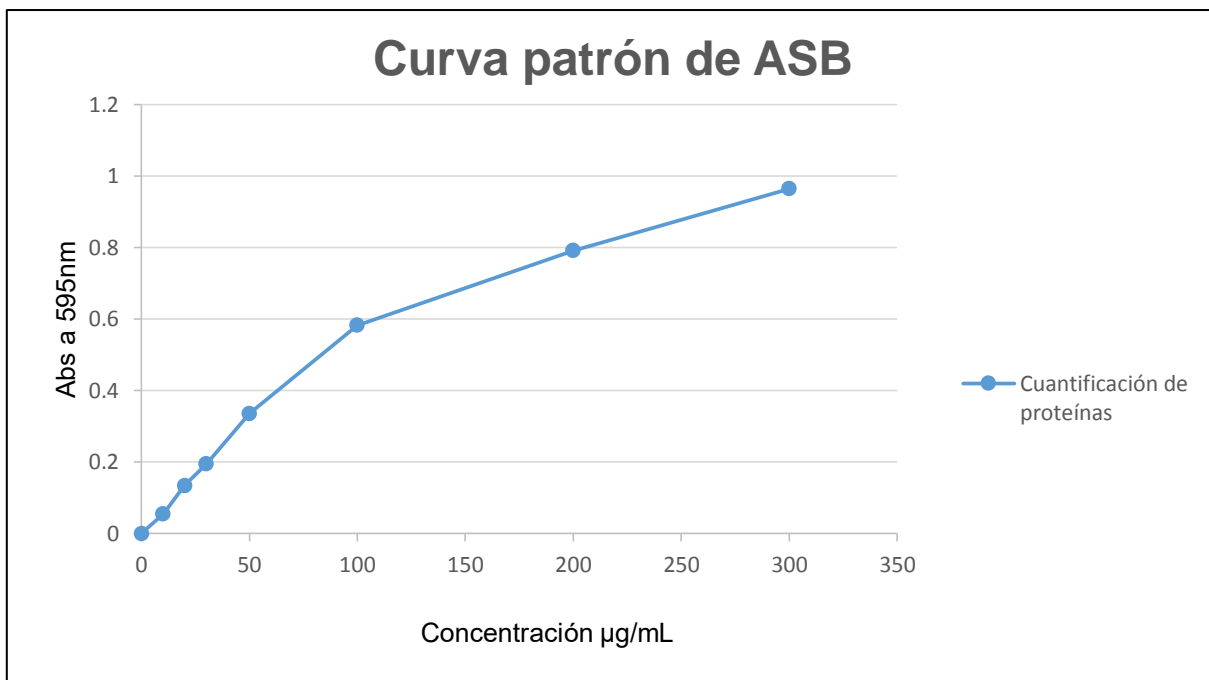
Muestras	Abs 1	Abs 1 C	Concentración $\mu\text{g/mL}$	μg Az red/mL
P-Sb (50 μl)	0.658	0.5885	65.708	1314.16
P-Sb (100 μl)	1.071	1.0015	112.112	1121.12



10.9.2 Curva patrón de proteínas por el método de ácido bicinconínico

Lecturas de la cuantificación de proteínas a 540 nm					
Concentración µg/mL	Abs 1	Abs2	Abs1 C	Abs2 C	Abs prom
0	0.092	0.105	0	0	0
25	0.115	0.117	0.023	0.012	0.0175
125	0.26	0.266	0.168	0.161	0.1645
250	0.373	0.368	0.281	0.263	0.272
500	0.654	0.621	0.562	0.516	0.539
750	0.732	0.783	0.64	0.678	0.659
1000	0.911	0.936	0.819	0.831	0.825
1500	1.349	1.479	1.257	1.374	1.3155
2000	2.036	1.551	1.944	1.446	1.695

Muestra	Abs 1	Abs2	Abs1 C	Abs2 C	Abs prom	Interpolación	Conc µg/mL
P-Sb dil 1:5	0.113	0.117	0.021	0.012	0.0165	23.571	117.857



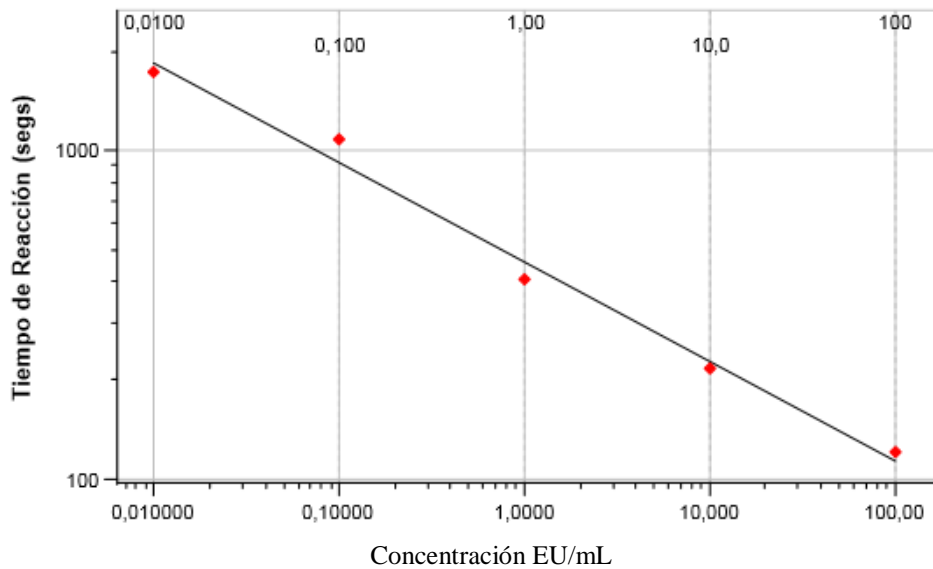
10.9.3 Curva estándar de endotoxina por el método de Limulus

Lecturas de la curva estándar

STANDARDS	CONCENTRATION	WELL	REACTION TIME (sec)	AVG. TIME	BACK PREDICTION (LR)
Blank	Blank	A 1	****	****	****
		A 2	****		
		A 3	****		
Std. 1	0,0100	B 1	1740	1743	0,0120
		B 2	1715		
		B 3	1775		
Std. 2	0,100	C 1	1688	1087	0,0572
		C 2	811		
		C 3	783		
Std. 3	1,00	D 1	416	408	1,47
		D 2	408		
		D 3	400		
Std. 4	10,0	E 1	222	216	12,1
		E 2	213		
		E 3	214		
Std. 5	100	F 1	133	121	82,2
		F 2	118		
		F 3	112		

LPPG — Lot No. LPPG							
SAMPLES	CONCENTRATION	WELL	REACTION TIME (sec)	AVG. TIME	RAW EU	RESULTS (LR) EU/µg	REL. LIMIT
S1	1	H 4	****	****	< 0,0100	< 0,0100	N/A

Linear Regression : CORR. = -0,995 SLOPE = -0,302 Y INT. = 2,661
 Reader Parameters : Delta t = 60 Meas. Filtr. = 340 Delta mOD = 30 Reads No. = 100



10.10 Lectura de las absorbancias de las placas de ELISA

10.10.1 Absorbancias de la placa de ELISA con diluciones seriadas de antígeno y de suero anti-LPPG

Absorbancias leídas a 492 nm													
Dilución del suero	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	C neg	C neg	C pos	
Concentración Ag (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	10	0.936	0.968	0.925	0.919	0.76	0.465	0.295	0.249	0.19	0.173	0.206	0.312
B	5	0.908	0.909	0.675	0.799	0.539	0.331	0.182	0.115	0.088	0.073	0.081	0.187
C	2.5	0.919	0.946	0.794	0.533	0.318	0.178	0.11	0.086	0.073	0.062	0.067	0.154
D	1.25	0.968	0.719	0.614	0.364	0.217	0.138	0.091	0.044	0.057	0.058	0.061	0.123
E	0.625	0.881	0.57	0.402	0.249	0.139	0.084	0.067	0.068	0.059	0.058	0.056	0.078
F	0.312	0.607	0.41	0.281	0.163	0.109	0.079	0.063	0.06	0.055	0.072	0.053	0.07
G	0.156	0.442	0.28	0.162	0.114	0.084	0.07	0.056	0.054	0.055	0.053	0.051	0.058
H	0.078	0.317	0.204	0.125	0.087	0.081	0.061	0.055	0.062	0.06	0.057	0.054	0.057

10.10.2 Absorbancias de la placa de ELISA con antígeno constante y diluciones seriadas del antisuero anti-LPPG

Absorbancias leídas a 492 nm													
Dilución del suero	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	C neg	C neg	C pos	
Concentración Ag (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.25	0.83	0.62	0.52	0.34	0.29	0.11	0.09	0.057	0.05	0.11	0.18	1.05
B	1.25	0.73	0.58	0.45	0.27	0.16	0.09	0.07	0.052	0.044	0.07	0.08	0.98
C	1.25	0.65	0.65	0.43	0.23	0.15	0.08	0.07	0.053	0.045	0.05	0.06	0.93
D	1.25	0.69	0.55	0.37	0.24	0.15	0.1	0.07	0.07	0.053	0.05	0.08	0.93
E	1.25	0.69	0.58	0.42	0.22	0.15	0.08	0.07	0.051	0.047	0.05	0.05	0.76
F	1.25	0.63	0.56	0.46	0.23	0.14	0.09	0.08	0.05	0.048	0.04	0.04	0.58
G	1.25	0.7	0.61	0.45	0.23	0.15	0.08	0.06	0.051	0.048	0.04	0.05	0.38
H	1.25	0.6	0.55	0.43	0.33	0.2	0.14	0.08	0.069	0.055	0.04	0.05	0.28
	Promedio	0.681	0.587	0.430	0.237	0.149	0.088	0.069	0.055	0.048	0.052	0.058	0.759

11 Referencias

1. Wong BI, Alcántara HM, Mancilla HI, Ramírez SI, Arriaga PL, Ferat OE, et al. El papel de lipopéptidofosfoglicana en la respuesta inmune por *Entamoeba histolytica*. J. Biomed. Biotech. 2009; 2010 (254521): 1-12.
2. Ávila E, Salaiza N, Pulido J, Rodríguez M, Díaz C, Becker I, et al. Trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y lipopéptidofosfoglicana desencadenan trampas extracelulares de neutrófilos humanos. Plos one. 2016; 11 (7): 1-18.
3. Rojas L, Morán P, Valadez A, Gómez A, Ximénez C, et al. Niños en edad escolar en México infectados con *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*: relación genotípica y filogenética. BMC Infectious Diseases. 2016; 16 (485): 1-12.
4. Anuarios de Morbilidad 1984-2015. Distribución de nuevos casos de enfermedad [Internet]. México; 2015. [Accesado 31 de enero de 2017]. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html
5. Lotter H, González NR, Lindner B, Winau F, Isibasi A, Moreno LM, et al. Células Natural Killer T activadas por una lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* son críticamente importantes para el control del absceso hepático amibiano. J. PLOS Path. 2009; (5): 1-11.
6. Uslu H, Aktas O, Hamidullah U. Comparación de varios métodos en el diagnóstico de *Entamoeba histolytica* en muestras de suero y heces. J. Med. Eur. 2016; 124 (9): 124-129.
7. Gutiérrez Cisneros María José. Amibiasis en España: Diagnóstico molecular y estudio epidemiológico de una parasitosis emergente [tesis doctoral]. España, Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.

8. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM. 54^a ed. México: Thompson; 2008. vol. 1; pp 1647.
9. Barrón G, Serrano V, Villareal T, Verduzco M, Morales V. Inhibición del crecimiento axénico in vitro de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. Ciencia UANL. 2008; 9 (3): 285-290.
10. Montoya VH. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2^a ed. Colombia: Universidad de Antioquia; 2008.
11. Romero CR. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3^a ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
12. Ángel VM, Isibasi AA, Kumate J, Orozco Esther. Diferencias moleculares entre amibas patógenas y no patógenas de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. 1990. 21 (1):217-221.
13. Nakada-Tsukui K. Nozaki T. Respuesta inmune de amibiasis y evasión inmune por *Entamoeba histolytica*. Frontiers in Immunology. 2016; 7 (175): 1-13.
14. Barranco TC, Acosta AG, Campos RR, Isibasi AA, Kumate RJ. Inhibición por anticuerpos de la adherencia de los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. 1986. 17: 237-241.
15. Marinets A, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Vollman U, et al. Protección contra amibiasis invasiva por un solo anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno lipofosfoglicano localizado en la superficie de *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 1997; 186 (9): 1557-1565.

16. Isibasi A, Santa Cruz M, Soto M, Ramírez A, Kumate J. Localización en los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de una lipopéptidofosfoglicana extraída por fenol-agua de la cepa HK-9. Arch. Invest. Méd. 1982; 13 (3): 57.
17. Agundis MC, Blanco F, Chávez K, Cervera H, Isibasi A. Identificación en suero de una glicoproteína de 35 kDa de *Entamoeba histolytica* en pacientes con absceso hepático amibiano y con anticuerpo monoclonal de ratón. Arch. Med. Research. 1997. 28 (1): S264-S266.
18. Agundis M, Blanco F, Zenteno E, Linares M, Zavala A, Chávez K. Reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales de ratón para glicoproteína con dos diferentes antígenos de membrana externa de *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Research. 1997. 28 (1): S239-S241
19. Villegas GJ, Fastag S, Hoz-Couturier R, Torre M. Reacción tisular en la primoinfección y en la reinfección experimental con cultivos axénicos y monoxénicos de *E. histolytica*. Arch. Invest. Méd. 1973 4 (1): S131-S140.
20. Isibasi AA, Santa CM, Ramírez A, Kumate RJ. Inmunoquímica de una lipopéptidofosfoglicana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HK-9 cultivados en medio axénico, utilizando el método de fenol-agua. Arch. Invest. Méd. 1982. 13 (3):51-55.
21. Alcántara Hernández Marcela. Evaluación de la respuesta inmune innata a la lipopéptidofosfoglicana de cepas de *Entamoeba histolytica* con diferentes grados de virulencia a través de Receptores tipo Toll [tesis de maestría]. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2010.

22. Maldonado B, Kirschning CJ, Rosenstein Y, Rocha LM, Isibasi A. La respuesta inmune innata de la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* mediada por Receptores tipo Toll 2 y 4. *Parasite Immunology*. 2005; 27: 127-137.
23. Isibasi A, Sánchez MN, García TF, Kumate J. Serología con polisacáridos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* 1978. 9 (1):285-290.
24. Isibasi A, Santa Cruz M, Cottlieb M, Kumate J. Purificación de la porción polisacáridica de la lipopéptidofosfoglicana extraída de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* 1986. 17 (1): 73-79.
25. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular*. 3ª ed. España: MC Graw Hill Interamericana de España; 2001.
26. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway*. 7ª ed. China: Mc Graw Hill Educación; 2009.
27. Campos RR, Andrade P, Acosta AG, Barranco T, Isibasi A, Kumate J. Inducción de una respuesta inmune humoral local contra antígenos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd.* 1986. 17 (1): 277-282.
28. Aguirre GJ, Calderón LP, Vázquez, SA, Tanimoto WM. Estudios histopatológicos de las lesiones hepáticas en hámsters inoculados con distintas cepas de *E. histolytica* desarrollada en condiciones axénicas. *Arch. Inv. Méd.* 1973; 4(1): s109-s114.
29. Vivanco CH, Alpuche AC, Wong BI, Rocha RM, Ríos SN, Isibasi AA. Lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* activa macrófagos humanos y células dendríticas y sus endosomas posteriores. *Parasite Immunology*. 2007; (29): 467-474.
30. Maldonado C, Trejo W, Ramírez A, Carrera M, Isibasi A. Lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* induce una respuesta inmune innata antiinflamatoria y baja

regulación de Receptores tipo Toll 2 (TLR2) por la expresión genética de monocitos humanos. Arch. Med. Research. 2000; (31): S71-S73.

31. Agundis C, Isibasi A, Reyes J, Ortiz V, Kumate J. Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de membrana externa de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. 1990. 21 (1):15-22.
32. Correa L, Velázquez M, Ortiz O. Interacción de *Entamoeba histolytica* y anticuerpos in situ. Arch. Invest. Méd. 1986. 17 (1): 283-284.
33. Acosta AG, Torres SE, Meraz E, Isibasi AA, Kumate RJ. Detección de anticuerpos de clase IgA dirigidos contra una lipopéptidofosfoglicana de *E. histolytica* en muestras de calostro humano. Arch. Invest Méd. 1986; 17(1):291-295.
34. Organización Mundial de la Salud. Vacunas. [Internet]. México; 2017. [Accesado 9 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>.
35. Giménez SJ, Cárdenas G, López OM, Isibasi A, Kretschmer RR. Inmunización con un tetrámero derivado de un pentapéptido anti-inflamatorio producido por *Entamoeba histolytica* para la protección de jerbos (*Merions unguiculatus*) contra el absceso hepático amibiano experimental. Parasite Immun. 2004; (26): 343-349.
36. Graham C, Diamond SL. Métodos de cultivo de parásitos protistas luminales de importancia clínica. Clin. Microbiology Reviews. 2002; 15 (3): 329-341.
37. Rodríguez AJ. Manual de prácticas de bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León: 1987. 4ª ed. Monterrey, Nuevo León. pp. 53-57.
38. Gutiérrez DJ. Determinación de carbohidratos en aguas residuales de la industria azucarera y cuerpos de aguas contaminados. Ministerio de Ciencia Tecnología y

Medio Ambiente Centro de Información, Gestión y Educación Ambiental. Habana, Cuba.

39. Díaz NA, Jorrín VJ, Bárcena RJ. Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares. Dep. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. España.
40. Fernández RE, Galván CA. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba.
41. García A. Humberto, Vázquez D. Rafael. Cuantificación de proteínas: una revisión. Instituto de Biotecnología, UNAM: 1998. Vol. 3. México. pp. 77-88.
42. Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Thermo Scientific.
43. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clin. Microbiol. 27:947-951.
44. Sierra López Francisco. Análisis de las diferencias inmunoquímicas en la lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba histolytica* obtenida por el método fenol-agua y el método fenol-agua modificado [tesis de licenciatura]. México, D. F.: UNAM, FES Zaragoza; 2011.
45. González Roldán Nestor. Análisis estructural de la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* y su papel en la activación de la respuesta inmune: reconocimiento por receptores TLR y presentación antigénica a través de CD1d [tesis doctoral]. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2008.
46. Nelson D. Lehninger Principios de Bioquímica. 3 ed. España: Omega; 2001.
47. Mathews KC, Van Holde EK, Appling RD, Anthony-Cahill JS. Bioquímica. 4ª ed. España: Pearson; 2013.

48. Carrillo SJ, Candia PM, Lugo SR, Espinoza OE, Noriega RJ. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). Universidad de Sonora, INVURNUS. 2013; 8 (1): 19-26.
49. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
50. Coligan EJ, Kruisbeek AM, Margulies HD, Shevach ME, Strober W. Current Protocols in Immunology. National Institutes of Health. Vol 1. Supl. 44. Edit. John Wiley & Sons, Inc. EUA. 2003.
51. Bos HJ, Van Den Eijk AA. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en el serodiagnóstico de amibiasis. 721-726.
52. Murray KR, Granner KD, Mayes A. Bioquímica de Harper. 24^a ed. México: Manual Moderno; 1997.
53. Goldsby AR, Kindt JT, Osborne AB. Kuby Immunology. 4^a ed. Estados Unidos: Freeman; 2001.
54. Siochoque HE. Inmunología. Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio. Bogotá: Centro Editorial Universidad del Rosario; 2006.
55. Florentino GS. La inmunología en el diagnóstico clínico. Bogotá: Centro Editorial Javeriano CEJA; 1994.
56. Calderón PR. Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología e Inmunoquímica. México: UNAM; 2007.
57. Guía de técnicas inmunológicas 2010.
58. Barrera RL, Drago SM, Pérez RJ, Sainz ET, Zamora AC, Gómez AF, Et al. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Rev.

Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. [Revista Online]. 2004 mar [Citado 2017 jun 24]; 17(1): 42-55. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo>.

59. Sánchez González Ismael. Evaluación de la respuesta de anticuerpos inducidos por la mezcla de la LPPG de *Entamoeba histolytica* y la porina OmpC de *Salmonella typhi* como posible vacuna bivalente contra el absceso hepático amebiano e infección por *Salmonella typhi* [tesis de maestría]. México D. F.: Instituto Politécnico Nacional; 2013.
60. Tsutsumi V, Mena LR, Anaya VF, Martínez PA. Bases celulares del absceso hepático amibiano experimental. AJP. 1984; 117 (1): 81-91.
61. Chadee K, Meerovitch E. La patogénesis de absceso hepático amibiano inducido experimentalmente en gerbos (*Merions unguiculatus*). AJP. 1984; 117 (1): 71-80.
62. Lotter H, Jacobs T, Gaworski I, Tannich E. Dimorfismo sexual en el control de absceso hepático amibiano en un modelo enfermo de ratón. Inf and Imm. 2006; 74 (1): 118-124.
63. Lotter H, Khajawa, Stanley Samuel, Tannich E. Protección en gerbos ante el absceso hepático amibiano por vacunación con un péptido derivado de una región rica en cisteína de *Entamoeba histolytica* con una lectina adherente específica de galactosa. Inf and Imm. 2000; 68 (8): 4416-4421.
64. Tan Zi N, Wong WK, Shaymoli M, Arefuddin A, Olivos GA, Boon HL. Detección de *Entamoeba histolytica* en el absceso hepático amibiano inducido experimentalmente: comparación de tres métodos de tinción. Asian. Pac. Trop. Biomed. 2012; 2 (1): 61-65.
65. Manual. Anatomía patológica. Aspectos técnicos de la inmunohistoquímica. Formación Alcalá; 1998.

66. Montalvo AC. Técnica histológica. 2010.
67. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin L. Métodos Histotecnológicos. EUA: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América; 1995.
68. Serviansky TH, Kresch TN, Moreno CG, Arenas R, Vega MM. Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico. Derm. CMQ. 2013; 11(1): 13-18.
69. Scientific RA. Tinción avanzada, tinción de metenamina de plata de Grocott modificada ácido peryódico. Inserto de Thermo Scientific.
70. García BM, Belso SE, Pérez SM, Silva GL. Técnico Especialista en Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud. España: MAD, SERGAS; 2006.
71. Ventura JJ, Barba GL, Muñoz FL, Martínez ML, González RR, Campos RR. Caracterización inmunohistoquímica de colitis amibiana fulminante en el humano. Par Immun. 2007; 29: 201-209.
72. Casia AX, Silva FT, Silva OF, Guimaraes SJ, Aparecida GM, Vidigal CM. Influencia de inflamación en absceso hepático amibiano experimental de área y parasitismo. Par. Vect. 2011; 4 (27): 3-7.
73. Tisne BL. Procedimiento para técnicas de inmunohistoquímica. Hospital Santiago Oriente. 2012
74. Biocare Medical. Decloaker, 10X. Número control: 901-DV2004X-030415. Inserto.
75. Biocare Medical. MACH 2 Double Stain 2. Mouse-HRP + Rabbit-AP. Polymer Detection Kit. Número control: 901-MRCT525-090214. Inserto.
76. Dako. Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System. Code K3468. Inserto.
77. Mendenhall W, Beaver R. Introducción a la probabilidad y la estadística guía programada. México: Herreros Hermanos Sucesores; 1972.

78. Quach J, St-Pierre J, Chadee K. El desarrollo futuro para vacunas contra *Entamoeba histolytica*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014; 10 (6): 1514-1521.
79. Hedergaard CJ, Heegaard PM. Inmunización pasiva, una vieja idea revisada: Principios básicos y aplicaciones para sistemas de producción modernos en animales. *Vect. Imm. Imp.* 2016; 174. 50-63.
80. Backx M, Freedman A. Immunization. *Defence against infection*. 2009; 37 (10): 529-534.
81. Binoy R, Guro L, Koppang EO, Lars A. Inmunización pasiva de peces de acuario. *J. Immun.* 2017; 198: 4195-4202.
82. Zeitlin L, Cone RA, Moench TR, Whaley KJ. Prevención de enfermedades infecciosas con inmunización pasiva. *Microbes and Inf.* 2000; 2: 701-708.
83. Petri AW, Ravdin JI. Protección en gerbos de absceso hepático amibiano por inhibición con la lectina adherente específica de galactosa de *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 1991; 59 (1): 97-101.
84. Lotter H, Khajawa F, Stanley SI, Tannich E. Protección en gerbos de absceso hepático amibiano con un péptido 25-mer derivado de la región rica en cisteína de la lectina de adherencia específica de Galactosa de *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 2000; 68 (8): 4416-4421.
85. Zhang T, Stanley LS. Vacuna con DNA con la proteína rica en serina de *Entamoeba histolytica* (SREHP) para prevenir el absceso hepático amibianos en modelos roedores para la enfermedad. *Vaccine*. 1999; 18: 868-874.

86. Lotter H, Zhang T, Seydel BK, Stanley LS, Tannich E. Identificación de un epítotope de la lectina de 170 kDa de *Entamoeba histolytica* confiere protección mediada por anticuerpos contra amibiasis invasiva. J. Exp. Med. 1997; 185 (10): 1793-1801.
87. Dodson JM, Lenkowski WP, Eubanks CA, Mann, JB, Petri WA. Infección e inmunidad mediada por el dominio de reconocimiento de carbohidratos de la lectina Gal/Gal-NAc de *Entamoeba histolytica*. JID. 1999; 179: 460-466.