



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Programa de Maestría en Ciencias e Ingeniería

**“DESARROLLO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
MONOESPECÍFICOS DIRIGIDOS CONTRA LA SUBUNIDAD PESADA DE LA
LECTINA DE UNIÓN A Gal/NacGal DE *Entamoeba histolytica*”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

Q.F.B. SUSANA CAROLINA RODRÍGUEZ CASTILLO

Tijuana, Baja California.

Enero de 2016

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 159
Tijuana, B. C., a 06 de noviembre de 2015

C. Susana Carolina Rodríguez Castillo
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Samuel Guillermo Meléndez López

Quienes serán las responsables de la calidad de trabajo que usted presente,
referido al tema "DESARROLLO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ANTICUERPOS MONOESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA LA SUBUNIDAD
PESADA DE LA LECTINA DE UNIÓN A Gal/NAcGal DE *Entamoeba histolytica*".

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCION
- II.- JUSTIFICACIÓN
- III.- HIPOTESIS
- IV.- OBJETIVOS
- V.- MATERIALES Y METODOS
- VI.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- REFERENCIAS
- IX.- ANEXOS


Dr. José Luis González Vázquez
Sub-Director Secretario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA




Dr. Samuel Guillermo Meléndez López
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafex Maestre
Director

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por permitirme estar aquí culminando esta etapa y por darme la oportunidad de realizar mis sueños.

Gracias a mis padres por estar siempre conmigo apoyándome en todo y motivándome siempre, sin ustedes no sería nada.

A mi hija por ser mi razón de existir y mi motor diario.

A mi hermano por ser un gran apoyo en todo momento.

Gracias al Dr. Samuel Melendez, al Dr. Marco Ramos y la Dra. Rosy Mares por permitirme estar en el laboratorio hermoso de biotecnología, por aceptarme como su alumna y brindarme su apoyo tanto académico como personal, gracias por tantas enseñanzas y brindarme su mano amiga en momentos difíciles.

Dr. Cornejo Bravo, Dra. Araceli, Maestra Lilian gracias por todos los consejos dados.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología por hacerme sentir en casa dentro del laboratorio e ir a trabajar con gusto de verlos, por su paciencia y amistad gracias.

A mis compañeros de posgrado, por su amistad y apoyo, a nuestra secretaria de posgrado Paty por brindarme su amistad.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Dirección del
DR. SAMUEL GUILLERMO MELÉNDEZ LÓPEZ
y la Asesoría del
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. Amibiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	7
I.1.1. Epidemiología	8
I.1.2. Ciclo de vida.....	9
I.1.3. Patología.....	10
I.1.4. Factores de virulencia	11
I.1.5. Lectina de unión a galactosa y N-acetilgalactosamina	11
I.2. Métodos de diagnóstico de la amibiasis	12
I.2.1. Microscopía.....	12
I.2.2. Métodos bioquímicos: cultivo e isoenzimas	13
I.2.3. Reacción en cadena de la ADN polimerasa	14
I.2.4. Detección de antígeno	15
I.2.5. Detección de anticuerpos	16
I.2.6. Técnicas más recientes	17
II. JUSTIFICACIÓN	20
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1. Objetivo general	22
IV.2. Objetivos específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1. Reactivos químicos y biológicos.....	23
V.1.1. Plásmidos.....	23
V.1.2. Células y medios.....	24
V.1.3. Anticuerpos.....	24
V.1.4. Reactivos químicos	24
V.2. Equipo.....	25
V.3. Transformación bacteriana	25
V.4. Expresión y purificación de <i>EhLC3</i> recombinante	26
V.5. Renaturalización de <i>EhLC3</i> recombinante	27
V.6. Obtención de anticuerpos policlonales anti- <i>EhLC3</i>	27
V.6.1. Esquema de inmunización.....	27
V.6.2. Obtención de suero hiper-inmune	28
V.6.3. Inmunoensayo tipo ELISA indirecto	28
V.7. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>EhLC3</i>	29
V.7.1. Preparación de la resina Sepharose®-4B acoplada a proteínas bacterianas	29

V.7.2. Preparación de la resina Sepharose®-4B acoplada a EhLC3	30
V.8. Procedimiento de purificación de anticuerpos anti-EhLC3	30
V.9. Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3	31
V.9.1. Evaluación de la especificidad contra el antígeno recombinante	31
V.9.2. Evaluación de la especificidad de anti-EhLC3 contra el antígeno recombinante en condiciones de competencia	33
V.9.3. Evaluación de la especificidad contra antígeno nativo	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
VI.1. Transformación bacteriana con pQE30EhLC3	37
VI.2. Expresión y purificación de <i>EhLC3</i> recombinante	37
VI.3. Obtención y titulación de suero hiper-inmune anti- <i>EhLC3r</i>	38
VI.4. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>EhLC3</i>	39
VI.5. Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>EhLC3</i>	40
VII. CONCLUSIONES	44
VIII. REFERENCIAS	45
IX. ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del ciclo biológico de Entamoeba histolytica.....	9
Figura 2. Análisis de la transformación de células competentes de E. coli ER2738 con pQE30EhLC3.....	37
Figura 3. Separación electroforética (SDS-PAGE 12%) de las fracciones obtenidas de la purificación de EhLC3 mediante cromatografía de afinidad a níquel.	38
Figura 4. Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3.	39
Figura 5. Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3 contra el antígeno recombinante.	40
Figura 6. Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3 contra antígeno recombinante en condiciones de competencia.	41
Figura 7. Caracterización de los anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-EhLC3 contra el antígeno nativo.....	42
Figura 8. Caracterización de los anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-EhLC3 contra antígeno nativo presente en fracción membranosa.	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento EhLC3.	23
Tabla 2. Características generales del ensayo para la titulación del suero hiper- inmune.....	28
Tabla 3. Diluciones de los anticuerpos anti- <i>Eh</i> LC3 utilizadas para la evaluación de su especificidad contra el antígeno recombinante.....	32
Tabla 4. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Eh</i> LC3 contra antígeno recombinante.....	33
Tabla 5. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Eh</i> LC3 contra antígeno nativo.....	35
Tabla 6. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti- <i>Eh</i> LC3 contra el antígeno nativo en proteínas membranosas de trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	36

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
Anm	Absorbencias a diferente longitud de onda (500, 415 y 280)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
anti- <i>Eh</i> LC3	Anti-fragmento LC3 de <i>E. histolytica</i>
BSA	Albumina de suero bovino
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. moshkovskii</i>	<i>Entamoeba moshkovskii</i>
E1...En	Fracción cromatografica eluida
<i>Eh</i> LC3r	Fragmento LC3 recombinante de <i>E. histolytica</i>
ELISA	Del ingles <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Antibody</i>
<i>et al.</i>	Del latin “ <i>et allos</i> ” : y colaboradores
Fc	Fragmento cristalizabile o constante en las Inmunoglobulinas
g, mg, µg, ng	Gramos, miligramos, microgramos y nanogramos
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
KDa	Kilo Daltons
L, mL, µL	Litros, mililitros, microlitros
LB	<i>Luria-Bertani</i>
M, mM,µM	Molar, milimolar, micromolar
h, min	Horas, minutos
Na+	Ión Sodio
Nm	Nanómetros
No.	Numero
OD	Unidades de densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Del Ingles <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	Peso Molecular
Rpm	Revoluciones por minuto

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Amibiasis y *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es uno de los parásitos protozoarios citotóxicos más potentes conocidos. La amibiasis se define como la infección intestinal o extra-intestinal causada por *E. histolytica*. Clínicamente, la amibiasis intestinal puede manifestarse comúnmente como disentería y colitis; en tanto la extra-intestinal, como absceso hepático, infección pulmonar, y amibiasis genitourinaria, entre otras [1].

Las primeras observaciones del parásito datan del siglo XIX. En 1859, *Lamb* fue el primero en identificar amibas en el contenido intestinal del hombre. Posteriormente, en 1875, *Losch* observó al parásito en las heces y úlceras del colon al realizar la necropsia de un paciente; sin embargo, no la consideró patógena y la denominó *Amoeba coli*. A finales de siglo, en 1891, *Councilman* y *Lafleur* la denominaron *Amoeba dysenteriae*. Ya en el siglo XX, *Schaudinn* diferenció a la amiba patógena de *E. coli*, llamándola *E. histolytica*. *Brumpt* (1925). Además, sugirió que los humanos podrían ser infectados por dos especies de *Entamoeba*, morfológicamente idénticas y que diferían en su capacidad patógena: *E. dysenteriae*, especie patógena (invasiva), y *E. dispar*, especie no patógena (no invasiva) [2].

La controversia fue resuelta por *Tannich* y col, los cuales evidenciaron en forma contundente, mediante análisis de ADN, que *E. histolytica* y *E. dispar* son diferentes genéticamente. Estos resultados fueron confirmados por *Diamond* y *Clark*, quienes propusieron la nomenclatura de *E. histolytica* y *E. dispar* para las dos especies [2].

Por otro lado, *E. moshkovskii* fue descrita por primera vez en 1941 por *Tshalaia*, quien la consideró como una amiba de vida libre. *E. moshkovskii* posee algunos rasgos biológicos que la diferencian de *E. histolytica* y *E. dispar*, como la capacidad de crecer a temperatura ambiente, la osmotolerancia y la resistencia a emetina [3]. La identificación de *E. dispar* y *E. moshkovskii* en muestras fecales de humanos ha complicado el diagnóstico de *E. histolytica*, ya que son morfológicamente indistinguibles y las dos primeras se consideran comensales. Sin embargo, estudios recientes sugieren que pueden desempeñar un papel patogénico.

En Bangladesh e India, *E. dispar* y *E. moshkovskii* han sido asociadas con síntomas gastrointestinales [4], aún más, se ha demostrado que *E. dispar* produce lesiones intestinales y hepáticas en conejillos de indias [5]. La distribución mundial y la magnitud de la infección de estas tres especies de *Entamoeba* son difíciles de estimar, ya que la mayoría de los estudios diagnósticos, especialmente en países del tercer mundo y en vías de desarrollo, se siguen basando en la observación microscópica como principal herramienta, la cual no permite diferenciarlas adecuadamente [4].

I.1.1. Epidemiología

La amibiasis es principalmente una enfermedad de países subdesarrollados. Se estima que se presentan entre 35 y 50 millones de casos anuales y que la enfermedad causa alrededor de 100,000 muertes cada año. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la amibiasis es la tercera causa de mortalidad debido a una enfermedad parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis [6].

La prevalencia global de la infección (estimada en 1986) sugirió que el 10% de la población mundial podría estar infectada por el parásito causante de la amibiasis. Además, se observó que la infección desarrolla cuadros clínicos (síntomas de amibiasis invasiva) sólo en el 10% de los individuos infectados, y que el 90% restante permanecen asintomáticos [7], lo que indica una deficiente identificación de las especies, patógenas y no patógenas, prevalentes en la población. Lo anterior promovió que, en 1993, se estableciera la diferenciación entre *E. histolytica* y *E. dispar* [8]. Desafortunadamente, la mayores índices de morbilidad y mortalidad se presentan en países de Asia, África, Centroamérica y Sudamérica, siendo la población infantil la más vulnerable, ya que pueden sufrir desnutrición y retraso en el crecimiento como resultado de infecciones repetidas [9].

En México, la amibiasis sigue siendo una de las 20 principales causas de morbilidad, ocupando el décimo lugar en 2013 [10]. Sin embargo, en los últimos 40 años, las tasas de mortalidad debido a las complicaciones graves de la amibiasis han disminuido, principalmente por la mayor accesibilidad a tratamientos anti-amibianos eficaces. A pesar de esto, los resultados de un estudio seroepidemiológico relativamente reciente mostraron que alrededor del 8.4% de la población mexicana ha desarrollado anticuerpos circulantes anti-amibianos, lo que indica una alta exposición al parásito [11].

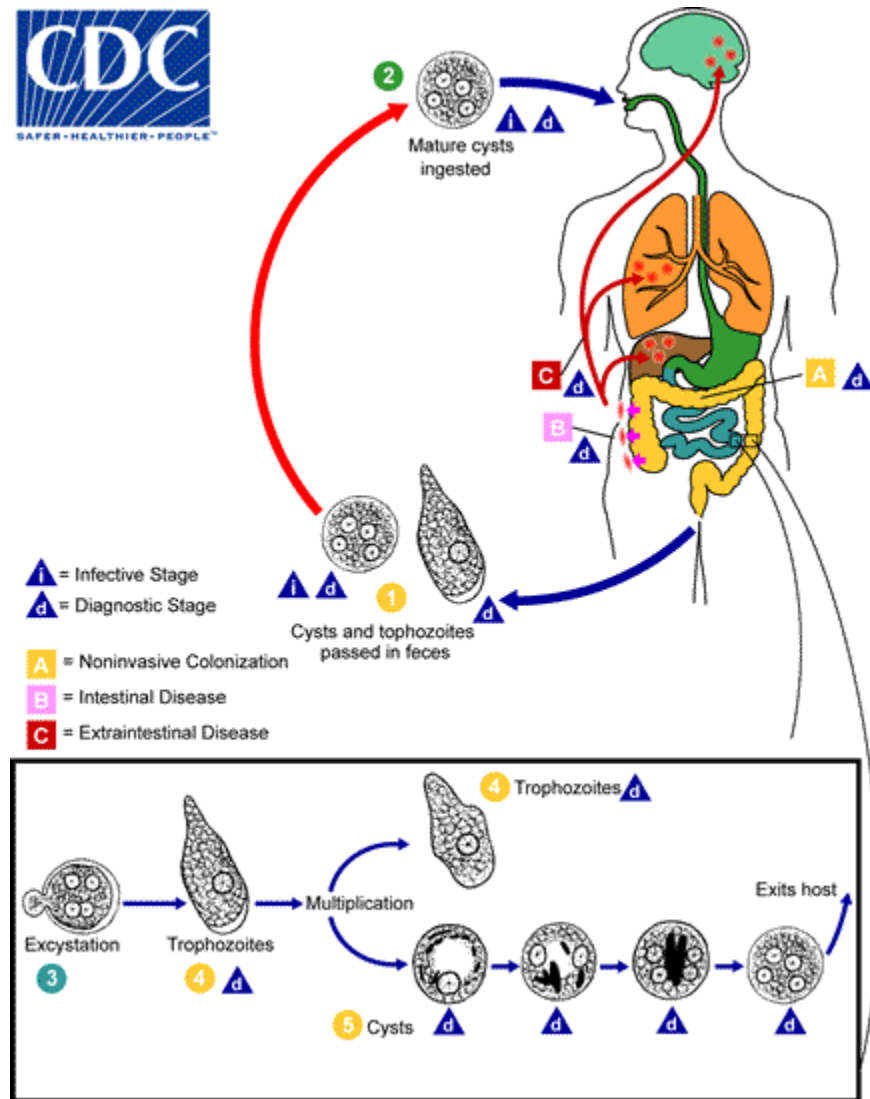


Figura 1. Representación del ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.
 [Información tomada de <http://www.cdc.gov/>]

I.1.2. Ciclo de vida

E. histolytica presenta dos formas o fases de desarrollo bien establecidas: el trofozoíto y el quiste, que constituyen, respectivamente, la forma invasiva e infectante (figura 1). El trofozoíto es la forma móvil del parásito, el cual se desplaza mediante proyecciones citoplasmáticas, llamadas pseudópodos, que le permiten fagocitar pequeñas partículas, bacterias, y eritrocitos para alimentarse. El quiste mide de 10 a 15 μm , tiene forma esférica u oval, y contiene 4 núcleos. El quiste inmaduro tiene 1 a 2 núcleos y se le pueden observar algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. Los quistes y trofozoítos se incorporan en las heces¹. Los quistes se encuentran en las heces formadas, mientras que los

trofozoítos se encuentran típicamente en heces diarreicas. La infección por *E. histolytica* se produce por la ingestión de quistes maduros ② en alimentos, agua, o las manos contaminados con heces. El desenquistamiento ③ se produce en el intestino delgado liberando a los trofozoítos ④, que migran al intestino grueso. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y producen quistes ⑤, y ambas fases pasan a las heces ①. Cuando las condiciones del medio no son ideales para subsistir, el trofozoíto se desarrolla a pre-quiste (mono-nucleado) y, eventualmente, madura a quiste (tetra-nucleado). Gracias a una cubierta de quitina, el quiste maduro tiene la capacidad de sobrevivir fuera del hospedero por días e incluso meses, sobre todo bajo condiciones húmedas, siendo estos los responsables de la transmisión. Los trofozoítos expulsados en las heces se destruyen rápidamente (una vez fuera del cuerpo), y sí son ingeridos, no sobreviven la exposición al ambiente gástrico. En muchos casos, los trofozoítos permanecen confinados a la luz intestinal A de los individuos que son portadores asintomáticos, expulsando quistes en las heces. En algunos pacientes, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal B, o bien, a través del torrente sanguíneo, migran a sitios extra-intestinales, como el hígado, el cerebro, o los pulmones C, con las respectivas manifestaciones patológicas resultantes [12].

I.1.3. Patología

La amibiasis intestinal se caracteriza clásicamente por disentería y dolor abdominal, aunque también puede ocurrir diarrea acuosa o con moco abundante. Histológicamente, se pueden observar los trofozoítos en la pared intestinal y las típicas úlceras en forma de botella. El colon ascendente es la región del intestino grueso más afectada. La colitis grave se manifiesta con disentería severa, dolor abdominal y raramente fiebre. La colitis necrotizante extensa es a menudo fatal [13].

Los grupos con mayor riesgo de tener una evolución grave son los niños, ancianos, individuos desnutridos, y los pacientes que reciben terapia con corticoides [14]. Las complicaciones incluyen: estrechez u obstrucción intestinal, fístula recto-vaginal, ameboma, megacolon tóxico, ulceración perianal, perforación intestinal con peritonitis, choque séptico, y muerte [15]. Se ha descrito también la amebiasis intestinal crónica con diarrea, dolor abdominal y períodos de constipación intermitentes [13]. La expresión clínica extra-intestinal más frecuente es el AHA (absceso hepático amibiano), causado por la diseminación hematogena de las amibas desde el colon al hígado vía la vena porta, lo que explica la mayor frecuencia del absceso en el lóbulo derecho del órgano [16]. En la mayoría de estos casos de AHA no se detecta infección intestinal concomitante, siendo los

adultos jóvenes los más afectados. La afección puede presentarse meses o años después de la exposición al parásito [13]. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, escalofríos, sudor, dolor abdominal, y hepatomegalia sensible a la palpación. Puede haber tos y estertores en la base del pulmón derecho, aunque la ictericia es inusual. Los síntomas son generalmente agudos, pero pueden ser crónicos acompañados de anorexia y pérdida de peso. Los hallazgos más comunes de laboratorio son leucocitosis sin eosinofilia, anemia, eritrosedimentación elevada, y aumento de la fosfatasa alcalina. La bilirrubina está elevada en menos de 50% de los casos. Las complicaciones incluyen infección bacteriana, ruptura del absceso hacia la cavidad pleural, pericardial, y peritoneal, choque séptico, y muerte. Infrecuentemente, pueden ocurrir, metástasis amibianas hacia otros órganos [15].

I.1.4. Factores de virulencia

Los principales factores de virulencia de *E. histolytica* son: una lectina, que media su unión a residuos de galactosa (Gal) y la N-acetil- D-galactosamina (NAcGal), lo cual es crítico en la adherencia y citotoxicidad del parásito; Una familia de amebaporos, que inducen la formación de poros células del hospedero; una familia de cisteína proteasas, que actúan sobre varios sustratos proteicos del hospedero [4]. *E. histolytica* secreta una alta cantidad de enzimas proteolíticas que presuntamente facilitan la invasión de los tejidos. Además, el parásito también elabora y presenta una amplia gama de enzimas en la superficie, que incluye a neuraminidasas asociadas a la membrana y glucosaminidasas [17, 18, 19]. Otros componentes potencialmente necesarios para la patogénesis de *E. histolytica* incluyen una proteína de unión a calcio y la calmodulina [20, 21].

I.1.5. Lectina de unión a galactosa y N-acetilgalactosamina

Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren al epitelio intestinal por la interacción de la *Lectina Gal/NAcGal* con glicoproteínas del hospedero [22]. Además de la adherencia, la *Lectina Gal/NAcGal* facilita la resistencia al complemento y la citotoxicidad [23]. Los anticuerpos monoclonales que reconocen a esta lectina pueden afectar tanto la adhesión como la citotoxicidad *in vitro* [24, 25].

La *Lectina Gal/NAcGal* es un heterodímero de 260 kDa que consta de una subunidad pesada (hgl, 170 kDa) y una ligera (lgl, 31-35 kDa) unidas por enlaces disulfuro y asociadas no covalentemente con una subunidad intermedia (igl, 150 kDa) [26, 27]. Las subunidades hgl e lhl están codificadas por familias de múltiples genes. La subunidad hgl está codificada por una familia de cinco genes [28], mientras que la subunidad lgl por una de seis a siete genes [29, 30].

Curiosamente, la lectina equivalente en *E. dispar* tiene una estructura y función distinta.

Interesantemente, se ha demostrado que la muerte celular depende del contacto de *E. histolytica* con los neutrófilos, macrófagos, y eritrocitos [31]. Además, la capa de mucina presente en el colon humano puede impedir que la célula hospedera sufra la actividad citolítica, mediante la neutralización de los epítomos de unión de la *Lectina Gal/NacGal* durante la interacción [32].

Las propiedades inmunogénicas y funcionales más relevantes de la *Lectina Gal/NacGal* de *E. histolytica* residen en un fragmento de su subunidad pesada, denominado LC3, el cual comprende los residuos 758 a 1134. Una versión recombinante de LC3 [33] ha permitido generar anticuerpos monoclonales (de la clase IgG) que inhiben la adhesión de los trofozoítos, ya que incluye también al dominio responsable de la unión específica de la lectina a los residuos de Gal/NacGal [34, 35, 36]. Además, el fragmento LC3 recombinante ha resultado altamente inmunogénico, ya que usándolo como componente principal de una vacuna experimental mostró una eficacia cercana al 70%, en el modelo AHA en jerbo [30]. Por otro lado, se observó que la inmunización vía oral de ratones BALB/c con la proteína LC3 y la toxina del cólera (como adyuvante) induce una respuesta inhibidora de la adherencia intestinal a través de IgA anti-LC3 [37]. Aún más, se han detectado anticuerpos anti-LC3 (de clase IgA e IgG) en $\geq 90\%$ de los sueros de pacientes con amibiasis invasiva y en la mayoría de los sujetos con infección intestinal asintomática [38, 39, 40]. Además, en pacientes con colitis amibiana o AHA, se detectó una respuesta inmune basada en la producción de IgA anti-LC3 de mucosas [40, 41]. Por lo anterior, el fragmento LC3 ha sido considerado como un candidato viable para formular una vacuna contra la amibiasis.

I.2. Métodos de diagnóstico de la amibiasis

I.2.1. Microscopía

El diagnóstico de *E. histolytica* se ha basado históricamente en el examen microscópico de la morfología del protozooario, sin embargo, para que este análisis tenga valor diagnóstico debería poder diferenciar protozoarios con características morfológicas similares. Adicionalmente, el análisis microscópico convencional de heces fecales presenta una pobre sensibilidad y especificidad para diferentes especies de *Entamoeba*. Una forma alternativa que permite distinguir microscópicamente *E. dispar* de *E. histolytica*, es mediante la observación del fenómeno de eritrofagocitosis. Los glóbulos rojos ingeridos por los trofozoítos del

parásito pueden observarse en el citoplasma; este hallazgo todavía se considera diagnóstico para *E. histolytica* en pacientes con disentería. Habitualmente, *E. histolytica* se diagnostica con base a la morfología del protozooario sin la presencia de glóbulos rojos [42]. En varios estudios *in vitro*, se encontró que *E. histolytica* tiene una tasa de fagocítica significativamente mayor para los glóbulos rojos que las especies no patógenas (*E. dispar* y *E. moshkovskii*) [43]. González-Ruiz *et al.*, [44] concluyeron que la detección en muestras clínicas de trofozoítos de *E. histolytica* que contienen glóbulos rojos coinciden con un diagnóstico amebiasis invasiva activa. No obstante, en algunos casos, se han observado trofozoítos de *E. dispar* con glóbulos rojos ingeridos [45]. La presencia de trofozoítos se observa con mayor frecuencia en muestras de heces fecales frescas que contienen moco, pus y trazas de sangre. En preparaciones húmedas, los núcleos de los trofozoítos son difíciles de observar [46].

Las muestras de heces fecales pueden examinarse sin teñir o usando tinciones tales como Lugol o de D'Antoni. La tinción con yodo hace al núcleo perfectamente visible. La tinción de Giemsa, azul de metileno, clorazol negro E, Wright y yodotricrómico, pueden ser utilizadas con éxito. La tinción tricrómica de Wheatley o la tinción con hematoxilina férrica modificadas para frotis permanentes se han usado habitualmente para el diagnóstico microscópico de *E. histolytica* / *E. dispar* [47, 42, 46]. El diagnóstico definitivo de la amebiasis intestinal mediante estos métodos, requiere altos niveles de habilidad y experiencia [48]; un entrenamiento inadecuado puede conducir a un diagnóstico erróneo [42].

I.2.2. Métodos bioquímicos: cultivo e isoenzimas

Boeck y *Drbohlav* fueron los primeros en cultivar *E. histolytica* en un medio inclinado bifásico de huevo. Hoy en día, el medio de Robinson [49] y el medio TYSGM-9 de Diamond [50] se utilizan con mayor frecuencia para el cultivo xénico de *E. histolytica*. El medio axénico de *Diamond*, TYI-S-33 [51] es el medio axénico más utilizado. Desde hace tiempo se ha reconocido que el cultivo de *E. histolytica* a partir de muestras de heces fecales o de aspirados de abscesos hepáticos y la realización subsecuente de análisis de isoenzimas, es en general poco satisfactorio y no es útil como prueba rutinaria de laboratorio, además, la identificación de especies basada en el cultivo y la identificación de zimodemas, nunca excluye la posibilidad de que en muestras con infecciones mixtas, una especie supere en crecimiento a las otras [52].

Otro problema es la eliminación de organismos no deseados en el proceso de cultivo. Algunos organismos no deseados, especialmente *Blastocystis hominis*, pueden crecer demasiado en cultivo. *E. histolytica* con frecuencia se pierde en el

examen de heces fecales. Además, es muy importante recordar que cualquier cultivo que da un resultado negativo puede aún tener presente a *E. histolytica* [53]. Clásicamente, para diferenciar entre formas "patógenas" y formas "no patógenas", se utilizaron principalmente los patrones isoenzimáticos obtenidos a partir de lisados de cultivo amibianos [54, 55, 56, 57]. Se han reconocido un total de 24 zimodemas diferentes, 21 zimodemas se identificaron a partir de cepas aisladas de infecciones humanas (9 de *E. histolytica* y 12 de *E. dispar*) y 3 zimodemas de cepas amibianas cultivadas [58, 59]. Es posible diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar* con base al patrón isoenzimático de las enzimas: hexocinasa, glucosa fosfato isomerasa, enzima málica y fosfoglucomutasa [60]. Aunque el análisis tiene algunas desventajas tales como la dificultad en la realización de la prueba y procedimientos que requieren mucho tiempo, el uso de estos métodos bioquímicos en regiones de infección endémica puede llevar a una mejor comprensión de la situación epidemiológica [61].

I.2.3. Reacción en cadena de la ADN polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy sensible y específica, por lo que es el método de elección para estudios epidemiológicos y clínicos en países desarrollados y sub-desarrollados. En el caso de *E. histolytica*, las pruebas de ADN, basadas en PCR, son tan sensibles que pueden detectar el material genético de 5 quistes [62] o de solo 1 trofozoíto, en una muestra de heces fecales [63]. Además, esta técnica permite analizar muestras de aspirados de abscesos hepáticos y tejidos, lo que agiliza los procesos de detección, evitando el cultivo; aún más, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de estuches comerciales que facilitan la extracción de ADN amibiano directamente de la muestra biológica, incluso a partir de muestras fijadas con formol [64].

Se han desarrollado nuevos métodos para la diferenciación de amibas microscópicamente idénticas. La técnica de PCR Múltiple (Multiplex) es una técnica de biología molecular que permite la amplificación simultánea de varias secuencias génicas diferentes en un solo experimento de PCR. La PCR Múltiple (Multiplex) se ha utilizado ampliamente para los siguientes fines: identificación de patógenos, detección de polimorfismos mononucleotídicos, genotipificación, análisis de mutación, análisis de deleciones génicas, cuantificación, análisis de ligación, detección de ARN y estudios forenses, entre otros. En este tipos de ensayos, más de una secuencia diana puede ser amplificada mediante el uso de múltiples pares de cebadores en una mezcla de reacción. La extracción de ADN es a menudo un paso temprano e importante en muchos procesos de diagnóstico utilizados para detectar bacterias, virus y parásitos, así como el diagnóstico de enfermedades y trastornos genéticos [65].

La PCR en tiempo real es una metodología más reciente y muy atractiva para el diagnóstico de laboratorio de enfermedades infecciosas, debido a que no requiere el análisis post-PCR. Esta característica permite reducir el tiempo de realización, el riesgo de contaminación por amplicones y los costos. El método, permite la detección específica de la amplificación mediante la unión a una o dos sondas marcadas con fluoróforos durante el desarrollo de la PCR, lo que permite la monitorización continua del producto de PCR durante toda la reacción. Un aspecto importante de la PCR en tiempo real es la mejora en la sensibilidad en comparación con la PCR convencional, pudiendo detectar en algunos casos 0.1 células por gramo de heces fecales [82]. Además, la PCR en tiempo real es un método cuantitativo y permite la determinación del número de células de parásitos en diversas muestras [15].

A pesar de las bondades tecnológicas que ofrece la reacción de PCR, existe otro tipo de factores que pueden ser considerados como desventajas: el equipo y los reactivos son de valor económico inaccesible para laboratorios de diagnóstico clínico rutinario en países en vías de desarrollo, donde la amebiasis es un problema de salud pública; además, las muestras de heces fecales pueden contener inhibidores de la ADN polimerasa, lo cual puede generar resultados falsos negativos [64].

I.2.4. Detección de antígeno

El método de ELISA basado en la detección de antígeno tiene varias ventajas significativas sobre otros métodos utilizados actualmente para el diagnóstico de amebiasis: (i) diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, (ii) excelente sensibilidad y especificidad; (iii) fácilmente utilizables por personal de laboratorio, incluso los no experimentados; y (iv) el uso de un formato de placa de 96 pocillos permite el análisis simultáneo de muchas muestras, pudiéndose aplicar al desarrollo estudios epidemiológicos [65].

El panel Triage (Biosite Diagnostics, San Diego, Calif.). Es una tira inmunocromatográfica recubierta con anticuerpos monoclonales específicos para *E. histolytica* / *E. dispar* (29 kDa) y para antígenos de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* [66, 67]. *García et al.* [66] determinaron que la sensibilidad y especificidad de Triage era de 96 y 99,1%, respectivamente, para *E. histolytica* / *E. dispar* en 99 muestras de heces. En otro estudio, a pesar de que la especificidad de Triage fue muy alta (100%), la sensibilidad fue baja (68,3%) en comparación con el estuche Alexon ProSpecT ELISA [67]. *Jelinek et al.* Determinaron que la sensibilidad y la especificidad del ProSpecT ELISA fue 73.5 y

97.7%, respectivamente, en comparación con la microscopía para *E. histolytica* / *E. dispar* [68].

Hoy en día, los kits de ELISA que permiten la detección específica de antígenos de *E. histolytica* utilizan anticuerpos monoclonales contra la lectina de unión a Gal/GalNAc de *E. histolytica* (*E. histolytica* prueba II; TechLab, Blacksburg, Va.) [42, 45, 73] o anticuerpos monoclonales contra el antígeno rico en serina de *E. histolytica* (kit S óptima; Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Alemania). Además de los estuches previamente mencionados, se han utilizado también para la detección específica de *E. histolytica*: anticuerpos monoclonales contra un antígeno de superficie rico en lisina [69], un lipofosfoglicano [70], detección de la subunidad pesada (170 kDa) de con IgA salival [71, 72] y un antígeno sin caracterizar [72,74].

En resumen, las pruebas de detección de antígeno en heces fecales, son hoy una alternativa práctica, sensible y específica del laboratorio clínico para detectar *E. histolytica* intestinal. La única desventaja que presentan estas pruebas, es que no funcionan con muestras de heces fecales previamente fijadas. Pudiéndose usar solo muestras frescas o congeladas.

I.2.5. Detección de anticuerpos

La mayoría de las personas con infección amebiana intestinal en las zonas endémicas han estado expuestas a *E. histolytica* muchas veces. Los síntomas comúnmente atribuidos a *E. histolytica* pueden estar ausentes en la mayoría de los casos. Esta situación hace que el diagnóstico definitivo mediante la detección de anticuerpos sea difícil debido a la incapacidad para distinguir el presente y el pasado de la infección [75]. La combinación de las pruebas serológicas con la detección del parásito (por detección de antígeno o PCR) ofrece el mejor enfoque para el diagnóstico [76].

Los anticuerpos séricos de *E. histolytica* pueden ser detectados en 75 a 85% de los pacientes con infección sintomática. Los ensayos utilizados para detectar anticuerpos hasta la fecha han sido: Hemaglutinación indirecta (IHA) [77, 78], contra- inmunolectroforesis (CIE) [79, 80], prueba de difusión en gel [83], fijación del complemento (FC) [84, 85], ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) [77, 84, 87] aglutinación con perlas de látex (APL) [77, 84, 85, 87], y el ELISA [81, 15]. La prueba de ELISA es uno de los métodos más populares utilizados en los laboratorios de diagnóstico en todo el mundo. Se cree que la técnica es suficiente para los propósitos clínicos (particularmente en el diagnóstico de pacientes con AHA), ya que el valor diagnóstico de los anticuerpos específicos detectados en los pacientes sintomáticos es alto. La sensibilidad de detección de anticuerpos específicos contra *E. histolytica* en el suero es cercana a 100%, lo que es

prometedor para el diagnóstico de AHA [84]. Además, como ofrece resultados cuantitativos, también es de utilidad para dar seguimiento al tratamiento farmacológico de pacientes.

Contra Inmuno Electroforesis (CIE). Aunque en alguna etapa pasada la prueba de CIE fue de las más empleadas para diagnosticar amibiasis; su comparación con la prueba de ELISA, permitió determinar que la CIE tiene mucha menor sensibilidad que la prueba de ELISA para el diagnóstico de AHA [88]. Los resultados mostraron que la prueba CIE puede ser específica en amebiasis invasiva, pero tiene baja sensibilidad para el diagnóstico de amibiasis intestinal, demandando más tiempo que la prueba de ELISA.

La IFA es un método rápido y reproducible, con una sensibilidad del 93.6% y una especificidad del 96.7%, se considera ampliamente útil, ya que permite determinar si el absceso hepático es amibiano, o de otra etiología; además de diferenciar entre una infección pasada (tratada) o un reciente [82]. Desafortunadamente, este método requiere del cultivo de las amibas, por lo que resulta poco práctico como procedimiento de rutina.

Tradicionalmente, la IHA se ha utilizado como una prueba serológica estándar, pero la prueba de ELISA ha sido propuesta como una alternativa rápida, simple, y más sensible. En cuanto a la técnica APL, tiene la ventaja de ser una prueba rápida (aproximadamente 10 minutos), es altamente específica y sensible (99.5 % en absceso hepático y 100% en colitis amibiana); sin embargo, se han reportado con relativa frecuencia la obtención de resultados falsos negativos (debido a reacciones no específicas), lo cual reduce la especificidad de esta prueba a niveles no aceptables [78, 89].

I.2.6. Técnicas más recientes

Una aplicación que ha revolucionado la era post-genómica es el desarrollo y uso de la tecnología de microarreglos. Las micromatrices de ADN son una tecnología desarrollada recientemente utilizada para la detección de patógenos y es una metodología rápida y sensible. El método consta implica cuatro etapas: extracción de ADN genómico, la amplificación del ADN específico, la hibridación de ADN marcado con sondas de oligonucleótidos inmovilizados sobre una micro-matriz, y análisis de datos. El primer microarreglo de oligonucleótidos fue desarrollado para la detección paralela de *E. histolytica*, *E. dispar*, *G. lamblia* A y B, y *C. parvum* tipos 1 y 2 en un único ensayo con una alta especificidad y sensibilidad [90]. Además de distinguir entre los principales genotipos, este ensayo demostró ser útil para la detección y diferenciación entre *E. moshkovskii* y *E. histolytica*. Este

estudio se realizó con el ADN genómico purificado estándar extraído de cepas en cultivo de los diferentes parásitos [90].

Un ensayo de genotipificación basado en la técnica de microarreglos (hibridación genómica comparativa) se desarrolló más tarde usando clonas de ADN genómico secuenciados de *E. histolytica* (HM-1: IMSS). Este fue el primer análisis de todo el genoma de las cepas de *Entamoeba* y reveló que esta tecnología se puede utilizar para distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*, para identificar genes restringidos a cepas virulentas, y para encontrar posibles asociaciones entre genotipos y fenotipos [91].

Los microarreglos de ADN son en este momento una herramienta de investigación y rara vez se han utilizado en el laboratorio de diagnóstico clínico para la detección y diferenciación de los parásitos. Sin embargo, con las mejoras previstas en la tecnología de microarreglos, junto con la disminución de los costos, es posible que esta tecnología pueda llegar a ser la vanguardia de la investigación parasitaria [15]

La técnica conocida por sus siglas en inglés como MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*: Espectrometría de Masas basada en la desorción/ionización láser asistida por una matriz detectada por tiempo de vuelo) ha revolucionado recientemente la microbiología clínica [92]. Esta técnica permite la identificación rápida, precisa y barata de microorganismos en cultivos y muestras biológicas. Ahora se utiliza también en los laboratorios de microbiología de diagnóstico donde ha surgido como un método de primera línea para la identificación precisa de las bacterias, pero pocos datos están disponibles para los protozoos [93].

Comparado con los métodos moleculares, tales como los ensayos de PCR en tiempo real, las principales ventajas de MALDI-TOF MS son que requiere menos mano de obra, es menos costosa (excluyendo el costo de los instrumentos) y no requiere de múltiples áreas separadas físicamente para realizarse. Se ha determinado que la técnica de MALDI-TOF MS requiere una concentración mínima de 10⁶ trofozoítos/g de heces fecales. Esta técnica podría ser utilizada como una nueva forma para discriminar entre *E. histolytica* y *E. dispar* utilizando cultivos *in vitro*. El uso creciente de MALDI-TOF MS en los laboratorios de microbiología clínica podría dar lugar a su aplicación en la parasitología de diagnóstico [94].

El uso de nanopartículas, especialmente nanopartículas de sílice, es un nuevo método para la detección de microorganismos [95, 96]. El método de Stöber produce nanopartículas de buena calidad de tamaño apropiado en grandes cantidades [98], aunque solo hay un estudio que involucra a *Entamoeba histolytica* [97], el uso de nanopartículas fluorescentes de sílice promete ser un método

rápido, simple, rentable, altamente sensible y específico para la detección de *E. histolytica*. Se necesitan más estudios, antes de introducir su uso en el diagnóstico de laboratorio de la amibiasis [97].

II. JUSTIFICACIÓN

La amibiasis en México permanece como un problema de salud pública serio, ya que esta infección sigue figurando entre las primeras diez causas de morbilidad [10]. De acuerdo a diversos estudios, la población en ciertas regiones del país presenta una elevada prevalencia de anticuerpos anti-amibianos, como consecuencia de su frecuente exposición al parásito patógeno.

El tratamiento farmacológico de la amibiasis habitualmente es el metronidazol (MTZ), un antibiótico de la familia de los nitroimidazoles que generalmente es un anti-amibiano altamente eficaz. Aunque existen algunos reportes aislados de resistencia o disminución de la susceptibilidad de *E. histolytica* al tratamiento con MTZ, a la fecha no se ha reportado el aislamiento de una cepa clínica que sea claramente resistente al fármaco. Sin embargo, mediante estudios *in vitro*, ha sido posible inducir resistencia en cepas axénicas (de laboratorio). Por lo tanto, aun que MTZ sigue siendo agente eficaz en el tratamiento de la amibiasis, la aparición de cepas resistentes al fármaco resulta altamente probable.

La búsqueda de nuevos tratamientos contra la amibiasis, y otras parasitosis, se ha centrado en la identificación de nuevas moléculas con potencial terapéutico. Sin embargo, el desarrollo de formas farmacéutica innovadoras que permitan tanto la entrega sitio-específico de los fármacos existentes como la optimización de terapia anti-parasitaria son alternativas viables.

Los anticuerpos, como moléculas de reconocimiento específico, pueden ser acoplados a sistemas de liberación controlada y brindar una tecnología innovadora para la entrega específica de fármacos [45]. Aún más, proteínas con alto potencial inmunogénico pueden ser utilizadas en vacunas en esquemas de prevención de enfermedades infecto-contagiosas. Por lo tanto, la estrategia experimental para la obtención del fragmento LC3 recombinante y la producción de anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra la *Lectina Gal/NAcGal* de *E. histolytica* puede brindarnos herramientas moleculares fundamentales con potencial aplicación en esquemas de diagnóstico, tratamiento, y prevención de la amibiasis.

III. HIPÓTESIS

Los anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra la *Lectina Gal/NAcGal* de *E. histolytica*, obtenidos usando al fragmento LC3 recombinante como inmunógeno, reconocerán específicamente a la molécula nativa en ensayos *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Desarrollo, purificación y caracterización de anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra la subunidad pesada de la lectina de unión a Gal/NAcGal de *Entamoeba histolytica*, usando como inmunógeno el fragmento LC3 recombinante.

IV.2. Objetivos específicos

1. Amplificar la secuencia codificante del fragmento LC3 de la subunidad pesada (170 kDa) de la lectina de unión a Gal/NAcGal de *Entamoeba histolytica* a partir de ADN genómico mediante la reacción de PCR.
2. Clonar la secuencia amplificada de *EhLC3* en el plásmido de expresión bacteriana pQE30 mediante técnicas estándar de clonación molecular.
3. Expresar la proteína recombinante codificada por *EhLC3* en células de *E. coli*, en condiciones óptimas de inducción y cultivo.
4. Purificación de la proteína recombinante *EhLC3* a partir de lisados bacterianos con una Columna de Níquel-agarosa.
5. Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante *EhLC3* usando modelos animales adecuados (conejos) y siguiendo protocolos estándar de inmunización.
6. Obtener anticuerpos monoespecíficos contra la proteína recombinante *EhLC3* mediante protocolos estándar previamente establecidos.
7. Caracterización de anticuerpos monoespecíficos anti *EhLC3r*

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Reactivos químicos y biológicos

V.1.1. Plásmidos

pQE30 (3.46 kb, Qiagen) es un plásmido bacteriano de alta eficiencia de expresión proteica, caracterizado por contener el promotor T5 optimizado con un operador fuerte (consistente de dos elementos LacO), lo que garantiza una regulación génica muy estrecha. Su unidad transcripcional (5' a 3'): promotor T5 – 2xLacO – RBSII – ATG – 6xHis – MCS – 3xSTOP (TAA-TAG-TGA) – terminador t_0 del bacteriófago λ , permite una amplia variedad de estrategias de clonación. Además, contiene el origen de replicación Col E1 y el gen codificante para la enzima β -lactamasa, lo que asegura una eficiente estabilidad y selección (mediante resistencia a ampicilina).

pREP4 (3.74 kb, Qiagen) es un plásmido bacteriano de regulación negativa del operador LacO, caracterizado por contener la variante génica LacI^q , lo que favorece una expresión constitutiva, y de altos niveles, del represor LacI. Además, del gen codificante para la aminoglicósido fosfotransferasa (que confiere resistencia a kanamicina), contiene el origen de replicación p15A, el cual es compatible en plásmidos que poseen el origen ColE1.

pQE30EhLC3 es un plásmido de expresión bacteriana, derivado de pQE30, que contiene el fragmento LC3 de la *Lectina Gal/NAcGal* de *E. histolytica* bajo el control del promotor T5/LacO. El plásmido fue construido en el laboratorio de biotecnología de la FCQI-UABC y conservado como parte de la reserva de reactivos biológicos. Brevemente, la secuencia nucleotídica codificante para el péptido EhLC3, comprendida entre los residuos E758 y T1134 (NCBI Acc. No. P32022.2), fue amplificada mediante PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos como iniciadores (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento EhLC3.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
EhLC3F	cat cat <u>gga tcc</u> GAA TGT TCT AGT TTA ACA TGT CCA GC BamHI
EhLC3R	tac tac <u>aag ctt</u> TAT GTT TTC TTT GTG TAA ATA GTT TCT CC HindIII

La secuencia adaptadora para los sitios de restricción se indica en itálica y subrayada.

Posteriormente, el producto de PCR *EhLC3* fue digerido con las endonucleasas Bam HI y Hind III (New England Biolabs) y subclonado en el plásmido pQE30. El inserto del plásmido recombinante, pQE30*EhLC3*, fue caracterizado mediante un estricto análisis de restricción y verificado mediante secuenciación de ADN.

V.1.2. Células y medios

La cepa ER2738 de *E. coli* (New England Biolabs) fue utilizada de manera rutinaria en las técnicas de biología molecular. Las bacterias competentes para transformación por choque térmico fueron preparadas mediante un tratamiento con CaCl₂, siguiendo el protocolo típico de laboratorio. Las bacterias se cultivaron en medios complejos líquidos y sólidos (1.7% de agar). Los medios LB (10 g/L de triptona; 5 g/L de extracto de levadura; 10 g/L de NaCl) y 2X YT (16 g/L de triptona; 10 g/L de extracto de levadura; 5 g/L de NaCl) fueron preparados de acuerdo a los procedimientos estándar.

La cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* fue proporcionada amablemente por la Dra. Sharon Reed (Escuela de Medicina, UCSD) y cultivada en medio axénico usando la formulación TYI-S-33 [Diamond *et al.*, 1978].

V.1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-poli-histidina, producidos en ratón, fueron obtenidos de la compañía Thermo Scientific. En tanto, los anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo, producidos en cabra, acoplados a fosfatasa alcalina o a peroxidasa fueron adquiridos de las compañías Rockland y Boehringer-Mannheim, respectivamente.

V.1.4. Reactivos químicos

La resina *Sepharose*[®]-4B-Protein A y los reactivos *Tween*[®] 20, bromuro de etidio, azul de bromo-fenol, y azul de metileno fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich. Los reactivos Tris base (tris [hidroximetil] aminometano), EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) disódico, SDS (dodecilsulfato de sodio), glicerol, y Tritón X-100 de IBI Scientific. Los reactivos azul brillante de *Coomassie* R-250, TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina), *AP Conjugated Substrate Kit* de Bio-Rad. Otros reactivos, como β-mercaptoetanol (EM Science Inc.), imidazol (Fisher Biotech), persulfato de amonio (JT Baker), glicina (ICN), urea (Mallinckrodt), gelatina (Spectrum), cloruro de guanidinio (Thermo Scientific), fueron obtenidos de diferentes proveedores (indicados entre los paréntesis). Los marcadores de peso

molecular de proteínas *Prestained Protein Marker Broad Range* de New England BioLabs.

V.2. Equipo

Las determinaciones espectrofotométricas UV (en celda de cuarzo) se realizaron en un *Smart Spec™ Plus Spectrophotometer*, las determinaciones colorimétricas (en placa de microtitulación) mediante un *Microplate Reader 680*, la cámara de electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa *Criterion Blotter* fueron de Bio-Rad; además, la separación de proteínas se realizó en una cámara *Mini-Protean Tetra System* y las cámaras de electroforesis utilizadas *MINI-SUB Cell GT* de la misma compañía. El termobloque utilizado para incubación (*COD Digester Block*) de la compañía CHEINetries. El termociclador MultiGene de Labnet La incubadora de ambiente controlado *Incubator Shaker* de New Brunswick Scientific Co.

V.3. Transformación bacteriana

Preparación de células competentes. La pastilla celular proveniente de 1 mL de cultivo joven ($DO_{600} = 0.4-0.6$) fue separada mediante centrifugación (2 minutos a 12,000 rpm). Enseguida, fue lavada con 0.5 mL de agua destilada estéril (mediante resuspensión), mantenida en hielo durante 5 minutos, y separada mediante centrifugación. Similarmente, fue lavada con 0.5 mL de $CaCl_2$ 50 mM estéril. Posteriormente, fue resuspendida en 0.1 mL de $CaCl_2$ 50 mM estéril y mantenida en hielo durante 5 minutos.

Transformación mediante choque térmico. La suspensión bacteriana fue mezclada con 2 μ L del plásmido pQE30*Eh*LC3 [100-150 ng/ μ L] y mantenida en hielo durante 30 minutos. Enseguida, la mezcla fue incubada durante 1.5 minutos a 42 °C e, inmediatamente, fue transferida y mantenida en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, las bacterias fueron recuperadas en medio líquido 2X YT (1 mL) e incubadas a 37 °C durante 1 hora.

Selección de transformantes. La selección de unidades formadoras de colonias (ufc) estables fue realizada mediante sembrado en medio sólido LB suplementado con ampicilina [0.15 mg/mL]. El desarrollo colonial de ER2738/pQE30*Eh*LC3 fue promovido durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, varias ufc fueron aisladas y expandidas para análisis de expresión.

Co-transfección y selección de co-transformantes. La cepa ER2738/pQE30*Eh*LC3 fue co-transfectada con el plásmido pREP4, siguiendo el protocolo anteriormente

descrito, y seleccionada en medio sólido LB suplementado con ampicilina [0.15 mg/mL] y kanamicina [0.025 mg/mL].

V.4. Expresión y purificación de *EhLC3* recombinante

Expresión. 2 mL de un cultivo joven de la cepa ER2738/pQE30EhLC3/pREP4 fueron inoculados a 100 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina [0.15 mg/mL] y kanamicina [0.025 mg/mL]. El cultivo fue incubado durante 2 horas a 37 °C y con agitación constante (300 rpm). Posteriormente, se agregaron 10 µL de IPTG 1 M (concentración final de 0.1 mM) y se continuó la incubación durante 4 horas (en las mismas condiciones). Las células fueron separadas mediante centrifugación (4,500 rpm, 10 minutos).

Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión. La pastilla celular fue resuspendida en 5 mL de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; NaCl 100 mM; EDTA 5 mM, pH 8.0; DTT 1 mM; Tritón X-100 0.5%) mediante agitación vórtex (1 minuto). Enseguida, la lisis celular fue promovida mediante sonicación durante 6 minutos, en ciclos de 30 segundos de ruptura por 30 segundos reposo (en hielo). Posteriormente, la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) fue separada mediante centrifugación (15 minutos a 14,000 rpm, 10 °C). Adicionalmente, los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos en 5 mL de solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; NaCl 100 mM; EDTA 5 mM, pH 8.0; DTT 1 mM), sonicados y separados usando las condiciones previamente descritas. Los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos en 5 mL de solución de solubilización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; GuHCl 6 M; GSH 10 mM; DTT 25 mM) y solubilizados mediante agitación por rotación durante la noche.

Purificación. Una columna cromatográfica conteniendo 0.5 mL de la resina agarosa-NTA-Níquel fue preparada y ambientada en solución de estabilización (NaCl 300 mM; GuHCl 4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0). Posteriormente, los cuerpos de inclusión solubilizados fueron cargados lentamente en la columna (dos pasadas) y el efluente fue recolectado (fracción no pegada, FNP). Enseguida, la columna fue lavada con 5 mL de solución de estabilización y se recolectaron los primeros 0.5 mL del efluente (lavado 1, W1). Adicionalmente, la columna fue lavada con 10 mL de solución de lavado (NaCl 300 mM; GuHCl 4 M; imidazol 20 mM, pH 8.0; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) y se recolectaron los últimos 0.5 mL (lavado 2, W2). Finalmente, la proteína *EhLC3* fue separada mediante la adición de 5 mL de solución de elución (NaCl 300 mM; GuHCl 4 M; imidazol 250 mM, pH 8.0; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) y recolectada en fracciones de 0.5 mL (8 alícuotas). Una muestra de cada fracción cromatográfica fue precipitada con metanol (Anexo 2) y analizada mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE) al 12% (Anexo 1). Las fracciones con mayor concentración de *EhLC3* fueron mezcladas y la concentración fue determinada mediante espectrofotometría UV a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción calculado de 0.729 mg/mL.

V.5. Renaturalización de EhLC3 recombinante

Replegamiento. La proteína recombinante *EhLC3* purificada fue diluida 50 veces en solución de renaturalización (L-arginina 0.5 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; GSSG 0.6 mM), gota a gota, agitando por inversión. Se dejó en agitación suave por rotación, durante 3 horas a temperatura ambiente. Se almacenó en refrigeración.

Concentración de la proteína renaturalizada. Se procedió a preparar el tubo de ultrafiltración (pall-3k), se añadieron 10ml de agua destilada, se centrifugó a 9500 rpm por 40 minutos, una vez filtrada toda el agua, se añadieron 10ml de etanol al 30%, y se centrifugó bajo las mismas condiciones de velocidad. Se sensibilizó la membrana del tubo con 10 ml del buffer de renaturalización (L-arginina 0.5M; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; GSSG 0.6mM) y se centrifugó (como antes). Una vez preparado el tubo de ultrafiltración se procedió a pasar la proteína plegada, con rondas de centrifugación de 10 minutos a 9500 rpm, hasta alcanzar un volumen 10 veces menor al inicial.

Cuantificación de proteína. Se determinó la concentración de proteína por medio del método BCA (Acido bicinconinico) con el kit: QuantiPro BCA Assay Kit-Sigma con una curva estándar de BSA (50 µg/mL). Después de 1 hora de incubación a 37°C, con el reactivo de color, se leyó absorbancia a 560 nm (A_{560}). Se utilizó el programa GradPad Prism.

V.6. Obtención de anticuerpos policlonales anti-EhLC3

V.6.1. Esquema de inmunización

Un conejo blanco fue inmunizado por vía subcutánea (en diferentes puntos de la superficie dorsal) durante 9 meses. Antes de la primera inmunización, se realizó un primer sangrado. El suero obtenido fue considerado como pre-inmune (PI). La dosis inicial (200 µg de *EhLC3*) fue preparada como una emulsión a partir de 0.5 mL de solución de proteína (0.2 mg/mL en PBS 1X) y 0.5 mL de adyuvante completo de Freund (Sigma). Las administraciones posteriores fueron realizadas utilizando la misma cantidad de proteína, cada 10 días y usando adyuvante incompleto de Freund (Sigma).

V.6.2. Obtención de suero hiper-inmune

Todos los sangrados se realizaron mediante punción de la vena central de la oreja. Cada 30 días se obtuvieron 2 a 4 mL de sangre total. La sangre extraída fue incubada a 37 °C durante 1–2 h; posteriormente, el suero se separó mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min. El suero fue almacenado -20 °C. Los sangrados del 6 al 10 fueron realizados mediante el método de goteo de la vena central, en cada sangrado se obtuvo de 15 a 25 mL de sangre total. El título de anticuerpos se determinó mediante análisis de ELISA indirecto (por duplicado). El esquema de análisis de las muestras se describe en la Tabla 2.

V.6.3. Inmunoensayo tipo ELISA indirecto

Sensibilización: se sensibilizaron todos los pocillos de una placa de microtitulación fueron sensibilizados con alícuotas de 100 µL una solución de 5 µg/mL de *EhLC3r* (15.20 µL de una solución con 3950 µg/mL de *EhLC3r*; se añadieron a 12 ml de amortiguador de bicarbonatos 0.1 M, pH 9.5) durante toda la noche a temperatura ambiente.

Bloqueo: los pocillos se lavaron 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado (Tween®20 0.02%; DPBS 1X, pH 8). Enseguida, se añadieron 0.2 mL de solución de bloqueo (Gelatina 0.5%; Tween®20 0.2%; DPBS 1X, pH 8) y se incubó la placa durante 2 h a temperatura ambiente.

Reconocimiento primario: los pocillos se lavaron 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 µL de solución de reacción y, en un microtubo, se preparó una dilución 1:50 del suero hiper-inmune. Enseguida, a partir de esa dilución se prepararon diluciones seriadas 1:3 en los 10 primeros pocillos de cada fila. *p.e.* en el pocillo 1 (dilución

Tabla 2. Características generales del ensayo para la titulación del suero hiper-inmune.

Componente	Control 1	Control 2	Problema
<i>EhLC3</i> (antígeno)	X	X	X
Dilución de suero problema (anticuerpo primario)	-	-	X
Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (anticuerpo secundario)	X	-	X
TMB-Elisa (sustrato de peroxidasa)	X	X	X

1:150) se mezclaron 50 μ L de la dilución 1:50 con los 100 μ L de solución de reacción; en el pocillo 2 (dilución 1:450), se mezclaron 50 μ L de la dilución 1:150 con los 100 μ L de solución de reacción, y así sucesivamente hasta el pocillo 10 (dilución 1: 2,952,450). La placa fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente.

Reconocimiento secundario: los pocillos se lavaron 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado. En un tubo cónico de 15 mL, se preparó una dilución 1: 5,000 de anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa y se añadieron 100 μ L de esta a los pocillos 1 al 11 de cada fila. La placa fue incubada durante 1 h a temperatura ambiente.

Revelado: los pocillos se lavaron 3 veces con 0.2 mL de solución amortiguadora de lavado. Cada pocillo recibió 100 μ L de sustrato de peroxidasa (1- Step™ Ultra TMB-ELISA). La reacción enzimática se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se detuvo mediante la adición de 100 μ L de H₂SO₄ 2M. El color desarrollado fue cuantificado mediante un lector espectrofotométrico de microplacas a una longitud de onda de 450 nm (A₄₅₀).

V.7. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3

V.7.1. Preparación de la resina Sepharose®-4B acoplada a proteínas bacterianas

Preparación de un extracto proteico soluble de Escherichia coli. La pastilla celular de un cultivo joven de *E. coli XL1Blue MRF'* se resuspendió en 0.5 mL de solución amortiguadora de lisis (urea 8M; NaCl 300mM; imidazol 10mM; Tris-HCl 100mM, pH 8.0), se agitó en un vórtex, y se mantuvo en agitación suave constante durante 15 min. El extracto bacteriano proteico soluble (EBPS) se obtuvo mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, el EBPS se dializó (Anexo 3) contra un amortiguador de bicarbonatos (NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.5) durante 4 h, y la concentración proteica se determinó mediante espectrofotometría UV a 280 nm.

Preparación de la resina Sepharose-EBPS. La resina Sepharose®-4B-CNBr (Sigma) se activó según el protocolo del fabricante. Brevemente, 0.5 g de la resina se resuspendió en 50 mL de HCl 1mM y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min, para eliminar el conservador y favorecer la activación de los grupos reactivos (cianatos); posteriormente, la suspensión se filtró y lavó con 50 mL de HCl 1mM. La resina activada se transfirió a un tubo cónico que ya contenía 5 UA₂₈₀ del EBPS. La reacción de acoplamiento se dejó durante una noche con

agitación constante y suave. Los grupos reactivos no acoplados se inactivaron con la adición 0.6 mL de Tris-HCl 1M, pH 8.0. Mediante este procedimiento se obtuvieron aproximadamente 3 mL de resina Sepharose-EBPS, de los cuales 1.5 fueron utilizados en el protocolo de purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3*.

V.7.2. Preparación de la resina Sepharose®-4B acoplada a EhLC3

Preparación de la resina Sepharose-EhLC3. La resina Sepharose®-4B-CNBr (Sigma) se activó de acuerdo al protocolo reportado por el fabricante. La resina activada se transfirió a un tubo cónico que ya contenía 5 mg de *EhLC3* (en solución de bicarbonato). La reacción de acoplamiento se dejó proseguir durante una noche con agitación constante y suave. Los grupos reactivos no acoplados se inactivaron mediante la adición 0.6 mL de Tris-HCl 1M, pH 8.0. Mediante este procedimiento se obtuvieron aproximadamente 3 mL de resina Sepharose-EhLC3, de los cuales 1.5 fueron utilizados en el protocolo de purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3.

V.8. Procedimiento de purificación de anticuerpos anti-EhLC3

Acondicionamiento y recuperación de las resinas cromatográficas. Todas las resinas en columnas de cromatografía, se lavaron con 10 mL de solución PBS 1X, seguido por 10 mL de solución de ácido acético 0.1 M, y se mantuvieron en solución PBS 1X, previo a la purificación de anticuerpos. Después de su aplicación, las resinas fueron regeneradas mediante lavados secuenciales con 5 mL de PBS 1X, 20 mL de ácido acético 0.1 M, 10 mL de PBS 1X, 10 mL ácido acético 0.1 M y 10 mL de PBS 1X. Las columnas se conservaron a 4 °C en presencia de etanol al 30%.

Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3. Una mezcla de 2 mL suero hiper-inmune con 8 mL de PBS 1X se clarificó mediante centrifugación a 4,500 rpm durante 10 min. El sobrenadante recuperado se cargó a la columna de Sepharose-EBPS y el efluente recuperado (libre de anticuerpos anti-proteínas de *E. coli*) se conservó 4 °C para su uso posterior. El efluente libre de anticuerpos anti-proteínas de *E. coli* se pasó por una columna de Sepharose-Protein A (Sigma). Considerando que la proteína A de *S. aureus* tiene una alta afinidad por las regiones Fc de inmunoglobulinas IgG de mamíferos. Los anticuerpos IgG unidos a la columna se eluyeron con 15 mL de ácido acético 0.1 M, recolectándose alícuotas de 1 mL en microtubos que contenían 200 µL Tris-HCl 1M (pH 8.0), todas las fracciones se homogenizaron inmediatamente después de su recolección. La concentración de proteínas se determinó mediante

espectrofotometría UV a 280 nm. Las fracciones con la mayor concentración proteica se mezclaron (IgG total) y se conservaron a 4 °C para su uso posterior. La fracción de IgG total se cargó a la columna de Sepharose-*EhLC3*. La columna se lavó con 10 mL de PBS 1X, y los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3* se eluyeron con 20 mL de ácido acético 0.1 M, recolectándose en fracciones de 1 mL. La concentración de proteínas se determinó en cada fracción mediante espectrofotometría UV a 280 nm. Las fracciones con la mayor concentración de proteínas se mezclaron (IgG anti-*EhLC3*).

Los anticuerpos purificados se concentraron hasta un volumen final de 2 mL (en solución de Tris-HCl 20mM, pH 8.0) por el método de ultra-filtración (por centrifugación) (Anexo 4). El título de los anticuerpos purificados y concentrados se determinó por el método de ELISA indirecto.

V.9. Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3*

V.9.1. Evaluación de la especificidad contra el antígeno recombinante

Separación de proteínas mediante SDS-PAGE. Se realizaron diluciones seriadas a partir de 3.9 µg/µL de *EhLC3r* (Tabla 3), y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 12%, Anexo 1).

Electrotransferencia de proteínas. Las proteínas previamente separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, usando el procedimiento descrito para la cámara de transferencia Criterion™ Blotter (Bio-Rad), durante 30 min a 100 volts. Enseguida, la membrana de nitrocelulosa se colocó en solución amortiguadora de bloqueo (leche Svelty de Nestle® 5%; NaCl 50mM; Tween®20 0.05%; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) y se incubó durante una noche con agitación suave y constante.

Inmunodetección. La membrana se lavó previamente con solución TBS-T (NaCl 50 mM; Tween®20 0.05%; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0), realizando 3 lavados de 10 min cada uno. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario, Anti-*Eh*LC3 (1:5000), y se dejó en incubación por rotación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con TBS-T (como se describió previamente), se añadió el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina (1:5000), y se dejó incubar por rotación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados con TBST (como se describió previamente) y el inmunoreconocimiento se reveló usando el sustrato para fosfatasa alcalina: AP-Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad), hasta la aparición de las bandas correspondientes. Después del revelado, la membrana se digitalizó (con la asistencia de un escáner) y se realizó un análisis de la densidad digital de las bandas utilizando el programa

Tabla 3. Diluciones de los anticuerpos anti- <i>Eh</i> LC3 utilizadas para la evaluación de su especificidad contra el antígeno recombinante.	
Carril	ug/mL
1	3900.0
2	1950.0
3	975.0
4	487.5
5	243.75
6	121.88
7	60.94
8	30.47
9	15.23
10	7.62
11	3.81
12	1.90
13	0.95
14	0.48

(de libre acceso) ImageJ® 1.43u para Mac (NIH).

V.9.2. Evaluación de la especificidad de anti-EhLC3 contra el antígeno recombinante en condiciones de competencia

Separación de proteínas mediante SDS-PAGE. Por medio del análisis densitométrico anterior se determinó la cantidad ideal de cargado para la proteína EhLC3 para este ensayo (0.55 µg). La proteína EhLC3r fue separada mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 12%, Anexo 1).

Electrotransferencia de proteínas. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, usando el procedimiento descrito para la cámara de transferencia Criterion™ Blotter (Bio-Rad), durante 30 min a 100 volts. Enseguida, la membrana de nitrocelulosa fue colocada en solución amortiguadora de bloqueo (leche Svelty de Nestle® 5%; NaCl 50mM; Tween®20 0.05%; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0) e incubada a temperatura ambiente durante la noche con agitación suave y constante.

Inmunodetección. La membrana bloqueada se lavó con solución TBS-T (NaCl 50 mM; Tween®20 0.05%; Tris-HCl 100 mM, pH 8.0), realizando 3 lavados de 10 min cada uno. El procedimiento de inmunodetección se realizó siguiendo las condiciones y controles descritos en la Tabla 4.

Los anticuerpos se utilizaron a las siguientes diluciones: Ac monoclonal anti-poli-histidina 1:5,000; Ac policlonal mono-específico anti-Ehp29 1:5,000. Para el ensayo de competencia, EhLC3: Anti-EhLC3 (1:100), la mezcla de Acs y y Ags fue

Tabla 4. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonaes mono-específicos anti-EhLC3 contra antígeno recombinante.					
Reconocimiento		Membrana			
		1	2	3	4
Primario	EhLC3:pAb-(anti)-EhLC3 (1:100)*	X			
	pAb-(anti)-EhLC3		X		
	mAb-(anti)-poli-histidina			X	
	Sin anticuerpo primario				X
Secundario	pAb-(anti)-IgG(conejo) acoplado a FA	X	X		X
	pAb-(anti)-IgG(ratón) acoplado a FA			X	

*Pre-incubación durante 1 hora; pAb, anticuerpo policlonal; mAb, anticuerpo monoclonal; FA: Fosfatasa alcalina

pre-incubada a 37°C durante 1 h. En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en solución TBS-T, se añadieron a la membrana y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con TBS-T (con 10 mL c/u), los anticuerpos para reconocimiento secundario se diluyeron 1:5,000 en TBS-T, se añadieron a la membrana y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizaron tres lavados con TBST (con 10 mL c/u) y el inmuno-reconocimiento se reveló usando el sustrato para fosfatasa alcalina, AP-Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad), hasta la aparición de las bandas correspondientes.

V.9.3. Evaluación de la especificidad contra antígeno nativo

Extracción de proteínas totales de E. histolytica. Se cosecharon los trofozoitos de dos tubos con crecimiento confluyente de *E. histolytica*. Brevemente, se decantó todo el medio de cultivo, sin agitar previamente para evitar que los trofozoitos se separen de la pared del tubo, se añadieron 5ml de medio de cultivo fresco de amibas a cada tubo y se colocaron sobre hielo durante 10 min para despegar a los trofozoitos de la superficie, agitando cada 2 minutos por inversión; los trofozoitos despegados se resuspendieron y transfirieron un tubo cónico estéril de 50 mL. Los trofozoitos suspendidos se separaron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 min a 10 °C, y se lavaron con solución DPBS 1X estéril. Una vez suspendidos en DPBS 1X, se cuantificó el número de trofozoitos con la ayuda de un hemocitómetro. Los trofozoitos se resuspendieron a una concentración final de 2000 células/ μ L en DPBS 1X estéril (suplementado con E-64 100 μ M, Tritón X-100 1% y cóctel de inhibidores de proteasas 1X [Roche]). La lisis celular se realizó mediante agitación mecánica con un vórtex y 3 ciclos de congelación/descongelación. Finalmente, se añadió al lisado celular un volumen igual de SB 2X, se hirvió a 90°C y se procesó inmediatamente para realizar ensayos de Western Blot.

Separación, electrotransferencia de proteínas amibianas e inmunodetección. Diferentes cantidades de los extractos amibianos proteicos totales (equivalentes al número de trofozoitos, Tabla 5) se separaron mediante SDS-PAGE (Anexo 1). La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizó como se ha descrito previamente (sección IV.9.1).

Obtención de extractos proteicos de diferentes regiones sub-celulares de trofozoitos de E. histolytica. Se realizó el procedimiento descrito anteriormente (Sección IV.9.3.1), con las modificaciones descritas a continuación: después de las 3 series de congelamiento y descongelamiento, los extractos amibianos proteicos sub-celulares se obtuvieron mediante centrifugación durante 30 min a 14,500 rpm.

El sobrenadante (fracción soluble) se separó cuidadosamente y el sobrenadante (fracción membranosa) se resuspendió con Urea 8M y se procesó de inmediato para realizar ensayos de ELISA y Western Blot.

Separación, electrotransferencia de proteínas amibianas e inmunodetección. Se cargó el equivalente a 30,000 células de cada fracción (extracto total, extracto soluble y fracción membranosa), y se separaron mediante SDS-PAGE (Anexo 1). La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizó como se ha descrito previamente (sección IV.9.1).

Extracción de fracciones proteicas membranosas de E. histolytica. Para el reconocimiento del extracto membranoso, se procedió a realizar el procedimiento anteriormente descrito (sección IV.9.3.1), esta vez solo se tomaron alícuotas diferentes del extracto membranoso (equivalentes al número de trofozoitos, Tabla 6), y se separaron mediante SDS-PAGE (Anexo 1).

Tabla 5. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales monoespecíficos anti- <i>Eh</i> LC3 contra antígeno nativo.	
Carril	No. de células de <i>E. histolytica</i>
1	60,000
2	50,000
3	40,000
4	30,000
5	20,000
6	15,000
7	10,000

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizó como se ha descrito previamente (sección IV.9.1), con una adaptación en el reconocimiento primario: el anticuerpo policlonal mono-específico anti-*Eh*LC3 se utilizó a una dilución de 1:1000.

Tabla 6. Condiciones de reconocimiento para la caracterización de los anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-EhLC3 contra el antígeno nativo en proteínas membranosas de trofozoitos de *E. histolytica*.

Carril	No de células de <i>E. histolytica</i>
1	20,000
2	40,000
3	60,000
4	80,000
5	100,000
6	120,000
7	140,000

Análisis densitométrico. Después del revelado, la membrana fue digitalizada (con la asistencia de un escáner) y se realizó un análisis de la densidad digital de las bandas utilizando el programa (de libre acceso) ImageJ® 1.43u para Mac (NIH).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI.1. Transformación bacteriana con pQE30EhLC3

Una vez identificado el fragmento de aprox. 1128 pb (electroforesis en gel de agarosa al 1%) correspondiente a *EhLC3*, se procedió a clonarlo en el plásmido de expresión bacteriana pQE30. Se transformaron células competentes de *E. coli* ER2738 con pQE30*EhLC3* mediante choque térmico. Se analizó ADN plasmídico de colonias transfectantes aisladas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Como se muestra en la Figura 2, se analizó un total de 6 colonias transfectantes, todas ellas mostraron una banda de ADN similar al número de pares de bases esperado para pQE30*EhLC3* (4.54 kb).

VI.2. Expresión y purificación de *EhLC3* recombinante

La expresión de la proteína recombinante *EhLC3* se indujo en *E. coli* (ER2738) transfectada con el plásmido pQE30*EhLC3* usando como inductor a isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, un análogo no metabolizable de la galactosa). Las células fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes (con cloruro de guanidinio 4 M) y por sonicación.

Posteriormente, la proteína *EhLC3* recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad a metales usando una columna de níquel-agarosa, ya

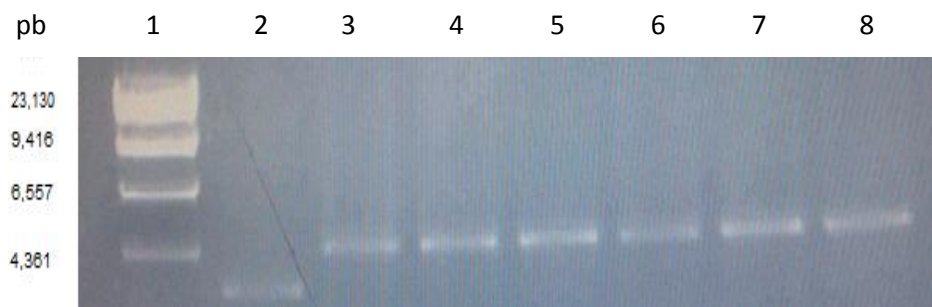


Figura 2. Análisis de la transformación de células competentes de *E. coli* ER2738 con pQE30*EhLC3*.

Carriles: 1, Marcadores de peso molecular; 2, ADN del plásmido pQE30 (3.46 kb); 3-8, ADN plasmídico aislado de colonias transfectantes.

que la proteína recombinante se expresó con un hexámero de histidinas en el extremo amino-terminal (el cual forma un enlace de coordinación con el Ni^{+2}).

La Figura 3 muestra el patrón de movilidad electroforética de las fracciones cromatográficas separadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% (previamente las muestras se precipitaron con metanol para eliminar el cloruro de guanidinio 4 M). Como se puede observar, la proteína purificada presenta un peso molecular de aprox. 44 kDa (fracciones E1-E3) correspondiente al peso molecular esperado. A partir de las fracciones de mayor concentración proteica, se obtuvo una mezcla cuya concentración final fue de 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

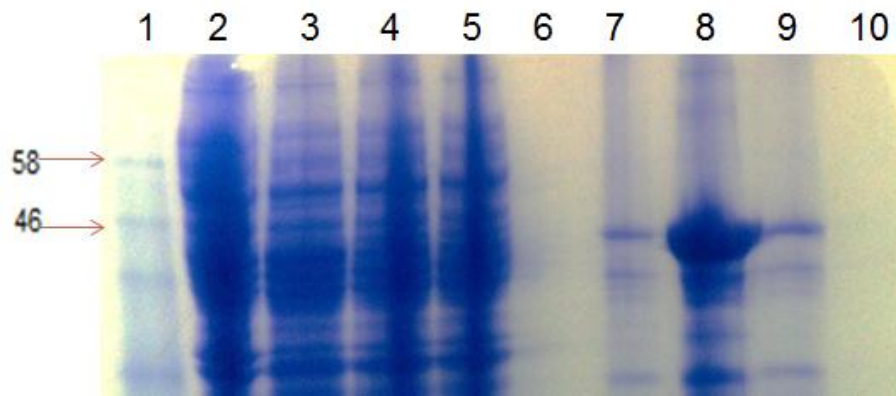


Figura 3. Separación electroforética (SDS-PAGE 12%) de las fracciones obtenidas de la purificación de *EhLC3* mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Carriles: 1, Marcadores de peso molecular; 2, Lisado bacteriano total; 3, Lisado clarificado; 4, Fracción no pegada; 5, Lavado 1; 6, Lavado 2; 7-10, Fracciones de Elución (1-4).

VI.3. Obtención y titulación de suero hiper-inmune anti-*EhLC3r*

El suero hiper-inmune anti-*EhLC3r* fue obtenido de dos conejos que fueron inmunizados durante 9 meses con la proteína recombinante, siguiendo el protocolo descrito en la sección IV.6.1. La respuesta inmunológica fue valorada mediante la determinación del título de anticuerpos, el cual se determinó mediante ensayos de ELISA cada 2-4 semanas.

La Figura 4 indica una tendencia ascendente del título de anticuerpos, obteniéndose un valor máximo a partir de la muestra 8 (Sangría 8) y manteniéndose relativamente constante durante todo el periodo de inmunización. Este fenómeno fue valorado como positivo para los objetivos del proyecto, ya que la afinidad de los anticuerpos madura conforme el sistema inmunológico es retado con un antígeno por un periodo prolongado de tiempo [100].

VI.4. Purificación de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3*

Los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3r* fueron purificados mediante una estrategia que constó de tres cromatografías de afinidad secuenciales. La primera cromatografía se realizó con una resina acoplada a proteínas de *E. coli*, descartando todos aquellos anticuerpos que se pudieron haber generado contra proteínas bacterianas. La segunda cromatografía se realizó con una resina acoplada a la proteína A de *S. aureus*, permitiendo la separación de inmunoglobulinas de la clase IgG (ya que la proteína A presenta una fuerte afinidad por las regiones Fc de ésta clase de inmunoglobulinas). La tercera y última cromatografía se realizó con una resina acoplada a la proteína *EhLC3* recombinante, obteniendo así sólo la fracción de inmunoglobulinas IgG con

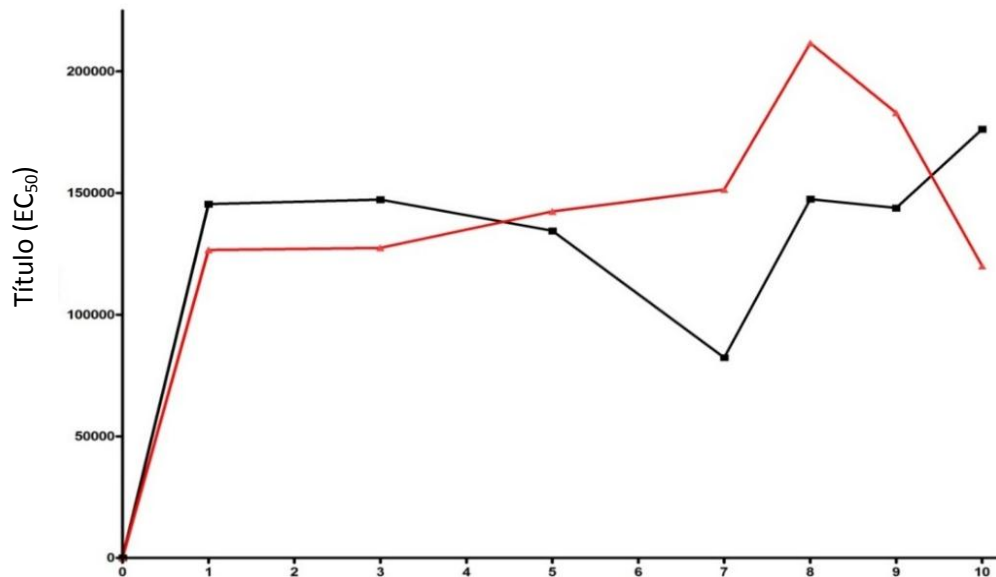


Figura 4. Producción de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3*.

Tendencia (en dos conejos) del título de anticuerpos anti-*EhLC3* durante el periodo de inmunización (las muestras se indican en número).

afinidad específica contra la proteína recombinante. A partir de 12 mL de suero hiper-inmune, se obtuvieron 0.213 mg/mL de anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3r* purificados (concentrados a un volumen aproximado de 2 mL por ultra-filtración).

VI.5. Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3*

Para evaluar la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3r* purificados se realizaron inmunoensayos (tipo *western blot*) contra antígeno recombinante. Se realizaron diluciones de la proteína *EhLC3r* en Log de 2 partiendo de una concentración de 3.9 µg/mL (Tabla 2).

La Figura 5A muestra el resultado del reconocimiento molecular de antígeno inmovilizado, es evidente la presencia banda de ~44 KDa, correspondiente al peso molecular esperado para *EhLC3r*. Como se puede observar, la intensidad del reconocimiento disminuye conforme disminuye la cantidad de la proteína *EhLC3r*. Se realizó un análisis densitométrico con el programa Image J para obtener el número de pixeles presentes en cada banda, el límite de detección calculado de manera visual fue de 60ng de proteína *EhLC3r* reconocida por anticuerpos Anti-*EhLC3r* (Figura 5B). Se obtuvo un EC50 de 0.55µg.

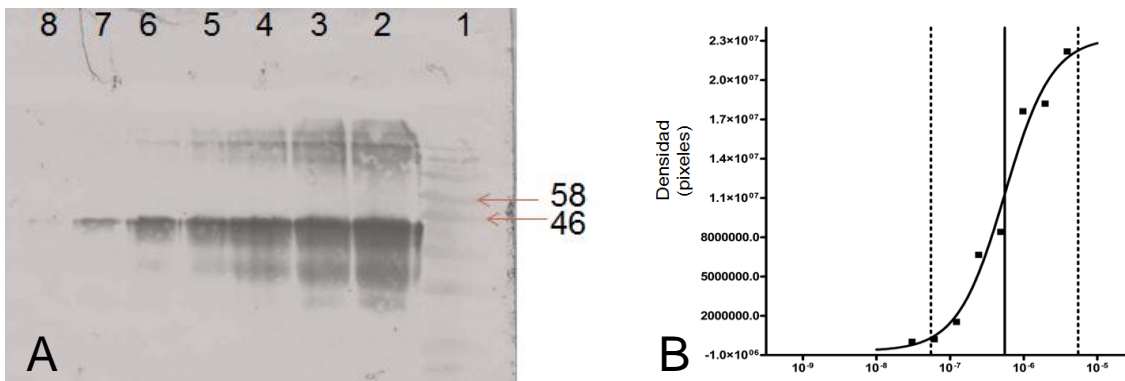


Figura 5. Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-*EhLC3* contra el antígeno recombinante.

(A) Membrana de nitrocelulosa que muestra el reconocimiento específico de *EhLC3* a concentraciones decrecientes en log de 2. (B) Determinación de los límites de detección de antígeno recombinante mediante un análisis densitométrico.

Además, un ensayo de competencia a una relación de concentración de 1:100 (anticuerpo: antígeno), Figura 6, donde se esperaba saturar al anticuerpo con el

antígeno, se observó una disminución de la reactividad de ~80% (Estimado visualmente). Lo anterior sugiere que no se bloquearon completamente todos los sitios de unión a antígeno, debido posiblemente a que existe una mezcla heterogénea de anticuerpos (con una gama diversa de afinidades), y es probable que aquellos de menor afinidad, aunque se encuentren interaccionando con una molécula antígeno (En la fase solida o soluble), siempre podrán separarse fácilmente y unirse a otra molécula de antígeno (u otro epítipo) [99].

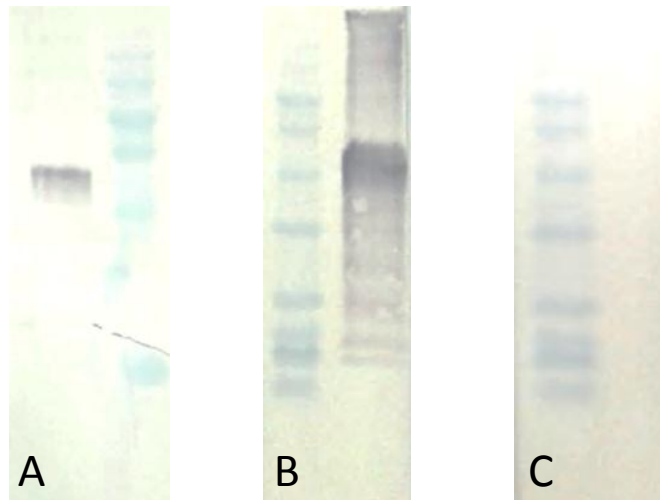


Figura 6. Análisis de la especificidad de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3 contra antígeno recombinante en condiciones de competencia.

(A) EhLC3:anti-EhLC3 (1:100), pre-incubación por 1 hora. (B) anti-EhLC3 (Dilución 1:100). (C) Sin anticuerpo primario.

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-EhLC3 de reconocer al antígeno nativo, se realizó un ensayo de inmunodetección de extractos totales de trofozoitos de *E. histolytica*, se observó reactividad inmunológica con una banda cercana a 170 kDa, peso molecular de la subunidad pesada de la lectina de unión Gal/NAcGal, que es donde se encuentra el fragmento LC3 [33], correspondiente a nuestra proteína EhLC3r.

Como se observa en la Figura 7A, la intensidad de la banda disminuyó en correlación con la concentración celular de *E. histolytica* (Figura 7A, carriles 2– 8) y fue posible detectar al antígeno nativo presente en un mínimo de 15,000 trofozoitos.

También se realizó el análisis por separado de los extractos de fracciones sub-celulares de trofozoitos de *E. histolytica*, Figura 7B, detectándose la banda correspondiente a la subunidad pesada de 170 kDa en todas las fracciones (extracto total, soluble y membranoso), este resultado se puede explicar por el tráfico vesicular de proteínas a la membrana celular (citoplásmica).

Además, en la Figura 8, se muestra la caracterización de fracción membranosa (donde se encuentra expuesta la lectina de interés), se realizaron diluciones de 20,000 a 140,000 trofozoitos (Figura 8A) y se realizó un análisis densitométrico

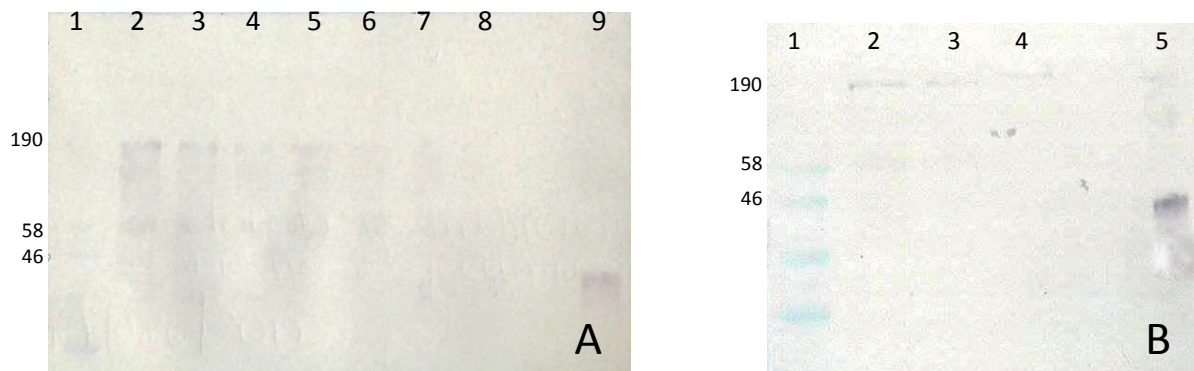


Figura 7. Caracterización de los anticuerpos policlonales mono-específicos anti-EhLC3 contra el antígeno nativo.

(A) Reconocimiento en extractos totales celulares: 1, Marcadores de peso molecular; 2, 60,000 trofozoitos; 3, 50,000 trofozoitos; 4, 40,000 trofozoitos; 5, 30,000 trofozoitos; 6, 20,000 trofozoitos; 7, 15,000 trofozoitos; 8, 10,000 trofozoitos; 9, control positivo (0.25 µg *EhLC3*). (B) 1, Marcadores de peso molecular; 2, Extracto total 30,000 trofozoitos; 3, Extracto soluble 30,000 trofozoitos; 4, Extracto membranoso 30,000 trofozoitos ; 5, Control positivo (0.25 µg *EhLC3*).

(programa ImageJ) de las bandas correspondientes para determinar el límite de detección (Figura 8B). Como se puede observar en la figura 8A la banda observada corresponde al peso esperado de ~170kDa y la intensidad de esta

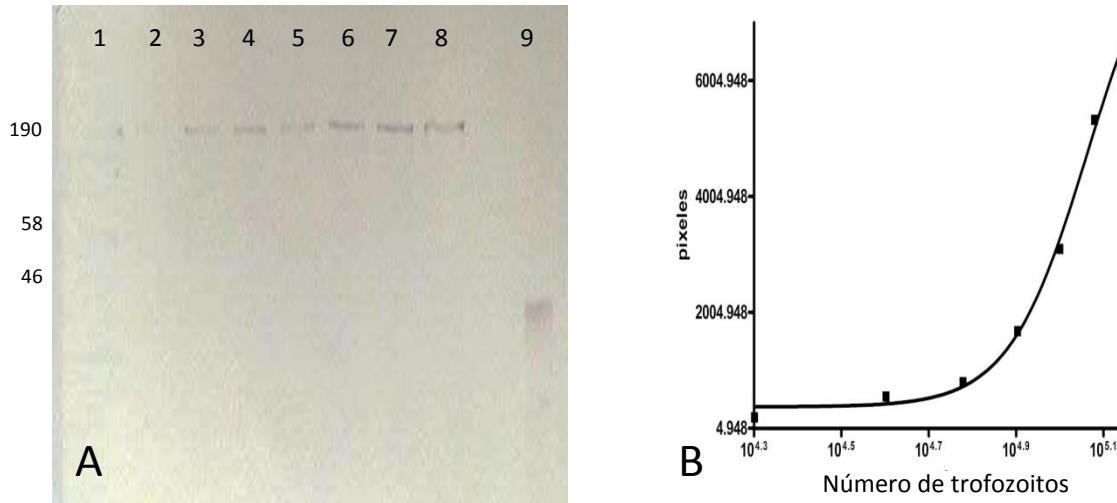


Figura 8. Caracterización de los anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-EhLC3 contra antígeno nativo presente en fracción membranosa.

(A) 1, Marcadores de peso molecular; 2, Fracción membranosa de 20,000 trofozoitos; 3, Fracción membranosa de 40,000 trofozoitos; 4, Fracción membranosa de 60,000 trofozoitos; 5, Fracción membranosa de 80,000 trofozoitos; 6, Fracción membranosa de 100,000 trofozoitos; 7, Fracción membranosa de 120,000 trofozoitos; 8, Fracción membranosa de 140,000 trofozoitos; 9, Control positivo (EhLC3 0.25 µg). (B) Análisis densitométrico .

aumenta conforme aumenta el número de trofozoitos analizados. Los Acs anti-EhLC3 reconocen al antígeno nativo.

En la Figura 8B se encontró una EC50 de 115,654 trofozoitos pero este valor está sobre estimado ya que no se llegó al punto de saturación, debido a esto no pudimos obtener el límite de detección.

VII. CONCLUSIONES

La proteína *EhLC3r* recombinante fue purificada favorablemente a partir de extractos bacterianos mediante un protocolo estándar de cromatografía de afinidad a níquel. Los anticuerpos policlonales *anti-EhLC3* fueron producidos satisfactoriamente en un modelo animal mediante un esquema de inmunización típico. Los anticuerpos policlonales (de clase IgG) mono-específicos *anti-EhLC3* fueron purificados exitosamente mediante un esquema secuencial de tres procedimientos cromatograficos de afinidad. Los anticuerpos *anti-EhLC3* obtenidos en conejo, reconocen la proteína recombinante (*EhLC3r*). Los anticuerpos *anti-EhLC3* obtenidos en conejo, reconocen la subunidad pesada de la lectina de unión a Gal/NacGal (170 kDa) de *Entamoeba histolytica* presentes en la fracción membranosa de la amiba (y en otras fracciones celulares). Los anticuerpos obtenidos en este trabajo, pueden tener diversas aplicaciones, como son: diagnóstico clínico de *Entamoeba histolytica* y otras aplicaciones biotecnológicas novedosas (acoplamiento a nanoparticulas). El fragmento *EhLC3r* tendría por sí mismo aplicaciones biotecnológicas como su uso para Kits de diagnóstico y posibles vacunas contra la amibiasis.

VIII. REFERENCIAS

1. Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L, López-Vancell R. (2015) *Entamoeba histolytica*: Adhesins and Lectins in the Trophozoite Surface. *Molecules*, 20, 2802-2815.
2. Chacín-Bonilla L. (2010). Amibiasis: Implicaciones del reconocimiento de *Entamoeba dispar* e identificación de *Entamoeba moshkovskii* en humanos. *Invest Clin* 51(2): 239 – 256.
3. World Health Organization. Amoebiasis. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 1997, 72, 97–100.
4. Chacín-Bonilla L. (2013). Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Rev Med Chile*; 141: 609-615.
5. Costa CA, Brito KN, Gómes MA, Caliarí MV. (2010). Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. *Eur J Histochem*; 54 (e39): 170-4.
6. Clark CG, Diamond LS. (1991). The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol*; 46:11-18.
7. Koushik D and Sandipan G. (2014). Evolutionary genomics and population structure of *Entamoeba histolytica*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 12: 26–33.
8. Diamond LS, Clark CG. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40:340–4.
9. Mondal D, Petri WA Jr, Sack RB, Kirkpatrick BD, Haque R.(2006). *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 100:1032–1038.
10. SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos (2013). <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>
11. Ximénez C, Moran P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, Genetics and Evolution*. 9: 1023–1032.
12. <http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>.
13. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. (1986). *Parasitología Clínica*. Editores Salvat, Barcelona, España. 882 pp.
14. Tanyuksel M, Petri WA Jr. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (4): 713-9.

15. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. (2007). Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev; 20 (3): 511-32.
16. Salles JM, Moraes LA, Salles MC. Hepatic amebiasis. (2003). Braz J Infect Dis; 7 (2): 96-110.
17. Que X and Reed S. (2000). Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. Clinical Microbiology Reviews. 196–206.
18. Udezulu IA, and Leitch GJ. (1987). A membrane-associated neuraminidase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect. Immun. 55:181–186.
19. Werries E, Nebinger P, and Franz A. (1983). Degradation of biogenic oligosaccharides by beta-N-acetyl-glucosaminidase secreted by *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 7:127–140
20. Muñoz ML, Moreno MA, Pérez-García JN, Tovar GR, Hernández VI. (1991). Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules containing collagenase. Mol. Microbiol. 5:1707–1714.
21. Yadava N, Chandok MR, Prasad J, Bhattacharya S, Sopory SK, and Bhattacharya A. (1997). Characterization of EhCaBP, a calcium binding protein of *Entamoeba histolytica* and its binding proteins. Mol. Biochem. Parasitol. 84:69–82.
22. Pillai R, and Kain KC. (2000). Recent developments in amoebiasis: the Gal/GalNAc lectins of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Microbes Infect. 2:1775–1783.
23. McCoy JJ, Mann BJ, and Petri WA, Jr. (1994). Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*, or how lectins let parasites stick around. Infect. Immun. 62:3045–3050.
24. Petri WA Jr, Snodgrass TL, Jackson TF, Gathiram V, Simjee AE, Chadee K, and Chapman MD. (1990). Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. J. Immunol. 144:4803–4809.
25. Saffer LD, and Petri WA Jr. (1991). Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. Infect. Immun. 59:4681–4683.
26. Petri WA Jr, Chapman MD, Snodgrass T, Mann BJ, Broman J and Ravdin JI. 1989. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-Dgalactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 264:3007–3012.
27. Petri WA Jr, Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF, and Ravdin JI. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Investig. 80:1238–1244.
28. Ramakrishnan G, Ragland BD, Purdy JE, and Mann BJ. 1996. Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Mol. Microbiol. 19:91–100.

29. McCoy JJ, Mann BJ, Vedvick TS, and Petri WA Jr. (1993). Sequence analysis of genes encoding the light subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61:325–328
30. Ramakrishnan G, Ragland BD, Purdy JE, and Mann BJ. (1996). Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 19:91–100
31. Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, and Mandell GL. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Infect. Dis.* 143:83–93.
32. Salata RA, and Ravdin JI. 1986. The interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. *J. Infect. Dis.* 154:19–26.
33. Abd Alla MD, Jackson TFGH, Soong GC, Mazanec M and Ravdin JI.(2004). Identification of the *Entamoeba histolytica* Galactose-Inhibitible Lectin Epitopes Recognized by Human Immunoglobulin A Antibodies following Cure of Amebic Liver Abscess. *Infect. Immun.* July: 3974–3980.
34. Dodson JM, Clark CG, Lockhart LA, *et al.* (1997). Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol. Int.* 46:225–235
35. Mann BJ, Chung CY, Dodson JM, Ashley LS, Braga LL, and Snodgrass TL. (1993). Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesion map to the cysteine-rich extracellular domain of the 170-kilodalton subunit. *Infect. Immun.* 61:1772–1778
36. Pillai DR, Wan WSK, Yau YCW, Ravdin JI, and Kain KC. (1999). The cysteine-rich region of the *Entamoeba histolytica* adherence lectin (170- kilodalton subunit) is sufficient for high-affinity Gal/GalNAc-specific binding *in vitro*. *Infect. Immun.* 67:3836–3841
37. Beving DE, Soong CJ, and Ravdin JI. (1996). Oral immunization with a recombinant cysteine-rich section of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitible lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has *in vitro* adherence inhibition activity. *Infect. Immun.* 64:1473–1476.
38. Abd-Alla MD, and Ravdin JI. (2002). Diagnosis of amebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute amebic diarrhea in Cairo, Egypt. *Trop. Med. Intern. Health* 7:365–370.
39. Ravdin JI, Jackson TFGH, Petri WA, *et al.* (1990). Association of serum anti-adherence lectin antibodies with invasive amebiasis and asymptomatic pathogenic *Entamoeba histolytica* infection. *J. Infect. Dis.* 162:768–772.
40. Ravdin JI, Abd-Alla MD, Welles SL, Reddy S, and Jackson TFGH. (2003). Intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infect. Immun.* 71:6899–6905.

41. Abou-E-Magd I, Soong CJ, El-Hawey AM, and Ravdin JI. (1996). Humoral and mucosal IgA antibody response to a recombinant 52-kDa cysteine-rich portion of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin correlates with detection of native 170-kDa lectin antigen in serum of patients with amebic colitis. *J. Infect. Dis.* 174:157–162
42. Tanyuksel M and Petri WA Jr. Laboratory Diagnosis of Amebiasis.(2003) *Clinical Microbiology Reviews.* 713–729
43. Trissl D, Martínez-Palomo A, de la Torre M, de la Hoz R, Pérez de Suarez E. (1978). Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* 148:1137–1145.
44. González-Ruiz A, Haque R, Aguirre A, Castañón G, Hall A, Guhl F, Ruiz-Palacios G, Miles MA, and Warhurst DC. (1994). Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Pathol.* 47:236–239.
45. Haque RL, Neville M, Hahn P, and Petri WA Jr. (1995). Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J. Clin. Microbiol.* 33:2558–2561.
46. Proctor EM. (1991). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin. Lab. Med.* 11:829–859.
47. Garcia LS. (1990). Laboratory methods for diagnosis of parasitic infections, p. 776–861. In E. J. Baron, L. R. Peterson, and S. M. Finegold (ed.), *Bailey's & Scott's diagnostic microbiology*. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo.
48. Healy GR. (1988). Diagnostic techniques for stool samples, p. 635–649. In J. I. Ravdin (ed.), *Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
49. Robinson GL. (1968). The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:285–294.
50. Diamond LS. (1982). A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. *J. Parasitol.* 68:958–959.
51. Diamond LS, Harlow DR, and 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.
52. Sehgal R, Abd-Alla M, Moody AH, Chiodini PL, and Ackers JP. (1995). Comparison of two media for the isolation and short-term culture of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:394.
53. Clark CG, and Diamond LS. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:329–341.
54. Ardic N, Tanyuksel M, Doganci L, and Gun H. (1998). Evaluation of zymodemes of pathogen and non-pathogen *Entamoeba histolytica*. *Flora* 3:125-133.

55. Gathiram V, and Jackson TF. (1990). Pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* remain unchanged throughout their life-cycle. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:806–807.
56. Haque R, Hall A and Tzipori S. (1990). Zymodemes of *Entamoeba histolytica* in Dhaka, Bangladesh. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84:629–632
57. Sargeaunt PG. (1987). The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. *Parasitol. Today* 3:40–43.
58. Blanc D, Nicholls RP, P., and Sargeaunt G. (1989). Experimental production of new zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:787–790.
59. Sargeaunt PG. (1985). Zymodemes expressing possible genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:86–89.
60. Blanck D, Sargeaunt PG. (1991) *Entamoeba histolytica* zymodemes: exhibition of gamma and delta bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase may be influenced by starch content in the medium. *Exp. Parasitol.* 72: 87-90
61. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, Anselmi M, Corrales J, Moreira J, Montalvo G, Bruno A, Mascrati R, Bisoffi Z, and Scaglia M. (2002). Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 123-127.
62. Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, Kobayashi S, Takeuchi T. (1997). Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 83: 96-98.
63. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. (1997) Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2405-2407.
64. Furrows SJ, Moody AH and Chiodini PL. (2004). Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Pathol.* 57: 264-266.
65. Zebardast N, Haghghi A, Yeganeh F, Javad S, Tabaei S, Gharavi MJ, Shirzad F, Lasjerdi Z, Salehi N, Taghipour N, Kohansal C, Naderi F. Application of Multiplex PCR for Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii*. (2014). *Iranian J Parasitol: Vol. 9, No. 4, pp.466-473.*
65. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Rehman T, Aguirre A, Hall A, Guhl F, Warhurst DC, and Miles MA. (1994). Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 32: 964-970.

66. Garcia, LS, Shimizu RY, and Bernard CN. (2000). Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the Triage parasite panel enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3337-3340.
67. Pillai DR and Kain KC. (1999). Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* and *Giardia lamblia* coproantigen. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3017–3019.
68. Jelinek T, Peyerl G, Loscher T, and Nothdurft HD. (1996). Evaluation of an antigen-capture enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:752–755.
69. Petri WA Jr, and Singh U. (1999). Diagnosis and management of amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 29:1117–1125.
70. Mirelman D., Nuchamowitz Y, and Stolarsky T. (1997). Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J. Clin. Microbiol.* 35:2405–2407.
71. Abd-Alla MD, Jackson TF, Reddy S, and Ravdin JI. (2000). Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 38:2344–2347.
72. Wonsit R, Thammapalerd N, Tharavanij S, Radomyos P, and Bunnag D. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in faecal specimens. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:166–169.
73. Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lyerly DM, and Petri WA Jr. (1997). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 175:734–736.
74. Hughes MA, and Petri WA. 2000. Amebic liver abscess. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14:565–582.
75. Caballero-Salcedo AM, Viveros-Rogel B, Salvatierra R, Tapia-Conyer J, Sepulveda-Amor G, Gutiérrez, and Ortiz-Ortiz L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50:412–419.
76. Haque R, Ali IKM, Akther S, and Petri WA Jr. (1998). Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Microbiol.* 36:449–452.
77. Cummins AJ, Moody AH, Lalloo K, and Chiodini PL. (1994). Rapid latex agglutination test for extraluminal amoebiasis. *J. Clin. Pathol.* 47:647– 648.
78. Van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, Gilis H, Peek R, Wetsteyn J, Van Genderen JJP, Vervoort T, Van Gool T.(2005) Use of Rapid Dipstick and Latex Agglutination Tests and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis

of Amebic Liver Abscess, Amebic Colitis, and *Entamoeba histolytica* Cyst Passage. J. Clin. Microbiol. 43: 4801-4806.

79. Bapat M and Bhawe GG. (1990). Counterimmunoelectrophoresis in the immunodiagnosis of amoebiasis. J. Postgrad. Med. 36:124–127.

80. Krupp IM. (1974). Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amoebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:27–30.

81. Parija SC, Jharna Mandal, and Ponnambath DK. (2014) Laboratory methods of identification of *Entamoeba histolytica* and its differentiation from look-alike *Entamoeba* spp. Trop Parasitol. 4(2): 90–95.

82. Blessmann J, Buss H, Nu PA, B. T. BT, Ngo QT, Van AL, Alla MD, Jackson TF, Ravdin JI, and Tannich E. (2002). Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. J. Clin. Microbiol. 40:4413–4417.

83. Jackson TF, Anderson CB, and Simjee AE. 1984. Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78:342–345.

84. Knobloch J, and Mannweiler E. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:727–732.

85. Lotter H., Mannweiler E, and Tannich E. (1993). Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement-fixation and enzyme linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of invasive amoebiasis. Trop. Med. Parasitol. 44:277–280.

86. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, and Shimizu RY. (1982). Comparison of indirect fluorescent-antibody amoebic serology with counterimmunoelectrophoresis and indirect hemagglutination amoebic serologies. J. Clin. Microbiol. 15:603–605.

87. Lotter H, Jackson TFHG, and Tannich E. (1995). Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amoebiasis. Trop. Med. Parasitol. 46:180–182.

88. Restrepo MI, Restrepo Z, Villareal CLE, Aguirre A, and Restrepo M. (1996). Diagnostic tests for amoebic liver abscess: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and counterimmunoelectrophoresis (CIE). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 29:27–32.

89. Sanchez-Guillén MC, Velázquez-Rojas M, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado, Fuentes-Pérez R, Martínez-Munguía J, Talamás-Rohana P.(2000) Seroprevalence of Anti-*Entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assay in blood donors from Puebla, México. Arch. Med. Res. 31: S53-S54.

90. Wang Z, Vora GJ, and Stenger DA. (2004). Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. J. Clin. Microbiol. 42:3262– 3271.

91. Shah PH, MacFarlane RC, Bhattacharya D, Matese JC, Demeter J, Stroup SE, and Singh U.(2005). Comparative genomic hybridizations of *Entamoeba* strains reveal unique genetic fingerprints that correlate with virulence. *Eukaryot. Cell* 4:504–515.
92. Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, *et al.* (2013). Subtype determination of *Blastocystis* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33: 529–536. PMID: 24078024.
93. Cassagne C, Pralong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand AC, *et al.* (2014). Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 20(6): 551–557. doi: 10.1111/1469-0691.12387 PMID: 24165542
94. Calderaro A, Piergianni M, Buttrini M, Montecchini S, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Chezzi C, Arcangeletti MC, Medici MC, De Conto F. (2015). MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *PLoS ONE* 10(4): e0122448 doi:10.1371/journal.pone.0122448
95. Rossi LM, Shi L, Rosenzweig N, Rosenzweig Z, (2006). Fluorescent silica nanospheres for digital counting bioassay of the breast cancer marker HER2/nue. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1900–1906
96. Salata O, (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnol.* 2, 3.
97. Hemadi A, Ekrami A, Oormazdi H, Meamar AR, Akhlaghi L, Samarbaaf-Zadehc AR, Elham Razmjoua.(2015) Bioconjugated fluorescent silica nanoparticles for the rapid detection of *Entamoeba histolytica*. *Acta Tropica* 145: 26–30.
98. Stöber W, Fink A, Bohn E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62–69.
99. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS.(2000) Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co, USA.
100. Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, Sale J, Batista FD, Williams G, Milstein C.(2000) Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355(1395): 357-60

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Precipitación metanólica.

1. Diluir la muestra (100 μ L) con cuatro volúmenes (400 μ L) de metanol absoluto frío y agitar manualmente durante 1 minuto.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 14,000 rpm. Descartar el sobrenadante.
3. Lavar la pastilla (proteínas) con cuatro volúmenes de metanol absoluto frío (400 μ L): agitación tipo vórtex durante 3 minutos.
4. Centrifugar durante 15 minutos a 14,000 rpm. Descartar el sobrenadante.
5. Remover el remanente de metanol mediante incubación a 37 °C durante varios minutos.
6. Re-disolver la pastilla en un volumen (100 μ L) de *2X SDS-PAGE loading buffer*. Desnaturalizar la muestra mediante incubación a 90 °C durante 15 minutos.
7. Separar las proteínas mediante *SDS-PAGE*.

ANEXO 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (*SDS-PAGE*) en condiciones reductoras.

Soluciones: *Solución de acrilamida* (acrilamida 30%; bis-acrilamida 0.8%); *4X Lower buffer* (Tris 1.5 M; SDS 0.4%; pH 8.8); *4X Upper buffer* (Tris 0.5 M; SDS 0.4%; pH 6.8); *10X Tank buffer* (Tris 25 mM; glicina 0.19 M; SDS 0.1%); *2X SDS-PAGE loading buffer* (glicerol 10%; SDS 2.5%; Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; 2-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0.002%). *Persulfato de amonio 25%*. *Solución de tinción con ABC* (isopropanol 25%; ácido acético 10%; azul brillante de *Coomassie R-250* 0.2%). *Solución de destinción* (isopropanol 10%; ácido acético 10%).

GEL SEPARADOR

Componentes	10%	12%
<i>4X Lower buffer (mL)</i>	1	1
<i>Solución de acrilamida (mL)</i>	1.4	1.6
<i>Agua desionizada (mL)</i>	1.6	1.4
<i>Persulfato de amonio 25% (μL)</i>	8	8
<i>TEMED (μL)</i>	8	8

GEL CONCENTRADOR

Componentes	4%
<i>4X Upper buffer (mL)</i>	0.50
<i>Solución de acrilamida (mL)</i>	0.27
<i>Agua desionizada (mL)</i>	1.23
<i>Persulfato de amonio 25% (μL)</i>	4
<i>TEMED (μL)</i>	4

1. Limpiar los vidrios con solución SDS 0.1%.
2. Mezclar los componentes para la preparación del gel separador.
3. Ensamblar el molde para el gel utilizando vidrios de 0.75 mm de espesor.
4. Agregar a la mezcla del gel separador. Inmediatamente agregar agua sobre el gel para evitar el contacto con el aire y formación de burbujas.

5. Una vez gelificado, remover el agua. Mezclar los componentes para la preparación del gel concentrador y agregar a la mezcla sobre el separador. Inmediatamente, colocar el peine correspondiente y esperar a que gelifique.
6. Remover el peine y colocar el gel en un sistema de electroforesis vertical para *SDS-PAGE*.
7. Preparar la muestra: mezclar un volumen de muestra con un volumen de *2X SDS-PAGE loading buffer*. Desnaturalizar durante 15 min a 90 °C.
8. Cargar las muestras en los pocillos del gel (10 µL). En el primer pocillo, agregar el marcador de PM como referencia (5 µL).
9. Llenar la sistema de electroforesis con el amortiguador de corrida (*Tank buffer 1X*).
10. Separar las muestras a 80 volts (inicialmente). Una vez que atravesado el gel concentrador aumentar el voltaje a 120 (constante).
11. Detener la corrida cuando el colorante (azul de bromofenol) llegue al borde del gel.
12. Remover el gel (con cuidado) y teñir con solución de tención con ABC (durante toda una noche) con agitación constante.
13. Desteñir con solución de distinción hasta identificar el patrón de separación.

ANEXO 3. Diálisis.

1. Colocar la muestra dentro de una bolsa de diálisis (MWCO = 3,500 Da, Spectra/Por® Biotech, Spectrum Laboratories, Inc.), que había sido previamente lavada e hidratada con solución de bicarbonatos (NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.5).
2. Posteriormente, colocar la bolsa dentro de un recipiente con 100 mL de solución de bicarbonatos (completamente sumergida) en agitación constante.
3. Mantener en estas condiciones durante un periodo de 24 horas. Realizar dos cambios de solución de bicarbonatos.

ANEXO 4. Concentración por ultra-filtración.

1. Lavar el tubo de ultrafiltración (Microsep™-3K, Pall Co.) con 4 mL de agua destilada. Centrifugar a 5,000 rpm durante 40 minutos.
2. Lavar con 4 mL de etanol 30% y centrifugar a 5,000 rpm durante 40 minutos.
3. Añadir 4 mL de Tris-HCl 20 mM (pH 8.0) y centrifugar a 5,000 rpm por 40 minutos (dos veces).
4. Añadir 4 mL de muestra (p. ej. anticuerpos anti-*EhLC3*) y centrifugar en las condiciones previamente mencionadas. Seguir este proceso de concentración hasta obtener un volumen final de 2 mL.
5. Llenar el tubo con Tris-HCl 20 mM (pH 8.0) para cambiar la solución, centrifugar en las condiciones previamente mencionadas y dejar la muestra en un volumen final de 2 mL.