



# Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

## "Caracterización de la actividad autoproteolítica de trofozoítos del género *Entamoeba*"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

Marcela Urania Báez-Camargo Castellanos

Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx., Noviembre de 1990





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio y con la asesoría del Dr. Rubén López Revilla, en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante la realización del trabajo, la autora fue becaria de CONACYT (61062).

Agradezco de una manera muy especial al Dr. Rubén López Revilla por el apoyo que siempre me dió, por su paciencia y sobre todo por el sinúmero de enseñanza que de alguna manera me prepararon para seguir en el camino.

Agradezco también a Adrián y Crescencio, quienes de muchas formas colaboraron para llevar a cabo este trabajo.

Quiero agradecer al Departamento de Fotografía y a la Sección de Artes Gráficas por su constante ayuda para la realización de este trabajo

También quiero agradecer a la M. en C. Martha O. Salcedo Alvarez, a la QFB Gloria Paniagua Contreras, al M. en C. Eduardo Barrera Escorcía y a la Biol. María de los Angeles Sanabria Espinosa, por la revisión de este manuscrito.

## CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMEN	xviii

### INTRODUCCION

A. Antecedentes generales.....	1
1. Amibiasis.....	1
2. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .....	2
3. Epidemiología de la amibiasis.....	2
4. Patología de la amibiasis.....	3
B. Antecedentes directos.....	4
1. Proteasas de parásitos.....	4
2. Proteasas y virulencia de <i>E. histolytica</i> .....	6
3. Cisteín-proteasas de <i>E. histolytica</i> .....	7
4. Cisteín-proteasas con actividad de gelatinasa.....	9
5. Autoproteólisis amibiana.....	9
C. Planteamiento del problema.....	13
D. Justificación del trabajo.....	14
E. Propósitos y etapas del trabajo.....	15

### MATERIALES

A. Origen de los reactivos.....	16
B. Composición y preparación de soluciones.....	16
1. Amortiguadores y soluciones para PAGE-SDS.....	17
Soluciones para los geles y los tanques de electroforesis.....	17
Solución A. Acrilamida-Bis.....	17
Solución B. Tris-HCl 3 M pH 8.8.....	17
Solución C. Tris-HCl 0.49 M pH 6.8.....	17
Solución D. SDS al 10%.....	17
Solución E. TEMED.....	17
Solución F. Persulfato de amonio (PA) al 10%.....	18
Solución G. Amortiguador de corrida 10X.....	18
Solución H. Amortiguador de corrida 1X.....	18
2. Soluciones para preparar muestras para electroforesis.....	18
Azul de bromofenol al 0.2%.....	18
Regulador de muestras (RM) 2X.....	18

pHMB 10 mM (pHMB 2X).....	19
Regulador de muestras con pHMB 5 y 10 mM (RM/pHMB).....	19
Regulador de muestras con 2-ME 143 mM (RM/ME 2X).....	19
Regulador de muestras con pHMB 5 mM/ PMSF 2 mM.....	19
3. Soluciones para ensayar la actividad proteolítica.....	19
Tris-HCl 75 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4.....	19
Tris-HCl 100 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4.....	20
Gelatina al 1%.....	20
4. Soluciones para teñir los geles.....	20
Colorante de Fairbanks.....	20
Solución desteñidora rápida.....	20
Acido Acético al 7.5%.....	20
5. Soluciones y reactivos de uso general.....	21
HCl 5 N.....	21
Glicerol al 50%.....	21
EDTA 0.2 M pH 8.....	21
Agar al 1%.....	21
6. Medios para la cosecha y lavado de amibas.....	21
TYI.....	22
C. Material biológico.....	22
1. Suero humano normal.....	22
2. Amibas.....	22

## METODOS

A. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
1. Formación de los geles.....	23
Gel separador (inferior).....	23
Gel concentrador (superior).....	25
2. Preparación del aparato de electroforesis.....	25
3. Preparación de las muestras.....	26
4. Corrida electroforética.....	26
5. Tinción de los geles.....	26
6. Fotografía de los geles teñidos.....	27
7. Secado de los geles.....	27
B. Electroforesis en geles de gelatina-SDS- poliacrilamida.....	28
1. Formación de los geles.....	28
Gel separador (superior).....	28
Gel concentrador (inferior).....	28

2. Corrida electroforética.....	28
3. Lavado, activación e incubación del gel-sustrato.....	28
C. Obtención de las muestras amibianas.....	29
1. Cosecha y lavado de amibas.....	29
2. Tratamiento de las muestras para electroforesis.....	29

## RESULTADOS

A. Estandarización del método de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.....	31
1. Polimerización de geles de SDS-poliacrilamida al 10%.....	31
2. Calibración de geles de SDS-poliacrilamida al 10%.....	32
3. Patrón electroforético de proteínas séricas humanas en geles de SDS-poliacrilamida al 10%.....	32
B. Efecto de la temperatura de almacenamiento, la ebullición, y la adición de inhibidores proteolíticos y mercaptoetanol sobre los patrones electroforéticos.....	33
1. Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	39
a. Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición.....	39
Almacenados a -196°C.....	39
Almacenados a -20°C.....	39
b. Efecto de la adición de pHMB.....	42
c. Efecto de la adición de 2-ME y de la temperatura de almacenamiento.....	42
d. Efecto de la adición de PMSF.....	47
2. Efecto de la temperatura de almacenamiento, la ebullición y la adición de inhibidores proteolíticos y mercaptoetanol sobre los patrones electroforéticos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like.....	47
a. Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición.....	50
i) Lisados de PZ e IP101.....	50
Almacenados a -196°C.....	50
Almacenados a -20°C.....	54
ii) Lisados de FIC.....	54
Almacenados a -196°C.....	54
Almacenaods a -20°C.....	57
iii) Lisados de Laredo.....	57
Almacenados a -196°C.....	57
b. Efecto de la adición de pHMB.....	57

i) Lisados de PZ e IP101.....	57
ii) Lisados de FIC.....	57
c. Efecto de la adición de 2-ME.....	63
i) Lisados de PZ e IP101.....	63
ii) Lisados de FIC y Laredo.....	63
C. Efecto de pHMB, PMSF y 2-mercaptoetanol sobre los patrones de gelatinasas amibianas en geles de sustrato.....	66
1. Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> HK9 HM1 y HM3.....	68
a. Efecto de la temperatura durante la corrida electroforética sobre los patrones de gelatinasas en los geles de sustrato.....	69
b. Disolución e incubación con o sin pHMB.....	71
i) Disolución e incubación sin pHMB.....	71
ii) Disolución e incubación con pHMB.....	71
c. Disolución con pHMB e incubación con o sin pHMB.....	71
i) Disolución con pHMB e incubación sin pHMB.....	71
ii) Disolución e incubación con pHMB.....	71
d. Disolución sin-incubación con pHMB.....	76
i) Disolución sin pHMB e incubación con pHMB.....	76
e. Disolución con o sin pHMB e incubación sin adiciones.....	79
i) Disolución sin pHMB.....	79
ii) Disolución con pHMB.....	79
f. Disolución sin adiciones e incubación con o sin pHMB.....	81
i) Incubación sin pHMB.....	81
g. Disolución con pHMB/PMSF e incubación en pHMB.....	81
h. Disolución con o sin 2-ME e incubación sin adiciones.....	85
i) Disolución sin 2-ME.....	85
ii) Disolución con 2-ME.....	85
h. Disolución con pHMB e incubación con pHMB ó DTT.....	88
i) Incubación con pHMB.....	88
ii) Incubación con DTT.....	88
i) Disolución con pHMB e incubación con pHMB ó 2-ME.....	88
i) Incubación con pHMB.....	88
ii) Incubación con 2-ME.....	88
2. Lisados de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like Laredo.....	93
a. Disolución con o sin pHMB e incubación sin adiciones.....	94
i) Disolución sin pHMB.....	94
ii) Disolución con pHMB.....	94
b. Disolución sin pHMB e incubación con o sin pHMB.....	97
i) Incubación sin pHMB.....	97

ii) Incubación con pHMB.....	97
c. Disolución con 2-ME e incubación sin adiciones.....	97
i) Disolución sin 2-ME.....	97
ii) Disolución con 2-ME.....	101

## DISCUSION

Autoproteólisis inmediata en <i>E. histolytica</i> .....	104
Efecto de inhibidores y activadores.....	104
Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la ebullición.....	106
Autoproteólisis inmediata en especies no- <i>histolyticas</i> .....	108
Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición.....	108
1. <i>E. invadens</i> PZ e IP101.....	108
2. <i>E. moshkovskii</i> FIC y <i>E. histolytica</i> -like Laredo.....	110
Gelatinasas de <i>E. histolytica</i> .....	113
Características de las gelatinasas cistein- dependientes de <i>E. histolytica</i> .....	118
Gelatinasas en las cepas de temperatura ambiente.....	120
1. <i>E. invadens</i> PZ e IP101.....	120
2. <i>E. moshkovskii</i> FIC y <i>E. histolytica</i> -like Laredo.....	121
<b>CONCLUSIONES</b> .....	123
<b>REFERENCIAS</b> .....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Anhidrasa carbónica
CP	Cisteín-proteasa
DTT	Ditiotreitol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida
EDTA	Etilén diaminotetracetato disódico
NEM	N-etilmaleimida
PMA	Fenilmercuriacetato
P	Fosforilasa b
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
TI	Inhibidor de tripsina
SETI	Inhibidor de tripsina proveniente del frijol de soya
Ig	Inmunoglobulinas
kDa	Kilodaltones
2ME	2-mercaptoetanol
OVA	Ovoalbúmina
PA	Persulfato de amonio
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfatos
RM	Regulador de muestras

BSA Seroalbúmina bovina  
SHN Suero humano normal  
TEMED N', N', N', N' - tetrametilén diamina  
TS Tris salino

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pesos moleculares de tior proteasas purificadas con diversos métodos	10
Tabla 2. Pesos moleculares de tior proteasas amibianas en geles de sustrato	11
Tabla 3. Formación de geles de SDS-poliacrilamida normales y de "sustrato"	24
Tabla 4. Suplementos al regulador de lisis para electroforesis	30
Tabla 5. Calibración de los geles de SDS-poliacrilamida al 10%	34
Tabla 6. Relaciones entre $R_r$ y peso molecular aparente (kDa) de la proteínas en geles de SDS-poliacrilamida al 10%	36
Tabla 7. Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de <i>histolytica</i>	40
Tabla 8. Efecto del pHMB, del 2ME y de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> HK9, HM1 y HM3	43
Tabla 9. Efecto del PMSF, de la temperatura de almccenamiento y de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	48
Tabla 10. Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoitos de <i>E. invadens</i> PZ	51
Tabla 11. Efecto de la ebullición y de la temperatua de almacenamiento sobre las proteínas principales en lisados de trofozoitos de <i>E. invadens</i> IP101	52

Tabla 12. Efecto de la ebullición y de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoítos de <i>E. moshkovskii</i> FIC	55
Tabla 13. Efecto de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -like Laredo almacenados a -196°C	58
Tabla 14. Efecto de la adición de pHMB o 2ME y de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoítos de <i>E. invadens</i> PZ almacenados a -196°C	59
Tabla 15. Efecto de la adición de pHMB o 2ME y de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoítos de <i>E. invadens</i> IP101 almacenados a -196°C	60
Tabla 16. Efecto de la adición de pHMB o 2ME y de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoítos de <i>E. moshkovskii</i> FIC almacenados a -196°C	61
Tabla 17. Efecto de la adición 2ME y de la ebullición sobre el contenido de proteínas principales en lisados de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -like Laredo almacenados a -196°C	64
Tabla 18. Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados sin pHMB VS. disueltos-incubados con pHMB	72
Tabla 19. Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados sin pHMB VS. disueltos con-incubados sin pHMB	74

Tabla 20.	Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados sin pHMB VS. disueltos sin-incubados con pHMB	77
Tabla 21.	Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados sin adiciones VS. disueltos con (pHMB + PMSF)-incubados con pHMB	83
Tabla 22.	Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados sin 2ME VS. disueltos con-incubados sin 2ME	86
Tabla 23.	Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados con pHMB VS. disueltos con pHMB-incubados con DTT	89
Tabla 24.	Actividad de gelatinasas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> disueltos-incubados con pHMB VS. disueltos con pHMB-incubados con 2ME	91
Tabla 25.	Actividad de gelatinasa de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like, disueltos-incubado sin adiciones VS. disueltos con-incubados sin pHMB	95
Tabla 26.	Actividad de gelatinasa de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like, disueltos-incubados sin adiciones VS. disueltos sin-incubados con pHMB	98
Tabla 27.	Actividad de gelatinasa de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like, disueltos-incubados sin adiciones VS. disueltos con-incubados sin 2ME	100

## LISTA DE FIGURAS

- Fig 1. Calibración de los geles de SDS-poliacrilamida al 10% 35
- Fig 2. Patrón electroforético del suero humano normal (SHN) en SDS-poliacrilamida al 10% 37
- Fig 3. Patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2% 41
- Fig 4. Efecto del almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2% con o sin pHMB 44
- Fig 5. Efecto de pHMB 20 mM sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2% 45
- Fig 6. Efecto de 2-ME 143 mM sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3 46
- Fig 7. Efecto de PMSF 2 mM, de la temperatura de almacenamiento y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2% 49
- Fig 8. Efecto del almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$  y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo, lisados en SDS al 2% 53
- Fig 9. Efecto del almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo, lisados en SDS al 2% 56

- Fig 10. Efecto de pHMB 20 mM sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101 y *E. moshkovskii* FIC, lisados en SDS al 2% 62
- Fig 11. Efecto de 2-ME 143 mM y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo 65
- Fig 12. Efecto de la temperatura durante la corrida electroforética (4°C ó 25°C) sobre los patrones de gelatinasas en los geles de sustrato 70
- Fig 13. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia o no de pHMB 5 mM y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. 73
- Fig 14. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. 75
- Fig 15. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia o no de pHMB y posterior incubación del gel en presencia de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. 78
- Fig 16. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia o no de pHMB y posterior incubación del gel en ausencia de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. 80
- Fig 17. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en ausencia de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. 82
- Fig 18. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de pHMB/PMSF y  
xvi

posterior incubación del gel en presencia de pHMB 5 mM, sobre su actividad de gelatinasa.	84
Fig 19. Efecto de la disolución de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia o no de 2-ME 143 mM y posterior incubación del gel en ausencia de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa.	87
Fig 20. Efecto de la disolución de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de pHMB y posterior incubación del gel en DTT o pHMB, sobre su actividad de gelatinasa.	90
Fig 21. Efecto de la disolución de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de pHMB y posterior incubación del gel en 2ME o pHMB, sobre su actividad de gelatinasa.	92
Fig 22. Efecto de la disolución de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like en presencia o no de pHMB y posterior incubación del gel sin pHMB, sobre su actividad de gelatinasa.	96
Fig 23. Efecto de la disolución de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like en ausencia de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa.	99
Fig 24. Efecto de la disolución de trofozoítos de <i>E. invadens</i> , <i>E. moshkovskii</i> y <i>E. histolytica</i> -like en presencia o no, de 2ME a y posterior incubación del gel sin adiciones, sobre su actividad de gelatinasa.	101

## RESUMEN

En trofozoitos de *E. histolytica* HK9 lisados con SDS se desencadena una degradación proteínica (autoproteólisis) inmediata y extensiva, ya que en muestras de dichos lisados se observa un patrón electroforético simple con una proteína remanente principal de 113 kDa que por calentamiento se disocia en otras de 31, 33 y 41 kDa. Esta autoproteólisis es estimulada por SDS, y parece deberse a actividad de cisteín-proteasa (CP) ya que es reactivada por 2-mercaptoetanol (2ME), e inhibida con reactivos de grupos tiol como el p-hidroximercuribanzoato (pHMB). En las proteínas remanentes hay actividad de gelatinasas de 113 kDa, 56 y 31 kDa. Las CP de *E. histolytica* HK9 parece tener un precursor único y productos con pesos moleculares menores y heterogéneos resultantes de disociación y procesamiento (o degradación).

Por estos antecedentes nos propusimos caracterizar el proceso de autoproteólisis en tres cepas de *E. histolytica* de virulencia conocida --HM1 (muy virulenta) y HM3 y HK9 (moderadamente virulentas)--, así como en otras tres especies del género *Entamoeba* (*E. invadens*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica*-like). En caso de ocurrir la autoproteólisis inmediata en las cepas de *E. histolytica* y en las de

temperatura ambiente, veríamos si también era mediada por CP como ocurre en HK9. De ser cierta esta hipótesis, también caracterizaríamos las CP más importantes con actividad de gelatinasa de cada cepa.

Para caracterizar la actividad autoproteolítica de los lisados de trofozitos de las cepas de *E. histolytica* mencionadas, así como de las cepas de *E. invadens* PZ e IP101, de *E. mashkovskii* FIC y de *E. histolytica*-like Laredo, usamos geles de SDS-poliacrilamida 10% que teñimos con Azul de Coomassie.

Para caracterizar las gelatinasas empleamos "geles de sustrato", que se obtiene mediante la copolimerización de gelatina-SDS-poliacrilamida; la aplicación de muestras de los lisados amibianos a estos geles es seguida de incubación y tinción con Azul de Coomassie. Las gelatinasas provocan la aparición de bandas claras en los sitios del gel donde se localizan dichas enzimas.

Encontramos que en los lisados no hervidos de las tres cepas de *E. histolytica* quedó una proteína remanente principal de 113 kDa, que por calentamiento se disoció en otras tres proteínas de 31, 33 y 41 kDa. La actividad autoproteolítica en las tres cepas fue mediada principalmente por CP, porque fue inhibida con pHMB y estimulada con 2ME.

En geles de sustrato, las CP más potentes de HM1 y HM3 fueron tres, de 56, 80 y 33 kDa y de HK9 fue una de 56 kDa.

Por otro lado, en los lisados de las cepas de temperatura ambiente (PZ, IP101, FIC y Laredo) también ocurrió autoproteólisis inmediata y extensiva, que en su mayoría pareció ser mediada por CP, dejando unas cuantas proteínas remanentes cuyo patrón electroforético también fue característico para cada cepa. Las CP más potentes fueron las siguiente: en PZ dos de 40 y 48 kDa, en IP101 dos de 32 y 36 kDa, en FIC una de 28 kDa y en Laredo una de 40 kDa.

Nuestros resultados indican que la autoproteólisis inmediata y extensiva es una característica compartida por las cuatro especies del género *Entamoeba* analizadas y que en todas ellas es mediada principalmente por CP. Estos hallazgos quizás implican que la CP puede tener un ancestro común en el género *Entamoeba*. La detección de gelatinasas de diferentes pesos moleculares en todas las cepas analizadas, parece deberse tanto a disociación de precursores de mayor peso moleculares como a procesamiento (o degradación) proteolítico de las mismas, como ya se había encontrado en *E. histolytica* HK9.

## INTRODUCCION

### A. ANTECEDENTES GENERALES

#### 1. Amibiasis

La amibiasis es una infección primaria del intestino grueso humano causada por el protozoario parásito *Entamoeba histolytica*, la cual puede ser luminal o invasora. En la amibiasis luminal el parásito vive como comensal en la luz del intestino sin inducir síntomas ni daño aparente. La amibiasis invasora ocurre cuando las amibas invaden y destruyen la mucosa intestinal produciendo desde pequeñas ulceraciones superficiales, hasta necrosis confluyente de gran parte de la mucosa en la colitis amibiana fulminante (Elhence et al., 1979).

La amibiasis intestinal invasora tiene diferentes formas de evolución, entre las cuales destaca la diseminación a través de la vena porta que puede llegar a producir lesiones extraintestinales en el hígado, llamadas abscesos hepáticos. En las lesiones hepáticas amibianas inicialmente hay acumulación de neutrófilos, linfocitos e infiltraciones granulomatosas; si las lesiones se extienden, el parénquima hepático es sustituido por material necrótico con trofozoítos en la periferia. La ausencia de trofozoítos en el centro de las lesiones se ha interpretado como resultado de la muerte.

del parásito junto con el tejido (Brandt y Pérez Tamayo, 1970; Tsutsumi et al., 1984 y 1988; Martínez-Palomo, 1989).

## **2. Ciclo de vida de *E. histolytica***

*E. histolytica* pasa por tres estadios sucesivos: quiste, prequiste y trofozoíto, siendo este último la forma móvil del parásito (Martínez-Palomo, 1989).

Los trofozoítos viven en la luz del intestino, son evacuados en las heces fecales y mueren rápidamente fuera del intestino debido a su fragilidad y susceptibilidad al medio ambiente.

El prequiste se caracteriza por la presencia de barras cromatóides y por secretar rápidamente una pared quística delgada y hialina constituida por capas concéntricas de quitina (Arroyo-Begovich et al., 1980, Avron et al., 1983). Cuando el prequiste tiene cuatro núcleos, las barras cromatóides desaparecen para dar lugar al quiste. Las formas infecciosas de *E. histolytica* son los quistes tetranucleados resistentes a la desecación y al jugo gástrico que aseguran la propagación del parásito (Lushbaugh, 1988).

## **3. Epidemiología de la amibiasis**

La infección por *E. histolytica* tiene amplia distribución. Ocurre tanto en los países desarrollados de clima templado o

frío, como en los países tropicales en vías de desarrollo; sin embargo, es más frecuente en estos últimos (Manson-Bahr y Apted, 1982; Muñoz, 1989).

La infección puede ocurrir a través de la ingestión de alimentos contaminados con quistes, principalmente por manipulación de alimentos y negligencia en el lavado, así como por aguas contaminadas y por contacto fecal-oral (Muñoz, 1989); sin embargo no hay datos epidemiológicos suficientes de la amibiasis por la falta de pruebas de diagnóstico estandarizadas y comparables (Walsh, 1986).

La infección se presenta cuando el hospedero ingiere quistes maduros y éstos eclosionan en el íleon, dando lugar cada uno a cuatro amébulas uninucleadas, las cuales llegan al intestino grueso y ahí se dividen por fisión binaria dando lugar a varios trofozoitos (Martínez-Palomo, 1989). Estos pueden vivir y multiplicarse indefinidamente en las criptas de la mucosa del intestino grueso para colonizarlo formar quistes, con lo que se completa el ciclo biológico (Albach y Booden, 1978).

#### 4. Patología de la amibiasis

Walsh (1988) estimó hace seis años que, en esa época, en todo el mundo se encontraban infectados unos 500 millones de personas con *E. histolytica*, de los cuales en un año 40

millones desarrollaron colitis o abscesos hepáticos y 400,000 murieron por la enfermedad.

En la actualidad se han caracterizado diferentes cepas de *E. histolytica* y se ha visto que las hay más o menos virulentas. Orozco et al. (1983 y 1987) y Mattern et al. (1977a y b, 1978) encontraron que la virulencia amibiana, medida como la capacidad de los trofozoitos para producir abscesos hepáticos en hámsteres, correlaciona con su capacidad de destrucción de diferentes líneas celulares en cultivo. La virulencia también parece correlacionar con la capacidad de eritrofagocitosis (Trissl et al. 1977 y 1978; Orozco et al., 1983), la susceptibilidad de las amibas para aglutinarse en presencia de concanavalina A (Trissl, 1983) y su contenido de enzimas proteolíticas (Gadasi y Kobiler, 1983; Lushbaugh et al., 1984; Gitler et al., 1984; Gitler y Mirelman, 1986; Scholze y Werries 1986a y b; Keene et al., 1986).

## **B. ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **1. Proteasas de parásitos**

Las proteasas juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades parasitarias, ya que facilitan la invasión de los tejidos del hospedero (Coombs, 1982). También ayudan a los parásitos a evadir la respuesta inmune y evitar la

coagulación de la sangre (McKerrow, 1989; Maeda et al., 1989). Cazzulo et al. (1990) encontraron en *Trypanosoma cruzi* una "cruzipaina" que hidroliza péptidos sintéticos que contienen arginina, fenilalanina, valina o leucina. Las esquistosómulas de *Schistosoma mansoni* secretan dos proteasas de 28 y 60 kDa que degradan caseína, gelatina y a los componentes C3 y C3b del complemento humano (Marikovsky et al., 1988). McKerrow et al (1985) purificaron dos proteasas de cercarias de *S. mansoni*, una de 30 kDa (dependiente de  $Ca^{++}$ ) y otra de 17 kDa (serín-dependiente); la segunda parece ser producto de la autoproteólisis del parásito y degrada elastina, azocoll y gelatina. Lockwood et al. (1984 y 1987) encontraron que *Trichomonas vaginalis* y *Trichomonas foetus* liberan varias cisteín-proteasas (CP), implicadas en la nutrición del parásito. Recientemente, North et al. (1990) caracterizaron las CP más potentes de *T. vaginalis*, con pesos moleculares de 20, 28, 38, 68, 76 y 96 kDa.

*Leishmania major* y *L. mexicana* contienen un glucoproteína de 63 kDa que parece ser una metaloproteína (Hernández et al., 1989). North y Coombs (1981) encontraron 11 bandas de actividad proteolítica, en *L. mexicana* la mayoría de las cuales fueron CP. Coombs (1982) encontró que los amastigotes de *L. mexicana* tienen 20 veces más actividad de CP que los promastigotes la cual interviene en el

crecimiento y degradación de proteínas en los macrófagos del hospedero. Hadley et al. (1983) y Lyon y Haynes (1986) encontraron que los trofozoítos, esquizontes y merozoítos de *Plasmodium falciparum* tienen actividad proteolítica de 28, 35, 40 y 75 kDa; todas ellas, excepto la de 75 son CP.

Los trofozoítos de *Giardia lamblia* tienen dos proteasas de 105 y 40 kDa detectadas en gelatina-SDS-PAGE (Hare et al., 1989) y *Ancylostoma duodenale* segrega una proteasa de 36 kDa que disuelve los coágulos de fibrina (Hotez y Cerami, 1983).

## **2. Proteasas y virulencia de *E. histolytica***

El daño al tejido intestinal en la amibiasis invasora requiere que haya penetración de los trofozoítos a través de la mucosa y la submucosa del intestino. Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos histolíticos del parásito.

Uno de los factores que se utiliza para explicar la capacidad histolítica de las amibas es la producción de citotoxinas como la hemolisina (Said-Fernández y López-Revilla, 1982, 1983 y 1988), la proteína formadora de poros --que se inserta en membranas naturales y artificiales-- (Lynch et al., 1982; Young et al., 1982), estructuras lisosomales, la citólisis por contacto (Radvin and Guerrant, 1982) y las actividades colagenolíticas (Muñoz et al., 1982 y 1984; Gadasí y Kessler, 1983), así como la producción de

proteasas que hidrolizan caseína, gelatina fibrina, amilasa, amilopectina y hemoglobina así como la fosfatasa ácida, hidrolasas y la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa (Jarumilinta y Maegraith, 1954; Neal, 1960; Werries y Müller, 1983 y 1986; Wilhem et al., 1988; Müller y Werries, 1988).

Gadasi y Kobiler (1983); Lushbaugh et al. (1984); Keene et al. (1986) sugieren que la virulencia del parásito puede ser que al parecer esta mediada por su capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular como colágena, laminina y fibronectina, así como redondear y desprender células en cultivo; los mismos investigadores encontraron que la secreción de enzimas proteolíticas correlaciona con la virulencia del parásito, ya que la cepa virulenta HM1 tiene mayor actividad proteolítica que la cepa HK9, de virulencia moderada.

### **3. Cisteín-proteasas de *E. histolytica***

Entre los efectos atribuidos a las CP amebianas se encuentran la degradación de fibronectina, laminina y elastina (Keene et al., 1986), el efecto enterotóxico inducido al inocular extractos amebianos en asas intestinales de rata (Feingold et al., 1985), la degradación de colágena I, específicamente entre los residuos Gly-Phe y Gly-Leu (Schulte et al., 1987), la activación del plasminógeno (Keene et al., 1986) y el mal

llamado efecto "citotóxico", que en realidad consiste en el despegamiento de la células cultivadas en superficie sin afectar su viabilidad (Gadasi y Kobiler, 1983). Se ha descrito tanto una CP con "citotoxicidad", como otra sin ella (Lushbaugh et al., 1984).

McLaughlin y Faubert (1977) encontraron una proteasa ácida cisteín-dependiente de 41 kDa parecida a catepsina D y otra neutra de 27 kDa, parecida a catepsina B. Lushbaugh et al. (1984) encontraron que los homogenados de cepas virulentas de *E. histolytica* tienen mayor actividad de proteasas ácida y neutra con pesos moleculares de 10 a 30 kDa (por filtración en gel) que otras cepas menos virulentas. Scholze y Werries (1984) reportaron una CP de  $21 \pm 2$  kDa, que inactiva diversas enzimas glucolíticas in vitro (Scholze y Werries, 1986) y degrada colágena tipo I (Lushbaugh et al., 1985; Schulte et al., 1987 y 1989). Recientemente, Luaces y Barret (1988) purificaron por cromatografía de afinidad una CP a la que denominaron "histolisina" (23 kDa en SDS-PAGE y 29 kDa por filtración en gel). Por otro lado, Keene et al. (1986) aislaron una CP de 56 kDa que degrada laminina, fibronectina y colágena tipo I y activa plasminógeno.

Recientemente Reed et al. (1989) encontraron una correlación directa entre la expresión de la actividad de la CP de 56 kDa en cepas aisladas de pacientes con amibiasis y

la gravedad de la enfermedad clínica (Tabla 1).

#### 4. Cistein-proteasas con actividad de gelatinasa

Se ha observado también gran heterogeneidad en el tamaño molecular de las CP amibianas que han sido analizadas en geles de SDS-poliacrilamida que contienen gelatina como sustrato, llamados "geles de sustrato". Pérez-Montfort et al. (1987) utilizando geles de sustrato encontraron cuatro zonas de lisis de 66, 56, 40 y 27 kDa, siendo las tres últimas debidas aparentemente a CP.

Ostoa-Saloma et al. (1989) encontraron en lisados de *E. histolytica*, seis bandas de hidrólisis cistein-dependientes de 23, 26, 30, 36, 45 y 73 kDa. La CP neutra de Keene et al. (1986) y la histolisina de Luaces y Barret (1988) tuvieron actividad proteolítica en geles de sustrato en la zona de 50 a 70 kDa.

Reed et al. (1989) obtuvieron bandas principales de gelatinasa de 30, 40 y 56 kDa. La de 56 kDa es una CP neutra que aislaron de amibas virulentas de pacientes con colitis o absceso hepático (Tabla 2).

#### 5. Autoproteólisis amibiana

La actividad in vitro de las proteasas amibianas ha representado un serio problema tanto para caracterizar las proteínas de *E. histolytica* en general, como para obtener y preservar los antígenos amibianos.

TABLA 1

**PESOS MOLECULARES DE TIOL PROTEASAS  
PURIFICADAS CON DIVERSOS METODOS**

Autores	Métodos*					kDa
	II	FG	Af	CE	IE	
Lushbaugh et al 1985	+	-	+	-	-	16
Scholze y Werries 1984	-	+	-	-	+	21
McLaughlin y Faubert 1977	+	+	-	-	-	27
Luaces y Barret 1988	-	-	+	-	-	29
Lushbaugh et al 1984	+	+	-	-	+	30
Keene et al 1986	+	-	-	+	-	56

\*II intercambio iónico, FG filtración en gel, Af afinidad, CE cromatoenfoco, IE isoelectroenfoco

**TABLA 2**  
**PESOS MOLECULARES DE TIOL PROTEASAS**  
**AMIBIANAS EN GELES DE SUSTRATO**

<u>Autores</u>	<u>kDa</u>
Keene et al 1986	50-70
Luaces y Barret 1988	50-70
Ostoa-Saloma et al 1989	23, 26, 30 45, 76
Reed et al 1989	30, 40, 56

Avila et al. (1985) probaron que la principal actividad autoproteolítica en los lisados de *E. histolytica* y *E. invadens*: (i) se inhibe con bloqueadores de grupos sulfhidrilo como yodacetato (IA), fenilmercuriacetato (PMA), N-etilmaleimida (NEM) y parahidroximercuribenzoato (pHMB), (ii) se reactiva con agentes reductores como el ditioneitol (DTT) y 2-ME, (iii) aumenta con dodecil sulfato de sodio (SDS).

En algunas especies de microorganismos patógenos también se ha descrito un proceso similar al de la autoproteólisis amibiana. McKerrow et al. (1985), reporta una proteasa de 17 kDa es el producto de la autoproteólisis de *S. mansoni*.

### C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En experimentos realizados recientemente por Ligia Canto (1990) y Bertha Jiménez (1990) en nuestro laboratorio, ellas observaron que cuando lisaban trofozoitos de *E. histolytica* HK9 en SDS al 2% con pHMB y luego los sometían a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, obtenían un patrón electroforético complejo y característico de la especie, sin degradación aparente. Sin embargo, cuando los lisaban con SDS al 2% con o sin 2-ME y luego los hervían, obtenían en cambio un patrón muy simple, con sólo cuatro bandas remanentes principales, de 26, 30, 33 y 56 kDa. De esta manera confirmaron que la actividad autoproteolítica de los lisados amibianos generados en regulador con SDS es (i) inmediata, (ii) extensiva y (iii) se debe a CP, como sugirieron Avila et al (1985).

Por los antecedentes mencionados hasta aquí, pensamos que sería interesante caracterizar el proceso de la autoproteólisis en tres cepas de *E. histolytica* de virulencia conocida, tales como la cepa HM1 (virulenta) y las cepas HM3 y HK9 (moderadamente virulentas), así como en amibas de especies del género *Entamoeba* no patógenas para el hombre como *E. invadens* (cepas PZ e IP101), *E. moshkovskii* (cepa FIC) y *E. histolytica*-like Laredo.

#### D. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Estamos interesados en la caracterización de la autoproteólisis amibiana porque deseamos saber si:

1. Se presenta solamente en *E. histolytica* o es compartido por diferentes especies del género *Entamoeba*.
2. En caso de ocurrir en otras especies del género
3. Las principales proteínas remanentes amibiana son CP.

De esta manera caracterizamos la autoproteólisis para ver si se comparte en diferentes especies del género *Entamoeba* y si es mediada por CP que en tal caso implicaría una relación filogenética que haría pensar que el gen de CP podría estar preservado en el género *Entamoeba*. Por otra parte las proteínas remanentes de la autoproteólisis amibiana fuesen CP podríamos desarrollar un método sencillo y general para aislarlas, de diferentes especies y así poder ayudar a su caracterización.

## E. PROPOSITOS Y ETAPAS DEL TRABAJO

El propósito general del trabajo fue por lo tanto la caracterización de la autoproteólisis amibiana en diferentes cepas de *E. histolytica* y de otras especies del género *Entamoeba*.

Para cumplir este propósito, hemos cubierto las siguientes etapas:

1. Búsqueda de la autoproteólisis amibiana de diferentes especies y cepas del género *Entamoeba*.
2. Determinar si la autoproteólisis es mediada por CP en especies diferentes de *E. histolytica*.
3. Determinar si las principales proteínas remanentes de la autoproteólisis son CP.

En la primera etapa analizamos los patrones electroforéticos de proteínas remanentes de diferentes especies y cepas del género *Entamoeba* en geles de SDS-poliacrilamida.

En la segunda y tercera etapa utilizamos geles de SDS-poliacrilamida copolimerizados con gelatina para detectar las bandas con actividad proteolítica cistein-dependiente.

## MATERIALES

### A. Origen de los reactivos

Obtuve los siguientes reactivos de J. T. Baker: glicerol, etiléndiaminotetracetato disódico (EDTA), ácido clorhídrico, alcohol isopropílico, ácido acético glacial, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, citrato férrico amoniacal.

Obtuve de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EUA): tris-(hidroximetil)-aminometano (Trizma base, Tris), glicina, 2-mercaptoetanol (ME), seroalbúmina bovina (BSA) fracción V, N'N'-metilén-bis-acrilamida, Azul brillante de Coomasie R250, ácido pararacloromercuribenzoico (pCMB), L-cisteína, glucosa, ácido ascórbico y gelatina (de piel de puerco tipo I).

La acrilamida provenía de Eastman Kodak Co. (Rochester NY, EUA), la N',N',N',N'-tetrametiléndiamina (TEMED) de Canal Industrial Corp. (Rockville MD, EUA); el persulfato de amonio de Bio-Rad Laboratories (Richmond CA, EUA), el agar de Difco Laboratories (Detroit MI, EUA), el dodecil sulfato de sodio (SDS) de BDH Chemicals Ltd. (Poole, Inglaterra), la peptona biotriptasa de Bioxon de México, S.A.

## B. Composición y preparación de soluciones

### 1. Amortiguadores y soluciones para PAGE-SDS

#### Soluciones para los geles y los tanques de electroforesis

##### Solución A. Acrilamida-Bis

Pesé 30 g de acrilamida y 0.4 g de bisacrilamida usando cubrebocas. Disolví los componentes en 70 ml de agua, filtré la solución con papel Whatman No. 1 y la aforé a 100 ml. Guardé la solución en una botella de polipropileno cubierta con papel aluminio y la almacené a 4°C.

##### Solución B. Tris-HCl 3 M pH 8.8

Disolví 36.3 g de Tris en 30 ml de agua, añadí 5.3 ml de EDTA 0.2 M pH 8, 10 ml de glicerol al 50% y ajusté el pH con HCl 5 N. Aforé la mezola a 100 ml, la coloqué en una botella de polipropileno y la almacené a temperatura ambiente.

##### Solución C. Tris-HCl 0.49 M pH 6.8

Disolví 5.98 g de Tris-base en 30 ml de agua, añadí 4 ml de EDTA 0.2 M pH 8, ajusté el pH con NaOH 10 N y aforé a 100 ml. Guardé la solución en una botella de polipropileno y la almacené a temperatura ambiente.

##### Solución D. SDS al 10%

Disolví 10 g de SDS en 70 ml de agua; aforé la solución a 100 ml y la almacené a temperatura ambiente en una botella lechera.

##### Solución E. TEMED

Distribuí muestras de 0.1 ml de TEMED en tubos Eppendorf de 0.5 ml que luego cerré perfectamente, sellé con Parafilm y almacené a 4°C.

Solución F. Persulfato de amonio (PA) al 10%

Coloqué muestras de 0.1 g de PA en tubos Eppendorf de 1.5 ml que tapé perfectamente y almacené a temperatura ambiente en un desecador con gel de sílice. Disolví el contenido de cada tubo con 1 ml de agua inmediatamente antes de usar la solución debido a que el PA en solución se inactiva rápidamente.

Solución G. Amortiguador de corrida 10X

Mezclé 30 g de Tris y 144 g de glicina con 100 ml de la solución D, 500 ml de agua y 40 ml de EDTA 0.2 M (pH 8). Ajusté el pH a 8.3 con HCl 1 N y aforé a 1000 ml. Guardé la solución en una botella de polipropileno a temperatura ambiente.

Solución H. Amortiguador de corrida 1X. Mezclé 20 ml del amortiguador de corrida 10X y aforé a 200 ml con agua bidestilada inmediatamente antes de usar.

**2. Soluciones para preparar muestras para electroforesis**

Azul de bromofenol al 0.2%. Disolví 20 mg de azul de bromofenol con 10 ml de agua; distribuí muestras de 1 ml en tubos Eppendorf y las almacené a -20°C.

Regulador de muestras (RM) 2X. Mezclé 5 ml de Tris-HCl 0.49 M pH 6.8, 2 ml de glicerol al 50%, 0.5 ml de azul de bromofenol al 0.2% y 0.9 ml de agua. Distribuí muestras de 1 ml en tubos Eppendorf y las almacené a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

pHMB 10 mM (pHMB 2X). Mezclé 8 mg de pHMB en 5 ml de agua. Para disolver completamente agregué 3 gotas de NaOH concentrado (con pipeta Pasteur) y agité con el vórtex. Luego adicioné 4 gotas de HCl 5 N (con pipeta Pasteur) y agité con el vórtex. Aforé a 5 ml con agua bidestilada.

Regulador de muestras con pHMB 5 ó 10 mM (RM/pHMB). Mezclé 1 vol de pHMB 2X con 1 vol de RM 2X.

Regulador de muestras con 2-ME 143 mM (RM/ME 2X). En la campana extractora adicioné 0.1 ml de 2-ME (1.1168 g/ml) a cada 9.9 ml de RM 2X. Distribuí muestras de 1 ml en tubos Eppendorf que almacené a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Regulador de muestras con pHMB 5 mM/ PMSF 2 mM. Mezclé un volumen de pHMB 20 mM con 1 vol de RM 1X para tener pHMB 5mM. Preparé PMSF 100 mM, mezclando 87 mg de PMSF en 5 ml de alcohol isopropílico. Mezclé 0.1 ml de PMSF 100 mM + 2.5 ml de pHMB 10 mM + 2.4 ml de RM 2X.

### **3. Soluciones para ensayar la actividad proteolítica**

Tris-HCl 75 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4. Disolví 5.54 g de Trizma base y 4.38 g de NaCl en 400 ml de agua bidestilada, ajusté

el pH a 7.4 con HCl 5 M, aforé a 500 ml con agua bidestilada y esterilicé en autoclave. Guardé a temperatura ambiente.

Tris-HCl 100 mM, NaCl 0.15 M pH 7.4. Disolví 6.005 g de Trizma base y 4.38 g de NaCl con 400 ml de agua biestilada, ajuste el pH a 7.4 con HCl 5 M, aforé a 500 ml con agua bidestilada y esterilicé en autoclave. Guarde a temperatura ambiente.

Gelatina al 1% A un tubo Eppendorf con 10 mg de gelatina añadimos 1 ml de agua bidestilada; sumergimos el tubo en agua hirviendo y agitamos suavemente hasta la disolución completa de la gelatina. La mezcla se preparó inmediatamente antes de usarla

#### 4. Soluciones para teñir los geles

Colorante de Fairbanks. Mezclé 225 ml de alcohol isopropílico, 50 ml de ácido acético glacial y 25 g de Azul brillante de Coomasie R250 con 300 ml de agua. Aforé a 500 ml, filtré a través de papel Whatman No. 1 y guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

Solución desteñidora rápida. Mezclé 50 ml de ácido acético glacial, 225 ml de alcohol isopropílico y 200 ml de agua y aforé la mezcla con agua a 500 ml. Guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

Acido acético al 7.5%. En la campana extractora mezclé 37.5 ml

de ácido acético glacial con 300 ml de agua y aforé con 500 ml. Guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

#### 5. Soluciones y reactivos de uso general

HCl 5 N. En la campana extractora añadí lentamente 42 ml de HCl concentrado (12 N) a una probeta que contenía 40 ml de agua y luego aforé la mezcla a 100 ml. Guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

Glicerol al 50%. A una probeta con 50 ml de glicerol añadí 50 ml de agua y almacené la mezcla a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

EDTA 0.2 M pH 8. Disolví 74 g de EDTA con 70 ml de agua, ajusté el pH a 8 con NaOH 10 N y aforé a 100 ml. Guardé la solución a temperatura ambiente en una botella de polipropileno.

Agar al 1%. En un vaso de precipitados de 250 ml añadí 1g de agar y 70 ml de solución B. Luego fundí el agar en el horno de microondas por irradiación con intensidad máxima por 2 min y aforé la mezcla a 100 ml con el mismo amortiguador. Distribuí muestras de 5 ml en tubos Pyrex de 13 X 100 mm con tapón de rosca que guardé, bien tapados y sellados con masking tape, a 4°C.

## 6. Medios para la cosecha y lavado de amibas

Medio TYI. Mezclé los siguientes componentes en 100 ml de agua caliente (60°C): 9.15 g de peptona biotriptasa, 2.85 g de glucosa, 0.55 g de NaCl, 0.30 g de L-cisteína, 0.06 g de ácido ascórbico, 0.175 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 7 mg de citrato férrico amoniacal. Ajusté el pH a 7 con NaOH 10 N, aforé a 250 ml, distribuí muestras de 11 ml en tubos Pyrex de 16 X 125 mm con tapón de rosca que esterilicé 15 min en el autoclave a 15-20 lb/pulg<sup>2</sup> y almacené en la oscuridad a temperatura ambiente no más de dos semanas.

## C. Material biológico

1. Suero humano normal. Obtenido en el laboratorio por Ligia Canto (1990) y Bertha Jiménez (1990).
2. Amibas. Utilicé trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9, *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo en fase logarítmica de crecimiento, cultivadas axénicamente en medio TYI-S-33 (Diamond et al, 1978) suplementado con suero de bovino (Colorado Serum Co., lote 2185 B).

## MÉTODOS

### A. Electroforesis en geles de poliacrilamida

#### 1. Formación de los geles

Gel separador (inferior). Armé la cámara para el gel plano de 90 mm de ancho, 70 mm de alto y 0.8 mm de espesor y sellé los bordes laterales e inferior aplicando con una pipeta Pasteur agar al 1% fundido, primero en la base y luego en los lados de las placas de vidrio ensambladas.

Marqué con plumón el nivel que debería alcanzar el gel separador en las placas de vidrio y en un matraz Erlenmeyer de 50 ml mezclé las soluciones, en el orden anotado en la Tabla 3, para formar el gel separador que contenían poliacrilamida al 10%. Antes de agregar el TEMED (solución E) y el persulfato de amonio (solución F), agité y desgasifiqué 1 min las mezclas en la línea de vacío. Con una pipeta añadí la mezcla cuidadosamente en el espacio contenido entre las placas de vidrio, evitando la formación de burbujas. Inmediatamente después con una pipeta Pasteur vacié cuidadosamente agua por el interior de uno de los extremos laterales de las placas, para cubrir la mezcla de polimerización y evitar su contacto con el aire. Esperé 10 min a que polimerizara el gel y cuando se formó la interfase eliminé el agua y lavé el borde superior del gel dos veces con agua de una pizeta.

TABLA 3

FORMACION DE GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA NORMALES Y "DE SUSTRATO"

GEL	% <sup>b</sup>	ADICIONES (ml) <sup>a</sup>							
		A	B	C	D	Gelat	H <sub>2</sub> O	E	F
<u>SEPARADOR</u>									
Normal	10	2	1.53	--	0.025	---	2.4	0.003	0.05
De sustrato	10	2	1.53	--	0.025	0.6	1.8	0.003	0.05
<u>CONCENTRADOR</u>									
	5.25	0.35	---	0.26	0.020	---	1.35	0.001	0.01

<sup>a</sup>Soluciones: A acrilamida-bis al 30%, B Tris-HCl 3 M pH 8.8, C Tris-HCl 0.49 M pH 6.8, D SDS al 10%, Gelat Gelatina al 1%, E TEMED, F Persulfato de amonio al 10%

<sup>b</sup>Acrilamida (g/100 ml) en el gel

Gel concentrador (superior). En un matraz Erlenmeyer de 50 ml mezclé las soluciones en el orden anotado en la Tabla 3. Antes de agregar el TEMED (solución E) y el persulfato de amonio (solución F) agité y desgasifiqué la mezcla 1 min en la línea de vacío.

Agité suavemente la mezcla y la coloqué inmediatamente sobre el gel separador hasta llenar el espacio libre que quedaba entre las placas de vidrio. Coloqué rápidamente el peine entre las placas, introduciéndolo primero un poco inclinado para evitar que se formaran burbujas bajo el borde inferior de los dientes, procurando que el extremo inferior del peine llegara hasta 1 cm por arriba del gel separador. La polimerización del gel concentrador ocurrió en 15 min.

## 2. Preparación del aparato de electroforesis

Mientras se polimerizaba el gel concentrador (superior), preparé 200 ml de amortiguador de corrida 1X. Antes de quitar el peine, sobre la cara externa de la placa mayor de vidrio marqué con un plumón indeleble fino el fondo de cada hendidura formada para colocar las muestras en el gel concentrador. Con el empaque de hule y las abrazaderas monté las placas de vidrio con los geles ya formados dentro del aparato de electroforesis. Llené el tanque superior con amortiguador 1X y verifiqué que no escurriera hacia el tanque

inferior. Quité luego el peine, cuidando de no deformar los carriles y con una pipeta Pasteur lavé tres veces con amortiguador de corrida cada una de las hendiduras del gel concentrador sin dejar ninguna burbuja. Agregué el amortiguador de corrida 1X restante en el tanque inferior.

### 3. Preparación de las muestras

Calculé primero las diluciones para obtener la cantidad de trofozoítos deseados en las muestras ( $2 \times 10^5$ ). Preparé las muestras amibianas sólo hasta que ya estaban montados los geles en el aparato de electroforesis y colocado el amortiguador de corrida en los tanques superior e inferior.

Con una jeringa Hamilton coloqué 20  $\mu$ l de cada muestra en la hendidura correspondiente. Enjuagué la jeringa tres veces con amortiguador de corrida antes de colocar cada nueva muestra (Las muestras no se hirvieron).

### 4. Corrida electroforética

a corrida se hizo a 25°C/120 V

### 5. Tinción de los geles

Después de la incubación (reactivación) paré la reacción y teñí con un volumen de colorante de Fairbanks suficiente para cubrir el gel, toda la noche. Retiré el colorante,

enjuagué el gel con agua corriente, luego con solución desteñidora rápida por 30 min y le di varios lavados en ácido acético al 7.5%. Finalmente lavé el gel en dos cambios de agua por 30 min cada vez.

#### 6. Fotografía de los geles teñidos

Una vez eliminado el exceso de colorante, los geles hidratados y húmedos se colocaron sobre una placa de vidrio y encima de un negatoscopio se transiluminaron para ser fotografiados con una cámara de 35 mm con objetivo de 50 mm y filtro amarillo. Las exposiciones fueron de 1/125 de seg a f/8 o f/11. Se utilizó película Kodak Plus X y se hicieron las impresiones en papel Kodabromide F2 de 4 X 5 pulgadas.

#### 7. Secado de los geles

Para secar cada gel ya teñido, lo puse primero sobre una placa de vidrio, eliminé el gel concentrador y orienté el gel separador de manera que el primer carril quedase a la derecha; lo cubrí luego con un pedazo rectangular de papel celofán de 13 X 11 cm. Transferí el gel (adherido al papel celofán), a un secador de parrilla (Gel Slab Dyer Bio-Rad, modelo 224) de manera que el celofán quedase abajo, sobre un papel filtro grueso colocado encima de la rejilla metálica

del secador. Cubrí el gel con una tira de plástico rígida y a ésta con la cubierta de hule.

Conecté el secador a una trampa de vacío formada por 2 matraces Kitasato en línea (colocados dentro de una bandeja de acero inoxidable con hielo seco) que a su vez conecté a una bomba de vacío (Felisa, modelo 1400). La temperatura del secador fue fija (80°-82°C) y el tiempo de secado de 30 min.

## **B. Electroforesis en geles de gelatina-SDS-poliacrilamida**

### **1. Formación de los geles**

#### Gel separador (inferior)

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml mezclé las soluciones en el orden anotado en la Tabla 3, para formar los geles separadores que contenían gelatina al 0.1% y poliacrilamida al 10%.

#### Gel concentrador (superior)

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml mezclé las soluciones en el orden anotado en la Tabla 3.

### **2. Corrida electroforética**

a corrida electroforética se hizo a 4°C/60V por 10h

### **3. Lavado, activación e incubación del gel-sustrato**

l concluir la corrida electroforética desmonté el gel y lo incubé tres veces a 37°C por 10 min en Tris-HCl 0.1 M-NaCl 15 M pH 7.4 (activación) y luego por 3 h en Tris-HCl 0.075

-NaCl 0.15 M pH 7.4. La tinción, el secado y la foto

### C. Obtención de las muestras amibianas

#### 1. Cosecha y lavado de amibas

Sumergí 10 min en hielo 10 tubos de cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* HM1, HM2, HM3, HM38 y HK9 o *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo en fase logarítmica, cultivados en medio TYI-S-33 (Diamond et al., 1978) y reuní su contenido en tubos Falcon a 90 X g (centrífuga IEC, CRU 5000 con cabezal 269, a 500 rev/min) por 3 min a 4°C. Lavé la pastilla de trofozoitos dos veces por centrifugación con 10 ml de TYI frío. Al final de cada lavado suspendí y conté una muestra de las amibas en el hematímetro. Dividí la suspensión del segundo lavado, a la mitad, en tubos de cultivo y centrifugé nuevamente a 90 X g para posteriormente realizar diferentes tratamientos a cada pastilla de trofozoitos.

#### 2. Tratamiento de las muestras para electroforesis

Para disolver las amibas aspiré cuidadosamente el sobrenadante del último lavado de cada tubo y a cada pastilla adicioné regulador de muestra (con o sin inhibidores o activadores) suficiente para tener  $2 \times 10^5$  (Tabla 4). Tapé luego los tubos y herví o no las muestras antes de almacenar a 20°C ó -196°C. de agua destilada antes de usar la solución.

**TABLA 4**  
SUPLEMENTOS AL REGULADOR  
DE LISIS PARA  
ELECTROFORESIS\*

- 
1. Ninguno
  2. pHMB 20 mM
  3. ME 143 mM
  4. pHMB 20 mM/PMSF 2 mM
- \* 0.2 ml/10<sup>6</sup> amibas

## RESULTADOS

### A. Estandarización del método de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida constituyen una matriz inerte en la que la separación de las proteínas se basa en su peso molecular y su carga (Gordon, 1975). En los geles de SDS-poliacrilamida, las proteínas forman complejos con el dodecil sulfato de sodio (SDS), potente detergente aniónico que se une a las regiones hidrofóbicas, por lo que los polipéptidos se desenrollan para generar cadenas extendidas individuales (Maizel, 1966; Shapiro et al., 1967). Por ello, cuando se aplica la corriente eléctrica las proteínas asociadas a moléculas con carga neta negativa cuya intensidad es proporcional al peso molecular de las cadenas polipeptídicas migran hacia el electrodo positivo (Shapiro et al., 1966; Weber y Osborn, 1969; Laemmli, 1970; Podulso, 1981).

#### 1. Polimerización de geles de SDS-poliacrilamida al 10%

Para producir los geles de poliacrilamida al 10% del proyecto, usé 54  $\mu$ l de PA al 10% fresco por cada 6 ml de mezcla de monómeros del gel separador y 10  $\mu$ l de la misma solución por cada 2 ml de la mezcla de monómeros del gel concentrador, de acuerdo con datos obtenidos por Ligia Canto y Bertha Jiménez en nuestro laboratorio (Tabla 3).

## 2. Calibración de los geles de SDS-poliacrilamida al 10%

Llevé a cabo el análisis en un gel plano de 90 mm de ancho, 70 mm de alto y 0.8 mm de espesor, con muestras de 20  $\mu$ l por carril (de 0.5 cm de ancho). Utilicé una mezcla de las siguientes proteínas marcadoras disueltas en regulador de muestras (RM 1X), cuya abreviaturas y pesos moleculares indico entre paréntesis: inmunoglobulinas (Ig, 160 kDa), fosforilasa b (P, 97 kDa), ovoalbúmina (OVA, 43 kDa), anhidrasa carbónica (AC, 31 kDa), e inhibidor de tripsina (TI, 21.5 kDa). Por regresión lineal obtuve la ecuación:  $M_r = \text{antilog}(2.381 - 1.071R_f)$ , en donde  $M_r$  es el peso molecular en kDa y  $R_f$  la migración respecto al frente; el coeficiente de correlación fue  $r = 0.998$  (Fig 1; Tablas 5 y 6).

## 3. Patrón electroforético de proteínas séricas humanas en geles de SDS-poliacrilamida al 10%

Para obtener el patrón electroforético de las proteínas del suero humano normal (SHN) y utilizarlo como estándar en experimentos posteriores, realicé una electroforesis con muestras de 7 a 110  $\mu$ g de proteínas séricas (Fig 2). La intensidad de las bandas fue proporcional a la cantidad de proteína aplicada. Observé una distorsión a la altura de la posición de la albúmina en los carriles que contenían 56 y 110  $\mu$ g, pero no en los que contenían entre 7 y 28  $\mu$ g de proteínas séricas. Las bandas de albúmina no fueron

homogéneas en los carriles con SHN ni en los extremos del gel, en los que coloqué 2  $\mu\text{g}$  de BSA como marcador de peso molecular; la falta de homogeneidad consistió en que se tiñeron más intensamente los extremos laterales que las partes intermedias de las bandas (Fig 2).

Con 14  $\mu\text{g}$  de proteínas séricas obtuve en este experimento el mejor patrón electroforético del suero, con bandas suficientemente nítidas e intensas pero no sobrecargadas. Para experimentos posteriores decidí emplear muestras con 14  $\mu\text{g}$  de proteínas de SHN como estándar y 2  $\mu\text{g}$  de BSA como marcador de peso molecular.

**B. Efecto de la temperatura de almacenamiento, la ebullición, y la adición de inhibidores proteolíticos y mercaptoetanol sobre los patrones electroforéticos**

El análisis de la composición proteínica de los trofozoítos de *E. histolytica* es problemático debido a la gran actividad proteolítica de los extractos. McLaughlin (1977) y Scholze (1984) reportaron la purificación parcial de una proteasa ácida de *E. histolytica* que no es afectada por inhibidores convencionales (yodacetamida, bromuro de bromofenacilo), y una proteasa neutra inhibible por agentes que bloquean grupos tiol y activable por compuestos con sulfhidrilos libres. Keene (1986) y Schulte (1987) reportaron la presencia de una

**TABLA 5**  
**CALIBRACION DE LOS GELES DE**  
**SDS-POLIACRILAMIDA AL 10%**

Proteína marcadora	Mr (kDa)	Migración	
		mm	R <sub>f</sub>
Inmunoglobulinas	160.0	12	0.169
Fosforilasa b	97.4	29	0.397
Albúmina bovina	66.2	37	0.507
Ovoalbúmina	42.7	50	0.685
Anhidrasa carbónica	31.0	61	0.836
Inhibidor de tripsina	21.5	73	1.000*

\*Frente = 73 mm

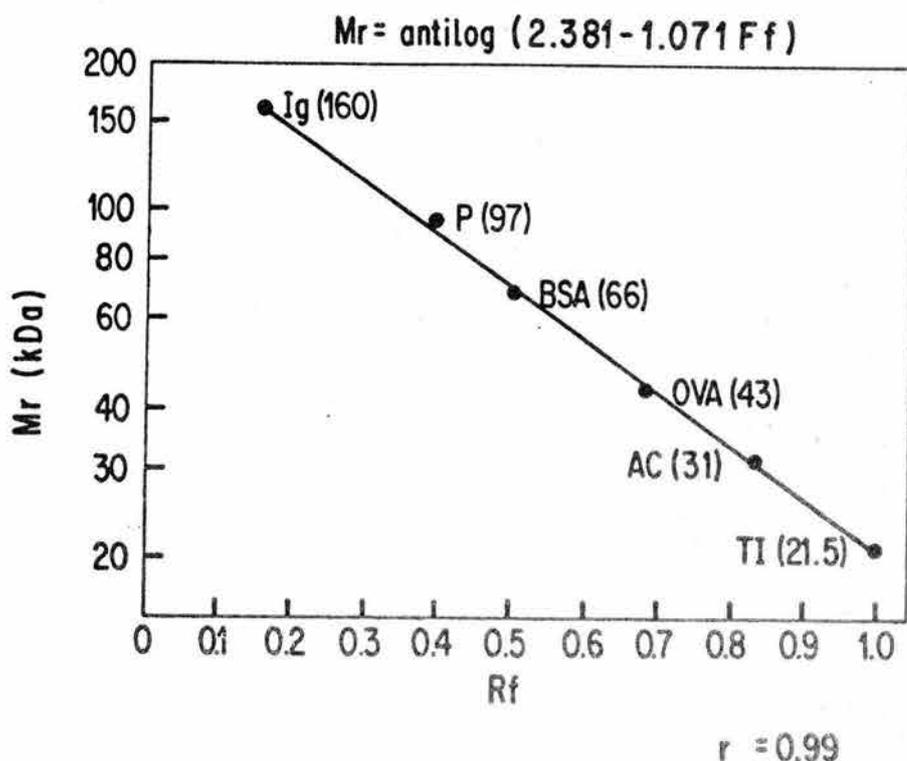


Fig 1. Calibración de los geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Llevé a cabo el análisis en un gel plano de 90 mm de ancho, 70 mm de alto y 0.8 mm de espesor, con muestras de 20  $\mu$ l por carril de 0.5 cm. Utilicé una mezcla de las siguientes proteínas marcadoras disueltas en regulador de muestras (RM 1X), cuyas abreviaturas y pesos moleculares indico entre paréntesis: Inmunoglobulinas (Ig, 160 kDa), fosforilasa b (P, 97 kDa), seroalbúmina bovina (BSA, 66 kDa), ovoalbúmina (OVA, 43 kDa), anhidrasa carbónica (AC, 31 kDa), e inhibidor de tripsina (TI, 21.5 kDa). Por regresión lineal obtuve la ecuación:  $Mr = \text{antilog} (2.381 - 1.071Rf)$ , en donde Mr es el peso molecular en kDa y Rf la migración respecto al frente; el coeficiente de correlación fue  $r = 0.998$ . Inicié la electroforesis con 60 V por 15 min y una vez que las muestras habían penetrado al gel separador apliqué 120 V durante 120 min. Luego teñí el gel con colorante de Fairbanks (Azul de Coomassie al 0.05%) y lo desteñí con varios cambios de ácido acético al 7.5%.

TABLA 6

RELACIONES ENTRE Rf Y PESO MOLECULAR APARENTE (kDa)  
DE LAS PROTEINAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA  
AL 10%

Rf/kDa	Rf/kDa	Rf/kDa	Rf/kDa
0.20/147.5	0.40/090.4	0.60/055.4	0.80/033.9
0.21/144.3	0.41/088.3	0.61/054.0	0.81/033.1
0.22/140.2	0.42/086.2	0.62/052.7	0.82/032.2
0.23/137.4	0.43/084.0	0.63/051.4	0.83/031.5
0.24/134.5	0.44/082.0	0.64/050.2	0.84/030.7
0.25/130.1	0.45/080.0	0.65/049.0	0.85/029.9
0.26/127.6	0.46/078.1	0.66/047.8	0.86/029.3
0.27/124.2	0.47/076.2	0.67/046.6	0.87/028.5
0.28/121.4	0.48/074.3	0.68/045.5	0.88/027.8
0.29/118.5	0.49/072.5	0.69/044.4	0.89/027.2
0.30/115.3	0.50/070.8	0.70/043.3	0.90/026.5
0.31/112.2	0.51/069.1	0.71/042.3	0.91/025.9
0.32/109.8	0.52/067.4	0.72/041.3	0.92/025.3
0.33/107.2	0.53/065.8	0.73/040.3	0.93/024.6
0.34/104.6	0.54/064.2	0.74/039.3	0.94/024.0
0.35/102.0	0.55/062.6	0.75/038.3	0.95/023.5
0.36/099.5	0.56/061.0	0.76/037.4	0.96/022.9
0.37/097.1	0.57/059.6	0.77/036.5	0.97/022.3
0.38/094.8	0.58/058.2	0.78/035.6	0.98/021.8
0.39/092.5	0.59/056.8	0.79/034.7	0.99/021.3
			1.00/020.7

$M_r = \text{antilog} (2.381 - 1.071R_f)$

$r = 0.998$

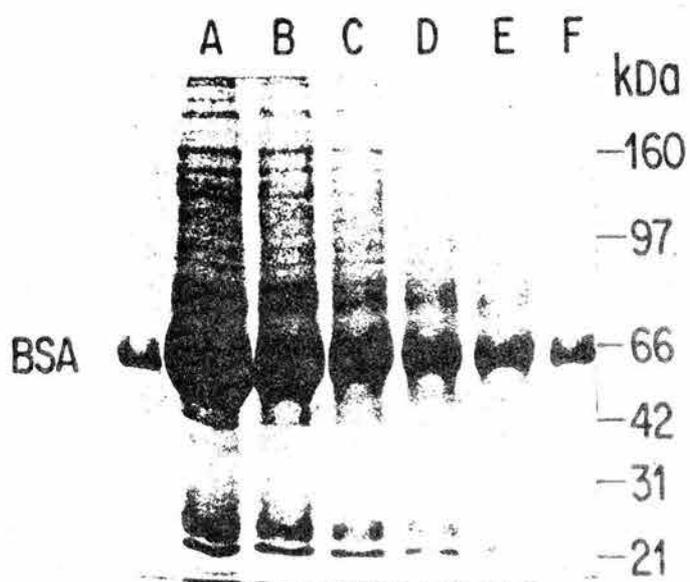


Fig 2. Patrón electroforético del suero humano normal (SHN). Contenido de proteínas indicado en cada caso. (A) y (G) BSA 2  $\mu$ g; (B) 110  $\mu$ g, (C) 55  $\mu$ g, (D) 28  $\mu$ g, (E) 14  $\mu$ g y (F) 7  $\mu$ g de SHN. Electroforesis y tinción de los geles como en la Fig 1.

cisteín-proteasa neutra (56 kDa) en extractos de trofozoítos de *E. histolytica* HM1, que destruye colágena I, elastina, fibronectina y laminina.

La inhibición de la degradación de las proteínas en los extractos de *E. histolytica* se ha logrado con inhibidores que reaccionan con los grupos sulfhidrilo (Avila et al., 1985). El pHMB reacciona específicamente con grupos sulfhidrilo libres de las proteínas para formar mercáptidos (Fraenkel-Conrat, 1957) y es el inhibidor de elección para prevenir la autoproteólisis de extractos de trofozoítos de *E. histolytica* HK9 y *E. invadens* PZ, la cual se reactiva con 2-mercaptoetanol (2ME) y se estimula con SDS (Avila et al., 1985).

En experimentos realizados recientemente por Ligia Canto (1990) y Bertha Jiménez (1990) en nuestro laboratorio, ellas observaron que cuando lisaban a los trofozoítos de *E. histolytica* HK9 en SDS al 2% con pHMB y los sometían a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, obtenían un patrón electroforético complejo y característico de la especie (por lo menos 35 bandas principales de proteínas) sin degradación aparente. Los lisados amibianos obtenidos en SDS al 2% solo o adicionado con 2ME y luego hervidos tenían, en cambio, un patrón electroforético muy simple con sólo tres bandas remanentes principales de 26, 30, y 33 kDa. De esta

manera ellas confirmaron que la actividad autoproteolítica de los lisados amibianos en SDS es inmediata, extensiva, y se debe a cistein-proteasas (Avila et al., 1985).

#### 1. Trofozoitos de *E. histolytica*

Para verificar si diferentes cepas de *E. histolytica* tienen actividad autoproteolítica inhibible con bloqueadores de grupos sulfhidrilo y de serín proteasas, analicé en geles de SDS-poliacrilamida al 10% muestras de trofozoitos de las cepas HK9, HM1 y HM3 disueltos en regulador de lisis (RL) adicionado con pHMB, 2ME, o la mezcla pHMB/PMSF (Tabla 4). Describiré por separado los patrones electroforéticos obtenidos en estas condiciones.

##### a. Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición

###### Almacenados a -196°C

Los lisados de *E. histolytica* HM1, HM3 y HK9, hervidos tuvieron cinco bandas principales de 25, 30, 33, 41, 56 kDa (Fig 3; Tabla 7).

###### Almacenados a -20°C

Los lisados sin hervir tuvieron cuatro bandas principales de 167, 140, 113 y 35 kDa y los hervidos tuvieron un patrón semejante al de los almacenados a -196°C (Fig 3; Tabla 7).

TABLA 7

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y LA EBULLICION SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS DE *E. histolytica*

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	-196°		-20°	
	H <sup>b</sup>	No h	No h	H
167	-	1	-	-
140	-	2	-	-
113	-	2	-	-
56	2	1	1	1
41	1	-	2	2
33	2	1	2	2
30	2	-	1	1
25	3	-	2	2

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa

<sup>b</sup> No h, no hervido; H, hervido

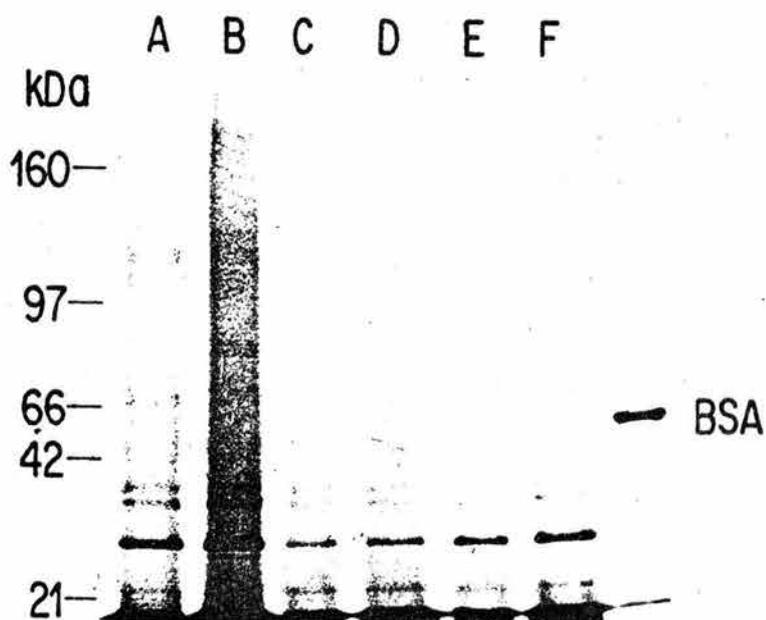


Fig 3. Patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoítos. (A) y (B) trofozoítos HK9, (C) y (D) trofozoítos HM3, (E) y (F) trofozoítos HM1. Obtuve las amibas de cultivos axénicos en fase logarítmica, las lavé dos veces con TYI frío, dividí la suspensión en dos partes iguales (cada una con  $2 \times 10^6$  amibas) y después de centrifugarlas disolví inmediatamente cada pastilla amibiana con regulador de lisis (RL: SDS al 2%, Tris-HCl 0.49 M, pH 6.8, glicerol al 50%) para obtener lisados con  $3 \times 10^5$  amibas/20  $\mu$ l. Electroforesis y tinción de los geles como en la Fig 1.

### b. Efecto de la adición de pHMB

Los lisados obtenidos con pHMB tuvieron patrones electroforéticos idénticos y complejos, con más de 30 bandas (Fig 5; Tabla 8), sin embargo cuando se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por unos días y se hirvieron antes de correrlos, vimos que solo quedan unas cuantas bandas remanentes de las que destacan dos bandas de 56 y 33 kDa (Fig 4; Tabla 8), corroborando que en las tres cepas analizadas se inhibe la autoproteólisis inmediata por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo, pero que para que la autoproteólisis se bloquee irversiblemente es necesario hervir las muestras antes de almacenar.

De estos resultados inferí que la autoproteólisis en dichas cepas es mediada por cisteín-proteasas y confirmé el hallazgo de Avila et al. (1985) de que la presencia de pHMB en una relación cercana a  $4 \mu\text{moles}/10^6$  amibas evita la degradación de las proteínas totales de trofozoitos de *E. histolytica* disueltos en SDS.

### c. Efecto de la adición de 2ME y de la temperatura de almacenamiento

Los lisados de las tres cepas (almacenados a  $-196^{\circ}$  ó  $-20^{\circ}\text{C}$ ) mostraron un patrón electroforético similar, con tres bandas principales, cuyo orden de intensidad fue  $30 = 33 > 41$  kDa (Fig 6, Tabla 9). Este patrón fue similar al del de los

TABLA 8  
 EFECTO DEL pHMB, DEL 2ME Y DE LA  
 TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE  
 EL CONTENIDO DE PROTEINAS PRINCIPALES EN  
 LISADOS DE TROFOZOITOS DE *E.*  
*histolytica* HK9, HM1 y HM3

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin adiciones <sup>b</sup>	Con pHMB		Con 2ME	
		-20°	-196°	-20°	-196°
118	-	-	4	-	-
92	-	-	4	-	-
74	-	-	3	1	1
56	2	1	2	-	-
44	-	-	4	-	-
41	-	-	2	1	3
33	2	3	3	2	3
30	2	1	2	1	2
25	3	1	-	-	-

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa;  
 3, intensa; 4, muy intensa

<sup>b</sup> Muestras almacenadas a -196°C

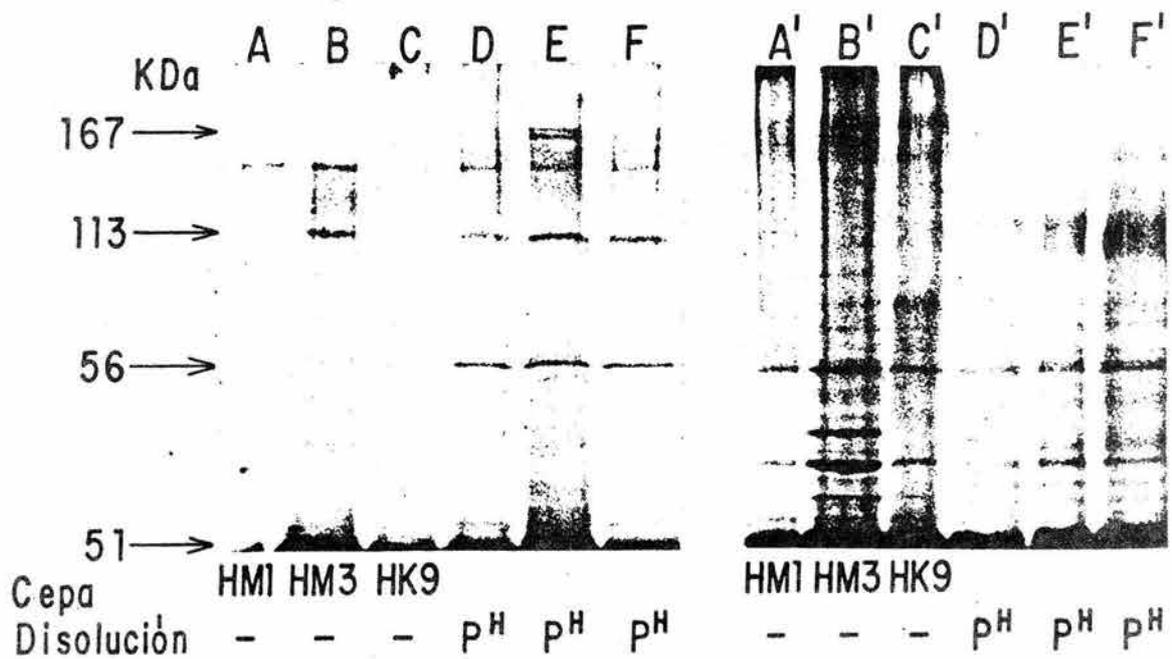


Fig 4. Efecto del almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoitos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2% con o sin p<sup>H</sup>MB. Muestra de 20  $\mu\text{l}$  por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $2 \times 10^5$  trofozoitos. Trofozoitos de HM1, sin hervir (A) y hervidos (A'). Trofozoitos de HM3, sin hervir (B) y hervidos (B'). Trofozoitos de HK9, sin hervir (C) y hervidos (C'). Trofozoitos de HM1 p<sup>H</sup>MB/sin hervir (D) y p<sup>H</sup>MB/hervidos (D'). Trofozoitos de HM3 p<sup>H</sup>MB/sin hervir (E) y p<sup>H</sup>MB/hervidos (E'). Trofozoitos de HK9 p<sup>H</sup>MB/no hervidos (F) y p<sup>H</sup>MB/hervidos (F'). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

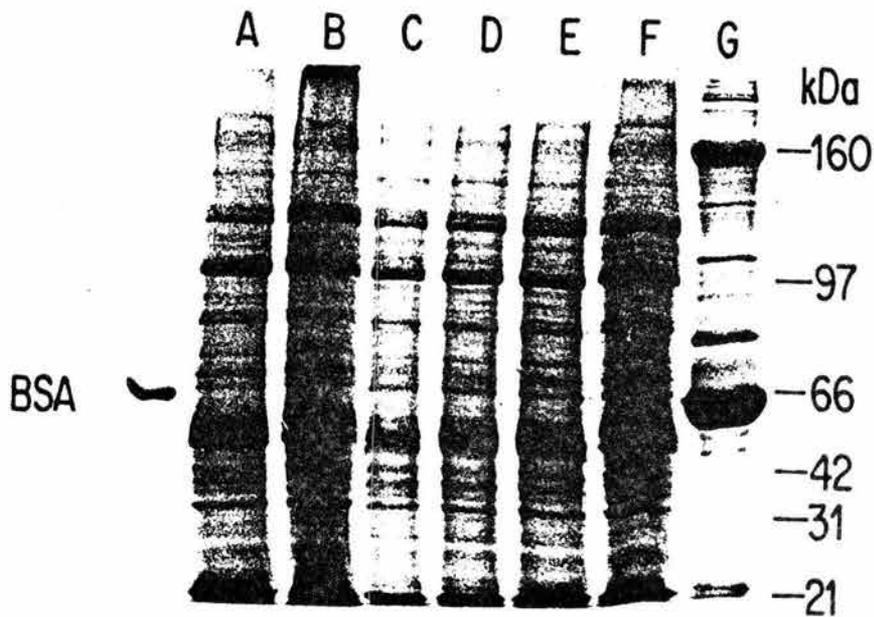


Fig 5. Efecto de pHMB 20 mM sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoítos disueltos en RL-pHMB 20 mM. Trofozoítos HK9, (A) y (B). Trofozoítos HM3, (C) y (D). Trofozoítos HM1, (E) y (F). Suero humano normal, 28  $\mu$ g de proteínas (G). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

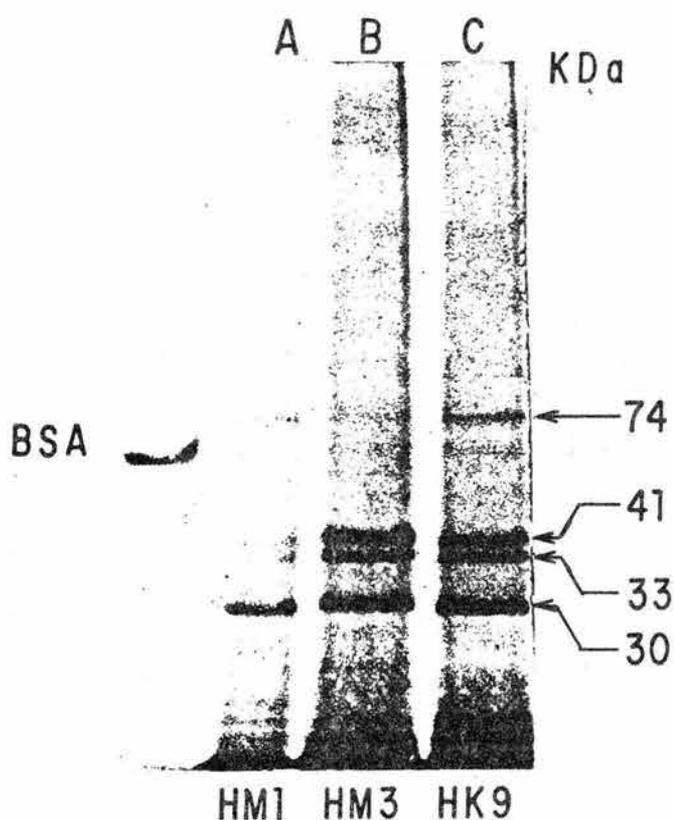


Fig 6. Efecto de 2ME 143 mM sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoitos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l. por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoitos, disueltos en RL-2ME 143 mM y hervidos. Trofozoitos HK9 (A). Trofozoitos HM1 (B). Trofozoitos HM3 (C). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

lisados sin 2ME.

#### **d. Efecto de la adición de PMSF**

Los lisados hervidos y almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  mostraron un patrón similar, con dos bandas principales de 35 y 43 kDa, que disminuyeron con el almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En lisados almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  y no hervidos, observé dos bandas de 109 y 143 kDa (Fig 7; Tabla 9).

Estos resultados confirmaron que la autoproteólisis inmediata es mediada por cisteín-proteasas, ya que se inhibió con pHMB pero no con PMSF (inhibidor de serín-proteasas), y se estimuló con 2ME.

## **2. Efecto de la temperatura de almacenamiento, la ebullición, y la adición de inhibidores proteolíticos y mercaptoetanol sobre los patrones electroforéticos de *E. invadens*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica*-like**

Se ha demostrado actividad autoproteolítica inhibible por agentes alquilantes de grupos sulfhidrilo en algunas especies de *Trichomonas* (Lockwood et al., 1987), *Leishmania* (Coombs et al., 1982) y en *E. invadens* PZ (Avila et al., 1985). Por otro lado, Hernández et al. (1989) observaron que los patrones electroforéticos de promastigotes de algunas especies de *Leishmania* suspendidos en suero bovino fetal y hervidos difieren de los de muestras similares pero no hervidas.

TABLA 9

EFFECTO DEL PMSF, DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y DE LA EBULLICION SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS DE TROFOZOITOS DE *E. histolytica*

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin PMSF			Con PMSF					
	-20°		-196°	-20°		-196°		-196°	
	No h <sup>b</sup>	H	H	No h	H	No h	H	H	
140	2	-	-	-	-	-	-	-	
118	-	-	-	1	-	1	-	-	
113	2	-	-	-	-	-	-	-	
109	-	-	-	1	-	2 <sup>c</sup>	-	-	
55	1	1	2	-	-	-	-	-	
41	-	2	3	-	1	-	2	-	
35	1	-	-	-	-	-	-	-	
33	-	3	2	-	1	-	2	-	
27	-	3	3	-	-	-	-	-	
25	-	2	3	-	-	-	-	-	

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa

<sup>b</sup> No h, no hervido; H, hervido

<sup>c</sup> Sólo en HK9; ausente en HM1 y HM3

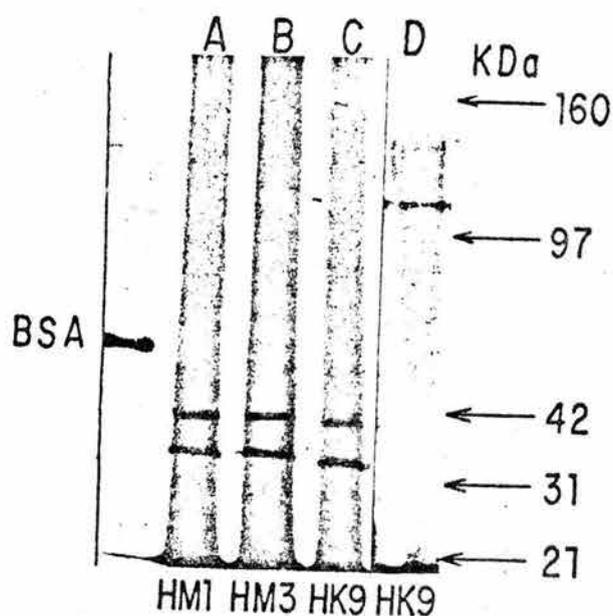


Fig 7. Efecto de PMSF 2 mM, de la temperatura de almacenamiento y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoitos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoitos, disueltos en RL-PMSF 2 mM. Antes de la electroforesis las muestras fueron almacenadas a  $-196^\circ\text{C}$ , excepto las de los carriles D y E que lo fueron a  $-20^\circ\text{C}$ . Trofozoitos HK9 hervidos (A). Trofozoitos HM1 hervidos (B). Trofozoitos HM3 hervidos (C). Trofozoitos no hervidos HK9 (D). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

Recientemente, Ligia Canto (1990) en nuestro laboratorio, confirmó lo reportado por Avila et. al (1985), que para inhibir la autoproteólisis en la cepa HK9 es necesario hervir los lisados, ya que la actividad proteolítica no se inhibe completamente con pHMB si no se hierve la muestra. Por ello decidí ver si otras especies del género *Entamoeba* como *E. invadens* IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo también tenían actividad autoproteolítica mediada por cisteín-proteasas y en caso de que fuera así, si los patrones de las proteínas remanentes eran similares.

Disolví los trofozoítos en regulador de lisis solo o con pHMB 20 mM, 2ME 143 mM, o pHMB 10 mM/PMSF 2 mM, para luego almacenarlos a  $-196^{\circ}\text{C}$  o  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de someter las muestras a electroforesis, herví o no los lisados. Por otra parte, como las muestras con  $3 \times 10^5$  trofozoítos dieron un patrón electroforético suficientemente intenso y nítido, decidí emplear tal cantidad de trofozoítos en todos los experimentos de esta etapa del proyecto.

#### a. Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición

##### 1) Lisados de PZ e IP101

##### Almacenados a $-196^{\circ}\text{C}$

El patrón electroforético de PZ constó de nueve bandas: las dos más intensas fueron las de 99 y 90 kDa, y siete menos

TABLA 10

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE  
ALMACENAMIENTO Y DE LA  
EBULLICION SOBRE EL CONTENIDO DE  
PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS  
DE TROFOZOITOS DE *E. invadens* PZ

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	-20°		-196°	
	No h	H	No h	H
127	-	-	1	-
121	3	3	3	-
99	2	-	4	-
90	-	2	4	-
82	-	-	-	-
66	-	-	-	-
54	-	-	1	-
51	-	-	1	-
43	-	-	1	-
37	-	-	1	4
35	-	-	-	-
31	-	-	-	-
28	-	-	-	-
27	-	-	-	-
25	-	-	1	-
23	1	2	-	-
22	1	2	-	-

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco  
intensa; 3, intensa; 4, muy  
intensa

<sup>b</sup> No h, no hervido; H, hervido

TABLA 11

EFFECTO DE LA EBULLICION Y DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS DE TROFOZOITOS DE *E. invadens* IP101

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	-20°		-196°	
	No h	H	No h	H
121	2	1	3	-
99	1	-	4	2
90	-	1	4	-
82	-	-	-	-
51	-	-	1	-
45	-	-	2	-
37	-	-	1	3
35	-	-	1	-
31	-	-	-	-
23	1	1	-	-
22	1	1	-	-

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa

<sup>b</sup> No h, no hervido; H, hervido

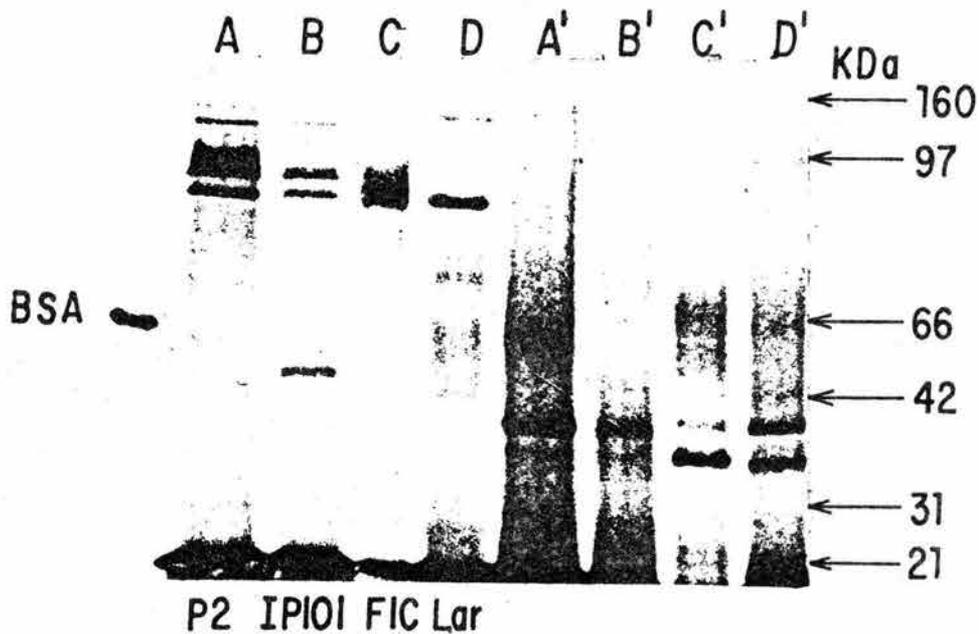


Fig 8. Efecto del almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$  y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo, lisados en SDS al 2%. Muestras de  $20\ \mu\text{l}$  por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoítos. Trofozoítos PZ, sin hervir (A) y hervidos (A'). Trofozoítos IP101, sin hervir (B) y hervidos (B'). Trofozoítos FIC, sin hervir (C) y hervidos (C'). Trofozoítos Laredo, sin hervir (D) y hervidos (D'). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

intensas de 25, 51, 54, 121 y 127, 43 y 37 kDa (Fig 8; Tabla 10). En el patrón de IP101 observé seis bandas: tres más intensas de 45, 90 y 99 kDa y cuatro menos intensas de 51, 121, 137 y 35 kDa (Fig 8; Tabla 11). En el lisado de PZ hervido se perdieron prácticamente todas las bandas y solamente quedó una muy intensa de 37 kDa (Fig 8; Tabla 10). El lisado de IP101 hervido constó de una banda remanente muy intensa de 37 kDa y otra menos intensa de 99 kDa (Fig 8; Tabla 11).

#### Almacenados a -20°C

En el lisado de PZ permanecieron las bandas de 22, 23, 99 y 121 kDa y al hervir aumentaron de intensidad las de 22 y 23 kDa (Fig 9; Tabla 10). El lisado de IP101 sin hervir tuvo cuatro bandas difusas de 22, 23, 90 y 121 kDa, pero cuando se hirvió se intensificaron las bandas de 22 y 23 kDa (Fig 9; Tabla 11).

#### ii) Lisados de FIC

##### Almacenados a -196°C

Los lisados sin hervir constaron de una banda remanente muy intensa de 90 kDa y tres bandas menos intensas de 82, 71, y 66 kDa (Fig 8; Tabla 12). Los lisados hervidos tuvieron tres bandas remanentes, la más intensa de 33 kDa y dos menos intensas de 37 y 109 kDa.

TABLA 12  
 EFECTO DE LA EBULLICION Y DE LA  
 TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO  
 SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS  
 PRINCIPALES EN LISADOS DE  
 TROFOZOITOS DE *E. moshkovskii*  
 FIC

Bandas* (kDa)	-20°		-196°	
	No	h	No	h
109	-	-	-	1
90	4	3	3	-
82	-	-	1	-
71	-	-	1	-
66	-	-	1	-
37	-	-	-	3
33	-	-	-	4

\* -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa; 5, la más intensa

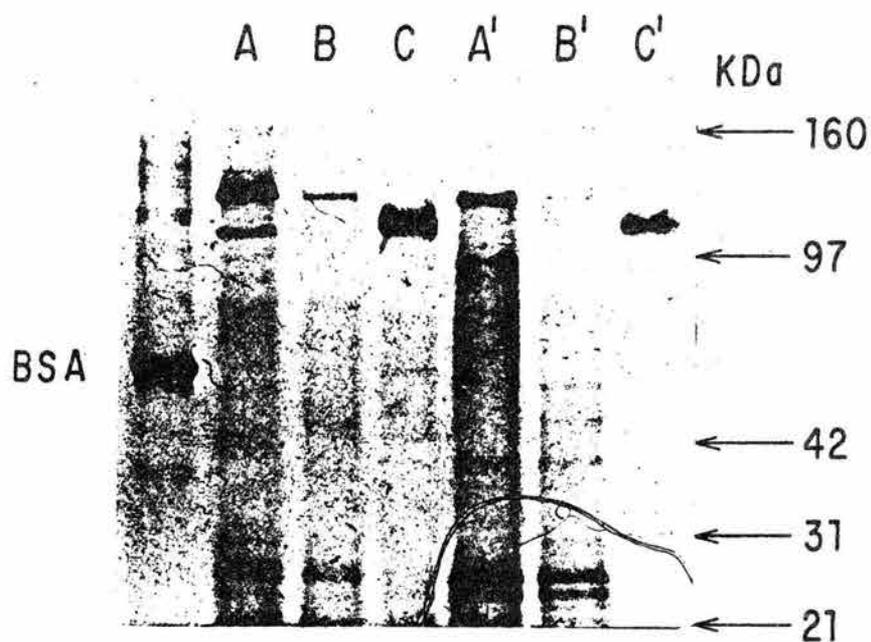


Fig 9. Efecto del almacenamiento a  $-20^{\circ}$  y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101 y *E. moshkovskii* FIC, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoítos. Trofozoítos PZ, (A) sin hervir y (A') hervidos. Trofozoítos IP101, sin hervir (B) y hervidos (B'). Trofozoítos FIC, sin hervir (C) y hervidos (C'). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

### Almacenados a -20°C

Los lisados de FIC sin hervir tuvieron una banda remanente de 99 kDa, que permaneció después de hervir las muestras (Fig 9; Tabla 12).

### iii) Lisados de Laredo

#### Almacenados a -196°C

El lisado sin hervir constó de una banda principal de 90 kDa y tres bandas menos intensas de 107, 115 y 127 kDa (Fig 8; Tabla 13). En los lisados hervidos observé dos bandas remanentes intensas de 33 y 37 kDa y una menos intensa de 106 kDa (Fig 8; Tabla 13). Cuando los lisados no se hirvieron, las proteínas remanentes tuvieron pesos moleculares mayores que cuando se hirvieron, por lo que inferí que la ebullición las desagregó.

### **b. Efecto de la adición de pHMB**

#### i) Lisados de PZ e IP101

Los patrones electroforéticos de PZ e IP101 fueron complejos y similares, con ocho bandas principales de 25, 26, 27, 31, 33, 44, 65, y 81 kDa (Fig 10; Tablas 14 y 15).

#### ii) Lisados de FIC

El patrón electroforético de FIC tuvo seis bandas principales de 27, 31, 33, 43, 65 y 81 kDa y fue parecido a los de PZ e IP101, pero sin las dos bandas principales de 25 y 26 kDa (Fig 10; Tabla 16).

TABLA 13

EFFECTO DE LA EBULLICION  
 SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS  
 PRINCIPALES EN LISADOS DE  
 TROFOZOITOS DE *E. histolytica*-  
 like Laredo ALMACENADOS A  $-196^{\circ}\text{C}$

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	No	
	hervidos	Hervidos
140	1	-
127	3	-
115	2	-
107	2	-
90	4	-
84	1	-
71	1	-
59	1	-
37	-	4
33	-	4

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco  
 intensa; 3, intensa; 4, muy  
 intensa;

TABLA 14

EFFECTO DE LA ADICION DE pHMB O 2ME Y DE LA EBULLICION SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS DE TROFOZOITOS DE *E. invadens* PZ ALMACENADOS A  $-196^{\circ}\text{C}$

Bandas* (kDa)	Con pHMB Hervidos	Con 2ME	
		No hervidos	Hervidos
107	-	3	-
90	-	4	-
81	3	-	-
65	2	-	-
60	-	-	4
43	2	-	-
37	3	-	4
35	4	-	-
31	4	-	-
28	1	-	-
27	4	-	-
26	2	1	1
25	3	-	1

\* -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa

TABLA 15

EFFECTO DE LA ADICION DE pHMB O 2ME Y DE LA EBULLICION SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS DE TROFOZOITOS DE *E. invadens* IP101 ALMACENADOS A  $-196^{\circ}\text{C}$

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Con pHMB Hervidos	Con 2ME	
		No hervidos	Hervidos
90	-	4	-
81	3	-	-
65	2	-	-
55	-	-	1
43	2	-	-
37	3	-	-
35	4	-	-
31	4	-	-
28	1	-	-
27	4	-	-
26	2	1	1
25	3	-	1

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa.

TABLA 16  
 EFECTO DE LA ADICION DE pHMB O 2ME Y  
 DE LA EBULLICION SOBRE EL CONTENIDO DE  
 PROTEINAS PRINCIPALES EN LISADOS DE  
 TROFOZOITOS DE *E. moshkovskii* FIC  
 ALMACENADOS A -196°C

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Con pHMB Hervidos	Con 2ME	
		No hervidos	Hervidos
133	-	2	-
109	-	1	-
92	-	1	-
81	3	3	-
71	2	4	4
65	2	-	1
55	-	-	3
47	-	-	3
43	3	2	-
37	2	1	3
35	4	-	-
31	2	-	-
28	1	-	1

<sup>a</sup> -, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa;  
 3, intensa; 4, muy intensa

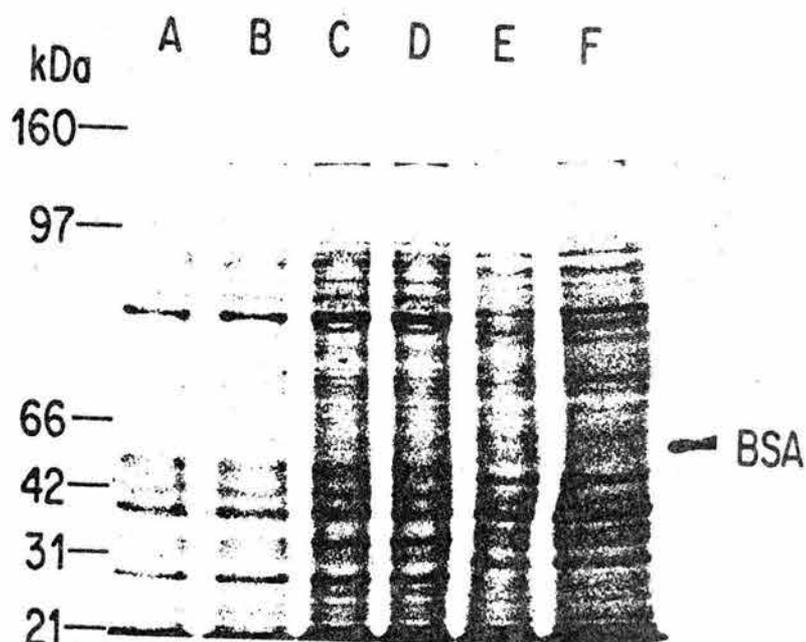


Fig 10. Efecto de pHMB 20 mM sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoitos de *E. invadens* PZ e IP101 y *E. moshkovskii* FIC, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoitos disueltos en RL-pHMB 20 mM. Trofozoitos IP101, (A) y (B). Trofozoitos PZ, (C) y (D). Trofozoitos FIC, (E) y (F). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

### c. Efecto de la adición de 2ME

#### i) Lisados de PZ e IP101

El lisado de PZ con 2ME y no hervido tuvo una banda principal de 90 kDa y dos bandas más difusas de intensidad decreciente: 107 > 26 kDa (Fig 11; Tabla 14); la misma muestra hervida tuvo dos bandas muy intensas de 60 y 39 kDa y dos difusas de 26 y 25 kDa (Fig 11; Tabla 14).

El lisado de IP101 con 2ME y no hervido tuvo una banda de 90 kDa y otra difusa de 26 kDa (Fig 11; Tabla 15); la misma muestra hervida tuvo una banda principal de 56 kDa y dos menos intensas de 25 y 26 kDa (Fig 11; Tabla 15).

#### ii) Lisados de FIC y Laredo

Los lisados de FIC con 2ME y no hervidos tuvieron una banda principal de 71 kDa, tres menos intensas de 81, 109 y 133 kDa y cuatro difusas de 37, 43 y 133 kDa (Fig 10; Tabla 16). Los mismos lisados hervidos tuvieron una banda intensa de 71 kDa, tres menos intensas de 37, 55 y 65 kDa y una difusa de 26 kDa (Fig 11; Tabla 16).

Los lisados de Laredo no hervidos tuvieron una banda principal de 76 kDa y tres difusas de 42, 84 y 121 kDa (Fig 11; Tabla 17); los mismos lisados hervidos tuvieron dos bandas intensas de 62 y 56 kDa y dos menos intensas de 37 y 76kDa (Fig 11; Tabla 17).

TABLA 17

EFFECTO DE LA ADICION DE 2ME  
Y DE LA EBULLICION SOBRE EL  
CONTENIDO DE PROTEINAS  
PRINCIPALES EN LISADOS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
-LIKE Laredo ALMACENADOS A  
-196°C

Bandas* (kDa)	Con 2ME	
	No hervidos	Hervidos
121	1	-
84	1	-
76	1	3
62	4	2
55	-	3
42	2	2
37		1

\* -, ausente; 1, tenue; 2,  
poco intensa; 3, intensa;  
4, muy intensa

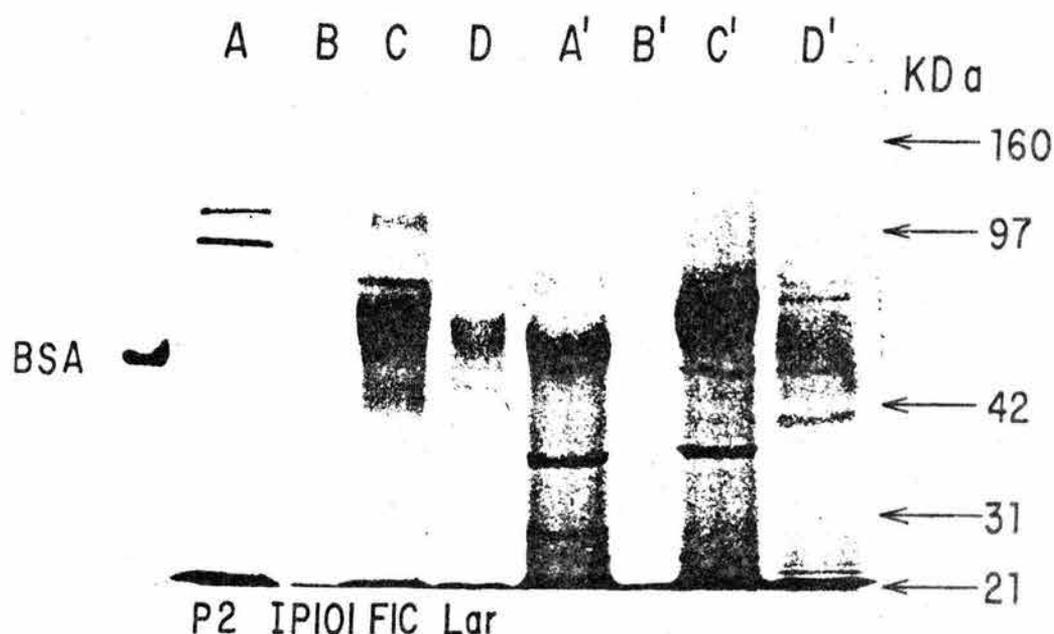


Fig 11. Efecto de 2ME 143 mM y de la ebullición sobre el patrón electroforético de proteínas de trofozoitos de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo, lisados en SDS al 2%. Muestras de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $3 \times 10^5$  trofozoitos, disueltos en RL-2ME 143 mM. Antes de la electroforesis las muestras fueron almacenadas a  $-196^\circ\text{C}$ . Trofozoitos PZ, (A) sin hervir y (A') hervidos. Trofozoitos IP101, sin hervir (B) y hervidos (B'). Trofozoitos FIC, sin hervir (C) y hervidos (C'). Trofozoitos Laredo, sin hervir (D) y hervidos (D'). Obtención de las amibas, electroforesis y tinción de los geles como en las Figs 1 y 3.

Cuando los lisados no se hirvieron, las proteínas tuvieron pesos moleculares mayores que cuando se hirvieron, por lo que inferí que con la ebullición se agregan las proteínas remanentes.

La temperatura de almacenamiento cambió los patrones electroforéticos, ya que cuando almacené los lisados a  $-20^{\circ}\text{C}$  las proteínas se degradaron más que cuando los almacené a  $-196^{\circ}\text{C}$ , por lo que para preservarlos mejor decidí en el futuro seguir almacenándolos a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### C. Efecto de pHMB, PMSF y 2-mercaptoetanol sobre los patrones de gelatinasas amibianas en geles de sustrato

Orozco et al. (1977) y Mattern et al. (1977 y 1978) encontraron que la virulencia de diferentes cepas amibianas --medida como la capacidad de los trofozoítos de *E. histolytica* para producir abscesos hepáticos en hámsteres-- correlaciona con la capacidad de destrucción de células animales en cultivo por los trofozoítos.

La virulencia de distintas cepas amibianas también parece correlacionar con la actividad proteolítica de los trofozoítos que podría determinar su capacidad histolítica, ya que una o varias proteasas amibianas pueden degradar proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina, laminina y colágena tipo I (Keene et al., 1986). Gadasi y

Kobiler (1983) han visto que la cepa virulenta HM1 tiene mayor actividad proteolítica que la cepa HK9, de virulencia moderada. Los activadores de plasminógeno se han estudiado por análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida copolimerizados con plasminógeno, que es retenido en los geles durante la electroforesis y sirve como sustrato in situ para localizar por tinción negativa las bandas de proteasas activadoras de plasminógeno ya que las proteasas dejan en el gel una zona de hidrólisis que no se tiñe con Azul de Coomasie (Heussen y Dowdle, 1980).

Una técnica similar que ha permitido determinar la presencia de seis proteasas de 73, 45, 36, 30, 26 y 23 kDa en geles de SDS-poliacrilamida en *E. histolytica* HM1, es la de los electroferogramas proteolíticos o "geles de sustrato" que consiste en correr los lisados amebianos mediante SDS-PAGE, activar las proteasas del gel por incubación corta en Tris-HCl pH 7.4 y luego sobreponer este gel "activado" sobre otro gel de poliactilamida que contiene gelatina copolimerizada, incubar y teñir el segundo gel con Azul de Coomassie; las bandas claras que resultan de la "tinción negativa" son las que tienen la actividad proteolítica, en este caso específico de gelatinasa (Ostoa-Saloma et al., 1989).

Para identificar las proteasas con actividad de

gelatinasa en los lisados de tres cepas *E. histolytica* de diferente virulencia (la virulenta HM1 y las moderadamente virulentas HM3 y HK9), utilicé una técnica de "geles de sustrato" adaptada por Bertha Jiménez en nuestro laboratorio, la cual tiene la ventaja de que la gelatina es copolimerizada en el gel de poliacrilamida y la actividad de las gelatinasas se puede ver directamente en el gel sin tener que sobreponerlo (con las proteínas una vez separadas) sobre otro gel con gelatina copolimerizada. Obtuve los lisados de trofozoítos con un regulador que contenía SDS al 2% y adicionado o no con un inhibidor de cisteín-proteasas (pHMB), otro inhibidor de serín proteasas (PMSF), o con 2ME. Posteriormente incubé los geles 45 ó 60 min en presencia o no de pHMB o de 2ME y luego los teñí con Azul de Coomassie.

#### 1. Trofozoítos de *E. histolytica* HK9, HM1 y HM3

Utilicé trofozoítos disueltos en RL adicionado con pHMB, o con 2ME, o con la mezcla pHMB/PMSF (Tabla 4). Luego de separar las proteínas por electroforesis en gelatina-SDS-PAGE, incubé los geles en presencia o en ausencia de pHMB. Describiré por separado los patrones de gelatinasas obtenidos en las diferentes condiciones.

a. Efecto de la temperatura durante la corrida electroforética sobre los patrones de gelatinasas en los geles de sustrato

En el laboratorio los geles de SDS-poliacrilamida se corren a temperatura ambiente (25°C) pero Heussen et al (1980) reportaron una técnica para analizar la activación del plasminógeno, con geles de sustrato, en la que hacen la corrida electroforética a 4°C. Es por esto que decidí probar si la temperatura de corrida modifica el patrón de gelatinasas (peso molecular, intensidad de las bandas) de *E. histolytica* HK9.

Utilicé trofozoitos disueltos en regulador de lisis (RL), para analizarlos en geles de sustrato (gelatina-SDS-poliacrilamida), en los que la corrida electroforética fue a 4°C o a 25°C y en ambos casos el voltaje fue de 60V.

Cuando la corrida electroforética se hace a 25° se observan solamente dos gelatinasas difusas con tamaños aparentes de 45 y 33 kDa, pero cuando los geles se corren a 4°C entonces HK9 aparecen hasta seis gelatinasas nítidas con pesos aparentes de 41, 80, 31, 61, 27 y 95 kDa (Fig 12A y A').

Esto resultados indican que hay mejor resolución de las

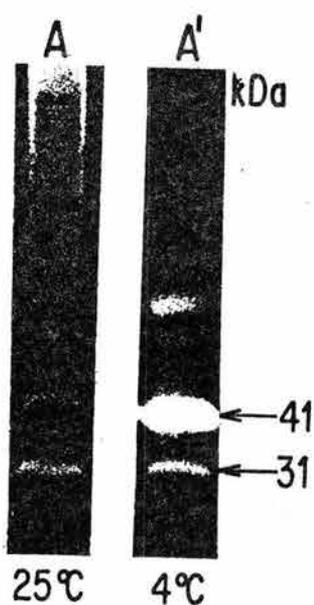


Fig 12. Efecto de la temperatura durante la corrida electroforética (4°C ó 25°C) sobre los patrones de gelatinasas en los geles de sustrato. Obtuve las amibas de cultivos axénicos en fase logarítmica, las lavé dos veces con TYI frío, dividí la suspensión en dos partes iguales (cada una con  $2 \times 10^6$  amibas) y después de centrifugarlas disolví inmediatamente cada pastilla amibiana con regulador de lisis para obtener lisados con  $2 \times 10^5$  amibas/20  $\mu$ l. Utilicé muestras para SDS-PAGE de 20  $\mu$ l por carril, cuyo contenido en todos los casos fue de  $2 \times 10^5$  trofozoitos. Las corridas electroforéticas fueron a 4°C o a 25°C y a 60 V durante 8 h. Luego lavé tres veces el gel con Tris-NaCl 100 mM (TS) y posteriormente lo incubé a 25°C por 45 min en TS. Teñí el gel con colorante de Fairbanks (Azul de Coomassie al 0.05%) y lo desteñí con varios cambios de ácido acético al 7.5%.

gelatinasas separadas a 4°C, que a 25°C; por ello en todos los experimento subsecuentes hice las corridas electroforéticas 4°C.

**b. Disolución e incubación con o sin pHMB**

i) Disolución e incubación sin pHMB

HM1 y HK9 tuvieron seis gelatinasas cuyo orden de potencia para HM1 fue 41 > 31 > 80 > 27 > 95 > 61 kDa, y para HK9 fue 41 > 80 > 31 > 61 > 27 > 95 kDa. HM3 tuvo un patrón semejante al de HK9 y HM1, pero sin la banda de 28 kDa (Fig 13A, 13B y 13C; Tabla 18).

ii) Disolución e incubación con pHMB

HM1 y HM3 tuvieron tres gelatinasas con orden de potencia 56 > 80 > 33 kDa. HK9 sólo tuvo una, de 56 kDa (Fig 13A', 13B', 13C; Tabla 18).

**c. Disolución con pHMB e incubación con o sin pHMB**

i) Disolución con pHMB e incubación sin pHMB

HM1 y HM3 tuvieron cinco gelatinasas cuyo orden de potencia fue 56 > 86 > 80 y 31 > 95 kDa (Fig 14A y 14B; Tabla 19). HK9 tuvo dos gelatinasas cuya potencia fue 86 > 57 kDa (Fig 14C; Tabla 19).

ii) Disolución e incubación con pHMB

HM1 y HM3 tuvieron tres gelatinasas con orden de potencia 56 > 80 > 33 kDa. HK9 sólo tuvo una, de 56 kDa (Fig 13A', 13B', 13C; Tabla 18).

TABLA 18

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
DISUELTOS-INCUBADOS SIN pHMB  
VS. DISUELTOS-INCUBADOS CON pHMB

Bandas* (kDa)	Sin <sup>b</sup> / Con pHMB <sup>c</sup>			
	HM1	HM2	HM3	HK9
95	1/0	1/0	1/0	1/0
80	1/1	0/1	2/1	3/0
56	0/3	0/2	0/3	0/2
41	4/0	4/0	4/0	4/0
33	0/1	0/1	0/1	-
31	3/0	3/0	3/0	3/0
27	2/0	2/0	-	2/0

\* 0, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa; -, ausente en ambos casos

<sup>b</sup> Trofozoítos disueltos-incubados sin pHMB

<sup>c</sup> Trofozoítos disueltos-incubados con pHMB 5-10 mM

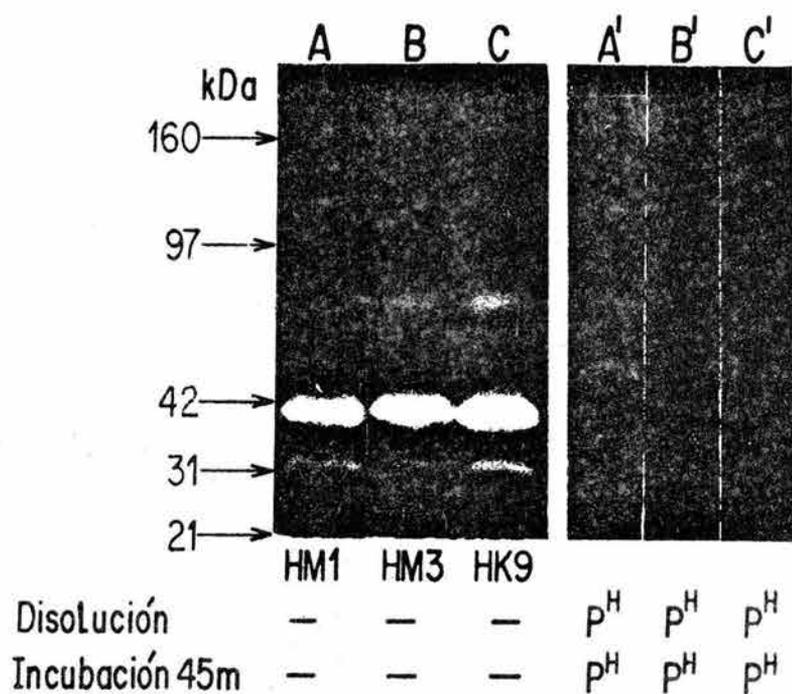


Fig 13. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. histolytica* en presencia o no de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en ausencia de pHMB: (A) HM1, (B) HM3, (C) HK9. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en presencia de pHMB 5 mM: (A') HM1, (B') HM3, (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

TABLA 19

ACTIVIDAD DE GELATINASAS  
DE TROFOZOITOS DE *E.*  
*histolytica* DISUELTOS-  
INCUBADOS SIN pHMB VS.  
DISUELTOS CON-INCUBADOS  
SIN pHMB

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin <sup>b</sup> /Con pHMB <sup>c</sup>		
	HM1	HM3	HK9
95	1/1	1/1	2/0
86	0/3	0/2	0/2
80	1/2	2/1	3/0
61	1/0	2/0	3/0
57	-	-	0/2
56	0/4	0/4	-
41	4/0	4/0	4/0
31	3/2	3/2	3/0
27	1/0	-	1/0

<sup>a</sup> -, ausente en ambos casos;  
0, ausente; 1, tenue; 2,  
poco intensa; 3, intensa;  
4, muy intensa

<sup>b</sup> Trofozoitos disueltos-  
incubados sin pHMB

<sup>c</sup> Trofozoitos disueltos con-  
incubados sin pHMB

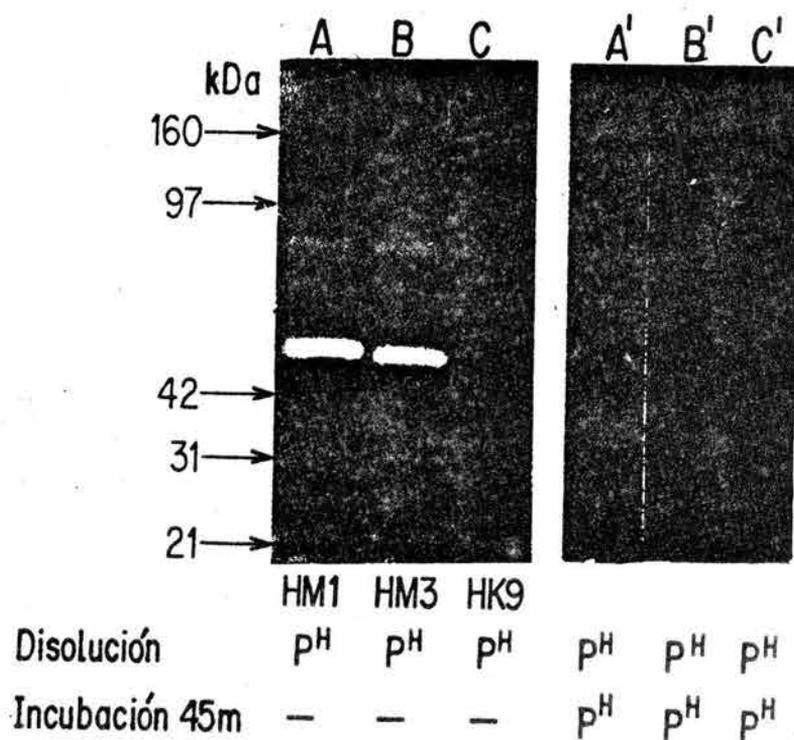


Fig 14. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoítos disueltos e incubación del gel en ausencia de pHMB: (A) HM1, (B) HM3, (C) HK9. Trofozoítos disueltos e incubación del gel en presencia de pHMB 5 mM: (A') HM1, (B') HM3, (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

#### d. Disolución sin-incubación con pHMB

##### 1) Disolución sin pHMB e incubación con pHMB

HK9 y HM3 tuvieron cinco gelatinasas cuyo orden de potencia fue 41 > 31 > 61 > 76 > 95 kDa. HM1 tuvo un patrón semejante, pero sin la banda de 95 kDa (Fig 15A, 15B Y 15C; Tabla 20).

La conclusión general de esta serie de experimentos con las cepas de *E. histolytica* es que los patrones de gelatinasas de los trofozoítos de *E. histolytica* HM1, HM3 y HK9 son diferentes si se agrega o no pHMB durante la lisis y durante la incubación de los geles de sustrato.

Esta conclusión general deriva de las siguientes conclusiones específicas

1) La mayor parte, sino es que toda la actividad de gelatinasas es cisteín-dependientes, ya que prácticamente se bloquéo, casi por completo, con pHMB añadido durante la lisis y la incubación

2) Las proteasas de no cisteín-dependientes más potentes en las cepas de *E. histolytica* (HM1, HM3 y HK9) son las de 56, 80 y 33 kDa, ya que no se llegaron a inhibir completamente en presencia de pHMB 5 mM durante la lisis y la incubación (Fig 13; Tabla 18).

TABLA 20

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
DISUELTOS-INCUBADOS SIN pHMB VS.  
DISUELTOS SIN-INCUBADOS CON pHMB

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin <sup>b</sup> / Con pHMB <sup>c</sup>		
	HM1	HM3	HK9
95	1/0	1/1	2/1
80	1/1	2/2	3/3
61	1/1	2/2	3/3
41	4/3	4/3	4/4
31	3/0	3/0	3/0
28	1/0	-	1/0

<sup>a</sup> -, ausente en ambos casos; 0, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa

<sup>b</sup> Trofozoítos disueltos-  
incubados sin pHMB

<sup>c</sup> Trofozoítos disueltos sin  
pHMB-incubados con pHMB

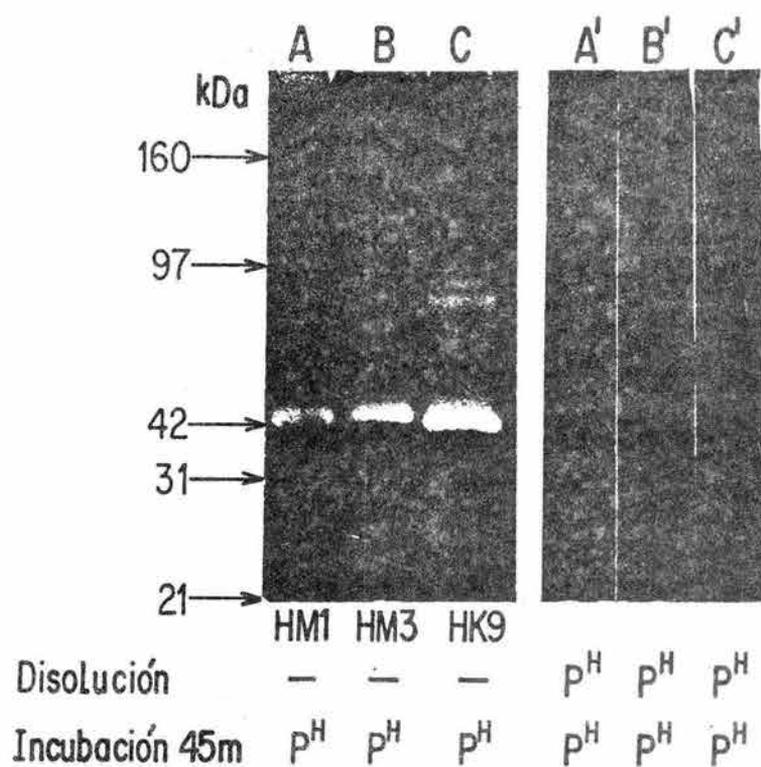


Fig 15. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia o no de pHMB 5 mM e incubación del gel en presencia de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. La corrida electroforética fue a 4°C y 60 V durante 8 h. Trofozoítos disueltos en ausencia de pHMB e incubación con pHMB 5 mM: (A) HM1, (B) HM3, (C) HK9. Trofozoítos disueltos e incubación del gel con pHMB 5 mM: (A') HM1, (B') HM3, (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en Fig 12.

e. **Disolución con o sin pHMB e incubación sin adiciones**

i) Disolución sin pHMB

HM1 y HK9 tuvieron seis gelatinasas cuyo orden de potencia para HM1 fue 41 > 31 > 76 > 28 > 95 > 65 kDa y para HK9 fue 41 > 76 > 31 > 61 > 28 > 95 kDa. HM3 tuvo un patrón semejante, pero sin la banda de 28 kDa (Fig 16A, 16B y 16C; Tabla 19).

ii) Disolución con pHMB

HM1 y HM3 tuvieron cinco gelatinasas cuyo orden de potencia fue 56 > 86 > 80 y 31 > 95 kDa. HK9 tuvo dos de 86 > 57 kDa (Fig 16A', 16B' 16C'; Tabla 19).

Las conclusiones de esta serie de experimentos son:

- 1) En estas condiciones HM1 y HM3 tienen cinco cistein-proteasas de 56 > 86 > 31 > 80 > 95 kDa; la más potente es la de 56 kDa. HK9 tiene dos proteasas muy tenues de 86 y 57 kDa.
- 2) En estas condiciones las bandas de gelatinasa son muy claras y nítidas, a diferencia de las obtenidas con los demás tratamientos (i. e. sin adicionar pHMB y adicionando 2ME) en que son difusas. 3) Las gelatinasas de muestras de HK9 sin pHMB (95, 80, 61 y 27 kDa) son más potentes que las de HM3, que a su vez son más potentes que las de HM1.
- 3) HM3 no tiene la gelatinasa de 27 kDa.

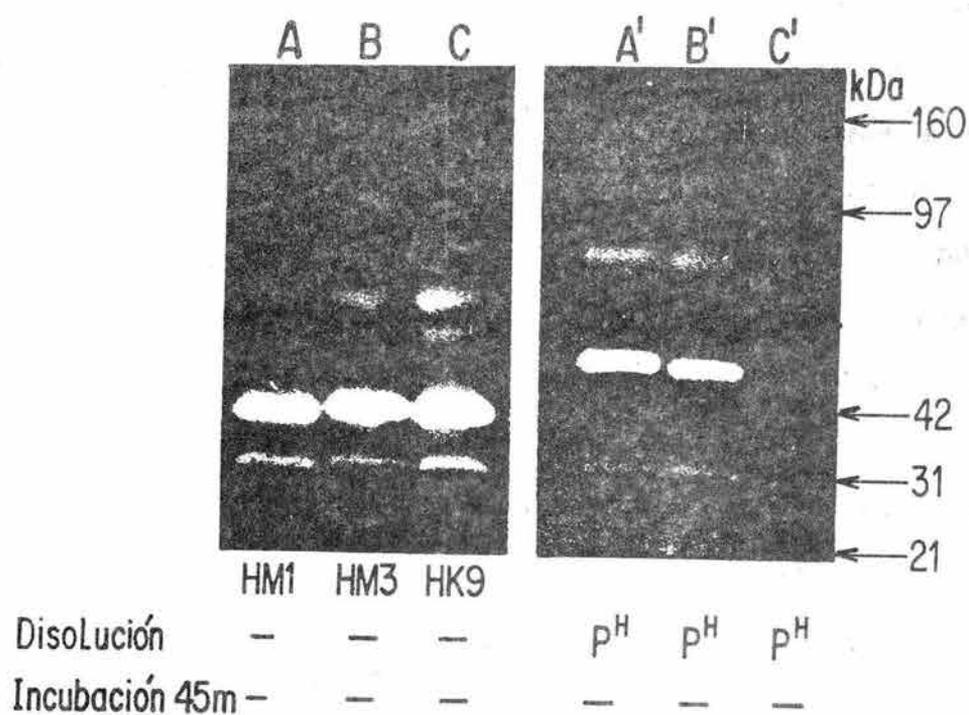


Fig 16. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. histolytica* en presencia o no de pHMB y posterior incubación del gel en ausencia de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos e incubación del gel sin pHMB: (A) HM1, (B) HM3, (C) HK9. Trofozoitos disueltos en presencia de pHMB e incubación del gel sin pHMB 5 mM: (A') HM1, (B') HM3, (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

**f. Disolución sin adiciones e incubación con o sin pHMB****i) Incubación sin pHMB**

HM1 y HK9 tuvieron seis gelatinasas cuyo orden de potencia fue para HM1 fue 41 > 31 > 80 > 27 > 95 > 65 kDa y para HK9 41 > 80 > 31 > 61 > 27 > 95 kDa. HM3 tuvo un patrón semejante, pero sin la banda de 27 kDa (Fig 17A, 17B y 17C; Tabla 20).

**ii) Incubación con pHMB**

HK9 tuvo cinco gelatinasas cuyo orden de potencia fue 41 > 31 > 61 > 80 > 95 kDa. HM1 y HM3 tuvieron un patrón de gelatinasas semejantes, pero sin la banda de 95 kDa (Fig 17A'; Tabla 20).

**g. Disolución con pHMB/PMSF e incubación en pHMB**

En estas condiciones, HM1, HM3 y HK9 tuvieron solamente dos gelatinasas tenues de 60 y 88 kDa y seis bandas remanentes de proteínas teñidas con Azul de Coomassie, de 144, 115 y 60 > 70 > 50 > 48 y 44 kDa (Fig 18A', 18B' y 18C'; Tabla 21).

Por estos datos concluyo que las tres cepas tienen dos proteasas de 60 y 88 kDa que son no cisteín-, ni serín-dependientes.

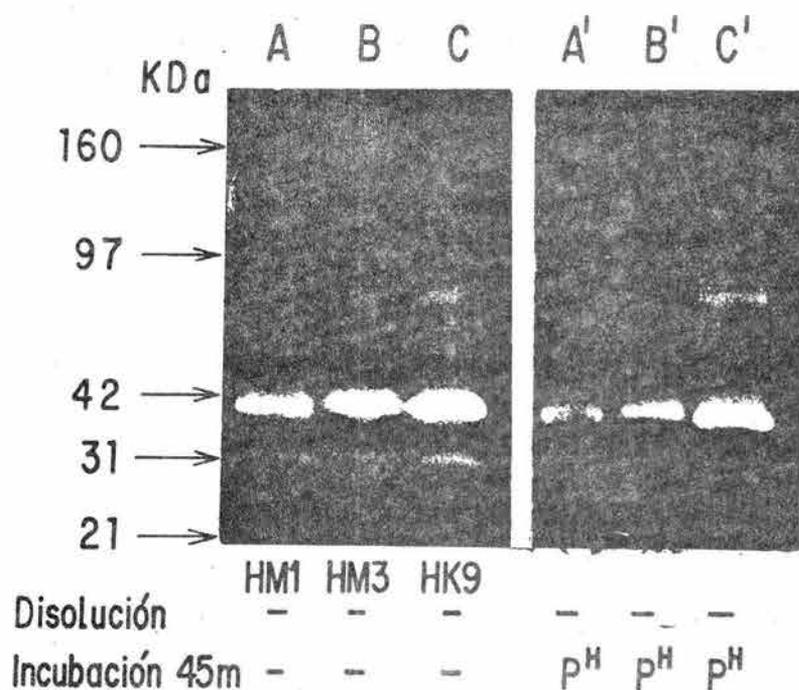


Fig 17. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. histolytica* en ausencia de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en ausencia de pHMB: (A) HM1, (B) HM3, (C) HK9. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en presencia de pHMB 5 mM: (A') HM1, (B') HM3 y (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

TABLA 21

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
DISUELTOS-INCUBADOS SIN ADICIONES  
VS. DISUELTOS CON (pHMB + PMSF)-  
INCUBADOS CON pHMB

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin <sup>b</sup> /Con (pHMB + PMSF) <sup>c</sup>				
	HM1	HM2	HM3	HM38	HK9
88	0/2	0/2	0/2	0/1	0/2
60	0/3	-	0/2	-	0/2

<sup>a</sup> 0, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa; -, ausente en ambos casos

<sup>b</sup> Trofozoitos disueltos-incubados sin adiciones

<sup>c</sup> Trofozoitos disueltos con (pHMB 5-10 mM + PMSF 2-4 mM)-incubados con pHMB 5-10 mM

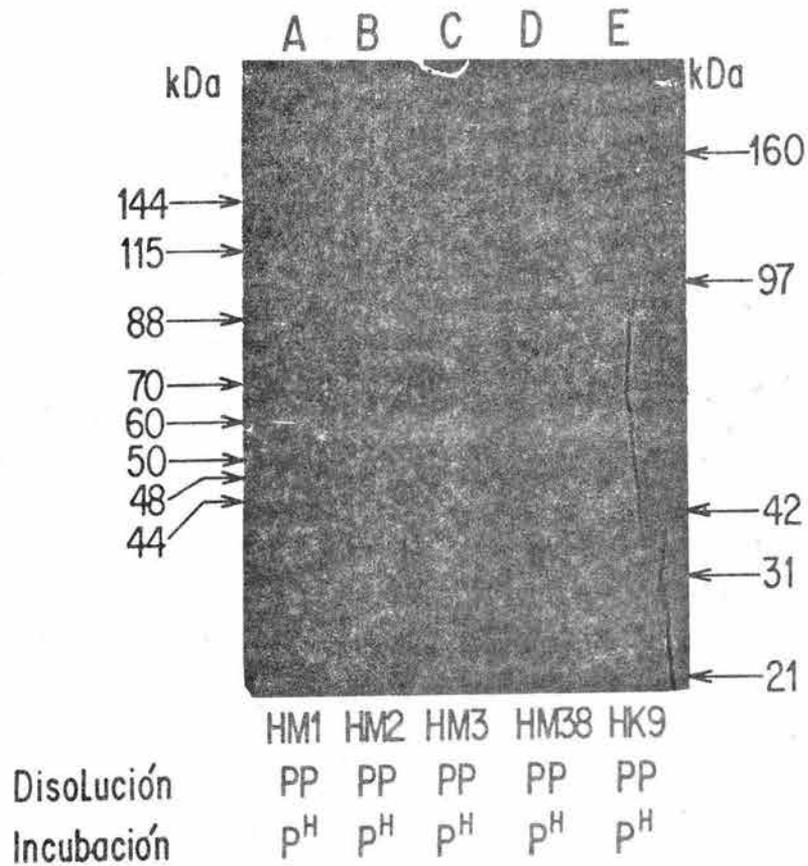


Fig 18. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. histolytica* en presencia de p<sup>H</sup>MB/PMSF y posterior incubación del gel en presencia de p<sup>H</sup>MSF 5 mM, sobre su actividad de gelatinasa. (A) HM1, (B) HM2, (C) HM3, (D) HM38 y (E) HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

#### h. Disolución con o sin 2ME e incubación sin adiciones

##### i) Disolución sin 2ME

HM1 y HK9 tuvieron seis gelatinasas cuyo orden de potencia para HM1 fue 41 > 31 > 80 > 27 > 95 > 61 kDa, y para HK9 fue 41 > 80 > 31 > 61 > 27 > 95 kDa. HM3 tuvo un patrón semejante al de HM1 y HK9, pero sin la banda de 27 kDa (Fig 19A, 19B y 19C; Tabla 22).

##### ii) Disolución con 2ME

HM1 tuvo cuatro gelatinasas con orden de potencia 41 > 31 > 27 > 95 kDa (Fig 19A'; Tabla 22). HM3 tuvo cinco gelatinasas de 41 > 31 > 56 > 80 y 95 kDa (Fig 19B'; Tabla 22). HK9 tuvo seis gelatinasas de 41 > 31 > 27 > 56 > 80 y 95 kDa (Fig 19C'; Tabla 22). En los lisados de HM3 y HK9 apareció una banda de 56 kDa, ausente de muestras sin 2ME; en las mismas muestras sin adiciones hubo una banda de 61 kDa con potencia semejante a la de 56 kDa (Fig 19B y 19C; Tabla 22). HM1 no tuvo la banda de 56 kDa y la de 80 kDa era muy tenue.

Las conclusiones de esta serie de experimentos son:

- 1) En estas condiciones, en las tres cepas (HM1, HM3 y HK9) no son aparentes las gelatinasas de mayor peso molecular (95, 80 y 61 kDa) que están presentes en los lisados correspondientes sin 2ME (Fig 19).
- 2) La gelatinasa de 61 kDa de HM3 y HK9 tal vez tiene enlaces

TABLA 22

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
DISUELTOS-INCUBADOS SIN 2ME  
VS. DISUELTOS CON-INCUBADOS  
SIN 2ME

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin <sup>b</sup> / Con 2ME <sup>c</sup>		
	HM1	HM3	HK9
95	1/1	1/1	2/1
80	1/0	2/1	3/1
61	1/0	2/0	3/0
56	-	0/1	0/2
41	4/2	4/3	4/4
31	3/2	3/2	3/3
27	1/1	-	1/3

<sup>a</sup> -, ausente en ambos casos;  
0, ausente; 1, tenue; 2,  
poco intensa; 3, intensa;  
4, muy intensa

<sup>b</sup> Trofozoitos disueltos-  
incubados sin 2ME

<sup>c</sup> Trofozoitos disueltos  
con-incubados sin 2ME

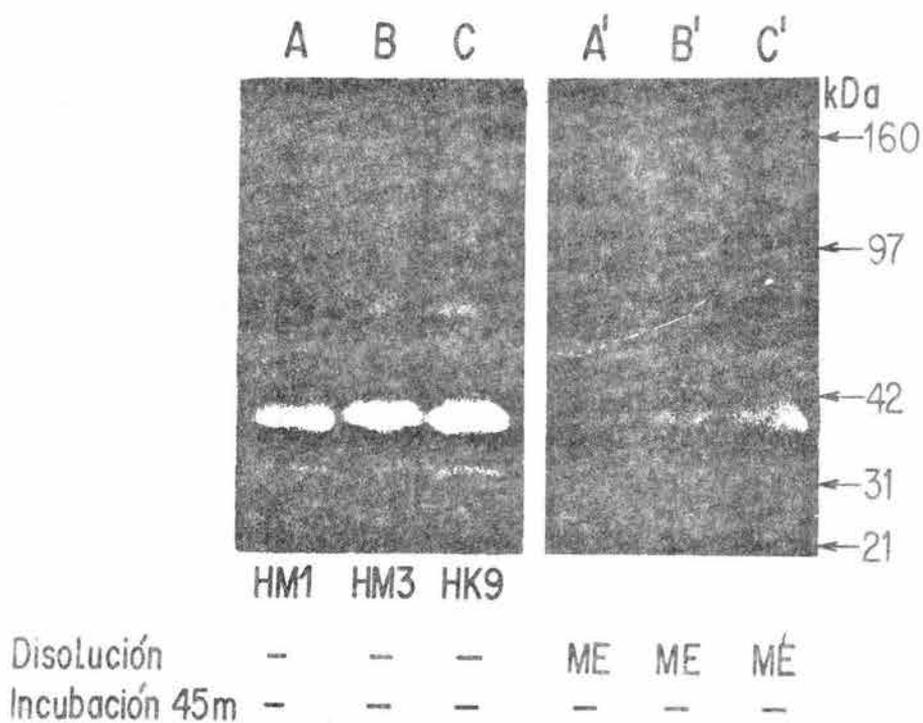


Fig 19. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. histolytica* en presencia o no de 2ME 143 mM y posterior incubación del gel en ausencia de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos e incubación del gel sin adiciones: (A) HM1, (B) HM3, (C) HK9. Trofozoitos disueltos en 2ME 143 mM e incubación del gel en ausencia de pHMB: (A') HM1, (B') HM3, (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

disulfuro intramoleculares y con 2ME estos enlaces parecen romperse, cambiando el peso aparente de 61 kDa a 56 kDa.

#### **h. Disolución con pHMB e incubación con pHMB ó DTT**

##### **i) Incubación con pHMB**

Las tres cepas tuvieron tres gelatinasa, cuyo orden de intensidad fue 56 > 80 > 33 kDa (Fig 20; Tabla 23)

##### **ii) Incubación con DTT**

HM1 tuvo seis gelatinasas de 56 > 33 > 80 > 31 = 41 = 61 kDa; HM3 tuvo ocho gelatinasas de 56 > 33 > 80 > 109 > 61 > 127 > 147 kDa y HK9 tuvo siete gelatinasas de 56 > 33 > 80 > 31 = 41 = 61 > 109 kDa (Fig 20; Tabla 23).

#### **i. Disolución con pHMB e incubación con pHMB ó 2ME**

##### **i) Incubación con pHMB**

Las tres cepas tuvieron tres gelatinasa, cuyo orden de intensidad fue 56 > 80 > 33 kDa y ocho bandas de proteínas remanentes (teñidas con Azul de Coomassie) con orden de intensidad 54 > 35 > 27 > 90 > 118 > 140 > 155 > 167 kDa, las bandas de 155 y 167 eran difusas en HM3 y HM1, las de 118 y 140 kDa eran difusas en HK9 (Fig 21; Tabla 24).

##### **ii) Incubación con 2ME**

HM1 tuvo cinco gelatinasas de 56 > 80 > 33 > 41 > 70 kDa, HM3 tuvo siete gelatinasas de 56 > 80 > 95 = 70 > 33 > 41 kDa y HK9 tuvo cuatro gelatinasas de 56 > 80 > 33 > 41 kDa (Fig 21; Tabla 24).

TABLA 23

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
DISUELTOS-INCUBADOS CON pHMB  
VS. DISUELTOS CON pHMB-  
INCUBADOS CON DTT

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Con pHMB <sup>b</sup> / Con DTT <sup>c</sup>		
	HM1	HM3	HK9
147	-	0/1	-
127	-	0/2	-
109	-	0/3	-
80	3/3	2/2	2/2
61	0/1	1/0	0/1
56	4/4	3/3	3/3
41	0/1	-	0/1
33	3/2	3/2	3/2
31	0/2	-	0/2

<sup>a</sup> -, ausente en ambos casos;  
0, ausente; 1, tenue; 2,  
poco intensa; 3, intensa;  
4, muy intensa

<sup>b</sup> Trofozoitos disueltos con  
pHMB-incubados sin DTT

<sup>c</sup> Trofozoitos disueltos con  
pHMB-incubados con DTT

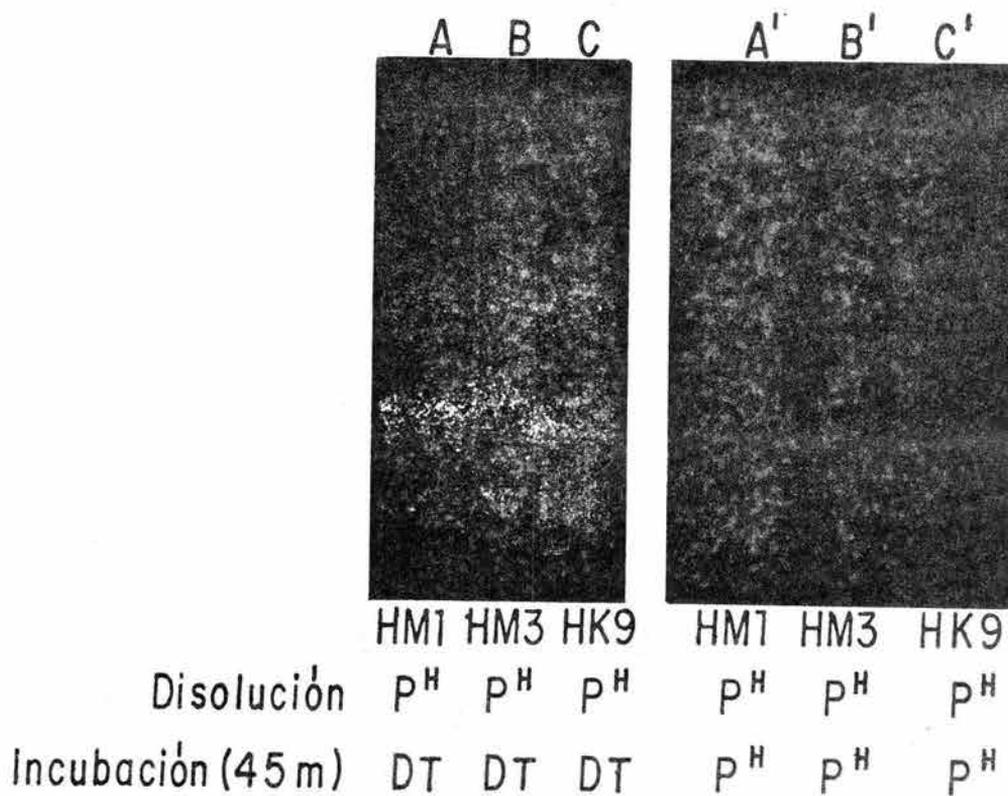


Fig 20. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de pHMB y posterior incubación del gel en DTT o pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoítos disueltos en pHMB 10 mM e incubación del gel en DTT 2 mM: (A) HM1, (B) HM3 y (C) HK9. Trofozoítos disueltos e incubación del gel en presencia de pHMB 10 mM: (A') HM1, (B') HM3 y (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

TABLA 24

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. histolytica*  
DISUELTOS-INCUBADOS CON pHMB  
VS. DISUELTOS CON pHMB-  
INCUBADOS CON 2ME

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Con pHMB <sup>b</sup> / Con 2ME <sup>c</sup>		
	HM1	HM3	HK9
95	-	0/2	-
80	3/3	2/2	2/2
70	0/1	0/1	-
61	-	0/1	-
56	4/4	3/3	3/3
41	0/1	0/1	0/1
33	3/2	3/2	3/2
31	0/	-	0/

<sup>a</sup> -, ausente en ambos casos;

0, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa

<sup>b</sup> Trofozoitos disueltos con pHMB-incubados sin 2ME

<sup>c</sup> Trofozoitos disueltos con pHMB-incubados con 2ME

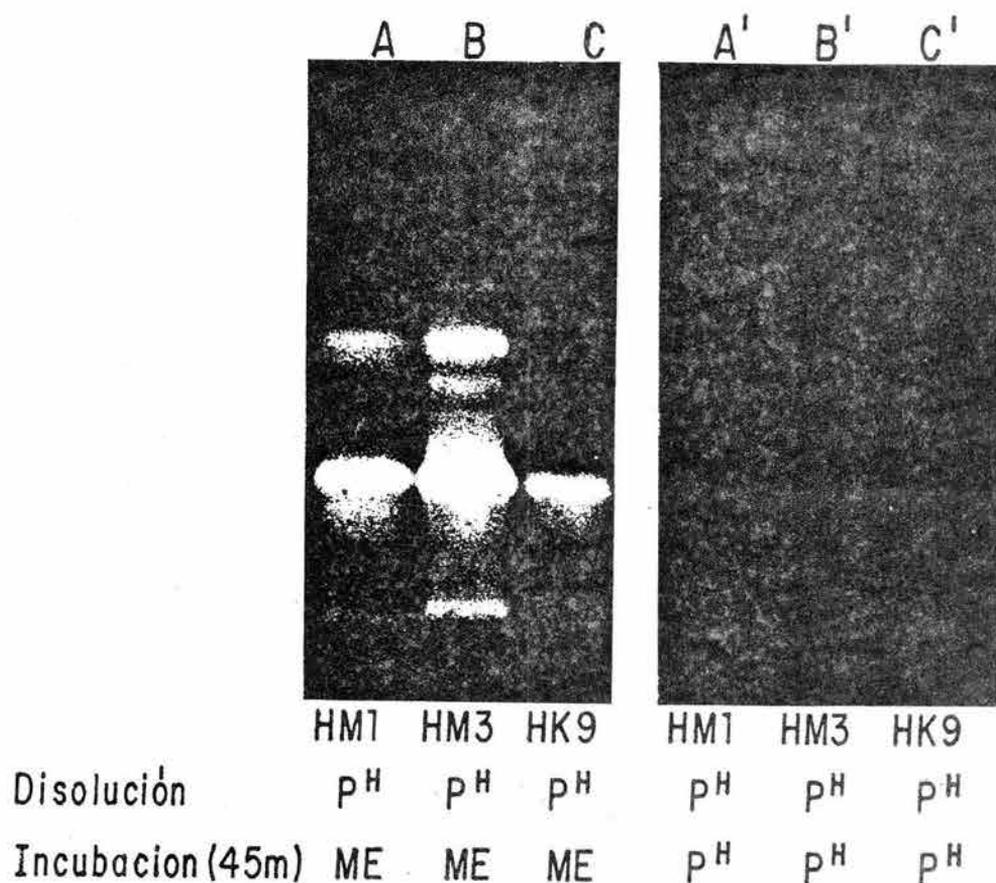


Fig 21. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. histolytica* en presencia de pHMB y posterior incubación del gel en 2ME o pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos en pHMB 5 mM e incubación del gel en 2ME: (A) HM1, (B) HM3 y (C) HK9. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en pHMB 10 mM: (A') HM1, (B') HM3 y (C') HK9. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

De estos experimentos con activadores obtuvimos las siguientes conclusiones:

- 1) Las proteasas de 56, 80 y 33 kDa parecen ser cisteín-dependientes parcialmente inhibidas, por que se reactivan con DTT y 2ME. Las bandas de 56 y 80 kDa podrían contener gelatinasas cisteín- y no cisteín- dependientes porque en presencia de pHMB se inhiben las primeras (disminuyendo la potencia de éstas) y no las segundas (Figs 20 y 21).
- 2) Las gelatinasas de HM1 son más potentes que las de HM3 y estas a su vez son más potentes que las de HK9.
- 3) En HM3 se reactivan cuatro CP de 109, 127, 147 y 170 kDa, no detectables en HM1 y HK9.

## 2. Lisados de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo

Utilizando geles de sustrato con gelatina, con péptidos sintéticos, o con ambos, en algunas especies de *Trichomonas* se ha demostrado actividad autoproteolítica inhibible por agentes alquilantes de grupos sulfhidrilo (Lockwood et al., 1987; North et al., 1990).

Por los resultados ya mostrados, de que los lisados de *E. invadens* PZ e IP101, *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo también tienen actividad autoproteolítica mediada por CP, decidí caracterizar la actividad proteolítica de estas cepas que crecen a temperatura ambiente, en geles de

sustrato.

Disolví los trofozoítos en RL con o sin pHMB, con 2ME, o con la mezcla pHMB/PMSF y almacené los lisados a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Hice corridas electroforéticas a  $4^{\circ}\text{C}$  y 60V y lavé e incubé los geles de sustrato como los de los lisados de *E. histolytica*. Por otra parte, como las muestras con  $2 \times 10^5$  trofozoítos dieron un patrón electroforético a la vez suficientemente intenso y nítido, decidí emplear la misma cantidad de trofozoítos en todos los experimentos de esta etapa.

#### a. Disolución con o sin pHMB e incubación sin adiciones

##### i) Disolución sin pHMB

PZ tuvo ocho gelatinasas con orden de potencia 69 > 48 > 40 > 84 > 36 > 32 > 28 kDa (Fig 22A; Tabla 25). IP101 tuvo cinco gelatinasas de 70 > 36 > 32 > 88 > 69 (Fig 22B; Tabla 25). FIC tuvo seis gelatinasas de 32 > 76 > 70 > 69 > 40 > 30 kDa (Fig 22C; Tabla 25). Laredo tuvo tres gelatinasas de 70 > 40 > 32 kDa (Fig 22D; Tabla 25).

##### ii) Disolución con pHMB

PZ tuvo seis gelatinasas con orden de potencia 69 > 59 > 50 > 74 > 76 > 175 kDa (Fig 22A'; Tabla 25). IP101 tuvo seis gelatinasas con orden de potencia 65 > 59 > 40 > 70 > 84 kDa (Fig 22B'; Tabla 25). FIC tuvo seis gelatinasas de 76 > 70 > 65 > 32 > 59 > 40 kDa (Fig 22C'; Tabla 25). Laredo tuvo tres gelatinasas de 70 > 43 > 50 kDa (Fig 22D'; Tabla 25).

**TABLA 25**  
**ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE**  
**TROFOZOITOS DE *E. invadens*, *E.***  
***moshkovskii* Y *E. histolytica*-LIKE,**  
**DISUELTOS-INCUBADOS SIN ADICIONES VS.**  
**DISUELTOS CON-INCUBADOS SIN pHMB**

Bandas* (kDa)	Sin <sup>b</sup> /Con pHMB <sup>c</sup>			
	PZ	IP101	FIC	Laredo
175	0/1	-	-	-
171	-	0/1	-	-
102	1/0	-	-	-
88	-	1/0	-	-
84	3/0	0/1	-	-
76	0/1	-	1/3	-
74	0/1	-	-	-
70	-	2/1	2/2	1/2
69	4/3	1/0	2/0	-
65	-	0/3	1/2	-
59	0/2	0/2	0/1	-
50	0/2	-	-	0/1
48	3/0	-	-	-
43	-	-	-	0/2
40	3/0	0/2	1/1	1/0
36	2/0	1/0	-	-
32	1/0	1/1	3/2	1/0
28	1/0	-	1/0	-

\*0, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa; -, ausente en ambos casos

<sup>b</sup>Trofozoitos disueltos-incubados sin adiciones

<sup>c</sup>Trofozoitos disueltos con-incubados sin pHMB

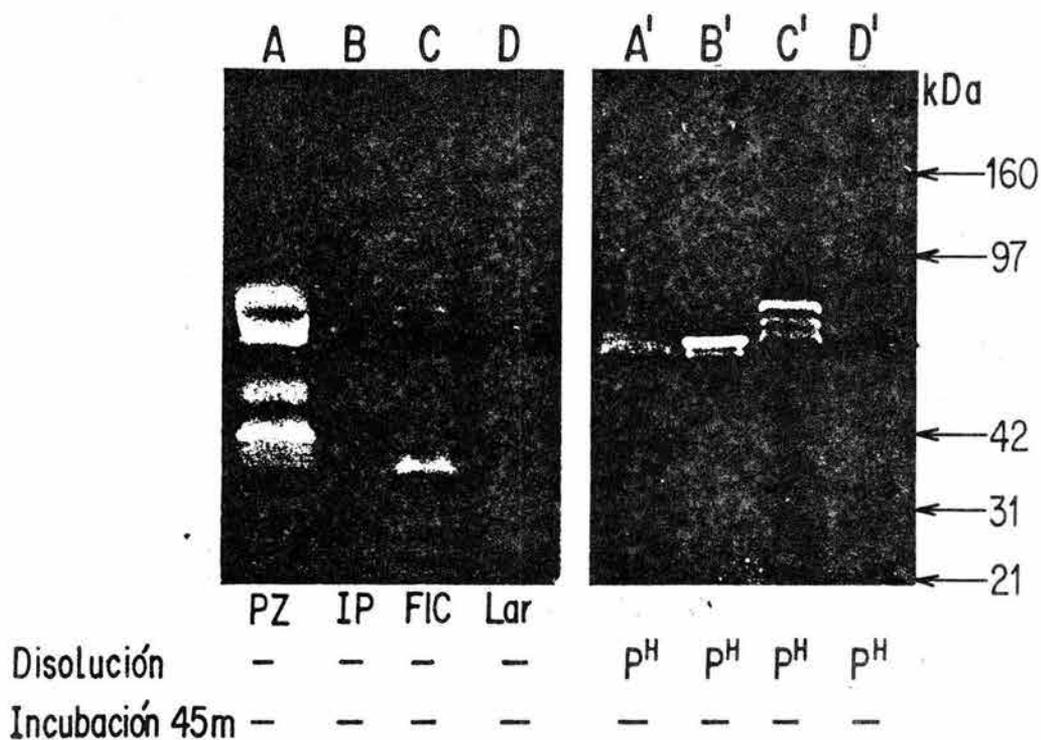


Fig 22. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. invadens*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica*-like en presencia o no de pHMB y posterior incubación del gel sin pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en ausencia de pHMB 5 mM: (A) PZ, (B) IP101, (C) FIC, (D) Laredo. Trofozoitos disueltos en pHMB 5 mM e incubación del gel sin pHMB: (A') PZ, (B') IP101, (C') FIC, (D') Laredo. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

## b. Disolución sin pHMB e incubación con o sin pHMB

### i) Incubación sin pHMB

PZ tuvo ocho gelatinasas con orden de potencia 69 > 48 > 40 > 84 > 36 > 32 > 28 kDa (Fig 23A; Tabla 26). IP101 tuvo cinco gelatinasas de 70 > 36 > 32 > 88 > 69 (Fig 23B; Tabla 26). FIC tuvo seis gelatinasas de 32 > 76 > 70 > 69 > 40 > 30 kDa (Fig 23C; Tabla 26). Laredo tuvo tres gelatinasas de 70 > 40 > 32 kDa (Fig 23D; Tabla 26).

### ii) Incubación con pHMB

PZ tuvo siete gelatinasas de 54 > 65 > 61 > 43 > 80 > 48 > 40 kDa (Fig 23A'; Tabla 26). IP101 tuvo seis gelatinasas de 65 > 88 > 64 > 54 > 43 > 40 kDa (Fig 23B'; Tabla 26). FIC tuvo cuatro gelatinasas de 74 > 65 > 40 > 69 kDa (Fig 23C'; Tabla 26). Laredo tuvo dos gelatinasas muy tenues de 69 > 48 kDa (Fig 23D'; Tabla 26).

Tabla 26

## c. Disolución con 2ME e incubación sin adiciones

### i) Disolución sin 2ME

PZ tuvo ocho gelatinasas con orden de potencia 69 > 48 > 40 > 84 > 36 > 32 > 28 kDa (Fig 24A; Tabla 27). IP101 tuvo cinco gelatinasas de 70 > 36 > 32 > 88 > 69 (Fig 24B; Tabla 27). FIC tuvo seis gelatinasas de 32 > 76 > 70 > 69 > 40 > 30 kDa (Fig 24C; Tabla 27). Laredo tuvo tres gelatinasas de 70 > 40 > 32 kDa (Fig 24D; Tabla 27).

TABLA 26

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. invadens*, *E.*  
*moshkovskii* Y *E. histolytica*-LIKE,  
DISUELTOS-INCUBADOS SIN ADICIONES VS.  
DISUELTOS SIN-INCUBADOS CON pHMB

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin <sup>b</sup> /Con pHMB <sup>c</sup>			
	PZ	IP101	FIC	Laredo
102	1/0	-	-	-
88	-	1/2	-	-
84	3/0	-	-	-
80	0/3	-	-	-
74	-	-	0/3	-
70	-	2/0	2/0	1/0
69	4/0	1/0	2/1	0/1
65	0/4	0/2	1/2	-
64	-	0/1	-	-
61	0/3	-	-	-
54	0/4	0/1	-	-
48	3/2	-	-	0/1
43	0/3	0/1	-	-
40	3/1	0/1	1/2	1/0
36	2/0	1/0	-	-
32	1/0	1/0	3/0	1/0
28	1/0	-	1/0	-

<sup>a</sup> 0, ausente; 1, tenue; 2, poco intensa; 3, intensa; 4, muy intensa; -, ausente en ambos casos

<sup>b</sup> Trofozoitos disueltos-incubados sin pHMB

<sup>c</sup> Trofozoitos disueltos sin-incubados con pHMB

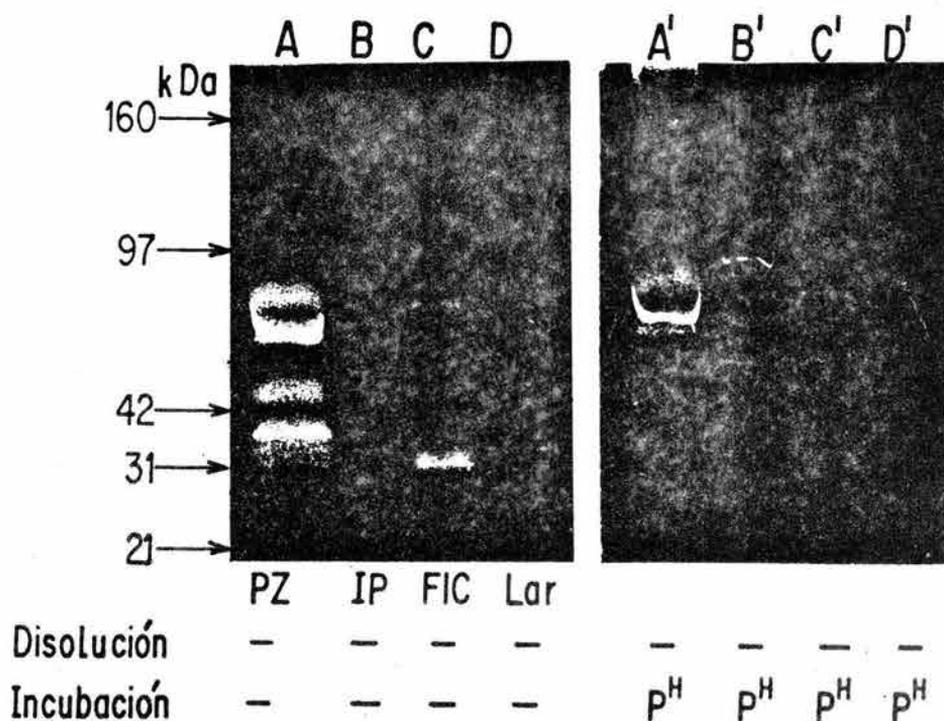


Fig 23. Efecto de la disolución de trofozoitos de *E. invadens*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica-like* en ausencia de pHMB y posterior incubación del gel en presencia o no de pHMB, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoitos disueltos e incubación del gel en ausencia de pHMB: (A) PZ, (B) IP101, (C) FIC, (D) Laredo. Trofozoitos disueltos en ausencia de pHMB e incubación del gel en pHMB 5 mM: (A') PZ, (B') IP101, (C') FIC, (D') Laredo. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

TABLA 27

ACTIVIDAD DE GELATINASAS DE  
TROFOZOITOS DE *E. invadens*, *E.*  
*moshkovskii* Y *E. histolytica*-LIKE,  
DISUELTOS-INCUBADOS SIN ADICIONES VS.  
DISUELTOS CON-INCUBADOS SIN 2ME

Bandas <sup>a</sup> (kDa)	Sin <sup>b</sup> /Con 2ME <sup>c</sup>			
	PZ	IP101	FIC	Laredo
102	1/2	-	-	-
88	-	1/0	-	-
84	3/0	-	-	-
80	0/3	0/1	-	-
70	-	2/0	2/2	1/0
69	4/0	1/0	2/0	-
67	0/2	0/3	0/2	-
62	0/2	-	0/1	0/1
55	0/4	-	-	-
48	3/3	0/2	-	-
40	3/3	-	1/0	1/2
36	2/0	1/2	0/3	-
32	1/1	1/2	3/2	1/0
28	1/1	-	1/2	0/3

<sup>a</sup> 0, ausente; 1, tenue; 2, poco  
intensa; 3, intensa; 4, muy  
intensa; -, ausente en ambos casos

<sup>b</sup> Trofozoítos disueltos-incubados  
sin adiciones

<sup>c</sup> Trofozoítos disueltos con-  
incubados sin 2ME

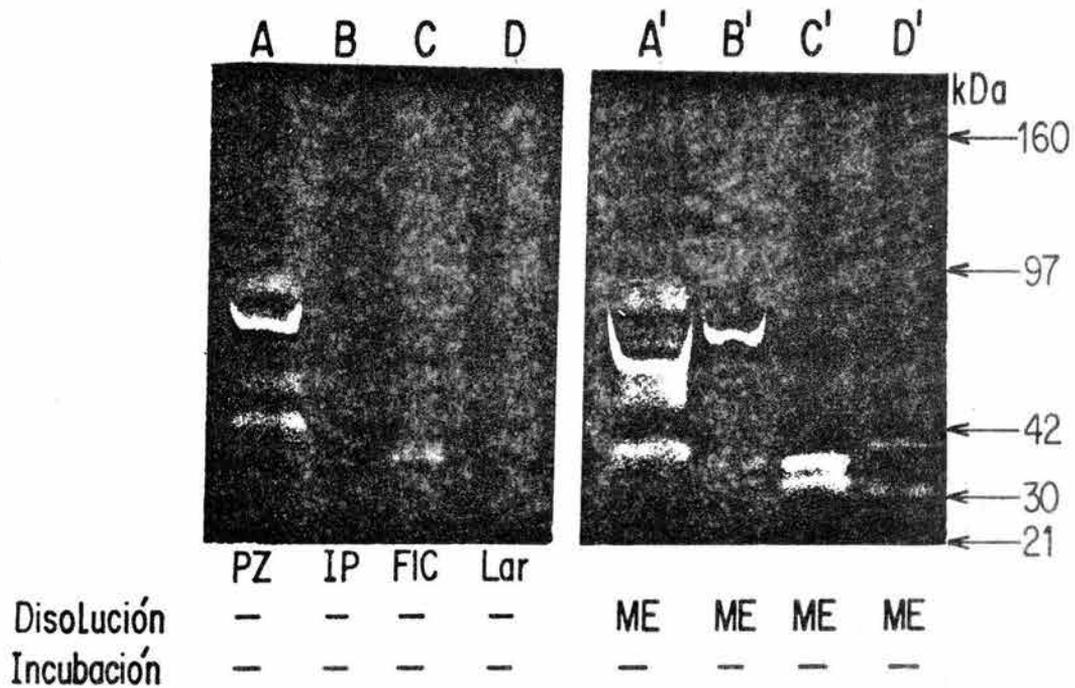


Fig 24. Efecto de la disolución de trofozoítos de *E. E. invadens*, *E. moskovskii* y *E. histolytica*-like en presencia o no de 2ME y posterior incubación del gel sin adiciones, sobre su actividad de gelatinasa. Trofozoítos disueltos e incubación del gel en ausencia de 2ME 143 mM: (A) Trofozoítos disueltos e incubación del gel en ausencia de 2ME 143 mM: (A) PZ, (B) IP101, (C) FIC, (D) Laredo. Trofozoítos disueltos en presencia de 2ME e incubación del gel sin adiciones: (A') PZ, (B') IP101, (C') FIC, (D') Laredo. Obtención de las amibas, electroforesis, lavado, incubación y tinción de los geles como en la Fig 12.

ii) Disolución con 2ME

PZ tuvo nueve gelatinasas con orden de potencia de 55 > 80 > 48 > 40 > 102 > 67 > 62 > 32 > 55 kDa (Fig 24A'; Tabla 27). IP101 tuvo cinco gelatinasas de 67 > 48 > 36 > 32 > 80 kDa (Fig 24B'; Tabla 27). FIC tuvo seis gelatinasas de 36 > 70 > 67 > 32 > 28 kDa (Fig 24C'; Tabla 27). Laredo tuvo tres gelatinasas de 28 > 40 > 62 kDa (Fig 24D'; Tabla 27).

La conclusión general de esta serie de experimentos con las cepas de temperatura ambiente es que las cepas son diferentes. Esta conclusión general se debe a las siguientes conclusiones especiales:

- 1) PZ tiene mayor actividad proteolítica que IP101 y los patrones de ambas cepas son diferentes (pesos moleculares, nitidez de las bandas de proteasas), a pesar de que se afirma que ambas cepas son de la misma especie.
- 2) En PZ destaca la gelatinasa de 69 kDa y en IP101 la de 70 kDa.
- 3) PZ tiene al parecer dos cisteín-proteasas de 40 y 48 kDa e IP101 tiene dos de 32 y 36 kDa, ya que se inhiben con pHMB y se reactivan con 2ME.
- 4) FIC tiene una sola cisteín-proteasa de 28 kDa (inhibible con pHMB y reactivada con 2ME).
- 5) Laredo tiene una cisteín- proteasa de 40 kDa, (se inhibe

con pHMB y es reactivada con 2ME 143 mM)

6) PZ tiene cinco gelatinasas que podrían ser no cistein-dependientes; destacan las de 65 y 59 kDa.

7) IP101 tiene siete gelatinasas que podrían ser no cistein-dependientes; destaca la de 65 kDa.

8) FIC tiene cinco gelatinasas que podrían ser no cistein-dependientes, destaca la de 64 kDa.

9) Las proteasas de 84 y 69 kDa de PZ parecen tener enlaces disulfuro intramoleculares ya que al ser tratadas con 2ME cambian su movilidad electroforética y por lo tanto sus pesos moleculares aparentes (84 kDa a 80 kDa y de 69 kDa a 67 y 62 kDa).

10) La proteasa de 70 kDa de Laredo parece tener enlaces disulfuro intramoleculares ya que al ser tratadas con 2ME cambian su movilidad electroforética y sus peso molecular aparentes de 70 kDa a 62 kDa.

## DISCUSION

Cuando deseamos realizar experimentos con las proteínas amibianas, encontramos el problema de la autoproteólisis inmediata y extensiva en los lisados. Avila et al. (1985) encontraron que esta autoproteólisis se inhibe con bloqueadores de grupos sulfhidrilo, se reactiva con agentes reductores y se estimula con SDS.

Por otra parte, recientemente Canto Ortiz (1990) encontró que cuando los trofozoitos de la cepa HK9 de *E. histolytica* se lisan con SDS, quedan tres bandas principales remanentes de la autoproteólisis inmediata, con pesos moleculares de 31, 45 y 64 kDa. También encontró que las bandas de 31 y 45 kDa tienen actividad de gelatinasa y aparentemente son CP.

Por estos antecedentes nuestro trabajo se enfocó a tres aspectos: i) la caracterización de la actividad autoproteolítica en varias cepas de *E. histolytica* y otras especies del género *Entamoeba*, ii) análisis de la relación de la autoproteólisis inmediata con la actividad de CP y iii) la caracterización de las CP más potentes de *E. histolytica*.

### Autoproteólisis inmediata en *E. histolytica*

#### **Efecto de inhibidores y activadores**

Los patrones electroforéticos de los lisados amibianos

(obtenidos en regulador de lisis sin inhibidores de proteasas) de las tres cepas de *E. histolytica* utilizadas fueron similares, con cinco bandas remanentes, tres de las cuales (30, 33 y 41 kDa) fueron más intensas. Esta diferencia de pesos moleculares en las proteínas remanentes con los obtenidos por Canto Ortiz (1990) (31, 45 y 64 kDa) puede deberse a la temperatura de corrida de los geles, ya que ella los hizo a 25°C y nosotros a 4°C; a 4°C la actividad de la CP podría determinar un procesamiento diferente de las proteínas remanentes en los lisados.

Los patrones electroforéticos de los lisados de trofozoítos adicionados con pHMB fueron complejos y similares, con más de 30 bandas teñidas con Azul de Coomassie. Así confirmamos que en varias cepas de *E. histolytica* de virulencia diferente la autoproteólisis se inhibe con bloqueadores de grupos sulfhidrilo y genera proteínas remanentes similares.

Los patrones de los lisados obtenidos con 2ME fueron semejantes a los obtenidos sin adiciones, aunque más tenues (Figs 3 y 6; Tablas 7 y 8). Esta disminución en el contenido de proteínas teñidas con Azul de Coomassie puede deberse a que las CP se activan con el 2ME (Lehninger, 1980). North (1982), dice que las CP se caracterizan por ser inhibidas con bloqueadores de grupos sulfhidrilo, pero sobre todo

porque se reactivan con agentes reductores como el 2ME y el DTT. Avila (1982) sugiere que los grupos -SH del sitio activo de las CP pudieran estar bloqueados por metales pesados presentes como impurezas en el medio, los cuales podrían ser desplazados por compuestos ricos en grupos sulfhidrilo libres.

Cuando adicionamos PMSF, obtuvimos patrones similares en los lisados de las tres cepas, con dos bandas remanentes principales de 33 y 41 kDa. Este patrón electroforético, diferente al obtenido sin adiciones y con 2ME, podría ser debido a que el PMSF inhibe la actividad proteolítica en un 15-35% (Avila et al., 1985; Canto Ortiz 1990).

Con estos resultados confirmamos que la autoproteólisis que ocurre en los lisados de trofozoítos amibianos obtenidos con SDS al 2% es inmediata y extensiva, similar en las tres cepas analizadas y debida principalmente a actividad proteolítica cisteín-dependiente ya que se inhibe con pHMB y aumenta con 2ME.

#### **Efecto de la temperatura de almacenamiento y de la ebullición**

Los lisados frescos no hervidos de las tres cepas de *E. histolytica* que primero fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  tuvieron un patrón similar, con cuatro bandas remanentes

entre las que destacó la de 113 kDa. Sin embargo, cuando los mismos lisados fueron almacenados y luego hervidos, obtuvimos cinco bandas remanentes de pesos moleculares más bajos (25, 30, 33, 41 y 56 kDa; Figs 3, 4 y 6). Estos resultados pueden explicarse con dos modelos alternativos ya sugeridos por Canto Ortiz (1990) para la cepa HK9; i) Modelo 1: la proteína de 113 kDa es oligomérica y al calentarla se disocia en las subunidades correspondientes de 30, 33 y 56 kDa, o bien, ii) Modelo 2: las proteínas de 56, 41, 33, 30 y 25 kDa resultan de proteólisis controlada de la de 113 kDa.

Algo similar reportan Lushbaugh et al. (1985), quienes de lisados de *E. histolytica* purificaron una CP de 16 kDa, además de otras dos de 33 y 48 kDa que se encontraban en menor proporción. Sugirieron que la de 16 kDa podría resultar de la disociación de dímeros (33 kDa) o trímeros (48 kDa) unidos por puentes disulfuro.

Cuando los lisados de las tres cepas se obtuvieron en presencia de pHMB, luego fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por varios días sin hervir y finalmente se analizaron en SDS-PAGE, dieron un patrón simple con pocas bandas remanentes, de 25, 30, 33 y 56 kDa (Fig 4; Tabla 8). Este efecto podría deberse a que el pHMB no inhibe totalmente la autoproteólisis y por lo tanto para lograr la inhibición completa deben también hervirse las muestras antes de almacenarlas. Por

otro lado, la temperatura de almacenamiento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) seguramente no evita que haya procesamiento de las proteínas. Con estos datos confirmamos lo que ya habían descrito Avila (1982) y Canto Ortiz (1990), quienes encontraron que es necesario hervir los lisados inmediatamente después de añadir el regulador de lisis con pHMB para inhibir total e irreversiblemente la autoproteólisis inmediata.

De estos resultados concluimos que la temperatura apropiada de almacenamiento de los lisados con y sin inhibidores es de  $-196^{\circ}\text{C}$ , ya que la autoproteólisis sigue ocurriendo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . También podemos decir que la ebullición provoca la disociación de la principal proteína de oligomérica de 113 kDa, que se disocia en otras tres proteínas de menor peso molecular.

### Autoproteólisis inmediata en especies no-histolytica

#### Efecto de la temperatura de almacenamiento y la ebullición

##### 1. *E. invadens* PZ e IP101

Los patrones electroforéticos de los lisados amibianos de *E. invadens* PZ e IP101 sin adiciones y almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$ , fueron similares. Entre las bandas principales remanentes de ambas cepas destacaron la de 99 kDa y otras dos menos intensas, de 90 y 121 kDa.

La banda de 99 kDa de PZ fue más intensa que la de IP101, pero cuando se hirvieron los lisados (PZ e IP101) quedó sólo una banda remanente de 37 kDa (Fig 8; Tablas 10 y 11). Estos resultados podrían explicarse si la proteína de 99 kDa fuese oligomérica y al calentarla se disociara en subunidades de 37 kDa, o bien, que estas resultaran de la proteólisis.

Cuando almacenamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  los lisados no hervidos, obtuvimos patrones de proteínas similares para PZ e IP101; PZ tuvo cuatro proteínas remanentes, destacando las de 121 kDa (muy tenue en IP101) y 99 kDa. Cuando hervimos los lisados de ambas cepas, prevaleció la banda de 121 kDa, desapareció la de 99 kDa, apareció una de 90 kDa y aumentaron de intensidad las dos de bajo peso molecular, de 22 y 23 kDa, quizás por desagregación de las moléculas de mayor peso molecular (121 y 99 kDa) para generar las de menor peso molecular (22 y 23 kDa (Fig 9; Tablas 10 y 11).

Las bandas de menor peso molecular en lisados almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  podrían ser productos de la autoproteólisis de las de mayor peso molecular, como reportan McKerrow et al. (1985), quienes vieron en *S. mansoni* una proteasa de 17 kDa que al parecer es producto de la autoproteólisis de otra de 30 kDa.

## 2. *E. moshkovskii* y *E. histolytica*-like Laredo

Los patrones electroforéticos de los lisados de FIC y Laredo almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  tuvieron una banda principal de 90 kDa. Sin embargo, las demás bandas remanentes más tenues difirieron en ambas cepas.

Cuando los lisados de FIC y Laredo se hirvieron, sólo quedaron dos bandas remanentes nítidas e intensas de 33 y 37 kDa, las cuales podrían haber resultado de la disociación por calentamiento de la de 90 kDa (Fig 8). Estos resultados podrían explicarse como los de *E. histolytica* y *E. invadens*, con los modelos alternativos 1 y 2, de disociación y proteólisis; si la proteína de 90 kDa fuese oligomérica y al calentarla se disociara en subunidades de 33 y 37 kDa, o bien, éstas últimas fueran el producto de la proteólisis de proteínas de mayor peso molecular.

Los lisados de FIC almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y luego hervidos o no, tuvieron una banda principal de 99 kDa que sólo disminuyó en intensidad con la ebullición.

De este grupo de experimentos concluimos que los lisados frescos de las cuatro cepas de temperatura ambiente tuvieron una proteína remanente principal de 90 kDa, que con la ebullición cambió a otra de 37 kDa. Esta similitud en las proteínas remanentes principales de PZ, IP101, FIC y Laredo, podría ser otro aspecto común que comparten *E. invadens*, *E.*

*moshkovskii* y *E. histolytica*-like Laredo, además de la homología en sus secuencias de DNA (PZ-FIC 38%; IP101-Laredo 38%; IP101-FIC 47%; PZ-Laredo 49%; Laredo-FIC 69%), reportada por López-Revilla y Gómez-Domínguez (1978 y 1988).

Los patrones proteínicos de los lisados de las cuatro cepas de temperatura ambiente durante el almacenamiento se conservan mejor a  $-196^{\circ}\text{C}$  que a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figs 8 y 9).

Los patrones electroforéticos de lisados frescos de trofozoítos de *E. invadens* PZ e IP101 y *E. moshkovskii* FIC adicionados con pHMB fueron complejos, con más de 30 bandas teñidas con Azul de Coomassie (Fig 10). Cuando adicionamos 2ME a los lisados frescos de PZ obtuvimos un patrón con dos bandas principales de 90 y 127 kDa; sin embargo, al hervir las muestras aparecieron dos bandas intensas de 60 y 37 kDa; en lisados frescos de IP101 adicionados con 2ME obtuvimos una banda principal de 90 kDa, pero al hervir las muestras obtuvimos una banda principal difusa de 55 kDa.

Las bandas de 60 y 37 kDa de PZ podrían ser el resultado de la disociación por calentamiento de la proteínas de 90 y 127 kDa (Fig 11). Estos resultados pueden explicarse en PZ, con los modelos 1 y 2 de disociación y proteólisis; si las proteínas de 90 y 127 fuesen oligoméricas y al calentarlas se disociaran en subunidades de 60 y 37 kDa, o bien fueran resultado de la proteólisis de las proteínas de mayor peso

molecular. Lo mismo podría ocurrir en IP101 con las proteínas de 90 kDa y 55 kDa.

Hernández et al. (1989) encontraron que gran parte de los antígenos de superficie de *Leishmania mexicana* y *L. major* varían al someterse a condiciones reductoras. En estas condiciones *L. mexicana* tiene tres proteínas de 65 (GP65), 50 (GP50) y 27 kDa; pero en condiciones no reductoras se encuentra una glucoproteína de 59 kDa (GP59) en lugar de la GP65 y otra de 48 kDa (GP48) en lugar de GP50. En *L. major* también vieron un cambio en una banda de 63 a 51 kDa. Algo semejante podría estar ocurriendo en PZ con la banda de 33 kDa obtenida sin reducir y la de 60 kDa reducida.

En lisados frescos de FIC obtenidos en presencia de 2ME obtuvimos dos bandas principales de 71 y 81 kDa. Sin embargo, cuando hervimos, vimos dos proteínas de 71 y 37 kDa. Esto podría explicarse si la proteína de 82 kDa tuviese enlaces intramoleculares que se rompieran con 2ME, cambiando el peso aparente de 81 a 37 kDa.

Las proteínas de lisados de FIC obtenidos sin adiciones y sin hervir (71, 82 y 90 kDa) casi no difirieron de las obtenidas con 2ME (71 y 82 kDa); sin embargo, las de lisados sin adiciones y hervidos sí fueron diferentes (33 y 37 kDa) de las obtenidas con 2ME (71 y 37 kDa) (Figs 8 y 11). Esta diferencia de migración entre las proteínas obtenidas en FIC

sin adiciones y hervidas (33 y 37 kDa) o con 2ME y hervidas (37 y 71 kDa) podría ser debida a la reducción de los puentes disulfuro de dichas proteínas y a que el polipéptido de 71 kDa fuese una glucoproteína, como sugiere Podulso (1981). Este autor encuentra que las glucoproteínas fetuina y avidina en condiciones reductoras, tienen un peso molecular aparentemente mayor, pero en condiciones no reductoras migran más, debido probablemente a la ruptura de puentes disulfuro intermoleculares en las subunidades.

De esta serie de experimentos con 2ME concluimos que en las cepas de temperatura ambiente también ocurre la autoproteólisis inmediata y extensiva, mediada en su mayor parte por CP, ya que se inhibe con bloqueadores de grupo sulfhidrilo y se reactiva con agentes reductores como lo describieron Avila et al. (1985) para la cepa PZ.

#### Gelatinasas de *E. histolytica*

En los lisados amibianos sin adiciones obtenidos de las tres cepas de *E. histolytica*, detectamos cuatro gelatinasas principales de 41, 31, 80 y 27 kDa, la última de las cuales estaba ausente en HM3 (Fig 13; Tabla 18); estas gelatinasas eran además termolábiles ya que cuando hervimos las muestras antes de someterlas a electroforesis no vimos ninguna banda clara. Esta termolabilidad se ha encontrado también para la

caseinasa de Nakamura y Edwards (1959), así como para la proteasa que hidroliza azure de Avila et al. (1985).

En los mismos lisados adicionados e incubados con pHMB, observamos tres gelatinasas principales de 56, 80 y 33 kDa en las cepas HM1 y HM3; en HK9 sólo fue visible la de 56 kDa (Fig 13; Tabla 18) porque las gelatinasas de 80 y 33 kDa, no son tan potentes en esta cepa y en 45 min de incubación no se alcanza a detectar su actividad. Cuando se incubaron los geles de HK9 por 60 min sí se vieron las bandas de 30 y 80 kDa. La diferencia en la actividad observada en las gelatinasas de las cepas HK9, HM1 y HM3 concuerda con el hallazgo previo de que la actividad de enzimas proteolíticas es mayor en cepas virulentas que en las avirulentas (McGowan et al., 1982, Gadasí y Kobilier, 1983; Keene et al., 1986).

Pérez-Montfort et al. (1987) encontraron que, en ausencia de inhibidores de proteasas y de agentes reductores, las gelatinasas tienen pesos moleculares de 56, 40 y 27 kDa. Afirman, sin embargo, que al adicionar inhibidores de CP a los lisados sólo observaron una banda de 70 kDa.

Estos datos son contrarios a los obtenidos por nosotros. Cuando obtuvimos los lisados en ausencia de pHMB no detectamos la banda de 56 kDa, aunque sí observamos las de alto peso molecular (95, 86 y 80 kDa) descritas por Keene et al. (1986). Por otro lado, cuando disolvimos los trofozoítos

de las tres cepas e incubamos los geles en presencia de pHMB, obtuvimos un patrón característico con tres bandas de 56, 80 y 33 kDa (en HK9 no son claras las de 80 y 33 kDa) (Fig 13; Tabla 18). Cuando sólo lisamos las amibas con pHMB e incubamos sin este inhibidor, la banda de 56 kDa permaneció, además de otras gelatinasas de 80, 86, 31 y 95 kDa (HK9 tuvo dos gelatinasas de 86 y 57 kDa) (Fig 14; Tabla 19). Estas diferencias entre los resultados de Pérez-Montfort et al. (1987) y los nuestros podría ser debida a la diferencia en el manejo de las amibas, ya que ellos las cosecharon y lavaron con PBS, medio salino que sabemos activa la autólisis y la autoproteólisis amibianas y provoca un cambio en el procesamiento de las CP amibianas (Jiménez Delgadillo, 1990).

Cuando los mismos lisados de las tres cepas de *E. histolytica* cuyos resultados acabamos de describir se obtuvieron sin pHMB y los geles correspondientes se incubaron con pHMB, el patrón de gelatinasas que obtuvimos fue similar al obtenido cuando los trofozoítos se lisaron e incubaron sin el inhibidor (Figs 13 y 15; Tablas 18 y 20).

Los mismos lisados disueltos con regulador de lisis sin adiciones e incubados con 2ME tuvieron patrones de gelatinasas similares a los obtenidos sin adiciones (Fig 16 y 18; Tabla 18 y 21). Por ello podemos inferir que durante la corrida electroforética hay un procesamiento de las CP ya que

al añadir el inhibidor sólo durante la incubación, obtuvimos un patrón de gelatinasas similar al obtenido sin inhibidores y sin agentes reductores.

Ostoa-Saloma et al. (1989) también encontraron actividad de gelatinasa en las zonas de 23 a 73 kDa en lisados ambientes reducidos con 2ME; sin embargo, al adicionar ellos pHMB o yodacetamida, las zonas de hidrólisis se inhibieron parcial o totalmente, pero no varió el patrón de gelatinasas descrito. Estos datos no concuerdan con los nuestros, ya que en experimentos similares nosotros detectamos en los lisados tratados con pHMB una serie de bandas de 56, 80, 86, 91 y 95 kDa, sin la banda de 41 kDa (Fig 14; Tabla 19). Esta diferencia entre las gelatinasas obtenidas por Ostoa-Saloma et al. (1989) y nosotros podría ser porque ellos agregaron SDS y 2ME al regulador de lisis; como el 2ME aumenta la autoproteólisis inmediata desencadenada por el SDS, pensamos que en sus experimentos se generaron las bandas de menor peso molecular y no pudieron detectar la de 56 kDa que se les degradó.

Por otro lado, cuando lisamos los trofozoítos en presencia de la mezcla pHMB/PMSF e incubamos los geles en pHMB, se produjo la máxima inhibición de la actividad obtenida por nosotros, con sólo dos bandas de gelatinasas de 60 y 88 kDa y gran cantidad de bandas de proteínas remanentes

teñidas con Azul de Coomassie. Estos resultados nuestros sí se asemejan a otros de Ostoa-Saloma et al. (1987), quienes con una mezcla de pHMB y SBTI (soybean trypsin inhibitor) dicen haber inhibido totalmente la actividad proteolítica de los lisados amibianos.

De estos resultados concluimos que las gelatinasas más potentes de trofozoitos de HM1 y HM3 lisados e incubados con pHMB fueron de 56, 80 y 33 kDa y que en HK9 fue aparente sólo la de 56 kDa. También encontramos que en los lisados de las tres cepas obtenidos sin pHMB desaparecieron las bandas de 56, 80 y 33 kDa y que la actividad más importante fue de 41 kDa. También demostramos que para inhibir la mayor parte de la actividad de gelatinasa es necesario disolver las amibas con la mezcla pHMB/PMSF e incubar los geles en pHMB.

La mayoría de la actividad de gelatinasas se inhibió cuando lisamos e incubamos los geles con pHMB. La presencia de pHMB sólo durante la incubación de los geles pero no durante la disolución de las amibas, no inhibió la actividad de las gelatinasas cisteín-dependientes, esto podría indicarnos que durante la corrida electroforética podría haber un autoprocésamiento de las CP y que la adición del pHMB, nada más durante la incubación, no es suficiente para inhibir la actividad de CP.

Características de las gelatinasas cisteín-dependientes de *E. histolytica*

Cuando lisamos los trofozoítos de *E. histolytica* con pHMB y luego incubamos los geles con DTT o 2ME obtuvimos patrones de gelatinasas diferentes para cada cepa, ya que HM3 no tuvo las gelatinasas de 41 y 31 kDa que sí estaban presentes en HM1 y HM2 (Fig 20; Tabla 23). Sin embargo, en las tres cepas destacaron tres gelatinasas muy potentes de 56, 33 y 80 kDa, que también se observaron aunque con menor intensidad, cuando lisamos las amibas e incubamos los geles con pHMB. HM3 tuvo una serie de gelatinasas de alto peso molecular (109, 127, 147 y 160 kDa) que parecen CP porque se activaron con DTT y se inhibieron con pHMB; estas gelatinasas de alto peso molecular no se vieron con ningún otro tratamiento y se encuentran dentro de un intervalo de tamaños mayores a los que han sido descritos previamente.

Las CP más potentes de *E. histolytica* son las de 56, 80 y 33 kDa, las cuales se inhibieron parcialmente con pHMB 5 y 10 mM y se reactivaron con 2ME.

Nuestros datos sobre la CP de 56 kDa son contrarios a los de Keene et al. (1986), Pérez-Montfort et al. (1987), Ostoa Saloma et al. (1989) y Reed et al. (1989), quienes afirman que in vitro y en geles de sustrato la proteasa de 56 kDa se inhibe totalmente con bloqueadores de grupos

sulfhidrilo. Nosotros encontramos que la gelatinasa de 56 kDa no se inhibe con pHMB, por lo cual pensamos que tanto las gelatinasas de 56, 80 y 33 kDa están conformadas por proteasas de dos o más clases (cisteín- y no cisteín-dependientes) de tal manera que en presencia de pHMB se inhiben las CP (al disminuir la potencia de éstas) y no las no cisteín-dependientes, (Fig 20; Tabla 23).

También observamos que las gelatinasas de HM1 fueron más potentes que las de HM3 y éstas a su vez más potentes que las de HK9. Estos resultados coinciden con los de McGowan et al. (1982), Gadasí y Kobiler (1983), Keene et al. (1986), e Hidalgo Lara (1989), ya que ellos dicen que la cepa virulenta HM1 tiene mayor cantidad de proteasas que cepas menos virulentas como HK9.

De estos experimentos concluimos que en *E. histolytica* las gelatinasas cisteín-dependientes más potentes son las de 56, 80 y 33 kDa y que, aunque menos potentes, las de 41, 31 y 61 kDa son también CP ya que se inhiben total o parcialmente con pHMB y se reactivan con 2ME y DTT. Solamente la cepa HM3 parece tener tres CP de alto peso molecular que no habían sido descritas antes (127, 147 y 160 kDa), no detectables en HM1 y HK9 y que aparecen mediante incubación de los geles con DTT pero no con 2ME.

## Gelatinasas en las cepas de temperatura ambiente

### 1. *E. invadens* PZ e IP101

Los lisados de PZ e IP101 sin inhibidores tuvieron patrones diferentes de gelatinasas, ya que PZ tuvo ocho gelatinasas entre las cuales destacaron las de 69, 48 y 40 kDa; (Fig 22, Tabla 25), mientras que IP101 tuvo cinco gelatinasas entre las cuales destacaron las de 70, 36 y 32 kDa. Cuando los mismos trofozoitos se disolvieron en pHMB y los geles se incubaron sin inhibidores, los patrones de gelatinasas también fueron diferentes en ambas cepas, ya que PZ tuvo seis, destacando las de 69 y 59 kDa ( Fig 22; Tabla 25), en tanto que en IP101 las más potentes fueron las de 65 y 59 kDa.

Los trofozoitos de PZ e IP101 lisados sin pHMB e incubados con este inhibidor también tuvieron diferentes patrones, ya que PZ tuvo dos gelatinasas muy potentes de 54 y 65 kDa, mientras que IP101 tuvo tres menos potentes de 65, 88 y 64 kDa. También vimos cambio en los lisado sin pHMB que se incubaron con 2ME, en los que las gelatinasas principales de PZ fueron de 69 y 48 kDa y las de IP101 de 70 y 36 kDa.

Estas diferencias en las bandas de gelatinasas de las dos cepas de *E. invadens* obtenidas con diferentes tratamientos se añaden a las ya reportadas por otros autores. López-Revilla y Gómez-Domínguez (1988), afirman que IP101 y

PZ difieren en un 8.5% en el contenido de GC en el DNA y 2  $\mu$ m en el tamaño de los núcleos y sugieren que dichas cepas no pertenecen a la misma especie, a pesar de la clasificación que de ellas hizo Meerovitch (1958).

De estos experimentos concluimos que, aparte de que no se habían reportado con anterioridad, los patrones de gelatinasas de las cepas PZ e IP101 son diferentes. Podemos también decir que PZ tiene al menos dos CP de 40 y 48 kDa e IP101 tiene dos CP de 32 y 36 kDa, porque todas ellas se inhiben con pHMB y se reactivan con 2ME. La actividad de gelatinasa de PZ es más potente que la de IP101. Las proteasas de 84 y 69 kDa de PZ parecen tener enlaces disulfuro intramoleculares ya que el tratamiento con 2ME cambia su movilidad electroforética y sus pesos moleculares aparentes se modifican (la gelatinasa de 84 kDa genera otra de 80 kDa y la de 69 kDa da lugar a una de 67 y otra de 62 kDa).

## 2. *E. moshkovskii* FIC y *E. histolytica*-like Laredo

Las principales gelatinasas de lisados de FIC obtenidos sin inhibidores fueron de 32, 76 y 70 kDa y las de los lisados de Laredo fueron de 70 y 40 kDa; todas fueron mucho menos potentes que las de PZ (Fig 22; Tabla 25). Sin embargo, cuando disolvimos las amibas sin pHMB e incubamos los geles

con este inhibidor, observamos que las bandas de gelatinasas principales de FIC de 76, 70, 65 y 32 kDa eran muy conspicuas, en tanto que en las mismas condiciones Laredo sólo tuvo tres gelatinasas muy tenues de 70, 43 y 50 kDa (Fig 22; Tabla 25).

Cuando obtuvimos los lisados sin pHMB e incubamos los geles en presencia del inhibidor, FIC tuvo cuatro gelatinasas nítidas de 74, 65, 40 y 69 kDa, en tanto que Laredo sólo tuvo dos de 69 y 48 kDa (Fig 23; Tabla 26). Pero cuando incubamos los mismos geles con 2ME, FIC tuvo seis gelatinasas, destacando las de 36 y 70 kDa, y Laredo tuvo tres de 28, 40 y 62 kDa, respectivamente (Fig 24; Tabla 27). Estas grandes diferencias en el número y el tamaño de las gelatinasas eran de esperarse, ya que las cepas comparadas pertenecen indudablemente a diferentes especies.

De estos experimentos concluimos que FIC y Laredo tienen gelatinasas diferentes y que la cepa con menor actividad es Laredo. Por otro lado, identificamos en FIC una CP de 28 kDa y en Laredo otra de 40 kDa.

## CONCLUSIONES

### I. Sobre la autoproteólisis

#### A. En *E. histolytica*

1. La autoproteólisis de lisados de *E. histolytica* obtenidos con SDS:
  - i) Es inmediata y extensiva
  - ii) Se debe principalmente a cisteín-proteasas (CP)
  - iii) Es similar en diversas cepas.
2. La actividad autoproteolítica de *E. histolytica* se previene:
  - i) Parcialmente, en lisados almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  (pero no a  $-20^{\circ}\text{C}$ )
  - ii) Totalmente, en lisados hervidos inmediatamente después de añadirles pHMB.
3. En los lisados frescos de *E. histolytica* queda una proteína principal remanente de 113 kDa, que por calentamiento se disocia en tres de 31, 33 y 41 kDa, entre las que predomina la de 31 kDa.
4. Las proteínas remanentes de 31, 33 y 41 kDa tienen actividad de gelatinasa.

B. En *E. invadens*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica*-like

1. La autoproteólisis de lisados de cepas de *Entamoeba* de temperatura ambiente (PZ, IP101, FIC y Laredo) obtenidos con SDS:
  - i) Es inmediata y extensiva
  - ii) Se debe principalmente a CP
  - iii) Genera patrones de proteínas remanentes específicos de cepa
2. La actividad autoproteolítica de los lisados de cepas de temperatura ambiente se previene:
  - i) Parcialmente, en lisados almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  (pero no a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
  - ii) Totalmente, en lisados hervidos inmediatamente después de añadirles pHMB.
3. En los lisados frescos de las cuatro cepas de temperatura ambiente analizadas queda una proteína remanente principal de 90 kDa que por calentamiento se disocia en otra de 37 kDa.
4. En los lisados de PZ queda, además de la de 90 kDa, una proteína remanente principal de 127 kDa; por calentamiento ambas se disocian en otras dos de menor peso molecular (60 y 37 kDa).
5. En los lisados de IP101 la proteína remanente principal de 90 kDa se disocia por calentamiento en otra de 55 kDa.

6. En los lisados de FIC y Laredo queda una proteína remanente principal de 90 kDa que por calentamiento se disocia en otras dos de menor peso molecular (33 y 37 kDa).
7. Las proteínas de 70, 66 y 33 kDa remanentes en FIC también son gelatinasas.
8. La proteína de 70 kDa remanente en Laredo también es gelatinasa.
9. Las proteínas remanentes principales de PZ e IP101 no son gelatinasas.

## II. Sobre las gelatinasas

### A. En *E. histolytica*

1. Las CP más potentes de lisados de *E. histolytica* son en HM1 y HM3 las de 56, 80 y 33 kDa; en HK9 solamente la de 56 kDa.
2. Las CP menos potentes de HM1 y HK9 son las de 28, 31 y 61 kDa.
3. HM3 carece de la gelatinasa de 28 kDa presente en HM1 y HK9.
4. HM3 tiene cuatro CP de 109, 127, 147 y 160 kDa que no habían sido descritas.
5. La inhibición máxima de las gelatinasas de *E. histolytica* se logra mediante disolución de las amibas con la mezcla pHMB/PMSF e incubación de los geles de sustrato en pHMB.

B. En *E. invadens*, *E. moshkovskii* y *E. histolytica*-like

1. Las proteínas remanentes de la autoproteólisis inmediata en las cepas de temperatura ambiente contienen las siguientes gelatinasas:
  - i) En PZ tres, de 69, 48 y 40 kDa
  - ii) En IP101 tres de 70, 36 y 32 kDa
  - iii) En FIC cuatro de 28, 32, 70 y 76 kDa
  - iv) En Laredo dos de 70 y 40 kDa
2. Las gelatinasas cistein-dependientes son:
  - i) Más potentes en PZ que en IP101
  - ii) En PZ dos de 40 y 48 kDa
  - iii) En IP101 dos de 32 y 36 kDa
  - iv) En FIC una de 28 kDa
  - v) En Laredo una de 40 kDa.

## REFERENCIAS

Albach RA, Booden T. Amoebae. En: Parasitic Protozoa. Vol II. Julius P. Kreier Ed. Academic Press NY, 1978

Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruíz-Herrera J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba histolytica*. J Parasitol 66: 735-741, 1980

Avila EE. Identificación de las proteínas de la membrana plasmática y del "cap" inducido por anticuerpo en *Entamoeba histolytica*. Tesis de maestría. 1982

Avila EE, Sánchez-Garza M, Calderón J. *Entamoeba histolytica* and *E. Invadens*: Sulfhydryl-dependent proteolytic activity. J Protozool 32: 163-166, 1985

Avron B, Bracha R, Deutsch MR, Mirelman D. *Entamoeba invadens* and *E. histolytica*: Separation and purification of precysts and cysts by centrifugation on discontinuous density gradients of percoll. Exp Parasitol 55: 265-269, 1983

Brandt y Pérez-Tamayo. Pathology of human amebiasis. Hum Pathol 1: 351-358, 1970

Canto Ortiz LB. Caracterización de la autoproteólisis de los

- trofozoítos de *E. histolytica*. Tesis de maestría. 1990
- Cazzulo JJ, Cazzulo FMC, Martínez J, Cazzulo BM Franken de.  
Some kinetic properties of a cysteine proteinase  
(Crusipain) from *Trypanosoma cruzi*. Biochim Biophys  
Acta 1037: 186-191, 1990
- Coombs GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other  
flagellate protozoa. Parasitology 84: 149-155, 1982
- Diamond LS, Harlow, DR, Cunnick CC. A new medium for the  
axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other  
*Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72: 431-432, 1978
- Elhence IP, Agrawal BM, Sharman BD. Amebic necrosis of  
bowel. Int Surg 64: 57, 1979.
- Feingold C, Bracha R, Wexler A y Mirelman D. Isolation,  
purification and partial characterization of an  
enterotoxin from extracts of *Entamoeba histolytica*  
trophozoites. Infect Immun 48: 211-218, 1985.
- Fraenkel-Conrat H. Methods for investigating the essential  
groups for enzyme activity. Colowick SP, Kaplan NO ed.  
Methods in Enzymology Nueva York Academic Press 4: 247-  
269, 1957
- Gadasi H y Kobilier D. *Entamoeba histolytica*: Correlation  
between virulence and content of proteolytic enzymes.  
Exp Parasitol 55: 105-110, 1983
- Gittles C, Calef E, Rosenberg I. Citopathogenicity of

- Entamoeba histolytica*. Philos Trans R Soc (London) B 307: 73-85, 1984
- Gitler C, Mirelman D. Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. Ann Rev Microbiol 40: 237-261, 1986
- Gordon AH. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. Work TS, Work E eds. Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Amsterdam: North-Holland Publishing Co. 396 pp, 1975
- Hadley T, Aikawa M, Müller LH. *Plasmodium knowlesi*. Studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. Exp Parasitol 55: 306-311, 1983
- Hare DF, Jarroll EL, Lindmark DG. *Giardia lamblia*: Characterization of proteinase activity in trophozoites. Exp Parasitol 68: 168-175, 1989
- Hernández AG, Payares G, Misle A, Dagger F. Heterogeneity of *Leishmania* cell-surface antigens. Parasitol Res, 75: 583-588, 1989
- Heussen C y Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry 102: 196-202, 1980

- Hidalgo Lara ME. Secreción de enzimas proteolíticas y virulencia en *E. histolytica*. Tesis de maestría. 1989
- Hotez PJ, Cerami A. Secretion of a proteolytic anticoagulant by *Ancylostoma* hookworms. *J Exp Med* 157: 1594-1603, 1983
- Jarumilinta R, Maegraith BC. Enzymes of *Entamoeba histolytica*. *Bull Wld Hlth Org* 41: 269-273, 1969
- Jiménez Delgadillo BMG. Caracterización de la autólisis de los trofozoítos de *E. histolytica*. Tesis de maestría. 1990
- Keene WE, Petit MG, Allen S, McKerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 163: 536-549, 1986
- Laemli UK. Cleavage of structural proteins durin the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277:680-685, 1970
- Lehninger AL. *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. New York 1104 pp, 1980
- Lockwood BC, North MJ, Coombs, GH. *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus* and *Trichomonitus batrachorum*: Comparative proteolytic activity. *Exp Parasitol* 58: 245-253, 1984
- Lockwood BC, North MJ, Scott KI, Bremner AF, Coombs GH. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem*

Parasitol 24: 89-95, 1987

López-Revilla R, Gómez-Domínguez R. *Entamoeba histolytica*, *E. invadens*, and *E. moshkovskii*: Fluctuations of the DNA content of axenic trophozoite. Exp Parasitol 44: 243-248, 1978

López-Revilla R, Gómez-Domínguez R. Trophozoite and nuclear size, DNA base composition, and nucleotide sequence homology of several *Entamoeba* strains in axenic culture. Parasitol Res 74: 424-430, 1988

Luaces AL, Barret AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Biochem J 250: 903-909, 1988

Lushbaugh WB, Hofbauer AF y Pittman EE. Proteinase activities of *Entamoeba histolytica* cytotoxin. Gastroenterology 87: 17-27, 1984

Lushbaugh WB, Hofbauer AF y Pittman. *Entamoeba histolytica*: Purification of cathepsin B. Exp Parasitol 59: 328-336, 1985

Lushbaugh WB. Proteinases of *Entamoeba histolytica*. Ravdin ed, Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, Inc. New York 219-231, 1988

Lushbaugh WB, Miller J. The morphology of *Entamoeba histolytica*. Radvin ed, Amebiasis: Human infection by

- Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, Inc. New York 219-231, 1988
- Lynch EC, Rosenberg IM, Gitler C. An ion-channel forming protein produced by *E. histolytica*. EMBO J 1: 801-804, 1982
- Lyon JA, Haynes JH. *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. J Immunol 136: 2245-2251, 1986
- Maeda H, Molla A. Pathogenic potentials of bacterial proteases. Clin Chim Acta 185: 357-368, 1989
- Mizel JV. Acrylamide-gel electropherograms by mechanical fractionation: radioactive adenovirus proteins. Science 151: 988-990, 1966
- Manson-Bahr PEC, Apted FIC. Manson's tropical diseases Ed Baillière Tindall, London 121-140, 1983
- Marikovsky M, Fishelson Z, Arnon R. Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 30: 45-54, 1988
- Martínez-Palomo A. Biología de *Entamoeba histolytica*. Martínez-Palomo A ed, Amibiasis. Ed. Médica Panamericana, México 11-40, 1989
- Mattern CFT, Keister. EXPERIMENTAL AMEBIASIS I. Pathogenicity

- of Axenically cultured *Entamoeba histolytica* in the brain of the newborn mouse. Am J Trop Med Hyg. 26: 393-401, 1977
- Mattern CFT, Keister DB. EXPERIMENTAL AMEBIASIS II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster 26: 402-411, 1977
- Mattern CFT, Caspar PA. EXPERIMENTAL AMEBIASIS III. A rapid in vitro assay for virulence of *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 27: 882-887, 1978
- McGowan K, Deneken CF, Thorne GM, Gorbach SL. *Entamoeba histolytica* cytotoxin: Purification, characterization, strain virulence and protease activity. J Infect Dis 146: 616-625, 1982
- McKerrow JH, Pino-Heiss S, Lindquist R, Werb Z. Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem 260: 3703-3707, 1985
- McKerrow JH. Minireview. Parasite protease. Exp Parasitol 68: 111-115, 1989
- McLaughlin J, Faubert G. Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and an acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. Can J Microbiol 23: 420-425, 1977
- Meerovitch E. Some biological requirements and host-parasite relations of *Entamoeba invadens*. Can J Zool 36: 513-

- 523, 1958
- Muñoz ML, Calderón J, Rojkind M. The collagenase of *E. histolytica*. J Exp Med 155: 291-295, 1982
- Muñoz ML, Rojkin M, Calderón J. *Entamoeba histolytica*: Collagenolytic activity and virulence. J Protozool 31: 468-470, 1984
- Muñoz O. Epidemiología de la amibiasis. Martínez-Palomo A ed, Amibiasis. Ed Médica Panamericana, México 164-182, 1989
- Müller FW, Werries E. Secretory hydrolases of *Entamoeba histolytica*. J Protozool 35: 291-295, 1988
- Nakamura M Y Edwards PR. Enzymes of *Entamoeba histolytica* I. Gelatinase. Proc Soc Exp Biol Med 403-404, 1959
- Neal R. Enzymic proteolysis by *Entamoeba histolytica*: Biochemical characteristics and relationship with invasiveness. Parasitol 50: 531-550, 1960
- North MJ, Coombs GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes andk promastigotes: Analysis by gel electrophoresis. Mol Biochem Parasitol 3: 293-300, 1981
- North MJ. Comparative biochemistry of the proteinases of eukariotic microorganisms. Microbiol Rev 46: 308-340, 1982
- North MJ, Robertson DC, Coombs GH. The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrates and specific inhibitors. Mol

Biochem Parasitol 39: 183-194, 1990

Orozco E, Guarneros G, Martínez-Palomo, Sánchez T. *Entamoeba histolytica* Phagocytosis as a virulence factor. J Exp Med 185: 1511-1521, 1983

Orozco E, Rodríguez MA, Hernández FC. The role of phagocytosis in the pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. Amebiasis JI Ravdin ed John Wiley and sons, Inc 326-338 pp, 1988

Ostoa-Saloma P, Cabrera N, Becker I y Pérez-Montfort R. Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. Mol Biochem Parasitol 32: 133-144, 1989

Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 26: 87-98, 1987

Podulso JF. Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis: Comparison of Tris-glycine and Tris-borate-EDTA buffer systems. Anal Biochem. 114: 131-139, 1981

Ravdin JI y Guerrant RL. A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. Reviews of Infectious Diseases 4: 1185-1207, 1982

Reed SL, Keene WE y McKerrow JH. Thiol proteinase expression

- and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 27: 2772-2777, 1989
- Said-Fernández S, López-Revilla R. Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Parasitol Res 67: 249-254, 1992
- Said-Fernández S, López-Revilla R. Latency and heterogeneity of *Entamoeba histolytica* hemolysins. Parasitol Res 69: 435-438, 1983
- Said-Fernández, López-Revilla R. Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect Immun 56: 874-879, 1988
- Scholze H y Werries E. A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 11: 293-300, 1984
- Scholze H, Werries E. Cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* I. Partial purification and action on different enzymes. Mol Biochem Parasitol 18: 103-112, 1986a
- Scholze H, Otte J, Werries E. Cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. II. Identification of the major split position in bovine insulin  $\beta$ -chain. Mol Biochem Parasitol 19: 39-43, 1986b

- Schulte W, Scholze H y Werries E. Specificity of a cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* towards the  $\alpha$ 1-CB2 peptide of bovine collagen type I. Mol Biochem Parasitol 25: 39-43, 1987
- Schulte W y Scholze H. Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. J Protozool 36: 538-543, 1989
- Shapiro AL, Scharff MD, Maizel JV. Poliribosomal synthesis and assembly of the H and L chains of gamma globulin. Proc Natl Acad Sci (USA) 56: 216-221, 1966
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Comm 28: 815-820, 1967
- Trissl D, Martínez-Palomo A, Argüello C, de la Torre M, de la Hoz R. Surface properties related to concanavalina A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. J Exp Med 145: 652-655, 1977
- Trissl D, Martínez-Palomo, De la Torre M. Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J Exp Parasitol 148: 1137-1145, 1978
- Trissl D. Glycosidases of *Entamoeba histolytica*. Z Parasitenkd 69: 291-298, 1983

- Tsutsumi V, Mena-López, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A.  
Cellular bases of experimental amebic liver abscess  
formation. Am J Pathol. 117: 81-91, 1984
- Tsutsumi V, Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in  
experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural  
study. Am J Pathol. 130: 112-119, 1988
- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis.  
Estimation of the global magnitude of morbidity and  
mortality. Rev Infect Dis 8: 228-238, 1986
- Walsh JA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection.  
Ravdin ed, Amebiasis: Human infection by *Entamoeba  
histolytica*. John Wiley and Sons, Inc. New York 93-105,  
1988
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight  
determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel  
electrophoresis. J Biol Chem 244: 4406-4412, 1969
- Werries E, Nebinger P, Franz A. Degradation of biogenic  
oligosacchrides by  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase secret by  
*Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 7: 127-140,  
1983
- Werries E, Müller F. Studies on the substrate specificity of  
 $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem  
Parasitol 18: 211-221, 1986
- Young JD, Young TM, Phu L, Unkeless JC, Cohn ZA.

Characterization of a membrane pore-forming protein  
from *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 156: 1677-  
1690, 1982