



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales
dirigidos contra lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba
histolytica* HM1-IMSS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Cruz Itzmel Ramírez Saldívar

ASESORES: *Dra. Luz María Rocha Ramírez*
M. en C. José Sotero Delgado Domínguez



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales dirigidos contra lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de Entamoeba histolytica HMI-IMSS".

que presenta la pasante: Cruz Itzmel Ramírez Saldívar
con número de cuenta: 40301904-5 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de abril de 2009.

PRESIDENTE	M.C. Pablo Martínez Labat	
VOCAL	Dr. Marco Antonio Vega López	
SECRETARIO	Dra. Luz María Rocha Ramírez	
PRIMER SUPLENTE	Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón	
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Ángel G. Martínez Sosa	

El presente trabajo fue realizado en la **Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica**, del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en colaboración con el **Laboratorio de inmunoparasitología** del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y el **Departamento de Infectología** del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Este trabajo fue financiado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con número de convenio 25897.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS:

Por la gracia de haberte descubierto en el camino, por ser el motivo de mi existir, por ser la fortaleza y la inspiración para continuar; porque siempre has estado conmigo y porque todo lo hemos realizado juntos, este logro, es nuestro!!!. Por tu AMOR, que me ha sido dado en los padres y en los hermanos que elegiste para mí, que sin duda, son los mejores; y por todos y cada uno de los seres que han formado parte de mi vida.

A mi mamá, Rebeca Saldívar: Por ser mi más grande ejemplo de fortaleza, de lucha y de perseverancia, con lo que has forjado mi carácter para levantarme frente a los obstáculos, y porque además de ser mi mamá, has sido mi amiga, mi hermana, mi consejera y mi maestra; por las noches de desvelo, de angustia y por todos aquellos momentos en los que has estado conmigo para darme siempre las palabras acertadas que me impulsan a seguir adelante.

A mi papá, Casto Ramírez: Por todo el amor y el respeto con que nos has educado, por los cuidados a nuestra familia, y en particular, por todo el tiempo que pasaste a mi lado durante mi niñez, apoyándome, como hasta ahora, en mis decisiones y enseñándome a darle el justo valor a las cosas, pero sobre todo, por enseñarme a no olvidar que todos valemos por el simple hecho de existir.

A mis hermanitos, Pako y Ángel: por su inigualable cariño, por sus ocurrencias y por su siempre agradable compañía, por las enseñanzas a mi vida a través de la madurez que han alcanzado estando lejos de casa. Gracias hermanos, por ayudarme a demostrar que han valido la pena los sacrificios de nuestros padres.

Gracias por la entrega total, por creer en mí y por quererme así...

A la familia González Ramírez: Mis tíos y primo, por abrirme las puertas de su casa, por cuidarme, guiarme y acompañarme en el duro camino fuera de mi hogar.

A mis tíos, Inocencia, Martha y Oliverio: Que han sido mi compañía en estos últimos años, gracias por el apoyo, cuidados y consejos.

A mis grandes amigos: por el apoyo incondicional, por los momentos, anhelos y sueños compartidos, por su gran cariño y comprensión, siempre gracias: Marco, Angie's, Lety, Jay, Paty, Dalis, Carmen, Héctor, Rosalía, Rosa, Isma, Alex GG, Lindo, Pacorro y en general, a todos mis compañeros de estudio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por la oportunidad que me brindó de pertenecer a su comunidad, por formarme y por poner a mi disposición los recursos necesarios para terminar esta etapa de mi vida académica.

Al Dr. Armando Isibasi, por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por haber creído en mis capacidades para llevar a buen término este proyecto.

A mis asesores:

Dra. Luz María Rocha Ramírez, por el tiempo y las enseñanzas vertidas en mí, por los consejos y el apoyo, la dirección y el valioso aporte de conocimientos con que ha contribuido a mi formación profesional.

Y de manera muy especial, quiero extender mi gratitud al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, cuyo apoyo ha sido determinante en la resolución de este trabajo; por sus enseñanzas, consejos, paciencia, responsabilidad, compromiso y constante revisión y asesoría en este proyecto.

A la Dra. Ingeborg Becker, por el espacio brindado en su laboratorio, lugar donde recibí apoyo y conocimientos fundamentales para realizar este trabajo.

A los valiosos elementos que conforman la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica:
por la siempre buena disponibilidad de apoyarme en mi trabajo de tesis, y de manera particular a:

Dr. Constantino López Macías

Dr. Antonio Ramírez Vidals

Dra. Isabel Wong Baeza.

Dr. Manuel Carrera

M. en C. Mario Adán Moreno Eutimio.

Q.F.B. Oswaldo Ibarra.

C. Karina Rojas

Dra. Nora Isela Ríos Sarabia

Del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM a: M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña, Dra. Norma Salaiza Suazo, Sr. Ricardo Vargas Orozco, M.V.Z. Daniel Sánchez Almaraz y Dra. María de la Luz Ramírez, *por el apoyo, el tiempo, el compromiso y la dedicación invertidos en este trabajo; y de manera particular, al Ing. Omar Agni García Hernández, por el apoyo en la edición de imágenes, por sus siempre acertadas observaciones, por las largas jornadas de trabajo extra y por las horas de ayuno obligadas para esta tesis, pero sobre todo por la amistad brindada.*

Del Departamento de Virología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” a: Dr. Jesús Casasola Flores, Química Araceli Santos Segura y de manera general, a todos los miembros de su grupo de trabajo, *por la accesibilidad a sus instalaciones, la buena disposición al apoyo de este trabajo, pero sobre todo, por el trato que me brindaron.*

DEDICATORIAS:

A mi familia, por el amor que han sembrado en mí y que ha sido la base para mantenerme firme frente a las adversidades. Por el tiempo, la distancia y por los momentos que no hemos pasado juntos desde hace ya once años, dedico este triunfo a ustedes con todo el amor de que soy capaz, pues es en realidad un reflejo de lo que han hecho en mí y por mí.

A las personas que estuvieron y a quienes aún están en mi vida luchando a mi lado para que yo pueda alcanzar mis metas.

A todas las personas que por distintas circunstancias, no han logrado formarse en el ámbito profesional, pero que indudablemente con su ejemplo de vida, nos enseñan a crecer y a ser mejores seres humanos...

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. ÍNDICE DE FIGURAS	i
II. ÍNDICE DE TABLAS	iii
III. ABREVIATURAS	iv
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 La amibiasis.	2
2.2 El parásito <i>Entamoeba histolytica</i>	2
2.3 La infección natural causada por <i>Entamoeba histolytica</i>	3
2.4 La superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> está asociada a su patogenicidad y virulencia.	5
2.5 La caracterización de la lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
2.6 La respuesta inmunitaria a la lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
2.7 Anticuerpos monoclonales y su importancia.	14
3. ANTECEDENTES	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	19
6.1 General	19
6.2 Particulares	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS	20
7.1 Material.	20

7.1.1	Reactivos.	20
7.1.2	Material biológico.	20
7.1.3	Medios de cultivo celular.	20
7.2	Métodos.	21
7.2.1	Cultivo de la cepa amibiana de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
7.2.2	Extracción de antígeno de membrana de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS.	21
7.2.3	Extracción de lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS.	22
7.2.4	Determinación de endotoxina (ensayo de amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i>).	24
7.2.5	Cuantificación de azúcares reductores por el método de Antrona.	25
7.2.6	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.	26
7.2.7	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), análisis de proteínas por tinción de Coomassie, análisis de carbohidratos por tinción de plata y reconocimiento Ag-Ac por Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot).	26
7.2.8	Inmunización de animales vía intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV), y sangría retroorbital.	28
7.2.9	Reconocimiento Ag-Ac por el método de ELISA (ensayo inmunoenzimático).	29
7.2.10	Extracción de bazo para la obtención de células esplénicas.	30
7.2.11	Cultivo de células de mieloma.	30
7.2.12	Fusión celular.	31
7.2.13	Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG en medio HAT.	31
7.2.14	Clonación de hibridomas por dilución limitante en medio HAT	32
7.2.15	Expansión de hibridomas productores de AcMo en líquido de ascitis.	33
7.2.16	Inmunofluorescencia indirecta.	35
7.2.17	Criopreservación.	35
8.	RESULTADOS	36
8.1	Extracción del antígeno de membrana de <i>Entamoeba histolytica</i>	36
8.2	Obtención de lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i>	38
8.3	Caracterización de la lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i>	38
8.4	Análisis de suero de los ratones inmunizados.	41

8.5 Selección de hibridomas positivos a LPPG.	42
8.6 Análisis de la lipopéptidofosfoglicana de <i>E. histolytica</i> por IET (reconocimiento Ag-Ac)	46
8.7 Análisis de la lipopéptidofosfoglicana de <i>E. histolytica</i> por IFI (reconocimiento Ag-Ac)	47
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	53
11. PERSPECTIVAS	54
12. BIBLIOGRAFÍA	55
13. APÉNDICE	62

I. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i>	4
Figura 2. Moléculas asociadas a la patogenicidad y virulencia de <i>E. histolytica</i>	6
Figura 3. Modelo de interacción de los componentes de superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> en la colitis amibiana.	8
Figura 4. Estructura parcial de LPPGEh.	10
Figura 5. Estructuras (a) PIEha y (b) PIEhb, propuestas para el GPI de <i>Entamoeba histolytica</i> ..	12
Figura 6: Vías utilizadas por las células de mamíferos para la síntesis de nucleótidos.	15
Figura 7: Extracción de AgMEh HM1-IMSS.	22
Figura 8: Extracción de LPPGEh HM1-IMSS por el método fenol-agua.	23
Figura 9: Clonación por dilución limitante en medio HAT	32
Figura 10: Obtención de hibridomas productores de AcMo por el método descrito por Kölher y Milstein.	34
Figura 11: Caracterización del AgMEh.	37
Figura 12: Caracterización de LPPGEh por corrimiento electroforético revelado por tinción de plata.	39
Figura 13: Caracterización de LPPGEh por reconocimiento Ag-Ac por el método de ELISA.	40
Figura 14: Determinación de títulos de Ac suero de animales inmunizados.	41
Figura 15: Selección de hibridomas anti-LPPG por el método de ELISA.	42

Figura 16: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (primera clonación).	43
Figura 17: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (quinta clonación).	43
Figura 18: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (octava clonación).	44
Figura 19: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (doceava clonación).	44
Figura 20: Reconocimiento de LPPGEh (a la izquierda) y AgMEh (a la derecha) por los hibridomas productores de AcMo anti-LPPG en líquido de ascitis.....	45
Figura 21: Reconocimiento Ag-Ac por IET.	46
Figura 22: Reconocimiento Ag-Ac por IFI.	47

II. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Curva patrón de endotoxina.	24
Tabla 2. Curva patrón de glucosa.	25
Tabla 3. Inmunización y toma de muestra en ratones BALB/c.	28
Tabla 4. Contenido de azúcares reductores y proteínas de AgMEh HM1-IMSS.	36
Tabla 5. Contenido de azúcares reductores y proteínas de LPPGEh HM1-IMSS.	38

IV. ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
Ac	Anticuerpo/Anticuerpos.
AcMo	Anticuerpo monoclonal/Anticuerpos monoclonales.
AcPC	Anticuerpo policlonal de conejo.
Ag	Antígeno/Antígenos.
AgMEh	Antígeno de membrana de <i>Entamoeba histolytica</i> .
A-poro	Proteína formadora de poros.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
CP	Proteína tipo serina y fosfatasa ácida.
C4	Clona C4.
CD80	Marcador de superficie de células dendríticas, linfocitos B y macrófagos activados
CD86	Marcador de superficie de linfocitos B, monocitos y algunos linfocitos T.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
D.O.	Densidad óptica
EH5	Anticuerpo monoclonal anti-PPG de <i>Entamoeba histolytica</i> .
EhCPADH112	Proteasa expuesta sobre la superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> .
EhPIa	Variante (a) en el GPI de la molécula de LPPGEh.
EhPIb	Variante (b) en el GPI de la molécula de LPPGEh.
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada.
EtN	Etanolamina.
EU/mL	Unidades de endotoxina por mililitro.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
g	Fuerza de gravedad.
Gal	Galactosa.
Gal/GalNac	Galactosa/N-acetil-galactosamina.
GILP	Glicoinositolfosfolípidos.
Glc	Glucosa.
GlcN	Glucosamina.

GPI	Glucosilfosfatidilinositol.
HAT	Medio de cultivo suplementado con hipoxantina-aminopterinina y timidina.
Hgl	Subunidad pesada de Galactosa/N-acetil-galactosamina.
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa.
H8	Clona H8.
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
IFN- γ	Interferón gama.
Igl	Subunidad intermedia de Galactosa/N-acetil-galactosamina.
IL-8	Interleucina 8.
IP	Intraperitoneal.
IET	Inmunoelctrotransferencia (Western-Blot).
IV	Intravenosa.
KDa	Kilodaltones.
LAL	Lisado de amebocitos de limulus.
Lgl	Subunidad ligera de Galactosa/N-acetil-galactosamina
LPG	Lipofosfoglicana.
LPGEh	Lipofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i> .
LPPG	Lipopéptidofosfoglicana.
LPPGEh	Lipopéptidofosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i> .
LPS	Lipopolisacárido.
Man	Manosa.
Map	Proteína tipo fosfatasa ácida expuesta sobre la superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> .
NF- κ B	Factor nuclear kapa B.
NK-T	Célula T asesina natural.
P	Grupo fosfato.
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno.
PARP	Proteína repetitiva de ácido procíclico.
PBS	Solución buffer de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG	Polietilenglicol.
PI	Inositolfosfato.
PPG	Proteofosfoglicanos.
PRR	Receptor de reconocimiento de PAMP.
P3-X-Ag8.653	Línea celular mieloide de origen murino.
SAP	Proteína tipo fosfatasa ácida expuesta sobre la superficie de <i>Entamoeba histolytica</i> .
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada.
SCID-HU-INT	Xenotransplante de colon humano a ratones con inmunodeficiencia severa combinada.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
Ser	Serina.
SFB	Suero fetal bovino.
SRHP	Proteína rica en serina.
TBS	Solución amortiguadora de Tris.
TBS-T	Solución amortiguadora de Tris-Tween.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
V	Vols.

1. RESUMEN

La lipopéptidofosfoglicana (LPPG) es un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) ya que induce la producción de citocinas por monocitos, macrófagos y células dendríticas, y es reconocido a través del receptor tipo Toll 2-4 (TLR2 y TLR4). La LPPG es una molécula que se encuentra en la superficie de *Entamoeba histolytica* (LPPGEh); el análisis estructural y funcional, revela que está involucrada en la patogenicidad del parásito y recientemente se demostró que también activa células NK-T; de ahí la importancia de su estudio. Sin embargo, no se cuenta con un anticuerpo monoclonal (AcMo) contra la LPPGEh, y es una herramienta muy importante para estudiar los mecanismos de interacción de esta molécula con el sistema inmunitario del hospedero. En el presente trabajo se obtuvieron hibridomas productores de AcMo dirigidos contra la LPPGEh HM1-IMSS; extraída por el método fenol-agua y caracterizada por cuantificación de carbohidratos (método de Antrona) y determinación de proteínas (método de Lowry); así como por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (método SDS-PAGE), revelados por tinción de plata. Asimismo, se realizó la determinación del reconocimiento antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), por el método de ELISA aplicando suero policlonal de conejo (AcPC) anti-antígeno total de membrana (AgMEh) como Ac de referencia. La obtención de hibridomas se produjo por la inmunización de ratones BALB/c con AgMEh y posteriormente con LPPGEh. Los títulos de Ac se determinaron por ELISA y se realizó la fusión de células de bazo de ratón inmunizado, con células de mieloma P3-X-Ag8.653X. La selección de clonas positivas se desarrolló por dilución limitante en medio con hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), y se concentró el Ac por expansión clonal en líquido de ascitis. La especificidad de los hibridomas productores de Ac se evaluó mediante ensayos de ELISA, Inmunoelotransferencia (IET) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se identificaron 2 hibridomas (C4 y H8), con diferente especificidad a la LPPGEh, siendo el hibridoma H8 el que reconoce a la LPPGEh tanto por ELISA, IFI e IET en títulos menores a C4, mostrando en este último ensayo, un corrimiento polidisperso, lo que sugiere a la LPPGEh como una molécula compleja, semejante al lipopolisacárido (LPS), con unidades repetidas de carbohidratos. Los Ac de estos hibridomas serán utilizados en el análisis funcional de la molécula y podrían ser una alternativa al diagnóstico de amibiasis a través de la identificación específica de LPPGEh sobre la superficie del parásito.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La amibiasis

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

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

2.2 El parásito *Entamoeba histolytica*.

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

E. histolytica, pertenece a la familia *Entamoebidae*, orden amoebidae, subphylum sarcodina. En su ciclo de vida adopta dos fases: quiste que es causa de infección, y trofozoíto. El quiste de *E. histolytica* es de forma esférica u oval, mide entre 3.5 a 25 μm de diámetro y está cubierto por una gruesa capa de quitina; ésta cubierta le permite sobrevivir en condiciones adversas que serían letales para el trofozoíto. Está descrito que dependiendo del grado de madurez, el quiste puede contener de uno a cuatro núcleos y estos se caracterizan por una membrana plasmática con frecuentes y profundas invaginaciones en su citoplasma, además de observarse polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno (Ludvik y Shipstone, 1970).

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

2.3 La infección natural causada por *Entamoeba histolytica*.

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

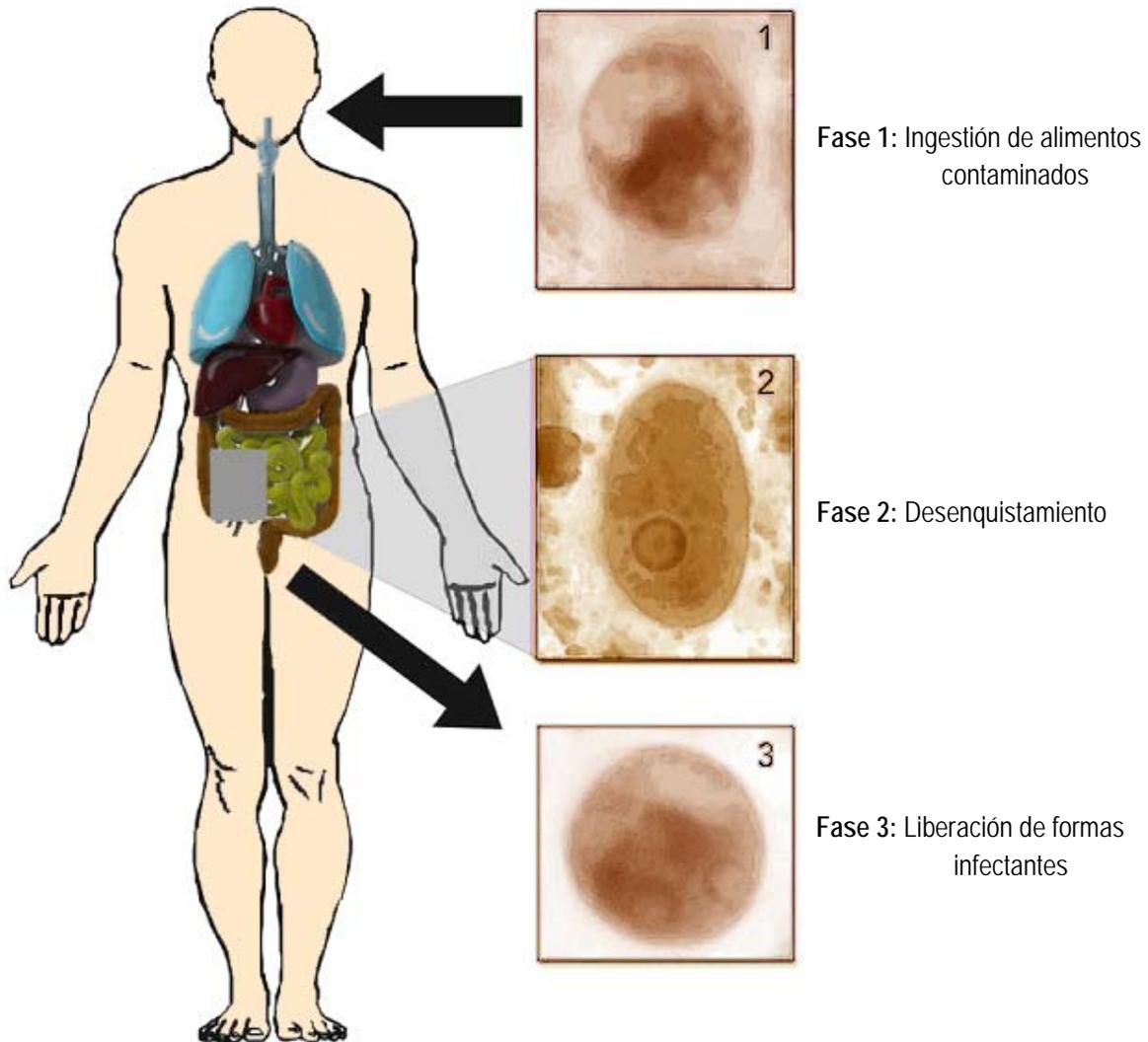


Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*. La infección por *E. histolytica* puede agruparse en tres fases: (1) La ingestión de quistes maduros del parásito presentes en alimentos contaminados o en manos mal lavadas. (2) Desenquistamiento y/o pérdida de la cubierta de quitina en los quistes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

Tomado de van Hal et al., MJA 2007; **186**: 412-416.

En el intestino, es donde se producen las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, y los quistes de individuos infectados pueden ser excretados en las heces; siendo los responsables de la

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

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

En México, los reportes epidemiológicos de la amibiasis extra-intestinal (absceso hepático amibiano), han declinado notablemente y son muy pocos los casos reportados en los últimos años; sin embargo, la colitis ulcerativa se mantiene en rangos importantes (Ramos *et al.*, 2005); por ejemplo, en el año 2000 se reportaron 1,353.43 casos de colitis ulcerativa versus 6.37 casos de amibiasis extra-intestinal por cada 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2001).

Los efectos de la infección sintomática por *E. histolytica* son provocados por la citólisis dependiente del contacto del trofozoíto con el epitelio y otras células blanco, siendo también influenciado por varios factores, entre ellos: la relación hospedero-parásito y las moléculas asociadas a su capacidad de virulencia y patogenicidad, expresadas en la superficie del parásito.

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

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

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

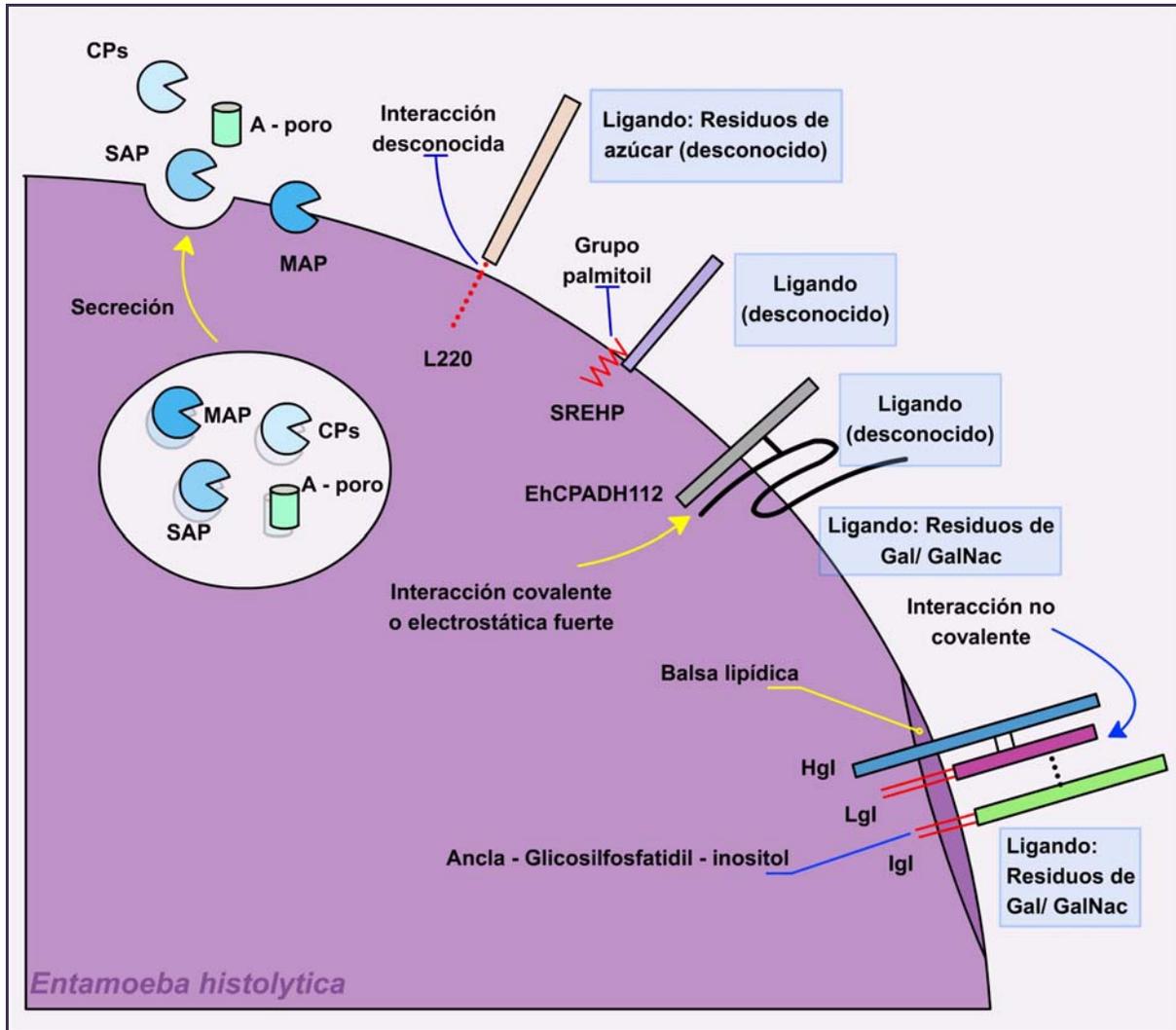


Figura 2: Moléculas asociadas a la patogénesis y virulencia de *E. histolytica*. A pesar de la descripción de diferentes moléculas presentes en la membrana de *E. histolytica* sus posibles ligandos de interacción son desconocidos. N-acetil-galactosamina (Gal/GalNac), en sus subunidades pesada, ligera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

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

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

1) Moléculas tipo lectina. Estas proteínas de superficie reconocen carbohidratos, entre ellas la inhibible por Galactosa/N-acetil-galactosamina, denominada Gal/GalNac. Su estructura es un complejo poco común, formado por un grupo disulfuro unido a dos subunidades (ligera de 35 KDa y pesada de 170 KDa), ambas están insertadas dentro de la membrana del parásito por anclajes separados (**Figura 2**). Entre las funciones atribuibles a la Gal/GalNac de *E. histolytica* está su papel en la adherencia y la modulación del efecto citotóxico del parásito (Frederick y Petri, 2005).

2) Péptidos formadores de poros (ameboporos). Estas moléculas no enzimáticas tienen un peso molecular de 18 KDa, pueden lisar bacterias o células eucarióticas, así como producir canales iónicos en la membrana de ciertas células. Sin embargo, no son exclusivos de la especie *E. histolytica*, ya que también se han descrito en *E. dispar* (Leippe *et al.*, 2005).

3) El grupo de proteasas. La proteólisis de la matriz extracelular de las células del hospedero por el parásito, incluye un conjunto de proteasas, entre ellas, las proteinasas de cisteína. Estas endopeptidasas de cisteína facilitan la invasión de la mucosa, demostrado por estudios *in vitro* e *in vivo* (Schulte y Scholze, 1989; Li *et al.*, 1995) (**Figura 2**).

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

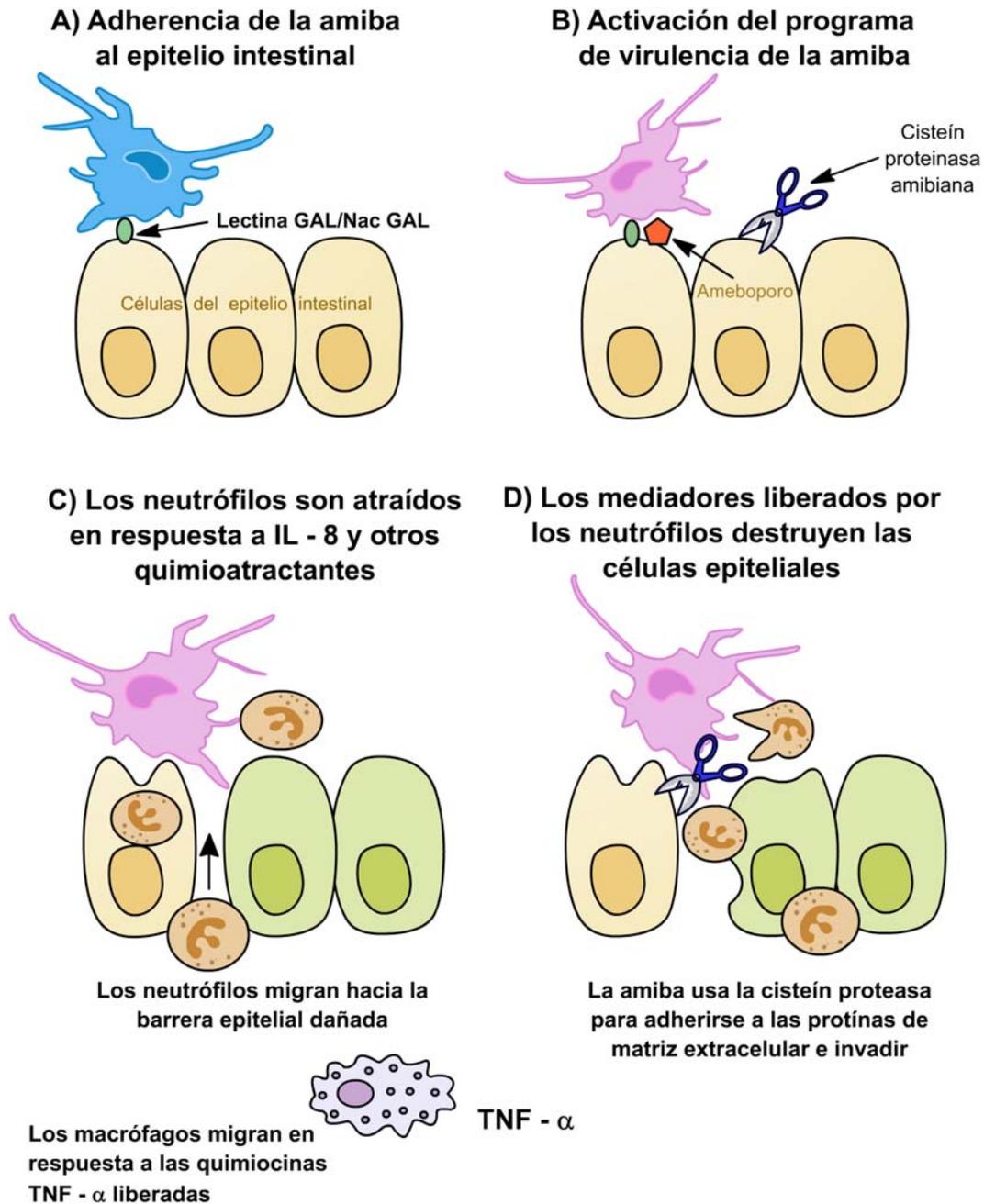


Figura 3: Modelo de interacción de *E. histolytica* en la colitis amibiana. (a) La adherencia al epitelio mediada por lectinas (b) Formación de ameboporos y (c y d) rompimiento por proteínas que favorecen el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos) y que también contribuyen al daño del epitelio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

Tomado de Ackers y Mirelman, *COM.* 2006; 9:367-373.

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

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

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

2.5 La caracterización de la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica*.

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

1) La cadena polipeptídica con residuos de serina, **2)** cadenas laterales heterogéneas de glucanos unidos en posición alfa 1-6 (con secuencias de 4 a 25 residuos) y tienen un disacárido central (Glc beta1-6Gal), unido vía puentes fosfodiéster a residuos de serina en la cadena polipeptídica y **3)** un GPI que caracteriza a los PPG y que contiene una secuencia central de glicanos y cadenas laterales más extensas de alfa galactosa (Moody-Haupt *et al.*, 2000).

La LPPGEh está considerada como una molécula tipo polisacárido, la cual contiene 75 a 80% de carbohidratos, 8% de proteínas, 2.5% de lípidos y 1% de fosfatos (Isibasi *et al.*, 1986; Isibasi *et al.*, 1990).

El análisis previo ha mostrado que las preparaciones de LPG y LPPG migran como bandas poli-dispersas entre (100 a 190 KDa) y (36 a 57 KDa), observado en el análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Moody *et al.*, 1997).

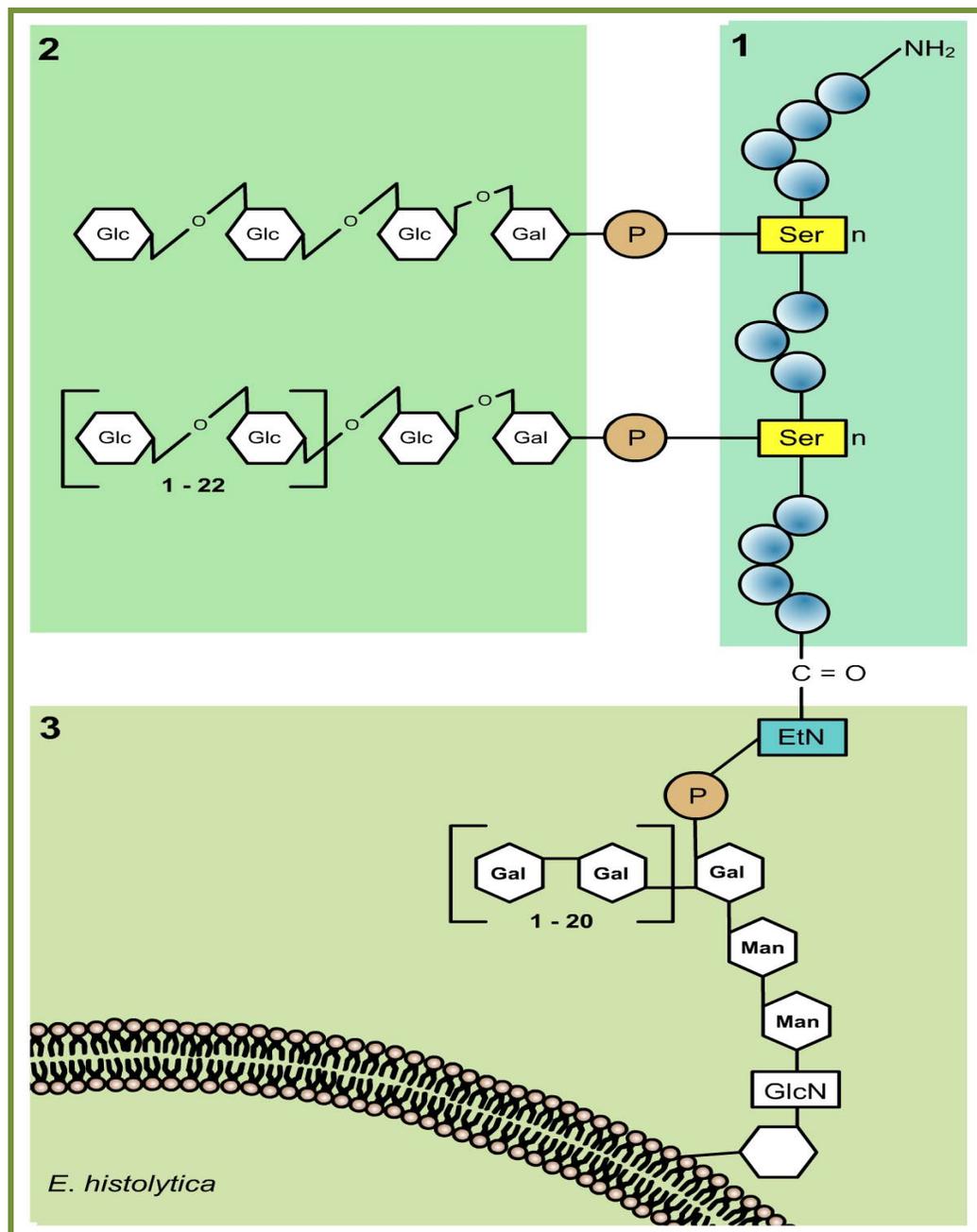


Figura 4: Estructura parcial de la LPPGEh. 1) Dominio polipeptídico; 2) Dominio de glucanas. Glc: Glucosa; Man: Manosa; Gal: Galactosa; Ser: Serina; EtN: Etanolamina; P: Grupo fosfato; GlcN: N-acetilgalactosamina, y 3) Dominio GPI anclado a glicanas.

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

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

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

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

En el PIEha, el glicerol está sustituido únicamente en la posición *sn*-1 por un ácido graso de cadena larga, lo cual se asemeja al anclaje presente en la LPG de *Leishmania donovani* (Orlandi, 1987). Por otra parte, PIEhb también posee un solo ácido graso de cadena larga en la posición *sn*-1 del glicerol, pero también posee una acilación en el anillo inositol en la posición 2, lo cual no es característica común entre anclajes de GPI de protozoarios, ya que generalmente ésta acilación se presenta únicamente durante el proceso de biosíntesis y es removida como un pre-requisito para su expresión en la superficie (McConville, 1993; Ferguson, 1999). Además, se propuso la presencia de un GPI anclado en la superficie de la LPPGEh, basado en la presencia del motivo o *core* Man α 1-4GlcN α 1-6*myo*-inositol-1-PO₄-lípidos, que lo sitúa como miembro de la familia de los GPI. Sin embargo, no se demostró ninguna evidencia de la presencia de lípidos unidos al *core* (González-Roldán, 2008). El PIEhb no es único ya que se ha encontrado en el caso de los GPI de *Plasmodium falciparum* (Naik *et al.*, 2000) y del GPI de la proteína PARP (Proteína repetitiva de ácido procíclico) de *Trypanosoma brucei* (Field *et al.*, 1991).

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

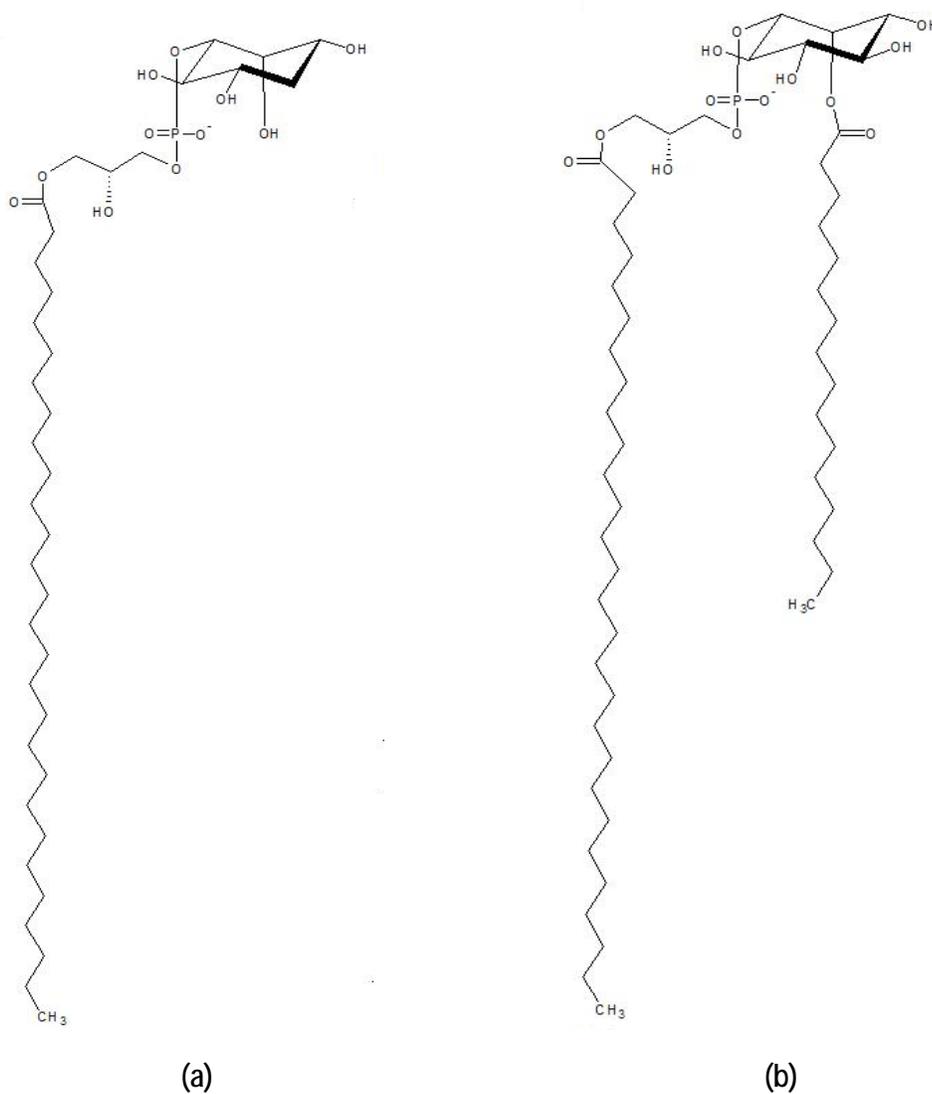


Figura 5: Estructuras (a) PIEha y (b) PIEhb, propuestas para el GPI de *E. histolytica*.

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

2.6 La respuesta inmunitaria a la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica*.

El sistema inmunitario del hospedero, está integrado por dos tipos de mecanismos: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunológica adquirida, ambas son interdependientes y mutuamente complementarias (Medzhitov y Jeneway, 2000a). La activación de la inmunidad innata, es dependiente del

reconocimiento de moléculas comunes presentes en los diversos patógenos (bacterias, virus, parásitos y hongos), y diferentes a las moléculas del hospedero. Este grupo de moléculas son conocidas con el nombre genérico de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Medzhitov y Jeneway, 2000b).

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

Al grupo de moléculas tipo PAMP, entre ellas, el LPS, los ácidos lipoteicoicos, la flagelina, la peptidoglicana y las mananas, se propone incluir la LPPGEh. El estudio de la estructura de la LPPG y su habilidad de activar *in vitro* a la respuesta inmunitaria innata, es muy importante para el control inmune del parásito. De acuerdo a esta propuesta, un aspecto interesante, es el análisis de la estructura y la interacción de las variantes de LPPG con el grupo de receptores tipo PRR, entre ellos, los receptores tipo Toll (TLR). Está demostrado que los TLR son capaces de distinguir modificaciones estructurales en las moléculas; por ejemplo, el LPS de diferentes bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (LPS hexa-acilado), que activa fuertemente TLR4 humano a diferencia del LPS penta-acilado de la misma especie, que no lo activa (Hajjar *et al.*, 2002). Asimismo, otras moléculas de LPS de otras bacterias como *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumófila* y *Yersinia pestis*, activan escasamente a TLR4 humano, por lo que esta activación diferencial por estas moléculas a los TLR podría estar relacionada al potencial de estos microorganismos de causar enfermedad (Miller *et al.*, 2005).

Moléculas de LPGEh y LPPGEh también señalizan a través de TLR, particularmente TLR2 (Maldonado *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2005). El reconocimiento de moléculas tipo PAMP de *E. histolytica* pueden iniciar

la respuesta inflamatoria/innata y contribuir al daño o invasión del parásito al hígado (Moody-Haupt *et al.*, 2000), o en su caso, el parásito puede iniciar activación en macrófagos con producción de óxido nítrico.

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

2.7 Anticuerpos monoclonales y su importancia.

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) son glucoproteínas altamente especializadas, que forman parte del sistema inmune y son producidas por las células B, con la capacidad de reconocer moléculas específicas (Ag) (Sampalo y López, 1992). Los AcMo son herramientas esenciales en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas; así como en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero y en la caracterización de moléculas que representan modelos de estudio en la respuesta inmune hacia agentes patógenos, mediante la marcación, detección y cuantificación de dichas moléculas (Machado *et al.*, 2006),

La producción de AcMo surgió en 1975 por Georges Köhler y César Milstein, que demostraron la posibilidad de producir dichos Ac mediante la fusión de linfocitos B con células mielomatosas (Köhler y Milstein, 1975). Las células de mieloma, son células deficientes en la enzima hipoxantil-guanil-fosforribosil-transferasa (HGPRT) (**Figura 6**). Este defecto enzimático permite la selección post-fusional. Durante la fusión existen dos vías necesarias para la formación de los precursores del DNA, la vía de novo y la vía de salvamento. La HGPRT es una enzima que utiliza guanina (G) o hipoxantina (H) para producir purinas, lo que permite la reutilización de las bases cuando la síntesis de novo se ve interrumpida, por ejemplo, por antagonistas del ácido fólico, como la aminopterina (A), que bloquea la síntesis de purinas y de timidina (T), por lo que los híbridos siguen la vía de salvamento, utilizando la adición de T al medio, permitiendo a la célula sintetizar timidina monofosfato (TMP) vía timidina quinasa (TK) (Margni, 2005). El medio selectivo HAT consiste en enriquecer el medio de cultivo celular con H y T, con el agregado de A

como inhibidor de la síntesis de novo, por lo tanto en presencia de A, solo podrán sobrevivir aquellas células que expresan HGPRT, como los hibridomas. Las de mieloma morirán y las de bazo no sobreviven por mucho tiempo en cultivo (Margni, 2005).

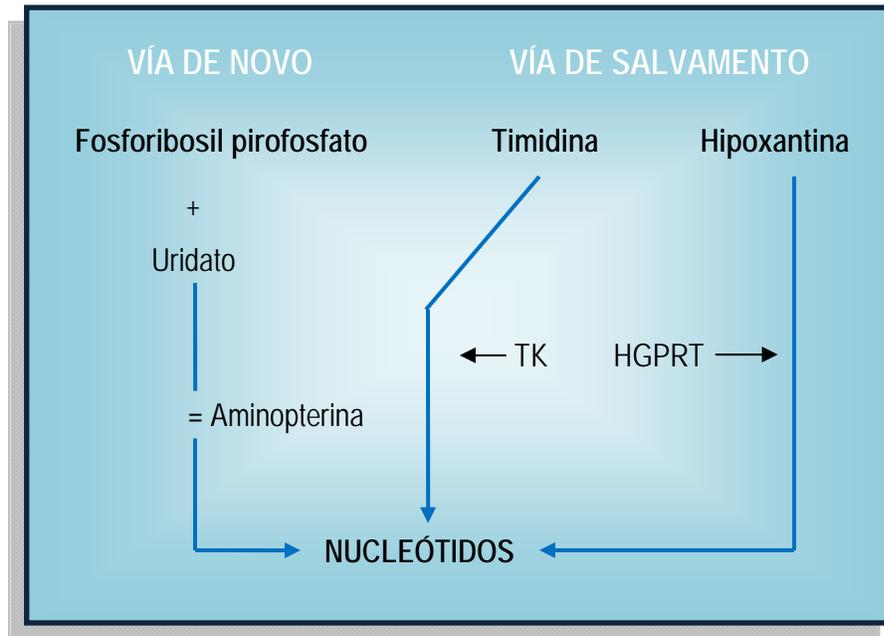


Figura 6: Vías utilizadas por las células de mamíferos para la síntesis de nucleótidos. TK: timidina quinasa. HGPRT: hipoxantina guanina fosforibosil transferasa.

Modificado de Margni, 1996. pp. 781-796.

3. ANTECEDENTES

El análisis de los estudios *in vitro* de inhibición de la adherencia por sustratos a lectinas y la microscopía electrónica, ponen en evidencia la cubierta de glucocalix en los trofozoítos de *E. histolytica* (Orozco *et al.*, 1985) y se muestra que las cepas, especies y clonas de *E. histolytica* pueden diferenciarse en base a sus carbohidratos de superficie. Entre las moléculas de diferenciación de cepas virulentas y no virulentas, está un lípido fosforilado, la LPPGEh, una molécula tipo polisacárido que se involucró de forma inicial en la adhesión del parásito a las células del hospedero (Stanley *et al.*, 1997).

Los estudios preliminares del análisis estructural y funcional de la LPPGEh, revelan a una molécula tipo PAMP, que correlaciona con la virulencia del parásito, única en especificidad. Asimismo, trabajos previos han descrito Ac de tipo monoclonal que reconocen proteoglicanos en algunas clonas axenizadas de *E. histolytica*, entre ellos, el Ac llamado 2D7.10 (Bhattacharya *et al.* 1990). Sin embargo, este Ac no reconoce a otras cepas, por ejemplo, la cepa 200:NHI y la Rahman. Estos resultados sugieren a los proteofosfoglicanos de estas cepas como antigénicamente diferentes (Bhattacharya *et al.*, 1990; Bhattacharya *et al.*, 1992). El polimorfismo en la LPG ha sido observado en varias clonas de *E. histolytica* y está demostrado porque el Ac 2D7.10 es incapaz de reconocer a estas clonas.

El papel de los Ac dirigidos a la LPPGEh puede ser útil en el diagnóstico bajo ciertas condiciones y controles adecuados; sin embargo, la variabilidad de la molécula entre las diferentes cepas virulentas hace difícil su aplicación. Por otro lado, la inmunización pasiva con AcMo (EH5) contra los proteoglicanos de *E. histolytica*, inhibe la formación de absceso hepático amibiano en modelos de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), lo que hace sugerir que estos Ag son importantes en la virulencia del parásito (Marinets *et al.*, 1997). En otros estudios, el pre-tratamiento a murinos (SCID-HU-INT) por vía intraperitoneal y xenotransplante intestinal sometidos a infección por *E. histolytica*, genera menor inflamación intestinal con respecto al grupo murino control (Marinets *et al.*, 1997). Asimismo, se ha reportado el papel protector de la IgA anti-amibiana circulante, ya que elimina al Ag presente en circulación, evitando que este forme complejos inmunitarios con IgG o IgM que fijan complemento y pueden causar lesión tisular (Campos-Rodríguez *et al.*, 1986). Estos datos proporcionan evidencia de la pre-existencia de Ac que podrían ser un punto crítico en la superficie de la amiba para proteger en contra de la colitis amibiana (Haque *et al.*, 2001).

4. JUSTIFICACIÓN

Reportes previos de anticuerpos monoclonales contra antígenos tipo fosfoglicanos, han contribuido a describir la importancia de estas moléculas complejas en la protección contra el parásito (Prasad *et al.*, 1992). Sin embargo, la disponibilidad de anticuerpos dirigidos a estos antígenos y su especificidad en cepas y clonas virulentas de *Entamoeba histolytica* está limitado; por lo que la obtención de un anticuerpo monoclonal dirigido contra LPPGEh permitirá el análisis de los mecanismos de interacción con el sistema inmunitario del hospedero.

5. HIPÓTESIS:

La generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales dirigidos a lipopeptidofosfoglicana (LPPG) de la cepa virulenta de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, es capaz de identificar a la molécula en la superficie del trofozoíto.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales dirigidos a lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

6.2 Objetivos particulares

- Realizar la extracción de LPPG de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1-IMSS y su caracterización, mediante la determinación de azúcares (antrona), proteínas (Lowry), identificación en geles de poliacrilamida y determinación de endotoxina (prueba de Limulus).
- Obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra LPPG de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y su identificación por el método de ELISA.
- Evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-LPPG, mediante ensayos de ELISA e IET.
- Producción de líquido de ascitis en ratones BALB/c por inoculación de hibridomas productores de anticuerpos anti-LPPG.
- Análisis del reconocimiento Ag-Ac de la LPPGEh en trofozoítos, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material

7.1.1 Reactivos

Los reactivos para la preparación del medio TYI-S33 para el cultivo axénico de los trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS, se adquirieron de Becton Dickson and Company (EUA) y SIGMA; el fenol al 90% empleado en el proceso de extracción de LPPG fue grado HLPC adquirido de Riedel de haën (Sigma Aldrich, Germany), el inhibidor de proteasas (iodoacetamida), fue adquirido de SigmaUltra (USA). Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de GIBCO (Grand Island, N.Y.), y los reactivos grado biología molecular se adquirieron de Sigma (USA).

7.1.2 Material Biológico

Para la extracción de AgMEh y LPPGEh, se utilizaron trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1-IMSS, cultivados axénicamente.

Para el esquema de inmunización se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c, de 6 1/2 semanas de edad, y para la producción de líquido de ascitis, de 8 semanas de edad.

Para la fusión celular se usó la línea celular P3x63Ag8.653, una de las principales líneas de mielomas murinos, que se caracteriza por no sintetizar cadenas de inmunoglobulinas y que es deficiente de la enzima HGPRT.

7.1.3 Medios de cultivo Celular

Para el cultivo de células de ratón y de mieloma, se utilizó medio Advanced RPMI-1640 GIBCO (Grand Island, N.Y.), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) GIBCO (Grand Island, N.Y.), penicilina y estreptomycin GIBCO, 2 mM y L-glutamina GIBCO, 2 mM. La fusión celular se realizó

empleando polietilenglicol (PEG) adquirido de SIGMA. En la selección de los hibridomas se empleó medio RPMI marca GIBCO al 10% de SFB suplementado con HAT (ver apéndice).

7.2 Métodos

7.2.1 Cultivo de la cepa amibiana de *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS fueron cultivados axénicamente a 37°C en medio TYI-S33 (ver apéndice) y que fueron cosechados en la fase logarítmica de su crecimiento (Diamond *et al.*, 1978). Los trofozoítos fueron despegados de las paredes de las botellas de cultivo de 225 cm², colocando éstas en hielo durante 10 minutos; a continuación se agitaron las botellas, se colectó el medio y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón fue resuspendido con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (ver apéndice). Se realizó el conteo de trofozoítos en cámara de Neubauer y nuevamente se centrifugó a las condiciones ya mencionadas, realizándose dos lavados más con PBS. La biomasa obtenida se concentró en un tubo Falcon y se conservó a -70 °C hasta su uso.

7.2.2 Extracción de antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

La extracción del AgMEh se realizó de acuerdo con el método descrito por Ramwani y Mishra (Ramwani y Misra, 1986). Se emplearon 80x10⁶ trofozoítos concentrados en tubo Falcon, el cual fue colocado en baño de hielo durante 20 minutos para el desprendimiento de los trofozoítos. Se resuspendió la muestra con 10 ml de PBS y se centrifugó a 430 xg (Hettich, AJ 18-481), 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón se reconstituyó con 2 ml de solución inhibidora de proteasas (ver apéndice), se realizó el rompimiento de membranas con el homogenizador Dounce por 30 strokes y se procedió a centrifugar a 12,000 xg por 10 minutos a 4°C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se colocó en tubos para ultracentrífuga (Beckman), completando el volumen faltante con solución inhibidora de proteasas; se ultracentrifugó a 130,000 xg (Beckman mod. L8-804, rotor 60 Ti, serie 779), 1 hora a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 500 µl de PBS y se alicuotó en volúmenes de 100 µl que se almacenaron a -70°C hasta su uso (Figura 7).

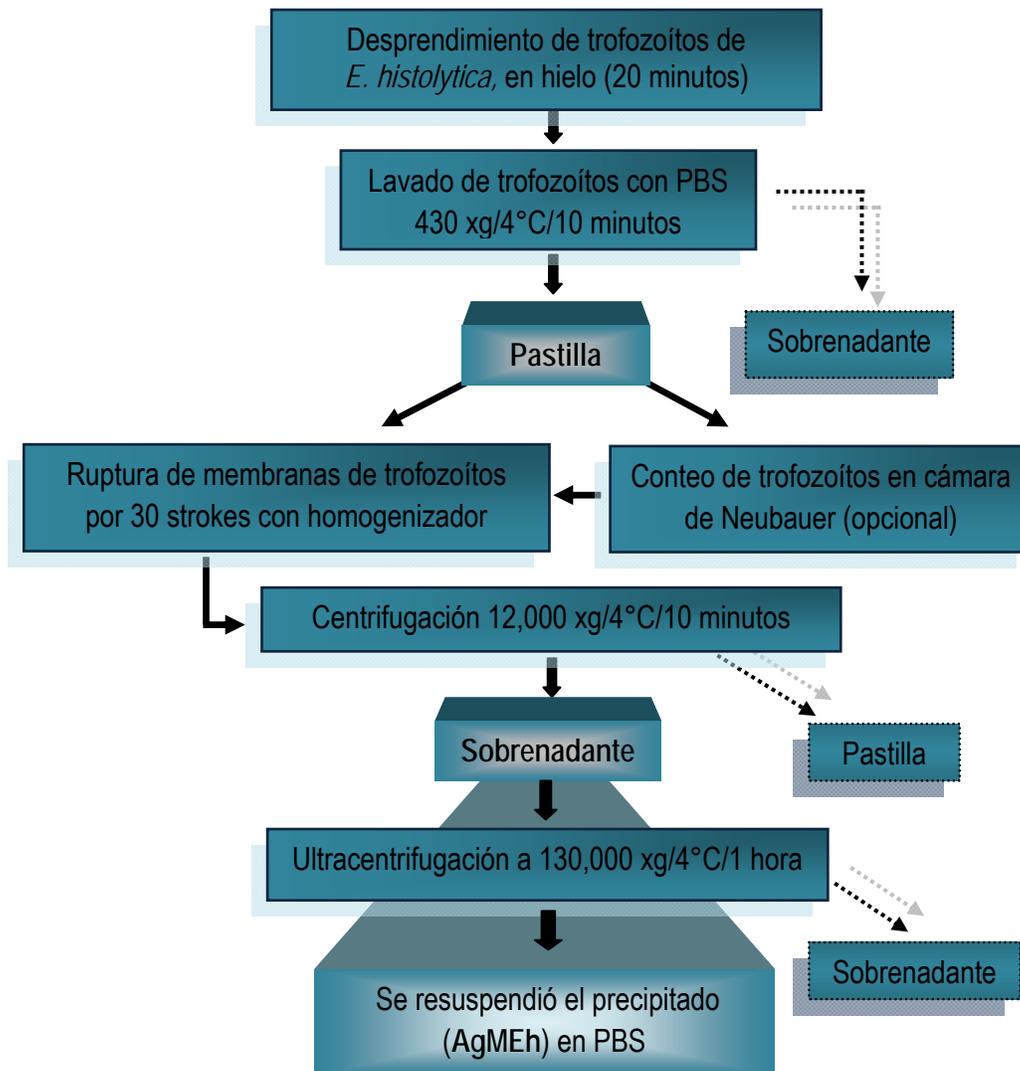


Figura 7: Extracción de AgMEh HM1-IMSS.

7.2.3 Extracción de lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

La extracción de LPPGEh, se realizó por el método de fenol-agua descrito por Westphal y Jann y modificado por Isibasi *et al* (Westphal, 1965; Isibasi, 1982). Se inició la extracción a partir de 8×10^9 trofozoítos aproximadamente, que fueron congelados a -70°C , durante 20 minutos y posteriormente descongelados a temperatura ambiente (3x). Los trofozoítos fueron lavados con 10 ml de PBS, centrifugando a $10,000 \text{ xg}$, 5 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se colocó en tubos

para ultracentrifuga, se sometió a ultracentrifugación a 150,000 xg, por 2 horas a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 5 ml de agua inyectable, los cuales se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml y se les adicionaron 5 ml de fenol al 90%, se homogenizó invirtiendo el tubo varias veces y se colocó en baño maría por 30 minutos a 68 °C; posteriormente se centrifugó a 12,000 xg durante 30 minutos a 4°C. Se recolectó la fase acuosa y se adicionaron sobre la pastilla contenida en el tubo, 5 ml de fenol al 90% y 5 ml de agua, y se repitió la extracción dos veces más. Las fases acuosas fueron puestas a diálisis con agua inyectable en una relación 1:20, durante 3 días a 4°C.

La muestra dializada, libre de fenol, se ultracentrifugó a 150,000 xg, durante 2 horas a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la capa de glicolípidos se reconstituyó en 500 µl de PBS, se alicuotó en volúmenes de 100 µl y se almacenó a -70 hasta su uso. De manera breve, el procedimiento se resume en la Figura 8.

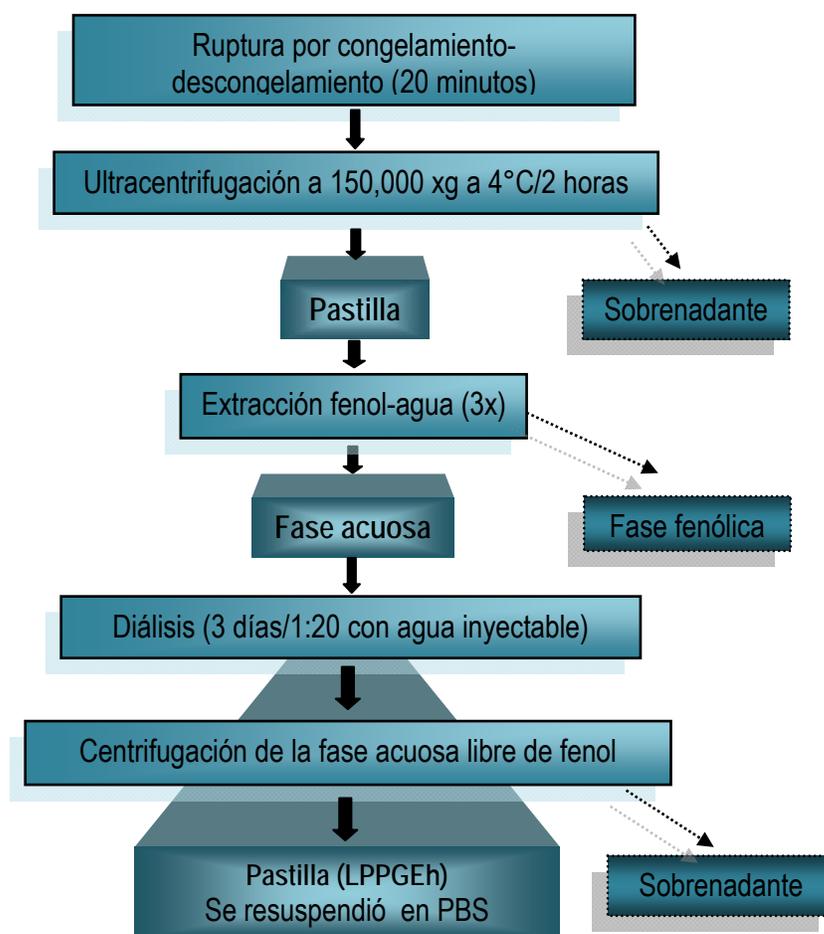


Figura 8: Extracción de LPPGEh HM1-IMSS por el método fenol-agua.

7.2.4 Determinación de endotoxina (lisado de amebocitos *Limulus polyphemus*).

Para determinar la presencia de LPS en la molécula de LPPGEh se realizó la prueba de aglutinación de lisado de amebocitos *Limulus polyphemus* (Endosafe LAL). Se elaboró una curva patrón a partir de diferentes concentraciones de endotoxina (Tabla 1). El ensayo se realizó por duplicado, colocando 900 µl de agua libre de pirógenos y 100 µl de la solución patrón de endotoxina en el tubo 1, de esta dilución, se tomaron 100 µl que se colocaron en el tubo 2 con 900 µl de agua libre de pirógenos, y de esta nueva dilución se tomaron 100 µl llevados a 1 ml con agua libre de pirógenos en el tubo 3. De esta dilución se tomaron 500 µl, que se colocaron en el tubo 4 con 500 µl de agua libre de pirógenos, y a partir de este tubo, se realizaron las diluciones dobles (Tabla 1). También, se tomaron 100 µl de la muestra problema, considerando diluciones de 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200 en agua libre de pirógenos. A la par, se corrieron los controles: control positivo (100 µl de muestra, 20 µl del tubo 3), y control negativo (100 µl de agua libre de pirógenos). A cada uno de los tubos se adicionaron 100 µl de Limulus. (Cooper *et al.*, 1971).

Tabla 1. Curva patrón de endotoxina.

Curva	No. Tubo	Agua (µl)	Solución patrón (µl)	Concentración (UE/ml)
Estándar	1	900	100	100
Dilución	2	900	100 ⁽¹⁾	10
	3	900	100 ⁽²⁾	1
	4	500	500 ⁽³⁾	0.5
	5	500	500 ⁽⁴⁾	0.25
	6	500	500 ⁽⁵⁾	0.125
	7	500	500 ⁽⁶⁾	0.0625
	8	500	500 ⁽⁷⁾	0.03125
	9	500	500 ⁽⁸⁾	0.01562

Los números entre paréntesis indican el número de tubo a partir del cual se realizó la dilución.

Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 1 hora y posteriormente se realizó la lectura.

La presencia de endotoxina se considera positiva cuando se presenta formación firme de un coágulo en gel, el cual se mantiene íntegro al invertir 180° el tubo de ensayo, y en su caso negativo, cuando no hay formación firme y no es retenido cuando el tubo es invertido.

7.2.5 Cuantificación de azúcares reductores por el método de Antrona.

El análisis del contenido de carbohidratos en el AgMEh y en la LPPGEh, se realizó por el método de antrona (Dubois, 1956), empleando 25, 50 y 100 μL de cada una de las moléculas, que se llevaron a un volumen final de 500 μl con agua destilada. Las muestras fueron tratadas con antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado (1 ml), junto con la curva patrón de glucosa que se preparó como se indica en la Tabla 2 (ver preparación de soluciones en apéndice). Todos los tubos fueron colocadas a ebullición en baño maría durante 10 minutos, se dejaron enfriar y se tomó la lectura de absorbancia a 660 nm contra un blanco de reactivos elaborado con agua destilada. El contenido de azúcares reductores en las moléculas se determinó por interpolación en la curva patrón de glucosa (μg de glucosa contra absorbancia).

Tabla 2. Curva patrón de glucosa.

Tubo	SOL. PATRON DE GLUCOSA (mg/ml)			Agua (μl)	Antrona/H ₂ SO ₄ (ml)	Conc. Glucosa μg
	0.01 (μl)	0.1 (μl)	1.0 (μl)			
1 (Blanco)	X	X	X	1000	2	0.0
2	500	X	X	500	2	5.0
3	X	100	X	900	2	10.0
4	X	200	X	800	2	20.0
5	X	400	X	600	2	40.0
6	X	X	80	920	2	80.0

7.2.6. Cuantificación de proteínas por método de Lowry.

Las proteínas presentes en el AgMEh y en la molécula de LPPGEh, se determinaron por el método de Lowry, para lo cual se elaboró una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) (SIGMA), a partir de concentraciones de 0.2 a 0.7 mg/ml, considerando al mismo tiempo, una serie de tubos control con agua destilada. Se adicionaron, en un primer paso, 20 μ l de ácido tricloroacético al 72%, se incubó a 4°C durante 30 minutos, posteriormente se adicionaron 89 μ l de hidróxido de sodio 0.5 N y 11 μ l de la solución de hidróxido de sodio 5 N, se procedió a calentar las muestras en baño maría por 10 minutos. A continuación, se adicionó 1 ml de la mezcla de reacción y finalmente 100 μ l de reactivo Folin-Ciocalteau (Merck) 1.0 N, se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Al mismo tiempo y bajo el mismo tratamiento que la curva patrón, se trabajaron las moléculas, considerando volúmenes de 25, 50 y 100 μ l. La lectura de absorbancia se tomó a 750 nm de longitud contra un blanco de hidróxido de sodio 0.5 N. La cantidad de proteínas se determinó por interpolación en la curva patrón (mg de proteína contra absorbancia), (ver preparación de soluciones en apéndice).

7.2.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), análisis de proteínas por tinción de Coomassie, análisis de carbohidratos por tinción de plata y reconocimiento Ag-Ac por Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot).

Las moléculas del AgMEh y la LPPGEh, se separaron mediante un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 10%, empleando una unidad electroforética para geles verticales en placa (BIO-RAD), en solución amortiguadora de corrimiento y bajo condiciones no reductoras, utilizando amortiguador de carga elaborado a base de glicerol y azul de bromofenol (ver preparación de soluciones en apéndice). El corrimiento se realizó a 70V hasta que las muestras pasaron al gel de corrimiento, y posteriormente a 120V constantes hasta la salida del frente de corrimiento (Correa *et al.*, 2000).

Las proteínas presentes en el AgMEh fueron detectadas por tinción con azul de Coomassie (límite de detección 0.3 a 1 μ g proteína/ banda), durante 1 hora; posteriormente, se eliminó el exceso de colorante mediante solución a base de ácido acético glacial y metanol. También se realizó la tinción de plata para la detección de carbohidratos en la LPPGEh, fijando las moléculas presentes en el gel con

solución de metanol/ácido acético durante 30 minutos, se lavó el gel con agua destilada (2x) y posteriormente se agregó metanol al 50% (3x, 15 minutos cada uno). Se lavó el gel nuevamente con agua destilada (2x) y se agregó la solución de oxidación durante un minuto, se volvió a lavar el gel durante 20 segundos (3x) y se colocó la solución de impregnación por 15 minutos. Nuevamente se lavó el gel durante 20 segundos (2x) y se cubrió ahora con solución reveladora, se dejó en agitación suave hasta que se apreció claramente el corrimiento de las muestras, se retiró la solución reveladora, se lavó el gel durante 1 minuto (2x) y finalmente se colocó en solución de paro (ver preparación de soluciones en apéndice).

Los geles fueron deshidratados para su conservación, colocándolos en solución de glicerol por una hora, junto con el papel filtro y celofán. Posteriormente, se colocaron sobre el equipo de secado: primero el papel filtro, después el gel y sobre éste el celofán y se secaron a 60°C durante 1 hora (ver solución en apéndice).

También se realizó el análisis antigénico, mediante IET. Se sometieron a corrimiento electroforético las muestras de LPPGEh, AgMEh y LPS (estos dos últimos como controles) y posteriormente fueron transferidas a membrana Immobilon. La membrana fue activada en metanol absoluto durante 5 minutos y posteriormente fue colocada en solución amortiguadora de transferencia (20-30 minutos), junto con los filtros y el gel. La transferencia se realizó durante 1 hora a 20V constantes. Al término de ésta, se colocó la membrana en rojo de Ponceau para observar el paso de las moléculas a la membrana. Se eliminó el colorante por lavados con TBS-T. Se bloquearon los sitios inespecífico con solución de bloqueo (30 minutos a 37°C), se lavó la membrana con solución amortiguadora de tris con Tween 20 (TBS-T) durante 5 minutos (4x). Paso seguido, se incubó con el AcMo anti-LPPG una vez obtenido, por un tiempo de 3 horas a 37°C. Se lavó la membrana con TBS-T, 5 minutos (6x) y se adicionó el Ac secundario anti-IgG total de ratón elaborado en cabra, conjugado a peroxidasa (Zymed), en una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo y se incubó 1.5 horas a 37 °C. Se lavó la membrana con TBS-T, 5 minutos (7x) (Burnette, 1981; Correa, 2000) (ver soluciones en apéndice). Se retiró el TBS-T y se procedió a revelar.

El revelado se realizó por quimioluminiscencia en un cuarto oscuro. Se colocaron en tres recipientes distintos, la solución reveladora, el agua y el fijador. Se colocó la membrana sobre un cassette y sobre esta, 1 ml del sustrato, y se puso en contacto con una película de autorradiografía, durante 10 minutos.

Después de la exposición, se colocó la película autorradiográfica en la solución de revelado por 3 minutos, se lavó en agua y por último se impregnó en la solución fijadora, se dejó secar la placa y se observó en el analizador de imágenes (ver soluciones en apéndice).

7.2.8 Inmunización de animales vía intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV), y sangría retrorbital.

Se utilizaron 3 ratones hembra de la cepa BALB/c de 6^{1/2} semanas de edad, los cuales se inmunizaron con el AgMEh y LPPGEh, a diferentes dosis y en diferentes tiempos, como se especifica en la Tabla 3 (Marinets *et al.*, 1997).

Tabla 3: Inmunización y toma de muestra en ratones BALB/c.

No. de dosis	Día	Concentración de antígeno	Vía de inmunización/toma de muestra
1	0	100 µg de AgMEh en 500 µl de SSF + 500 µl ACF	IP
2	7	100 µg de AgMEh en 500 µl de SSF + 500 µl AIF	IP
3	14	100 µg de AgMEh en 500 µl de SSF + 500 µl AIF	IP
4	20	100 µg de AgMEh en 20 µl de SSF	IV
5	28	100 µg de AgMEh en 20 µl de SSF	IV
	31	Sangría	Retrorbital
6	37	100 µg de LPPGEh en 300 µl de SSF.	IP
	40	Sangría	Retrorbital
7	52	50 µg de LPPGEh en 10 µl de SSF.	IV
	55	Sangría	Retrorbital

SSF: Solución salina fisiológica, ACF: Adyuvante completo de Freund, AIF: Adyuvante incompleto de Freund

Las muestras de sangre obtenidas de los ratones inmunizados, fueron centrifugadas a 400 xg durante 5 minutos a 4°C, se separó el suero y se determinó la presencia de Ac contra AgMEh, por ELISA.

En la tabla 3, se observa que algunas inoculaciones de Ag se aplicaron acompañadas de adyuvante; este es un agente que incrementa inespecíficamente la respuesta inmunitaria a un Ag dado; además actúa como depósito del mismo, propiciando que su liberación sea lenta y prolongada, y por lo tanto, que sea mayor su interacción con la célula presentadora de antígeno (CPA). Uno de los más empleados es el adyuvante de Freund, que es aceite mineral que puede ser completo o incompleto, dependiendo de la presencia o ausencia de micobacterias muertas en la mezcla (Correa, 2000).

El adyuvante utilizado fue marca GIBCO. Las dosis acompañadas de adyuvante se prepararon mediante el empleo de 2 jeringas de silicón, con capacidad para 2 ml, marca Chirana, colocando los 500 µL de adyuvante en una y en la otra la cantidad de Ag señalada en cada dosis, las jeringas fueron unidas mediante una manguera para realizar la mezcla.

7.2.9 Reconocimiento Ag-Ac por el método de ELISA (ensayo inmunoenzimático).

El ensayo del reconocimiento Ag-Ac por ELISA, se aplicó para la caracterización de las moléculas de AgMEh y LPPGEh, para la evaluación de títulos de Ac en los ratones inmunizados y para la detección de hibridomas productores de AcMo.

Se recubrieron los pozos de la placa de ELISA (Corning) con 50 µl de solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5 con una concentración de 0.6 µg/pozo del Ag (AgMEh o LPPGEh), se incubó 1 hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C. Se eliminó el exceso de Ag no pegado a la placa mediante el lavado de la misma con PBS-Tween (6x), se incubó luego en solución de bloqueo (PBS-leche) 1 hora a 37°C. Se lavaron los pozos nuevamente (6x), y se adicionó el primer Ac (en el caso de la caracterización de las moléculas, se usó un Ac policlonal de conejo –AcPC- como referencia; en la medición de títulos de Ac en el suero de ratones inmunizados, se emplearon diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 y para la detección de hibridomas, se utilizó sobrenadante de las células en cultivo o líquido de ascitis). Se incubó por 1 hora a 37 °C, se lavó la placa (6x). Posteriormente, se colocaron en cada pozo

50 µl del Ac anti-IgG de ratón elaborado en cabra conjugado con peroxidasa (Zymed) en el caso de la determinación de títulos de Ac en el suero de ratones y para el escaneo de hibridomas; y un Ac anti-IgG de conejo elaborado en cabra, conjugado con peroxidasa (Zymed), en el caso de la caracterización de moléculas, considerando en todos los casos una dilución 1:2000 en solución de bloqueo. Se incubó 1.5 horas a 37°C y se lavó la placa (8x). Se adicionó el sustrato, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad 10 minutos, se detuvo la reacción con 10 µl de H₂SO₄ 2.5 N en cada pozo y se leyeron las absorbancias a 490 nm en el lector de ELISA (Napco, modelo 6200) (Walker, 1994) (ver preparación de soluciones en apéndice).

7.2.10 Extracción de bazo para la obtención de células esplénicas.

Se seleccionó el ratón con altos títulos de Ac (determinados por ELISA) y fue sacrificado por dislocación cervical dentro de una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y fue colocado sobre un tamiz de 180 µm, colocado a su vez sobre una caja de Petri con 10 ml de RPMI sin SFB, previamente calentado a 37°C, y se maceró con ayuda del émbolo de una jeringa estéril. Se recuperaron las células de la caja de Petri y se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml, y se llevó a un volumen de 35 ml con medio RPMI sin SFB, se mezcló perfectamente y se centrifugó a 400 xg a 4°C por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular con 35 ml de medio RPMI sin SFB y se realizaron 2 lavados más, centrifugando cada vez a las condiciones ya mencionadas. Se realizó el conteo celular e inmediatamente se realizó la fusión con las células de mieloma X63-Ag8.653.

7.2.11 Cultivo de células de mieloma.

La línea celular de mieloma utilizada fue la X63-Ag8.653. Las células se descongelaron colocando el vial rápidamente en baño maría a 37°C y transfiriéndolas enseguida a un tubo Falcon con 8 ml de medio RPMI con SFB al 10%. Se centrifugó a 430 xg durante 5 minutos a 37°C, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 8 ml de RPMI con SFB al 10%, realizándose 2 lavados más a las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó todo el sobrenadante y las células (2x10⁶), fueron colocadas en una placa de cultivo de 24 pozos (Corning) en un volumen de 1 ml, que se mantuvieron bajo condiciones de 37 °C y 5% de CO₂, hasta que estuvieron a las condiciones ideales para cultivarlas

en botellas de 75 cm² y se emplearon para la fusión cuando se observó una confluencia del 100% (Correa, 2000).

7.2.12 Fusión celular.

Las células de mieloma X63-Ag8.653 en cultivo se llevaron a un volumen de 35 ml con RPMI sin SFB y se centrifugaron a 400 xg a 4°C durante 10 minutos; se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados más bajo las condiciones ya señaladas. Se decantó el sobrenadante, se realizó el conteo celular (30×10^6) y se mezclaron con las células de bazo de ratón en una relación 1:2 respectivamente. Se adicionó a la mezcla, 50 ml de medio RPMI sin SFB y se centrifugó a 400 xg a 4°C durante 10 minutos. Se decantó la mayor cantidad de sobrenadante, se colocó el tubo en baño maría a 37°C y se inició la adición gota a gota de 1 ml de PEG, en 1 minuto. Enseguida se adicionó 1 ml de RPMI sin suero en 1 minuto, de la misma manera que el PEG; inmediatamente se tomaron 2 ml de RPMI sin suero y se agregaron en 1 minuto, posteriormente, se colocaron 4 ml de medio en 2 minutos y finalmente 4 ml de medio en 4 minutos, agitando cada vez con la pipeta. Se agregó finalmente RPMI con SFB al 10% hasta llevar el volumen a 50 ml y se centrifugó a 400 xg a 37°C por 10 minutos. Se decantó y se resuspendió el botón celular con 50 ml de RPMI con SFB al 10% y se transfirieron a una botella de 75 cm², se dejó a temperatura de 37° con 5% de CO₂, durante 24 horas (ver preparación de soluciones en apéndice).

7.2.13 Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG en medio HAT.

Veinticuatro horas después de la fusión, las células se observaron al microscopio invertido y se adicionó medio HAT, a una concentración 1x. Se procedió a colocar esta suspensión en placas de 96 pozos (200 µl/pozo) y en placas de 24 pozos (2 ml/pozo), se mantuvieron en incubación a 37°C, con 5% CO₂ durante 10 días, hasta el vire del medio de naranja a amarillo, indicativo de crecimiento de las células híbridas, las cuales fueron monitoreadas por la técnica de ELISA antes descrita, usando como Ag la molécula de LPPGEh a una concentración de 0.6 µg/pozo y colocando el sobrenadante de las células en cultivo, sin diluir, como primer Ac.

7.3.14 Clonación de hibridomas por dilución limitante en medio HAT.

Las clonas productoras de Ac anti-LPPG seleccionadas por ELISA, fueron clonadas mediante la técnica de dilución limitante, empleando placas de cultivo de 96 pozos, colocando 100 μ l de medio con SFB al 10% y HAT 1x en toda la placa, se tomaron 100 μ l de la suspensión de hibridomas, que fueron colocados a lo largo de la columna 1, mezclándolos con el medio HAT y se hicieron diluciones seriadas de izquierda a derecha, hasta el final de la fila. Se llevó el volumen de cada pozo a 200 μ l con medio HAT 1x (Figura 9).

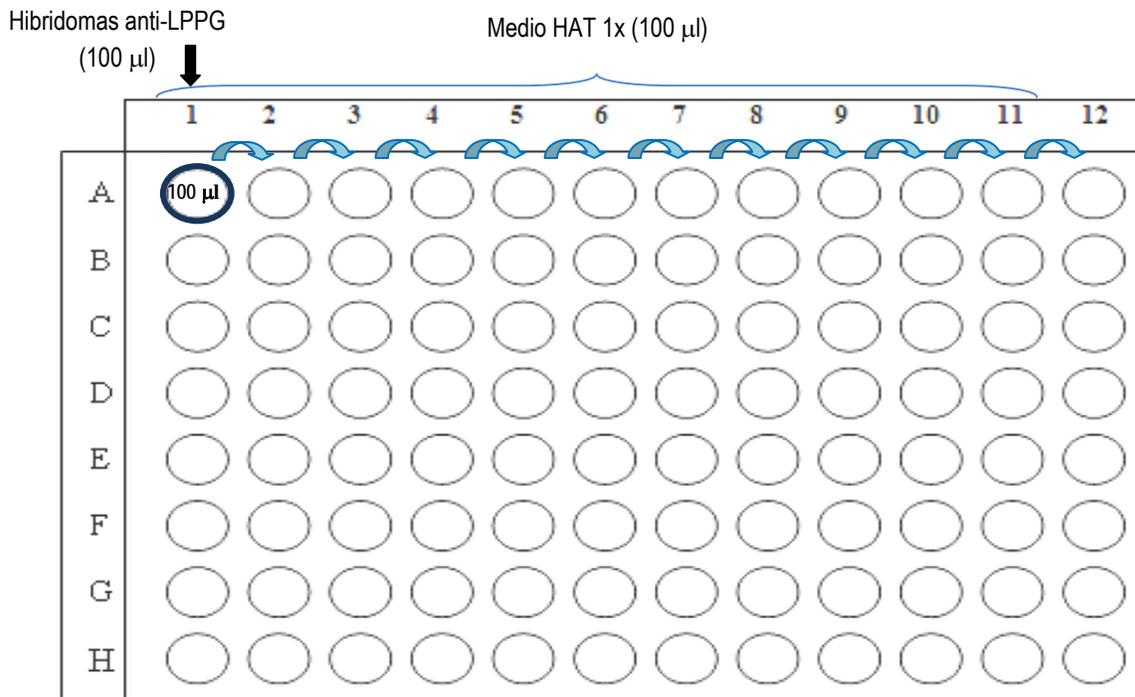


Figura 9: Clonación por dilución limitante en medio HAT.

El cultivo se mantuvo a 37 $^{\circ}$ C con 5% CO_2 durante 8-10 días. Posteriormente se revisaron al microscopio y nuevamente se seleccionaron aquellos pozos con formación de clonas para probarlos en ELISA y determinar si estas clonas estaban secretando Ac específicos, cuando esto resultó positivo, se procedió a repetir la clonación y expandir las células en cultivo o en peritoneo de ratón (Correa, 2000).

7.2.15 Expansión de hibridomas productores de AcMo en líquido de ascitis.

Para la expansión clonal de los hibridomas productores de AcMo anti-LPPG se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, a los que se les administró vía IP, 0.5 ml de pristane (Sigma). A los 8 días, fueron inoculados intraperitonealmente con las células en 0.5 ml de PBS estéril y a los 8-10 días post-inoculación, se observó el desarrollo de tumor y el líquido de ascitis fue extraído del peritoneo. El líquido de ascitis se centrifugó a 400 xg durante 10 minutos y se almacenó a -70 °C, hasta su uso.

De manera breve, se esquematiza la producción de los hibridomas productores de Ac, en la Figura 10.

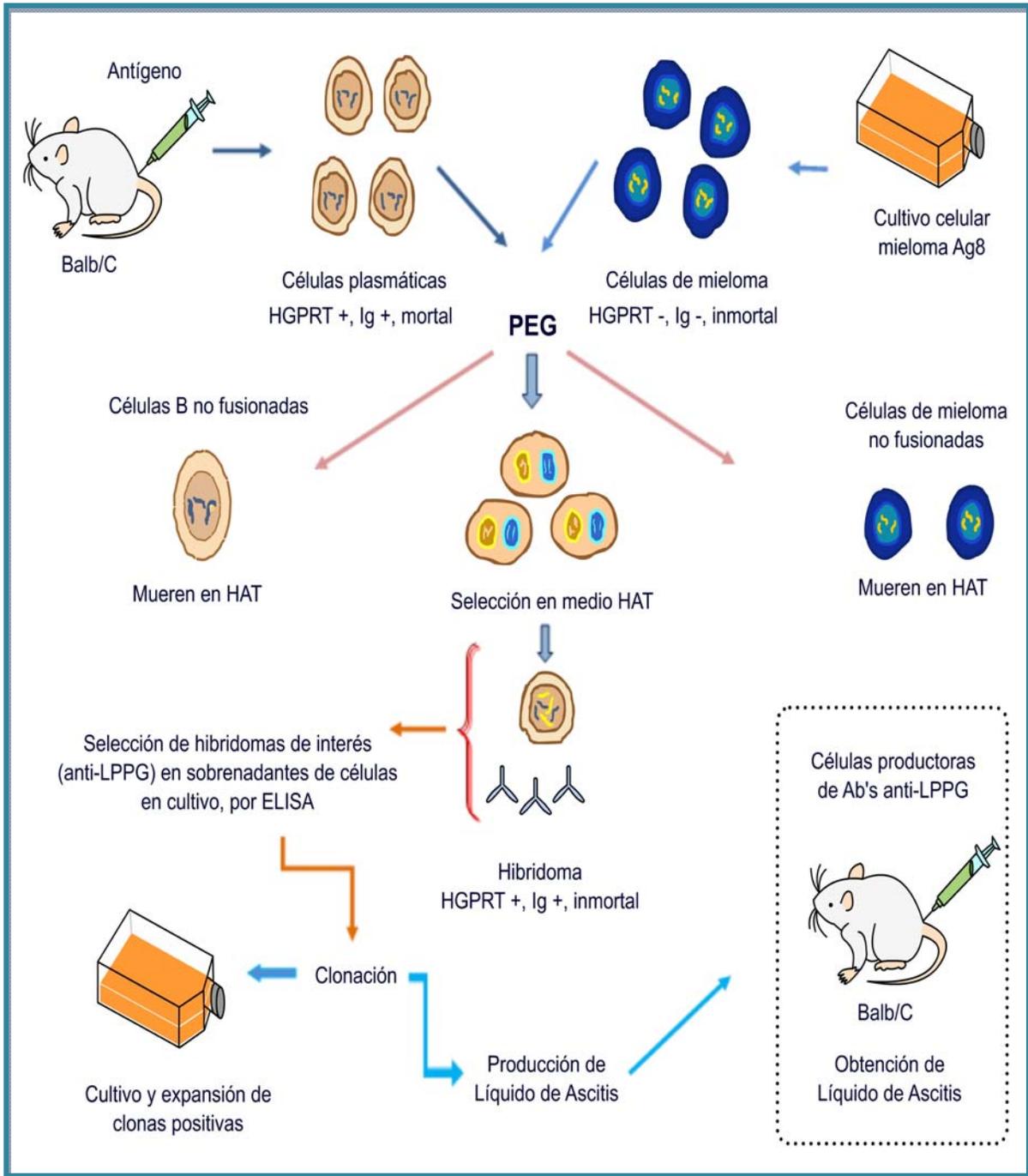


Figura 10: Obtención de hibridomas productores de AcMo por el método descrito por Köhler y Milstein. HGPRT: Hipoxantil-guanidil-fosforibosiltransferasa; Ig: Inmunoglobulina; Ag8: línea celular de mieloma deficiente de la enzima HGPRT; HAT: Hipoxantina-aminopterin-timina.

7.2.16 Inmunofluorescencia indirecta.

Se observó también el reconocimiento Ag-Ac por la técnica de IFI, partiendo de trofozoítos incluidos en cortes de parafina de 5 μ m. Los trofozoítos, fueron expuestos al Ac primario (líquido de ascitis anti-LPPG dilución 1:25), durante 30 minutos, posteriormente el Ac no pegado fue removido por lavados con PBS (2x) y se incubó con el Ac secundario (Ac de cabra anti-IgG de ratón marcado con Isotiocianato de Fluoresceína- FITC, marca Zymed), durante 30 minutos; se eliminó el Ac no pegado mediante lavados con PBS (2x) y finalmente, la muestra se revisó en el microscopio de fluorescencia colocando solución de montaje para fluorescencia sobre la muestra. La prueba es positiva únicamente cuando se observe un brillo amarillo-verde en el trofozoíto. Como control negativo, se empleó únicamente la incubación de los trofozoítos con el suero normal de ratón.

7.2.17 Criopreservación.

Para preservar los hibridomas obtenidos, se tomaron la células en crecimiento logarítmico, se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en 500 μ l de medio de cultivo y se tomó la cantidad necesaria para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer, tomando posteriormente la cantidad requerida para congelar, aproximadamente 1×10^6 células/ml, que son depositadas en la solución crioprotectora: 100 μ l de dimetilsulfoxido (DMSO) (SIGMA), 150 μ l de SFB en 750 μ l de medio RPMI con SFB al 10%. Se colocaron a -20 °C durante 2 horas aproximadamente y finalmente se conservaron a -70 °C hasta su uso.

8. RESULTADOS

8.1 Extracción del antígeno de membrana de *Entamoeba histolytica*.

La extracción del AgMEh, se realizó como comparativo a un Ag total que pudiera emplearse en la caracterización de la molécula de estudio, la LPPGEh; y se empleó también para iniciar el esquema de inmunización, con la finalidad de inducir de manera más rápida la producción de Ac. El análisis del AgMEh en contenido de azúcares y proteínas se realizó como se señaló en material y métodos. En la **Tabla 4** se muestran los valores en mg de estos componentes y como se puede observar no hay diferencias en el rendimiento entre carbohidratos y proteínas.

Tabla 4: Contenido de azúcares reductores y de proteínas en AgMEh HM1-IMSS.

Muestra: AgMEh	
Determinación	Rendimiento
Azúcares reductores (Antrona)	4.873 mg/ml
Proteínas (Lowry)	4.766 mg/ ml

Además, se determinó el corrimiento electroforético del AgMEh, revelado por tinción Coomassie (**Figura 11a**). En el barrido hay diferentes bandas de proteínas que no fueron identificadas de forma específica porque no fue el objetivo del trabajo, a la par, se corrió una muestra de LPS, que como es de esperarse, no se aprecia en esta tinción. Asimismo, la tinción de plata muestra un corrimiento en el cual hay bandas bien definidas que se modifican bajo diferentes condiciones de tratamiento (**Figura 11b**). También, se realizó un reconocimiento Ag-Ac por método de ELISA a diferentes concentraciones de Ag, en donde se observa que esta reacción es dependiente de la concentración de Ag y los valores de absorbancia están entre 0.2 y 0.5. (**Figura 11c**).

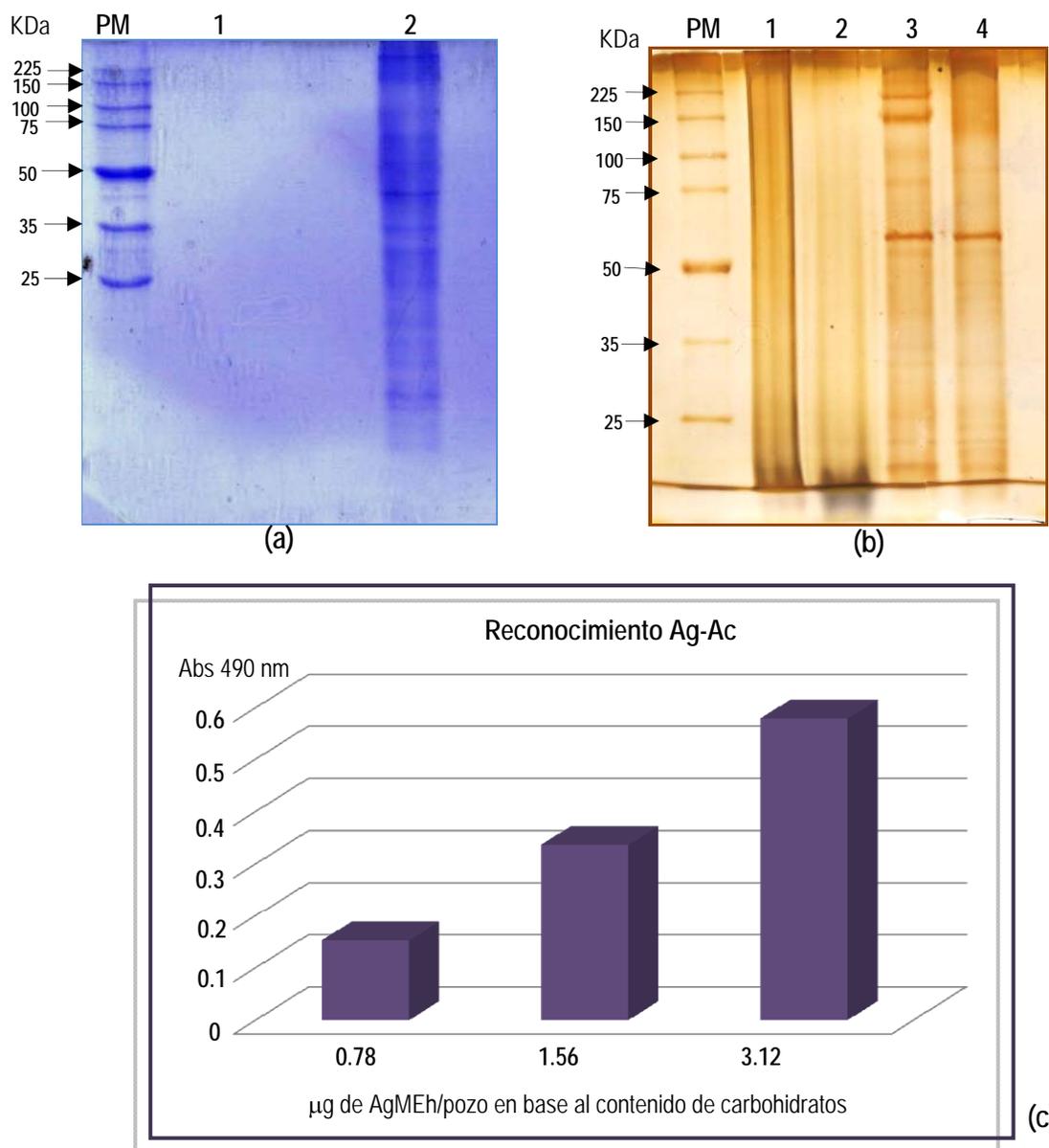


Figura 11: Caracterización del AgMEh.

- a) Corrimiento electroforético del AgMEh, revelado por tinción de Coomassie. PM: pesos moleculares (5 µg); 1) LPS lipopolisacárido de *E.coli* serotipo 055:B25 (10 µg); 2) AgMEh (10 µg).
- b) Corrimiento electroforético del AgMEh, revelado por tinción de plata. 1) LPS: (10 µg), 2) LPS (5 µg); 3) AgMEh: (10 µg), condiciones no desnaturalizantes; 4) AgMEh (10 µg), condiciones desnaturalizantes (5 minutos a ebullición).
- c) Reconocimiento Ag-Ac por método de ELISA, a diferentes concentraciones de Ag.

8.2 Obtención de lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica*.

En la **Tabla 5** se presentan los valores de azúcares y proteínas de tres diferentes lotes de LPPGEh. El primer lote, identificado como LM-CI-070307, fue empleado para cubrir el esquema de inmunización; mientras que los lotes 2 y 3, se emplearon para la selección de la clona productora de AcMo. Aunque hay variaciones entre los diferentes lotes en cuanto a las concentraciones de los componentes, los ensayos de caracterización e identificación de la molécula se ajustaron a 1 mg/ml de carbohidratos, que es el componente integral de la molécula de estudio.

Tabla 5: Contenido de azúcares reductores y proteínas de LPPGEh HM1-IMSS.

Muestra: Lipopéptidofosfoglicana (LPPG)		
Lote	Determinación	
	Azúcares Reductores (Antrona)	Proteínas (Lowry)
LM-CI-070307	3.808 mg/ml	2.34 mg/ml
CI-05-101207	19.0 mg/ml	0.3 mg/ml
LM-CI-31-070408	15.57 mg/ml	0.358 mg/ml

8.3 Caracterización de la lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica*.

Una vez purificada la LPPGEh de cada uno de los lotes, se procedió a analizar la molécula en geles SDS-PAGE al 10%, y debido a su naturaleza polisacáridica, se empleó como control positivo LPS 055:B5 en tinción de plata; al mismo tiempo se comparó con el extracto de AgMEh, y se observó que el corrimiento de ambas moléculas es diferente al de la LPPGEh. La **Figura 12a-c**, muestra el corrimiento LPPGEh como un desplazamiento polidisverso entre pesos moleculares de 35 a 225 KDa.

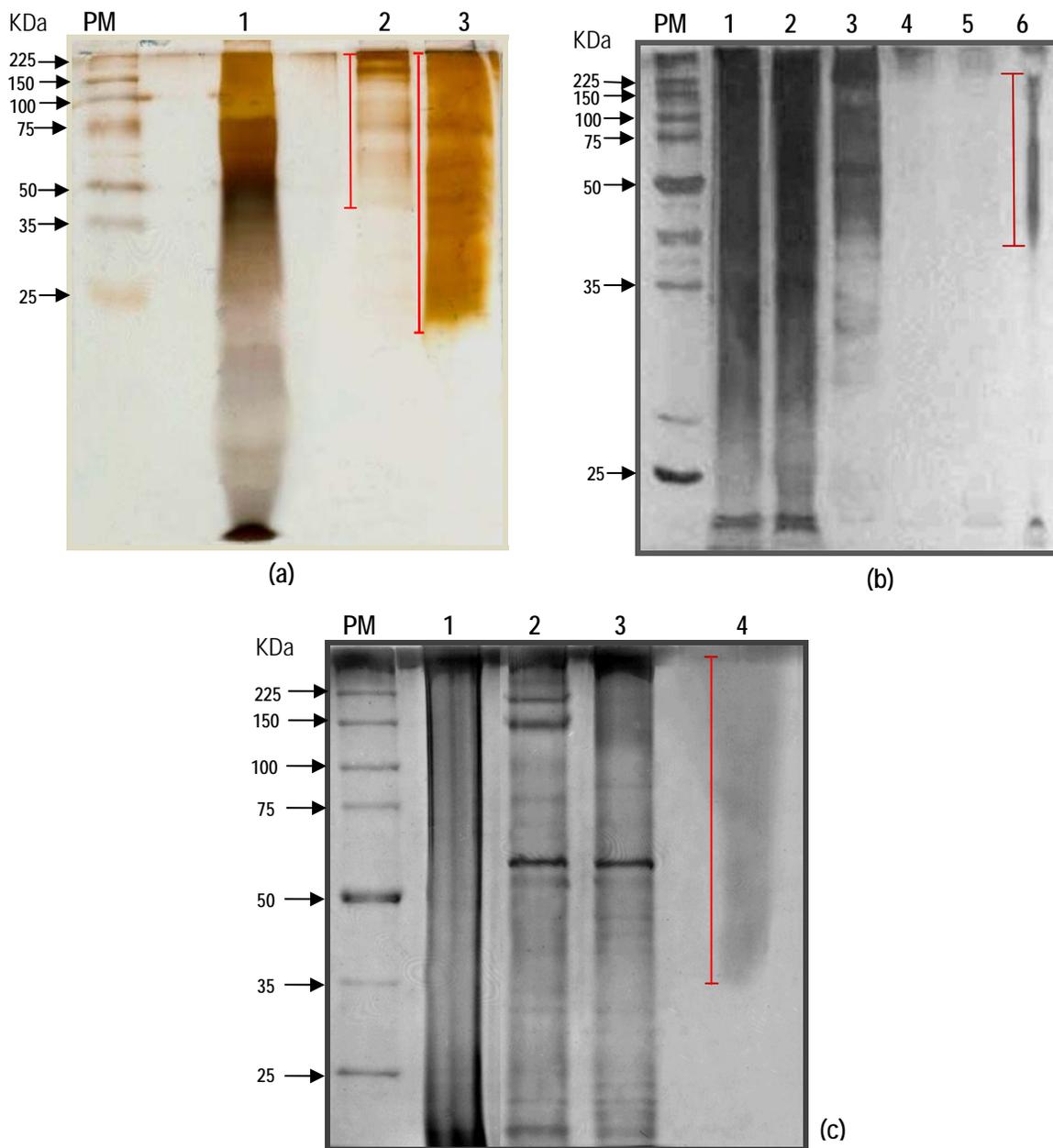


Figura 12: Caracterización de LPPGEh por corrimiento electroforético revelado por tinción de plata.

- (a) Lote LM-CI-070306. PM: pesos moleculares; 1) LPS: lipopolisacárido de *E.coli* serotipo 055:B25 (10 μ g); 2) LPPGEh: (10 μ g); 3) AgMEh: (10 μ g).
- (b) Lote CI-05-101207. 1) LPS (10 μ g) 2) LPS (5 μ g); 3) AgMEh: (10 μ g); 4) AgMEh (5 μ g); 5) LPPGEh: (5 μ g); 6) LPPGEh: (10 μ g). Observado en el analizador de imágenes.
- (c) Lote LM-CI-31-070408. 1) LPS (10 μ g); 2) AgMEh (10 μ g); 3) AgMEh (5 μ g); 4) LPPGEh: (10 μ g). Observado en el analizador de imágenes.

Adicionalmente se analizó el reconocimiento de la molécula purificada con un AcPC mediante el ensayo de ELISA. En la **Figura 13a** se observa el reconocimiento de la molécula de LPPGEh a concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, siendo las concentraciones de 50 y 100 μg las empleadas en el día 37 y 52 de la inmunización respectivamente; no así en los lotes 2 y 3 que se muestran en las **Figura 13b**, en donde se consideran concentraciones de 0.3, 0.6 y 1.2 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ ya que la concentración de LPPGEh usada para la selección de hibridomas fue de 0.6 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, observándose que a todas las concentraciones hay un buen reconocimiento de la molécula por el AcPC.

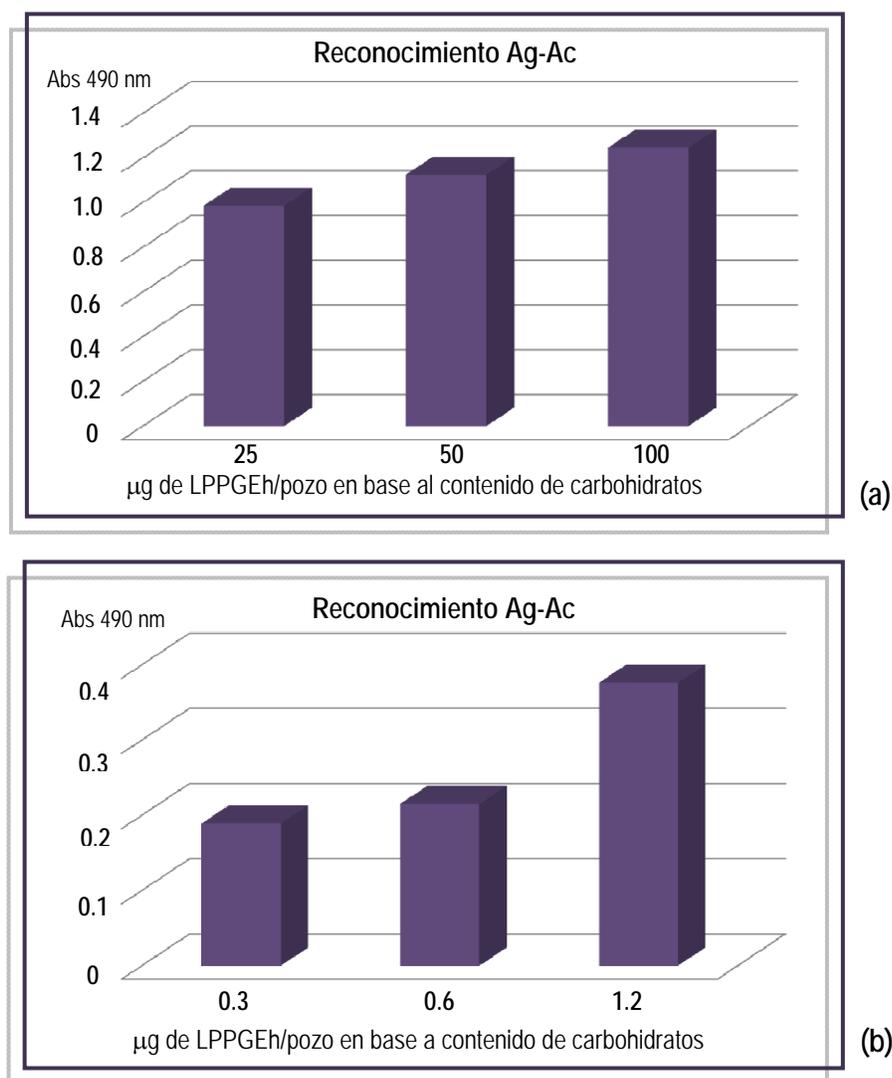


Figura 13: Caracterización de LPPGEh por reconocimiento Ag-Ac por el método de ELISA.

(a) Reconocimiento Ag-Ac, lote LM-CI-070307.

(b) Gráfica representativa del reconocimiento Ag-Ac de los lotes 1 y 2 (-05-101207 y lote LM-CI-31-070408).

8.4 Análisis de suero de los ratones inmunizados.

Los títulos de los Ac en los sueros de ratones inmunizados se muestran en la **Figura 14**. El reconocimiento al Ag purificado es altamente positivo en los tres sueros de ratones, aún cuando se manejaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, comparado con el suero de ratones no inmunizados. Estos títulos altos de Ac fueron indicativos de que cualquier ratón era apto para la fusión; sin embargo, se seleccionó el ratón 1 ya que como se observa en la dilución mayor (1:1000), es el que mantiene los valores de absorbancia más altos.

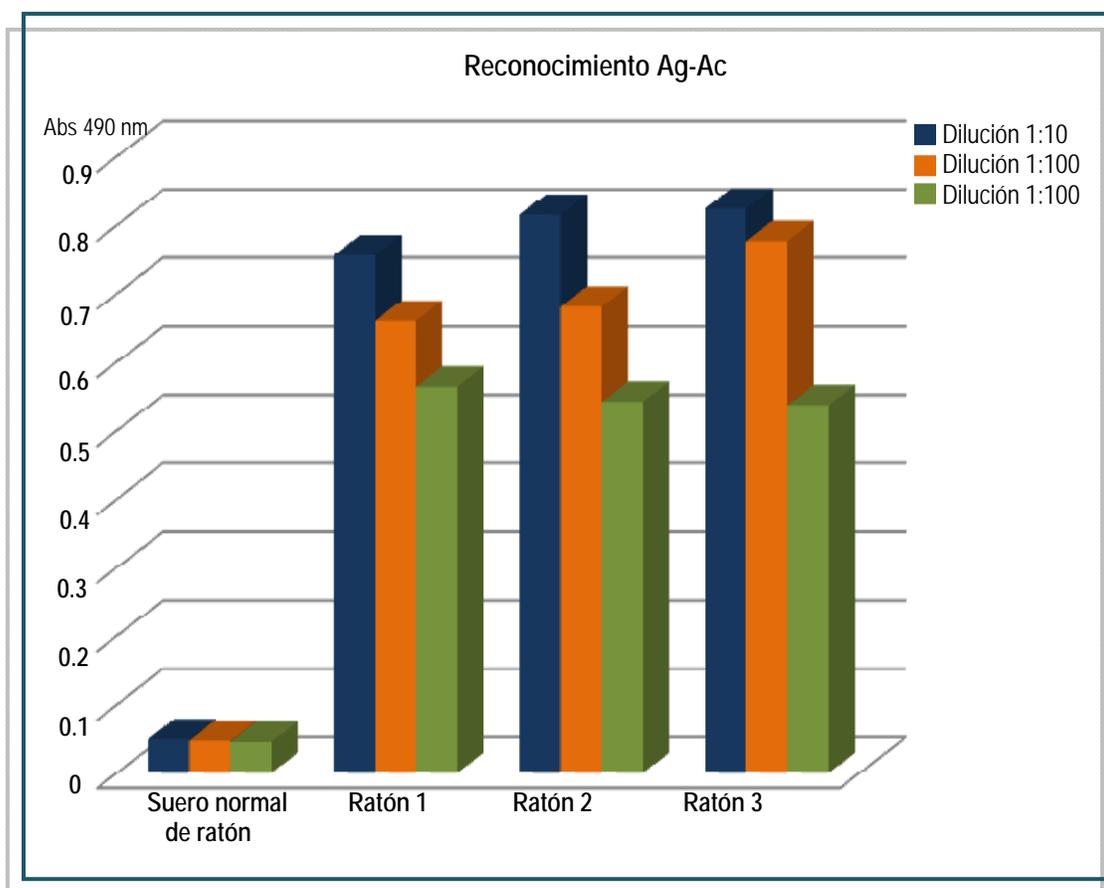


Figura 14: Determinación de títulos de Ac en suero de animales inmunizados. La positividad de los Ac en suero de ratones inmunizados, a diferentes diluciones, se realizó por el método de ELISA, empleando 0.6 $\mu\text{g/pozo}$ de LPPGEh.

8.5 Selección de hibridomas positivos a LPPGEh.

Diez días después de la fusión, se analizaron los sobrenadantes de los hibridomas, de los cuales se identificaron 15 diferentes pozos positivos a LPPGEh. En la **Figura 15** se muestran los pozos seleccionados por ELISA, a partir de los cuales se inició la clonación. Se estableció positividad de la clona cuando los valores de absorbancia están dos valores por arriba del control negativo.

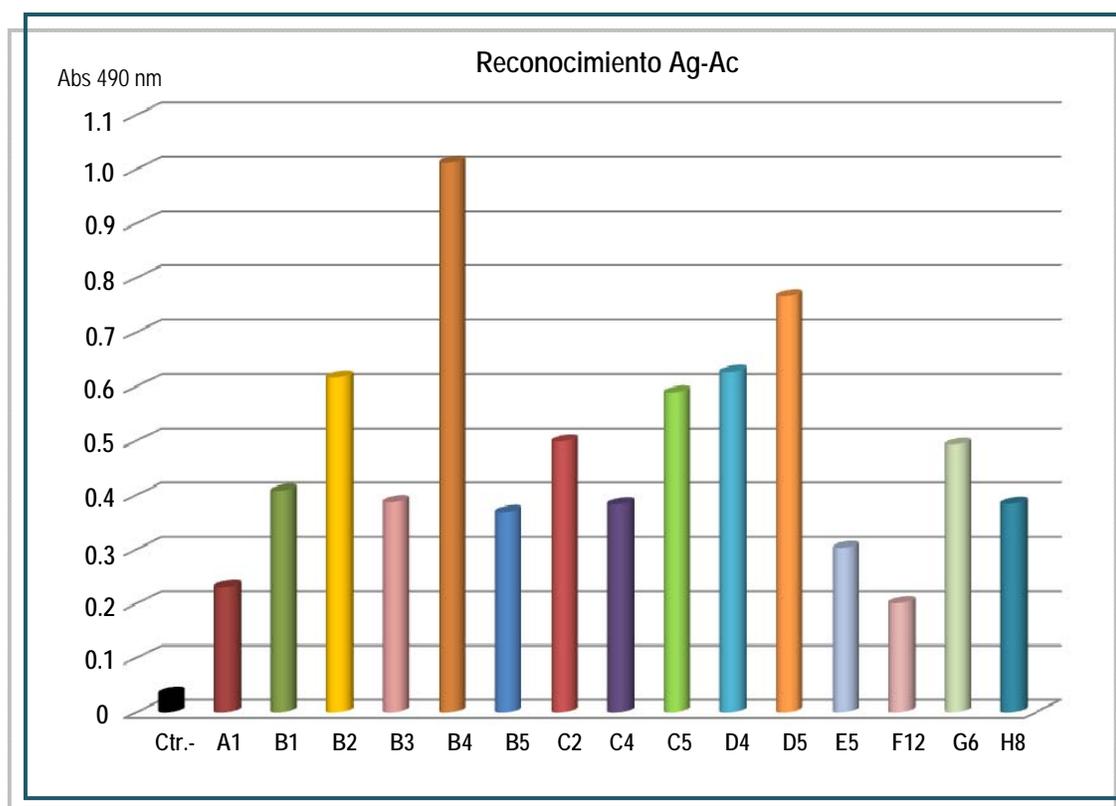


Figura 15: Selección de hibridomas anti-LPPG por el método de ELISA. Se determinaron títulos de Ac en sobrenadante de hibridomas en cultivo, empleando una concentración constante de Ag: 0.6 $\mu\text{g}/\text{pozo}$. El control negativo es un promedio de todas las variantes que pudieran estar presentando fondo en la reacción.

Quince días después de haberse realizado la primera dilución limitante, se identificaron solo 6 clonas productoras de Ac anti-LPPG. Sin embargo, al realizar las clonaciones subsiguientes (**Figuras 16-19**) se observó una disminución en el reconocimiento de 4 clonas (E5, G6, A9 y F12), pero las clonas C4 y H8, mantuvieron el reconocimiento hacia LPPGEh, bajo el criterio de selección antes mencionado.

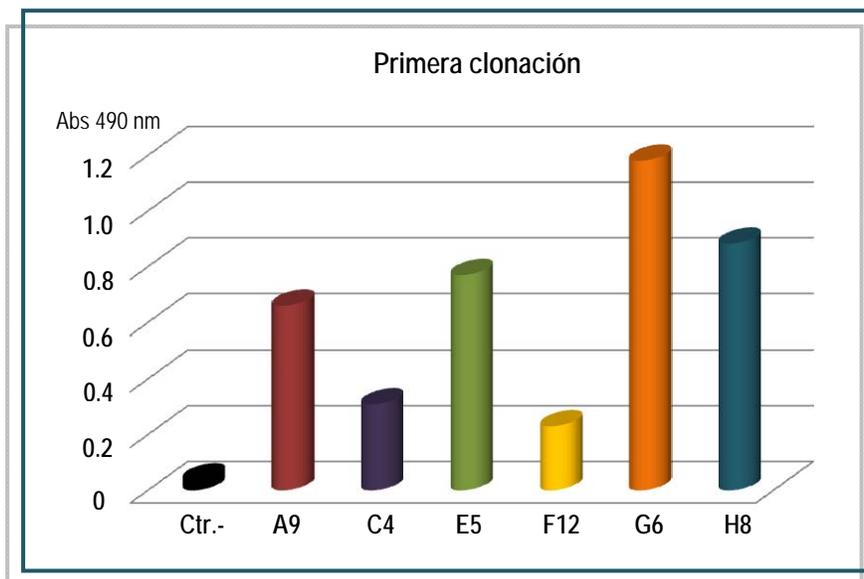


Figura 16: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (primera clonación). Se empleó una concentración de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ de LPPGEh y el sobrenadante de células en cultivo.

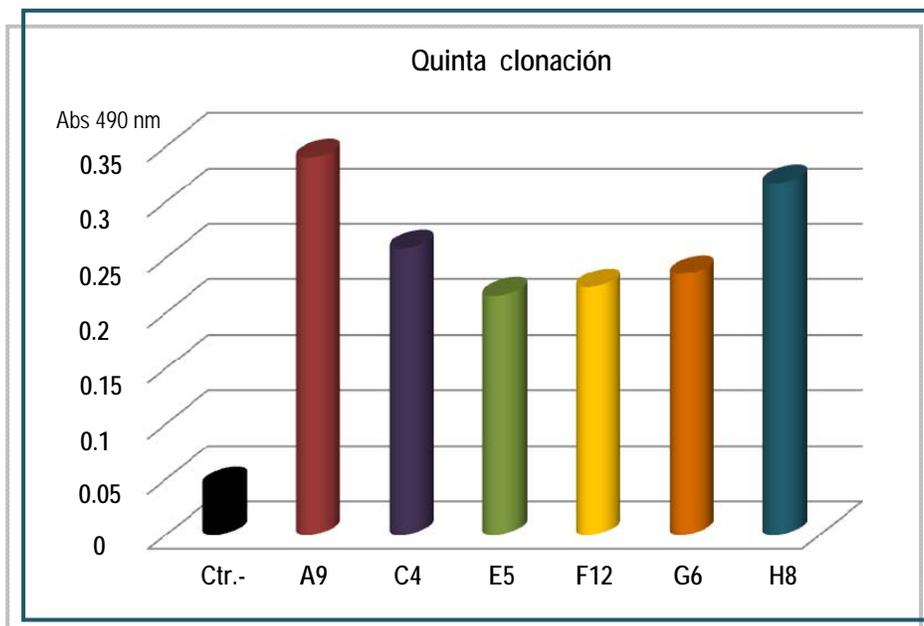


Figura 17: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (quinta clonación). Se empleó una concentración de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ de LPPGEh y el sobrenadante de células en cultivo.

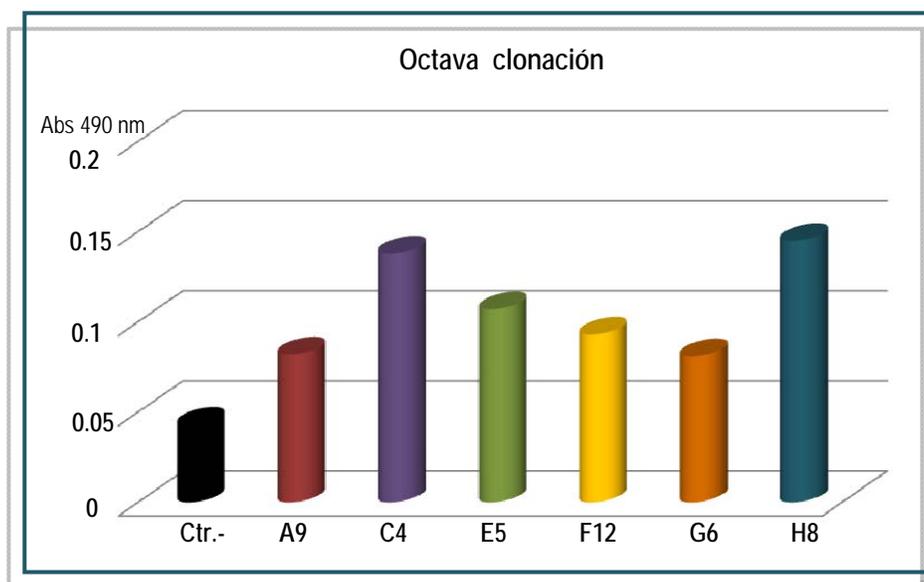


Figura 18: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (octava clonación). Se empleó una concentración de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ de LPPGEh y el sobrenadante de células en cultivo.

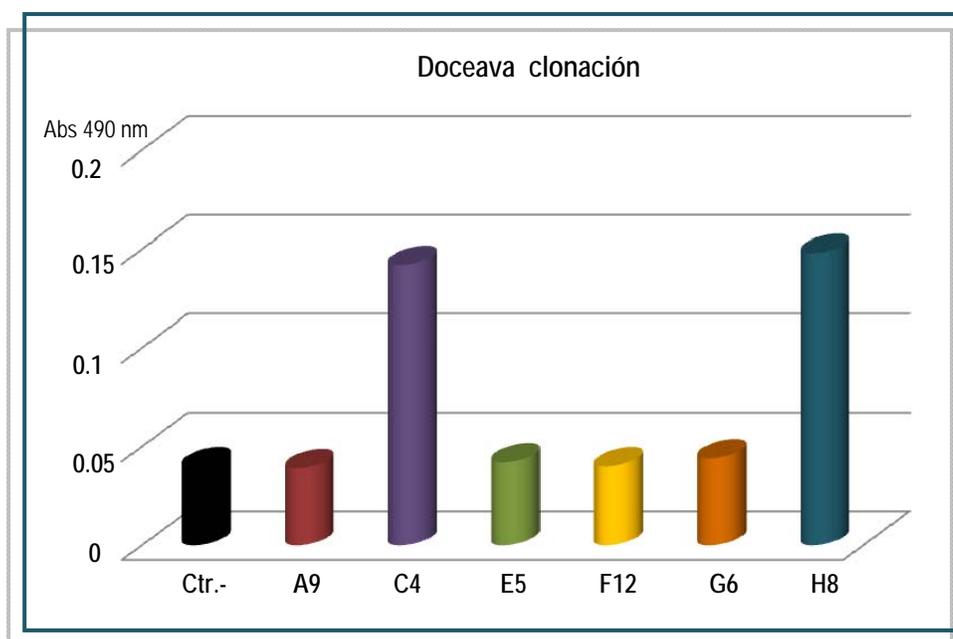


Figura 19: Selección de hibridomas productores de AcMo anti-LPPG (doceava clonación). Se empleó una concentración de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ de LPPGEh y el sobrenadante de células en cultivo.

Interesados en conocer las diferencias en el reconocimiento de los AcMo secretados por dichos hibridomas en líquido de ascitis, hacia LPPGEh y al AgMEh, se realizaron pruebas comparativas con ambos Ag. La Figura 20 muestra el reconocimiento de las moléculas por el AcMo secretado en líquido de ascitis, en el cual se observa que el hibridoma H8 presentó un mejor reconocimiento hacia la LPPGEh, que disminuyó al ponerlo en contacto con el AgMEh.

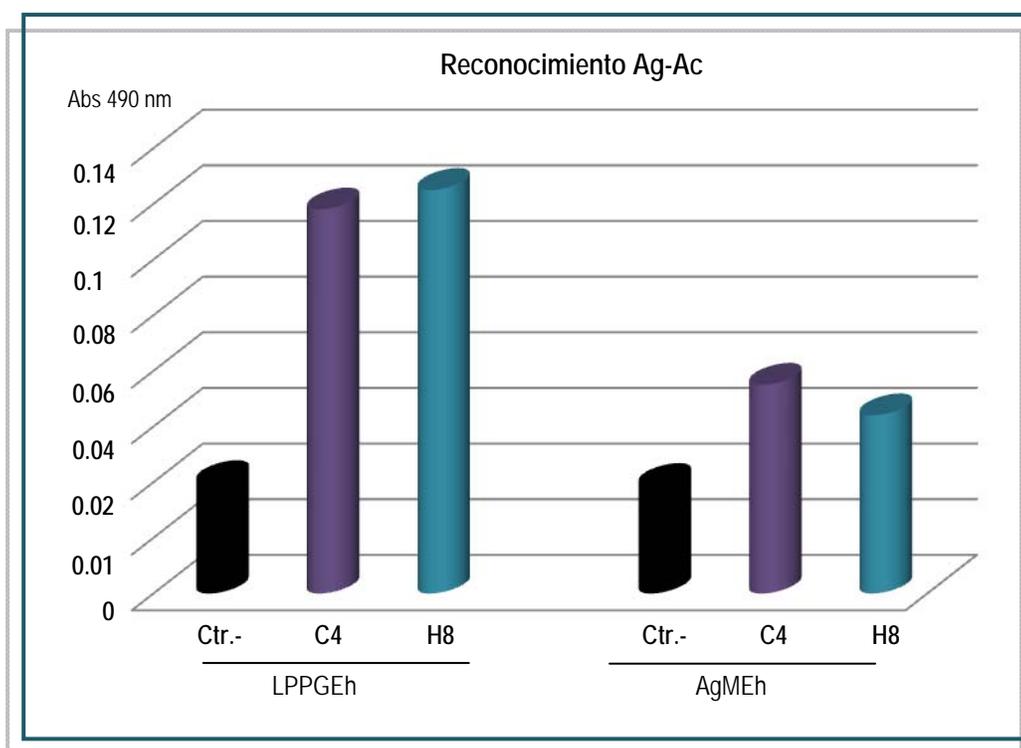


Figura 20: Reconocimiento de LPPGEh (a la izquierda) y AgMEh (a la derecha), por los hibridomas productores de AcMo anti-LPPG, en líquido de ascitis. Concentración de antígeno: 0.6 $\mu\text{g/pozo}$.

8.6 Análisis de la lipopéptidofosfoglicana de *E. histolytica* por IET (reconocimiento Ag-Ac).

En la **Figura 21** se muestran los resultados del reconocimiento de la LPPGEh por las clonas C4 y H8, esta última presentó una reactividad mejor por el corrimiento polidisperso (225 a 35 KDa), a diferencia de la clona C4 que presenta menor reactividad, evaluada por este tipo de análisis. Estas clonas presentaron reacción con el AgMEh, sin embargo, el barrido de reconocimiento es distinto, y los hibridomas de estas clonas no fueron reactivos a la molécula de LPS. Asimismo, si se compara con un Ac reportado en la literatura para lipofosfoglicano de *Entamoeba histolytica* (EH5) (Marinets *et al.*, 1997), la banda polidispersa es similar a los resultados de las clonas obtenidas en este trabajo para la molécula de LPPGEh.

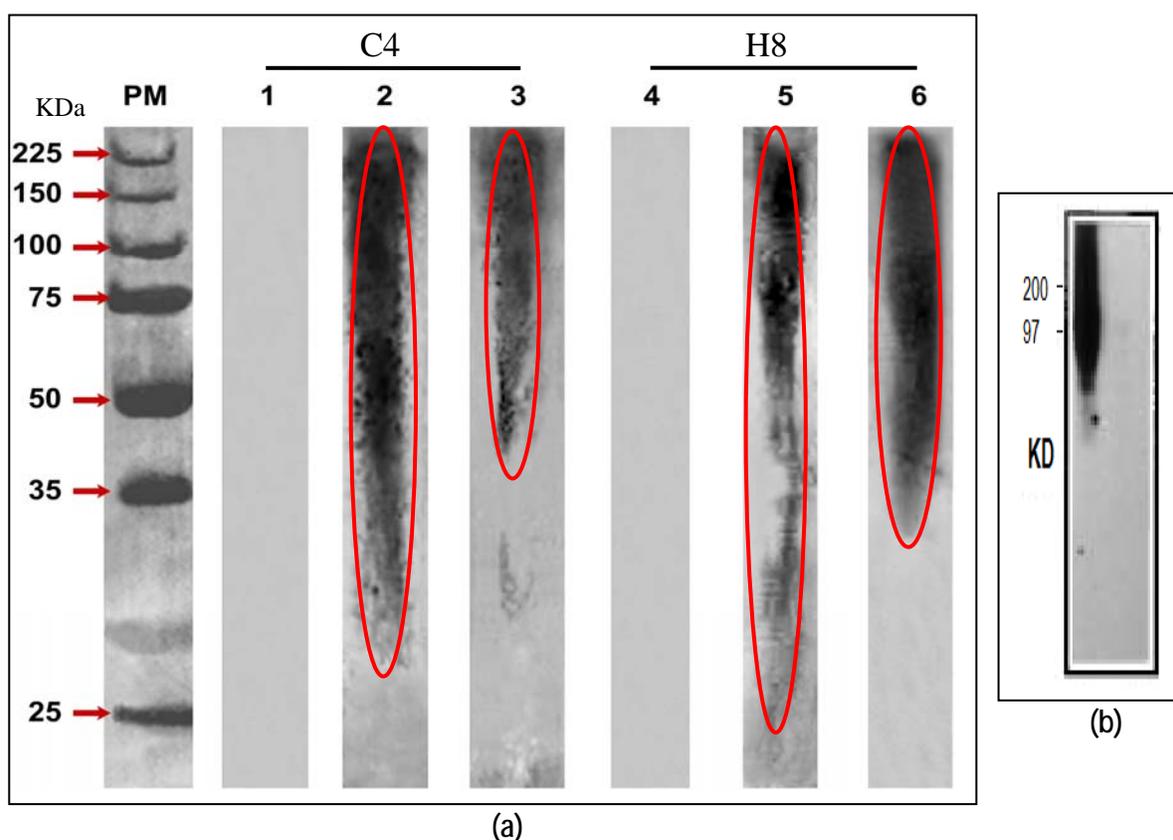


Figura 21: Reconocimiento Ag-Ac por IET.

- (a) Reconocimiento de LPPGEh. 1) LPS, 2) AgMEh, 3) LPPGEh; 4) LPS, 5) AgMEh, 6) LPPGEh. Se usó un anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rabano en una dilución 1:1000.
- (b) Reconocimiento de PPG de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1-IMSS, por el Ac EH5 (comparativo del reconocimiento de cadenas repetidas de carbohidratos) (Marinets *et al.*, 1997).

8.7 Análisis de lipopéptidofosfoglicana de *E. histolytica* por IFI (reconocimiento Ag-Ac).

En la **Figura 22**, están representados los resultados de la IFI con líquido de ascitis de las clonas C4 y H8 (Figura 22a y b). Las observaciones a la positividad de estas clonas por este método sobre trofozoítos de *E. histolytica* presenta una IFI del 100% para ambas clonas en una dilución 1:25. Su comparación con el testigo (trofozoítos tratados con suero normal de ratón), presenta ausencia de IFI (Figura 22c).

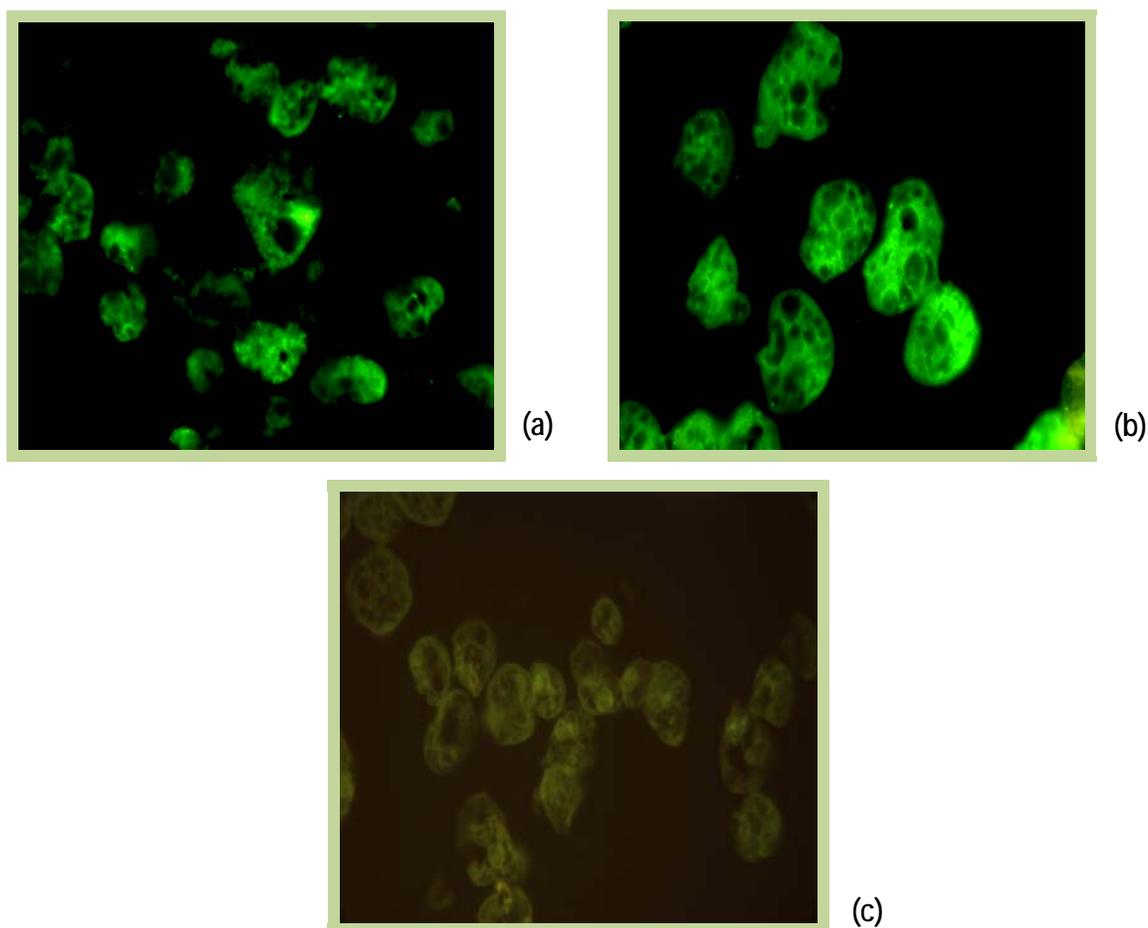


Figura 22: Reconocimiento Ag-Ac por IFI.

- (a) Líquido de Ascitis-Clona C4 (dilución 1:25)
- (b) Líquido de Ascitis-Clona H8 (dilución 1:25)
- (c) Control negativo (se usó suero de ratón no inmunizado).

9. DISCUSIÓN

Un gran reto para los estudiosos de la inmunología, es la respuesta inmunitaria, tanto *in vivo* como *in vitro* inducida por Ag purificados de extractos microbianos o productos sintéticos, entre ellos los Ag de lípidos y glicolípidos que tienen efectos potenciales de adyuvantes, por ejemplo, el ácido micólico, LPS, los ácidos lipoteicoicos, la lipoarabinomanana y los GPI derivados de microorganismos (Krutzik *et al.*, 2001; Akira *et al.*, 2006; Gazzinelli y Denkers, 2006).

De forma importante, los reportes del efecto adyuvante de estos productos microbianos está ligado a su reconocimiento por la familia de TLRs, y esta interacción parece suficiente para la activación de respuestas inmunitarias adaptativas inducidas por la diferenciación de células TH1. En contraste, productos no microbianos, como el hidróxido de aluminio, que no señalizan por TLRs tienden a inducir respuestas TH2 (Bendelac y Medzhitov, 2002). Por tal motivo la comprensión del reconocimiento estructural de los glicolípidos con función de adyuvante es fundamental para el diseño de nuevos inmunomoduladores que posean la capacidad de inducir funciones efectoras frente a infecciones específicas.

En este trabajo se analizó la LPPGEh y se obtuvieron hibridomas productores de anti-LPPG, seleccionados por dilución limitante (2/15 hibridomas). Las clonas productoras se etiquetaron como C4 y H8 y las observaciones de especificidad de estas, fueron demostradas por al menos tres métodos: ELISA, IET e IFI.

La LPPGEh es un glicoconjugado complejo, cuya estructura completa no ha sido definida a pesar de varios esfuerzos llevados por diferentes grupos de investigación (Isibasi *et al.*, 1982; Isibasi *et al.*, 1986; Isibasi *et al.*, 1990; Stanley *et al.*, 1992; Moody-Haupt *et al.*, 2000). En el caso del proceso de extracción de la molécula están reportados tres métodos distintos (Westphal y Jann, 1965; Isibasi *et al.*, 1982; González-Roldán, 2008). Para el presente trabajo se utilizó el método original de extracción, descrito por Isibasi y colaboradores (Isibasi *et al.*, 1982), el cual es una adaptación del método fenol-agua empleado para la extracción de LPS de bacterias Gram negativas. Este método se ha ido modificando al análisis de la función dual como Ag y adyuvante que ejerce la LPPGEh (Acosta-Altamirano *et al.*, 1986; Isibasi *et al.*, 1986).

De acuerdo a los datos obtenidos en esta tesis, la LPPGEh extraída por este método, presentó menor contenido en proteínas con respecto a azúcares reductores; similar al reportado por otros autores al emplear otro método distinto (Moody-Haupt, *et al.*, 2000), y se sugiere que la determinación de estos componentes es independiente del método utilizado. Las variaciones en los componentes de LPPGEh entre un lote y otro (**Tabla 5**), se pueden explicar por la variabilidad en las cantidades de biomasa en cada extracción; y como se sugiere en la literatura (Moody-Haupt, *et al.*, 2000), la expresión de secuencias de carbohidratos de 1-22 o de 1-20 en las cadenas de glucanas que componen dicha molécula, puede modificarse a lo largo del periodo de cultivo; sugiriendo así la importancia de mantener un cultivo homogéneo y de preferencia, utilizar un solo lote de Ag una vez que se haya obtenido la cantidad de biomasa suficiente para desarrollar un experimento.

Cabe señalar que el lote LM-CI-070307, a diferencia de los lotes CI-05-101207 y LM-CI-31-070408, presenta un rendimiento similar entre sus componentes, lo que sugiere que en la extracción se obtuvieron otras proteínas de superficie que no precisamente forman parte de la LPPGEh; por tal motivo, este lote fue utilizado para cubrir el protocolo de inmunización; en tanto que los otros dos lotes fueron empleados en el monitoreo de los hibridomas productores de Ac.

El análisis de proteínas por tinción de Comassie demostró ausencia de proteínas en la molécula, en tanto que la tinción de plata puso en evidencia la presencia de una molécula polisacáridica diferente al corrimiento de LPS de *E. coli* 055:B5 (**Figura 12**). Así también, en este trabajo la contaminación probable con endotoxina en la molécula de estudio se descartó por los resultados del ensayo de Limulus, los cuales no detectaron endotoxina.

Por otro lado, la aplicación de tecnología a través del método de Köhler y Milstein, es una de las herramientas para el análisis del reconocimiento específico de una Ig altamente específica que reconoce a su Ag a través de la selección de clones (Köhler y Milstein, 1975).

Reportes previos, describen AcMo contra distintas moléculas del parásito *E. histolytica* entre ellos, el denominado Mab 46G dirigido al Ag nuclear de 30 KDa, y está demostrado por el método de IFI, que reacciona con varios aislados de *E. histolytica*, independientes de las condiciones de cultivo, origen geográfico o patrón de zymodemos del parásito. Asimismo, otros autores (Abd-Alla, 1993; Haque, 1993),

reportan Acs dirigidos a otras moléculas, entre ellas, la lectina de amiba de 170 KDa. Los Acs dirigidos a esta molécula pueden identificar al parásito en muestras de heces y suero de pacientes infectados, por el método de ELISA (Yau *et al.*, 2001).

En contraste, la producción de Ac dirigidos a PPG de *E. histolytica*, está limitado a uno o dos Ac publicados por algunos grupos de investigación (Isibasi *et al.*, 1986; Bhattacharya *et al.*, 1990; Prasad *et al.*, 1992; Marinets *et al.*, 1997; Yau *et al.*, 2001). En particular el Ac etiquetado como EH5, es importante en la protección al reto del parásito y tiene la capacidad de reconocer los PPGs de diferentes cepas virulentas de *E. histolytica* (Marinets *et al.*, 1997).

Por otra parte, el Ac 2D7.10 reconoce Ag total de membrana de amiba de aislados de clonas virulentas de *E. histolytica*. Asimismo, el tratamiento con periodato y la enzima proteolítica tripsina, sugieren que el Ag que reconoce este Ac es un motivo de carbohidrato (Bhattacharya *et al.*, 1990; Prasad *et al.*, 1992; Yau *et al.*, 2001). Otros autores, proponen que el Ac reconoce epitopos de carbohidratos no asociados a la LPG (Prasad *et al.*, 1992).

En este trabajo, el Ac de las clonas C4 y H8 dirigidos a la LPPGEh, se obtuvieron utilizando un esquema de inmunización con AgMEh de forma inicial. Sin embargo, en las subsiguientes inmunizaciones se aplicó la LPPGEh extraíble, en combinación a la metodología ya descrita por Köhler y Milstein en 1975, empleando una inmunización por aplicación del Ag purificado con adyuvante completo de Freund; debido a las características preliminares de la molécula de LPPGEh que la señalan como molécula tipo polisacárido; es decir, una molécula con una serie repetida de carbohidratos, á diferencia de las proteínas; estas últimas consideradas entre los mejores inmunógenos por sus características químicas, entre ellas, la estructura primaria o complejidad de la molécula.

A su vez la producción del AcMo anti-LPPG se desarrolló mediante una evaluación previa de los títulos de Ac anti-LPPG que se demostró en un grupo de tres ratones. El bazo del ratón con títulos de Ac más altos, se empleó para la fusión con células de mieloma Ag8, a partir de células totales de bazo tal como se describe en la estrategia de Köhler y Milstein.

Sin embargo, por las características de la LPPGEh (molécula rica en carbohidratos) existe la posibilidad previa de la selección de poblaciones de células B de peritoneo que favorezcan la respuesta a Ags, por

ejemplo, las poblaciones B1 y B2. Estas poblaciones presentan diferencias fenotípicas y morfológicas y se ha descrito una respuesta diferencial de las células B1 y B2 murinas a estímulos externos (Rothstein, 2002; Tumang, 2005), en la cual los mecanismos que regulan la producción de Ac en las células B1 son diferentes a los que regulan la producción de Ac en las células B2. Los Ac que son secretados por las células plasmáticas corresponden al estadio de diferenciación de los linfocitos B (Cálame, 2001).

Durante el desarrollo a una respuesta inmune adaptativa se producen Ac efectores de alta afinidad específicos para el patógeno o el inmunógeno, resultado de la interacción de las células B y T cooperadoras, esta respuesta precisa pero lenta, es denominada timo dependiente o T-dependiente e involucra a las células B2 (Faragasan, 2000). Sin embargo, esta selección de poblaciones en la estrategia de monoclonales no es habitual, un ejemplo son los reactivos hemoclasificadores a grupos sanguíneos que siguen la estrategia de fusión original que ha resultado exitosa desde los años 80, tanto en Inglaterra como en Canadá, produciéndose anticuerpos Mo anti-grupo A y anti-grupo B (Messeter, 1984), por esta razón no se consideró una selección previa de las células B1 y B2 a la fusión con las células de mieloma.

Con la finalidad de producir mayores cantidades de AcMo anti-LPPGeh, se emplearon varios grupos de ratones por inmunización de las clonas productoras C4 y H8. Es descrito en la literatura que la generación de tumores ascíticos en ratones singénicos es una herramienta que ha sido empleada para la producción a escala de AcMo murinos.

Para este trabajo, el AcMo obtenido se concentró a través de esta metodología; no obstante, esta se ha desplazado por el uso de biorreactores, ya que además de evitar el proceso traumático al que son sometidos estos animales, garantiza la ausencia de proteínas propias del ratón facilitando los procedimientos de purificación de los AcMo generados. El cultivo en biorreactor no fue empleado en este trabajo, sin embargo es una alternativa a la concentración del Ac.

Los AcMo generados en esta tesis, reaccionaron con la especificidad esperada demostrada por ELISA (**Figura 16-19**), IET (**Figura 21**) y la IFI (**Figura 22**). En el escaneo de los hibridomas por ELISA, es preciso señalar que la disminución en la absorbancia se debe a diferentes posibles factores; entre ellos, la positividad de los hibridomas en una primera selección es dada por la presencia de diferentes Ac

dirigidos a distintos epítomos de la molécula; sin embargo, conforme se realizan las clonaciones por dilución limitante, se hace el aislamiento de una sola clona y por tanto, la cantidad de Ac secretados al medio es menor, además de que la estabilidad de los genes en los hibridomas no es constante, lo que responde a la pérdida de cuatro de las seis clonas obtenidas al inicio de la selección; asimismo, el uso de Ag procedentes de distintas extracciones contribuye a la disminución de la absorbancia, ya que tal vez la expresión del epítomo específico que es reconocido por los AcMo varía entre lote y lote; por lo tanto el reconocimiento es menor según sea esta expresión.

El análisis del reconocimiento a la molécula, por IET (**Figura 21**) mostró que el corrimiento de la molécula corresponde a pesos moleculares entre 35 y 150 KDa, identificados por el líquido de ascitis obtenido de los hibridomas producidos y etiquetados bajo las siglas C4 y H8, así también existe reconocimiento al AgMEh, resultado esperado ya que el AgMEh representa un extracto crudo de varios Ag entre ellos, la LPPGEh. Estos resultados son similares a datos reportados por Marinets y Battacharya (Battacharya, 1990; Marinets, 1995).

Es de señalar que de los tres métodos evaluados para la especificidad de este Ac, la IFI demostró mayor especificidad, lo que sugiere que podría utilizarse como herramienta en el diagnóstico. Si bien hay muchos Ac descritos a varias moléculas de la superficie de *E. histolytica*, no hay reportes claros en la literatura, a la molécula específica de LPPGEh y este trabajo reporta una vía para continuar el análisis de esta importante molécula del parásito. Sin embargo, para la aplicación de estos hibridomas productores de Ac, es necesaria la determinación de otros factores importantes en la obtención de los mismos, para evaluar su funcionalidad como reactivos, entre ellos la avidéz y su potencia, así como su isotipo.

Finalmente, este trabajo permitió la generación de dos hibridomas secretores de Ac con especificidad a LPPGEh bajo un protocolo de inmunización exitoso. Estos dos Ac murinos anti-LPPGEh son funcionales en base a la especificidad por los métodos evaluados y serán una herramienta de gran utilidad en el avance al conocimiento de la estructura de LPPGEh.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se obtuvieron 2 hibridomas, productores de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, denominados C4 y H8.
- 10.2 La especificidad de este anticuerpo fue evaluada por la reacción Ag-Ac por tres métodos inmunológicos: ELISA, Inmunoelectrotransferencia e Inmunofluorescencia indirecta.
- 10.3 Los anticuerpos de estos hibridomas son capaces de reconocer a la LPPG expresada en la superficie de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, por lo que este Ac podría representar una herramienta alternativa para el diagnóstico de este importante parásito.

11. PERSPECTIVAS

- 11.1 Determinar el isotipo en cada una de las clonas identificadas en este estudio, C4 y H8.
- 11.2 Evaluar los efectos biológicos de la LPPGEh en presencia de los anticuerpos monoclonales, por medio de la detección de citocinas anti- y pro-inflamatorias secretadas por las células de la respuesta inmunitaria en ensayos *in vitro*.
- 11.3 Determinar si los anticuerpos obtenidos de estos hibridomas son capaces de reconocer a la LPPG de diferentes clonas de *E. histolytica*, mediante el método de Inmunoelectrotransferencia.
- 11.4 Utilizar los anticuerpos obtenidos para la purificación de la LPPGEh mediante cromatografía de afinidad

12. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C. 2003. "Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol.* 21: 205-30.

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

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

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

Colligan J, Kruisbeer A, Margulies D, Shevach E, Strober W. "Current protocols in immunology". Ed. Wiley. National Institute Of Health. Vol. 1. 2001. pp. 8.9.1-8.9.3.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Haque R, Ali IM, Sack RB, Farr BM, Ramakrishnan G, Petri WA Jr. 2001. "Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children." *J.Infect.Dis.* 183:1787-1793.

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

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

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

Khöler G, Milstein C. 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature*. 256: 495-497.

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

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

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

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

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

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

Margni RA. "Inmunología e inmunoquímica, fundamentos". Editorial médica panamericana. Buenos Aires Argentina. 1996. pp. 781-796.

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

Martinez A. "The biology of *Entamoeba histolytica*. John Wiley y Sons. Chichester. England. 1982. pp. 161.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rothstein TL. 2002. Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunol.* 168: 4257-61.

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

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

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

Secretaría de Salud, 2001. Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad 2000. Secretaría de Salud, México D.F., pp. 15–32.

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

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

Tumang JR, Frances R, Yeo SG, Rothstein TL. 2005. "Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol.* 174: 3173-77.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13. APÉNDICE

Soluciones y reactivos

Acrilamida al 30%

Se pesaron los siguientes reactivos:

- Acrilamida	29.2 g
- Bis-acrilamida	0.8 g

Se disolvieron en agua 80 ml de agua destilada, y finalmente se llevó al volumen de aforo de 100 ml. Se filtró la solución y se preservó en botellas color ámbar.

Amortiguador de transferencia pH 8.3

Se tomaron los siguientes reactivos:

- Tris-base	3.03 g
- Glicina	14.42 g
- Metanol	200 ml
- Agua destilada	500 ml

Se ajustó el pH y se llevó a la marca de aforo de 1000 ml con agua destilada y se almacenó a 4°C.

Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico

Se tomaron con exactitud los siguientes reactivos:

- Antrona	0.09 g
- Ácido sulfúrico (gravedad específica 1.84, 95-98%)	45 ml

Esta solución se preparó en el momento de su uso. Se manejó protegida de la luz

Azul de bromofenol al 0.1%

Se mezclaron los reactivos que se muestran enseguida, filtrando una vez preparado, sobre papel filtro Whatman del No. 1.

- Azul de bromofenol	0.25 g
- Agua destilada	25 ml

Azul de azul brillante de Coomassie R250

Se mezclaron las siguientes cantidades de reactivos:

- Azul de Coomasie	0.25 g
- Metanol	90 ml
- Ácido acético glacial (99.7%)	10ml

La solución se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se almacenó un frasco oscuro.

Colorante rojo de Ponceau

Se tomaron y mezclaron los reactivos siguientes:

- Rojo de Ponceau	200 mg
- Ácido tricloroacético	3 g

Se aforó a 100 ml con agua destilada y se mantuvo a 4°C en frasco ámbar.

Fijador (KODAK GBX)- reactivo comercial

Se tomaron las cantidades necesarias de cada reactivo que se enlista a continuación, para cubrir los porcentajes de la mezcla:

Agua	50%
Tiosulfato de sodio	30%
Acetato de sodio	1%
Bisulfato de sodio	1%
Sulfito de amonio	1%
Ácido acético	1%
Ácido bórico	1%
Sulfato de amonio	1%

Gel concentrador

Se mezclaron perfectamente las siguientes soluciones:

- Solución reguladora de TRIS pH 6.8	375 µl
- Acrilamida al 30%	250 µl
- Agua destilada	875 µl
- APS	20 µl
- TEMED	1 µl

Gel separador (10%)

Se mezclaron perfectamente las siguientes soluciones:

Solución reguladora de TRIS pH 8.8	1.25 ml
Acrilamida al 30%	1.65 ml
Agua destilada	2.1 ml
APS	50 μ l
TEMED	2.5 μ l

Persulfato de amonio (APS) al 10%

Se mezclaron los reactivos siguientes:

- APS	100 mg
- Agua destilada	1 ml

Revelador (KODAK GBX)-reactivo comercial

Hidroquinona
Dietilenglicol
Sulfito de potasio
Sulfito de sodio
4-hisroximetil-4-metil-1-fenil-3-pirazolidinona

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4

Se pesaron los siguientes reactivos:

- Cloruro de sodio	8.7 g
- Fosfato dibásico de sodio (polvo)	2.7 g
- Fosfato monobásico de sodio (cristales)	0.7 g
- Agua destilada	500 ml

Se mezclaron, se ajustó el pH y finalmente se llevó a la marca de aforo de 1000 ml con agua destilada.

Solución amortiguadora de tris (TBS) pH 7.5

- Tris-Cl	15.75 g
- Cloruro de sodio (cristales)	9 g
- Agua destilada	500 ml

Se mezclaron los reactivos, se ajustó el pH y finalmente se llevó a la marca de aforo de 1000 ml con agua destilada.

Solución de ácido clorhídrico 0.1 N

La solución se preparó con los reactivos siguientes, colocándolos en el orden que se indica:

- Agua destilada	50 ml
- Ácido clorhídrico (37%)	0.82 ml

Se dejó enfriar, se mezcló y se llevó a la marca de aforo de 100 ml.

Solución de ácido sulfúrico 2.5 N

Se tomaron los siguientes reactivos, colocándolos en el orden indicado:

- Agua destilada	50 ml
- Ácido sulfúrico (gravedad 1.84, 95-97%)	6.66 ml

Se dejó enfriar, se mezcló y se llevó a la marca de aforo de 100 ml con agua destilada.

Solución de ácido tricloroacético al 72%

Se tomaron y mezclaron los siguientes reactivos:

- Ácido tricloroacético	18 g
- Agua destilada	50 ml

Se llevó a la marca de aforo de 100 ml con agua destilada.

Solución decolorante

Se tomaron y mezclaron los siguientes reactivos, colocándolos en el orden indicado:

- Agua destilada 800 ml
- Ácido acético glacial (99.7%) 100 ml
- Metanol 100 ml

Solución de bloqueo

Esta solución fue preparada al momento de su uso, pesando y mezclando exactamente:

- Leche descremada 5 g
- PBS 100 ml

Solución de carbonato de sodio al 2%

Se tomaron y mezclaron los siguientes reactivos:

- Carbonato de sodio anhidro 2 g
- Agua destilada 50 ml

Se llevó a la marca de aforo de 100 ml con agua destilada.

Solución de glicerol-metanol

Se mezclaron los siguientes reactivos:

- Glicerol 4 ml
- Metanol 45 ml
- Agua destilada 51 ml

Solución de hidróxido 0.1 N

Se tomaron con exactitud los reactivos siguientes:

- Hidróxido de sodio (lentejas) 0.4 g
- Agua destilada 50 ml

Se mezclaron y se llevó a la marca de aforo de 100 ml con agua destilada.

Solución de hidróxido 0.5 N

Se tomaron con exactitud los reactivos siguientes:

- Hidróxido de sodio (lentejas) 2 g

- Agua destilada 50 ml

Se mezclaron y se llevó a la marca de aforo de 100 ml con agua destilada.

Solución de hidróxido 5 N

Se tomaron exactamente los reactivos siguientes:

- Hidróxido de sodio (lentejas) 8 g
- Agua destilada 100 ml

Se mezclaron y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Solución de impregnación

Se pesaron con exactitud los siguientes reactivos:

- Nitrato de plata 0.5 g
- Formaldehído al 37% 188 μ l
- Agua destilada 150 ml

Se mezclaron perfectamente y se llevó al aforo de 250 ml con agua destilada. Se almacenó protegido de la luz.

Solución de oxidación

Se tomaron con exactitud los siguientes reactivos:

- Tiosulfato de sodio pentahidratado 50 mg
- Agua destilada 150 ml

Se mezclaron y se completó el volumen aforando a 250 ml con agua destilada.

Solución de paro

Se tomaron con exactitud los reactivos siguientes:

- Metanol 4 ml
- Ácido acético 65 ml
- Formaldehído al 37% 250 μ l
- Agua destilada 150 ml

Agua miliQ 401 ml

Solución fijadora para tinción de plata

Se midieron y mezclaron las cantidades siguientes de reactivos

- Agua destilada	100 ml
- Metanol	260.4 ml
- Ácido acético glacial (99.7%)	63 ml
- Formaldehído al 37%	250 μ l

Se llevó al aforo de 500 ml con agua destilada.

Solución patrón de glucosa 10 mg/ml

Se pesó con exactitud el reactivo siguiente:

- Glucosa	1 g
- Agua destilada	6 ml

Se mezcló perfectamente y se llevó al aforo de 10 ml con agua destilada.

Solución patrón de glucosa 1 mg/ml

- Solución patrón de glucosa 10 mg/ml	1 ml
---------------------------------------	------

Se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

Solución patrón de glucosa 0.1 mg/ml

- Solución patrón de glucosa 1 mg/ml	1 ml
--------------------------------------	------

Se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

Solución patrón de glucosa 0.01 mg/ml

- Solución patrón de glucosa 0.1 mg/ml 1 ml

Se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

Solución reguladora de carbonatos pH 9.5

Se pesaron con exactitud los reactivos siguientes:

- Bicarbonato de sodio 7 g
- Carbonato de sodio anhidro 2.8 g
- Agua destilada 500 ml

Se mezclaron perfectamente y se llevó al aforo de 1000 ml con agua destilada.

Solución reguladora de citratos pH 5.6

Se pesó exactamente:

- Ácido cítrico 4.1 g
- Citrato de sodio monohidratado 29 g
- Agua destilada 500 ml

Se mezclaron perfectamente y se llevó al aforo de 1000 ml con agua destilada.

Solución reguladora de corrimiento pH 8.3

Se pesaron con exactitud los siguientes reactivos:

- Glicina 14.4 g
- Tris (hidroximetil) metilamina 3.0 g
- Dodecilsulfato de sodio 1.0 g

Se disolvieron en 800 ml de agua destilada, se ajustó el pH y finalmente se llevó a la marca (1000 ml).

Solución reguladora de TRIS pH 6.8

Se pesaron los siguientes reactivos:

- Tris (hidroximetil) metilamina 1.51 g
- Dodecilsulfato de sodio 0.1 g

Se disolvieron en 15 ml de agua destilada, se ajustó el pH 6.8 y se llevó a la marca de aforo de 25 ml. Se guardó en refrigeración a 4 °C.

Solución reguladora de TRIS pH 8.8

Se pesaron los reactivos siguientes:

- Tris (hidroximetil) metilamina 4.55 g
- Dodecilsulfato de sodio 0.1 g

Se disolvieron en 15 ml de agua destilada, se ajustó el pH y se llevó al aforo de 25 ml. Se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Solución reveladora de ortofenilendiamina (OPD)

- OPD 0.006 g
- Solución reguladora de citratos 12 ml
- Peróxido de hidrógeno al 30% 10 µl

Se mezcló perfectamente. Se preparó en el momento de su uso.

Solución reveladora para tinción de plata

Se pesaron exactamente los reactivos siguientes:

- Carbonato de sodio anhidro 15 g
- Tiosulfato de sodio pentahidratado 1 mg
- Formaldehído al 37% 125 µl
- Agua destilada 150 ml

Se mezclaron perfectamente y a la marca de aforo a un volumen de 250 ml.

Solución reveladora para quimioluminiscencia

- Reactivo revelador (KODAK GBX) 109 ml
- Agua miliQ 401 ml

Solución salina fisiológica (SSF) 0.9%

Se pesó con exactitud el reactivo siguiente:

- Cloruro de sodio (cristales) 0.9 g

Se disolvió en 50 ml de agua destilada y finalmente se llevó a la marca de aforo con agua destilada (100 ml). Se esterilizó a 121°C, 15 libras de presión.

Solución stock de Albúmina Sérica Bovina (ASB) 2.5 mg/ml

Se pesó con exactitud el reactivo siguiente:

- ASB 0.0625 g

- Agua destilada 15 ml

Enseguida que se agregó el agua destilada se dejó en reposo hasta que la ASB se disolvió y finalmente se llevó a la marca de aforo de 25 ml con agua destilada.

Sulfato de cobre al 1%

- Sulfato de cobre pentahidratado 1 g

- Agua destilada 50 ml

Se mezcló perfectamente y se llevó al aforo de 100 ml con agua destilada y se protegió de la luz.

Sustrato HPR (peroxidasa de rábano) para quimioluminiscencia

Peróxido de hidrógeno al 30% 500 µl

Luminol 500 µl

Solución inhibidora de proteasas

La solución inhibidora de proteasas se preparó empleando los reactivos siguientes:

Reactivo	Marca	Cantidad
Cloruro de sodio	Monterrey	1.755 g
Fosfato monobásico de sodio	Merk	2.8392 g
Etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma	0.0744 g
Agua destilada	Pisa	200 ml

Iodoacetamida	SigmaUltra	0.1849 g
---------------	------------	----------

Mezcla de reacción

Solución	Cantidad
Solución de carbonato de sodio al 2%	50 ml
Solución de sulfato de cobre al 1%	500 µl
Solución de tartrato de sodio y potasio al 2%	50 ml

Preparación de medios de cultivo

1. Medio TYI-S

1.1 Los componentes del medio de cultivo TYI-S para 1000 ml son:

Reactivo	Marca	Cantidad
Peptona	BBL™	30.0 g
Glucosa	Sigma	10.0 g
Cloruro de sodio	Sigma	2.0 g
Fosfato de potasio monobásico	Sigma	0.60 g
Fosfato de potasio dibásico	Sigma	1.0 g
Ácido L-ascórbico	Merck	0.20 g
Clorhidrato de L-cisteína monohidratada	Sigma	1.0 g
Citrato de amonio férrico	JT Baker	0.228 g
Agua destilada	Pisa	1000 ml
Vitamina Diamond	SAFC Biosciences	40 ml
Suero bovino	Gibco Invitrogen	160 ml

1.2 Se disolvieron los reactivos en agua destilada, se ajustó el pH de 7.0 a 7.2 con NaOH 1N.

1.3 Se filtró el medio de cultivo, se alicuotó y se esterilizó a 121°C, 15 lb, durante 15 minutos.

1.4 Una vez frío el medio de cultivo, se adicionó la mezcla vitamínica con suero bovino en un porcentaje del 20%.

2. Medio RPMI no suplementado

2.1 Se tomaron las cantidades siguientes:

Reactivo	Marca	Cantidad
L-glutamina	GIBCO	3 ml
Penicilina-estreptomina	GIBCO	3 ml

RPMI 1640	GIBCO	294 ml
-----------	-------	--------

3. Medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%

3.1 Se tomaron las cantidades siguientes:

Reactivo	Marca	Cantidad
L-glutamina	GIBCO	3 ml
Penicilina-estreptomicina	GIBCO	3 ml
RPMI 1640	GIBCO	264 ml
Suero bovino	GIBCO	30 ml

4. Medio selectivo HAT

4.1 Se tomaron las cantidades siguientes:

Reactivo	Marca	Cantidad
L-glutamina	GIBCO	300 μ l
Penicilina-estreptomicina	GIBCO	300 μ l
RPMI 1640	GIBCO	64 ml
Suero bovino	GIBCO	100 ml
HAT 50x	GIBCO	2 ml

Nota: se empleó HAT marca GIBCO contenido en un vial (10 mM hipoxantina, 40 μ M de aminopterina y 1.6 mM de timidina), que fue resuspendido con 10 ml de agua inyectable (100x), de esta solución se tomaron 5 ml que fueron llevados a un volumen final de 10 ml con agua inyectable, para tener la concentración de 50x.