

00362



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
Universidad Nacional Autónoma de México

**Programa de Maestría y Doctorado
en Ciencias Bioquímicas**

**Caracterización de fracciones subcelulares de
Entamoeba histolytica con apoyo de marcadores
moleculares y actividades enzimáticas propias de
Retículo Endoplásmico**

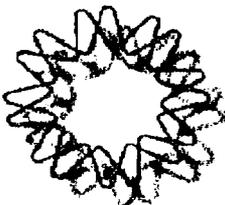
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

P R E S E N T A

MILENA SALGADO LYNN

Cuernavaca, Morelos. Agosto del 2003



**TESIS CON
CATEGORÍA DE ORIGEN**

... a la Dirección General de Bibliotecas:
... difundir en formato electrónico e impreso:
... do de mi trabajo recepcional
NOMBRE: Milena Salgado Lynn

FECHA: 2006-03
FIRMA: [Firma]

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

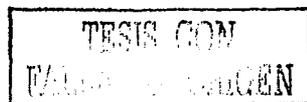
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

PAGINACION DISCONTINUA

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr.
Alejandro Alagón Cano, en el Departamento de
Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de
Biotecnología de la U.N.A.M., bajo la dirección de la
Dra. Rosana Sánchez López

Durante mis estudios de Posgrado fui becaria del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT) y de la Dirección General de Estudios de
Posgrado (DGEP) de la U.N.A.M.

Este proyecto fue apoyado por los proyectos
IN208400 e IN211402 del PAPIIT-DGAPA-UNAM y
CONACyT 33079-N.



B

"Tu" papá,

"Tu" mamá

y "Lucalú":

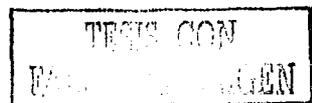
Gracias.....
otra vez.

Rk: llegaste a mí vida en el mejor momento

y sigues ahí

por siempre y...

C



Agradecimientos

A Alejandro Alagón, por la oportunidad de estar en su laboratorio y por todas sus sugerencias.

A Rosana Sánchez, por dirigir este trabajo y su constante opinión crítica.

A Roberto Stock, por compartir su experiencia, por su apoyo y por surtirme de excelente literatura.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad y por todos los momentos que pasamos juntos: Rik, Moni, Pichón, Andrés, Felipe, Blanche, Juditita, Herli, Ale, Erwin, Leo, Angélica, Deyanira, Richard, George, Charlie e Hilda.

A Everardo López-Romero y mis compañeros de laboratorio en Guanajuato, por su hospitalidad y apoyo durante mis estancias ahí.

Al Dr. Alberto Darzon, por las múltiples veces que utilicé su Ultracentrífuga.

Al Dr. Federico Sánchez y Dra. Claudia Treviño, por sus comentarios y sugerencias durante los tutorales.

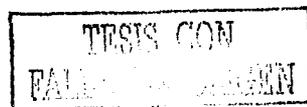
Al Dr. José Luis Puente, Dra. Rebeca Manning, Dra. Carmen Beltrán y Dra. Laura Palomares, por sus comentarios críticos durante la revisión de esta tesis.

A Alejandro Olvera, Felipe Olvera, Olegaria Benítez y Ricardo Mondragón, por su apoyo técnico en el laboratorio.

A Angélica Linares por su apoyo administrativo y su amistad.

A todos aquellos que de alguna manera cooperaron para que yo llegara hasta aquí.

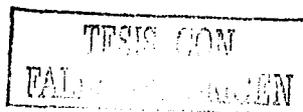
D



	Página
Abreviaturas	i
Índice de figuras y tablas	iv
Resumen	vi
Introducción	1
1. <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1 Amibiasis	1
1.2 Biología	1
1.3 Ciclo de vida	2
1.4 Bioquímica	3
1.5 Organización celular	3
1.6 Genoma	5
1.7 Patogenicidad	6
2. Secreción	6
2.1 Generalidades	6
2.2 Secreción en Eucariotes	7
2.3 Secreción en <i>E. histolytica</i>	10
3. Fraccionamiento Subcelular	12
3.1 Generalidades	12
3.2 Fraccionamiento subcelular en <i>E. histolytica</i>	13
4. Justificación	16
5. Hipótesis	17
6. Objetivos	17
7. Materiales	19
7.1 Amortiguadores (Buffers)	19
7.2 Células	19
7.2.1 Amibas	19
7.2.2 Mamífero	20

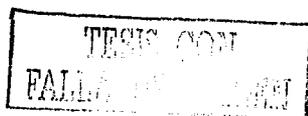
7.3 Medios de Cultivo	20
7.3.1 Amibas	20
7.3.2 Mamífero	20
7.4 Cómputo	20
7.5 Equipo	21
8. Métodos	21
8.1 Cultivo de células	21
8.2 Homogenización de células	21
8.2.1 Homogenización según método de Aley (Aley <i>et al.</i> , 1980)	22
8.3 Fraccionamiento según método de Aley (Aley <i>et al.</i> , 1980)	22
8.4 Centrifugación diferencial	22
8.5 Centrifugación en gradiente	23
8.5.1 Percoll®	23
8.5.2 Sacarosa	23
8.6 Preparación de lisados celulares	24
8.7 Electroforesis de proteínas	25
8.8 Transferencia de proteínas	25
8.9 Inmovilización de proteínas	25
8.10 Western Blots/Slot Blots	25
8.11 Actividad de DPMS	26
8.12 Actividad de NAGPT/NAGT	26
9. Resultados y Discusión	27
9.1 Condiciones de homogenización de trofozoitos de <i>E. histolytica</i>	27
9.2 Especificidad de anticuerpos	29
9.3 Condiciones de fraccionamiento subcelular	31
9.3.1 Centrifugación diferencial	31
9.3.2 Centrifugación en gradiente	37
9.3.2.1 Percoll®	37

9.3.2.2 Sacarosa	40
9.4 Caracterización de las fracciones subcelulares con apoyo de actividades enzimáticas (DPMS, NAGT)	45
9.5 Comparación de las fracciones subcelulares de amibas provenientes de absceso hepático con las fracciones subcelulares de amibas de la línea celular HM1	49
9.6 Comparación entre el fraccionamiento subcelular de células HeLa y trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (línea celular HM1)	53
10. Conclusiones	58
11. Perspectivas	59
12. Literatura citada	60



Abreviaturas

A	Adenina
ATP	Adenosina Trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato
β -ME	β -Mercaptoetanol
C	Citosina
Ca	Calcio
CaCl_2	Cloruro de Calcio
$^\circ\text{C}$	Grados Centígrados
CGN	Red Cis-Golgi (Cis Golgi Network)
CO_2	Dióxido de Carbono
Con A	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
DHFR	Dihidrofolato Reductasa
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPMS	Dolicol Fosfato Manosa Sintetasa
DTT	Ditiotreitol
E64	N-(N-(L-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil)-agmatina
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
Fe	Hierro
G	Guanina
g	Gramos
Gal	Galactosamina
GalNAc	N-Acetil Galactosamina
GPI	Glicosil-fosfatidil inositol
GTP	Guanosina trifosfato
h	Horas
I	Iodo



Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
Kg	Kilogramo
LPG	Lipofosfoglicanos
M	Molar
μCi	Microcuries
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
mA	Miliampers
Mb	Mega bases
mg	Miligramos
Mg	Magnesio
MgCl_2	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MnCl_2	Cloruro de Manganeso
mOsmol	Miliosmoles
mRNA	RNA mensajero
NAD	Niconinamida adenosina dinucleótido
NAGPT	N-Acetil Glucosaminil Fosfotransferasa
NAGT	N-Acetil Glucosaminil Transferasa
NBT	Azul de Tetrazolio
nm	nanómetro
p/v	relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
pb	pares de bases
PMSF	Fluoruro de Fenilmetil Sulfonilo
PPG	Proteofosfoglicanos

TRABAJO CON
FALLA DE CALIBRACION

PSI	Libras por Pulgada Cuadrada
RE	Retículo Endoplásmico
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Slot Blot
SFB	Suero Fetal Bovino
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SRP	Partícula de Reconocimiento de la Señal
T	Timina
TA	Temperatura ambiente
TEA	Trietanolamina
TGN	Red Trans Golgi (Trans Golgi Network)
Tween 20	Monolaurato de Sorbitol Polioxietileno (20)
V	Voltios
WB	Western Blot
x g	Gravedad

Índice de Figuras y Tablas

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	2
Figura 2. Micrografía electrónica de <i>E. histolytica</i>	4
Figura 3. Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> vistos por contraste de fases	4
Figura 4. Ruta secretoria típica de células eucariotas	8
Figura 5. Protocolo generalizado de fraccionamiento subcelular	13
Figura 6. Especificidad de anticuerpos anti marcadores de RE	30
Figura 7. Primer esquema de centrifugación diferencial	32
Figura 8. Análisis de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial	33
Figura 9. Segundo esquema de centrifugación diferencial	34
Figura 10. Distribución de Sec61 α en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial	34
Figura 11. Distribución de Sec61 α en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial	35
Figura 12. Protocolo final del proceso de centrifugación diferencial	36
Figura 13. Gradientes de Percoll monitoreados con marcadores de densidad	38
Figura 14. Distribución de Sec61 α en fracciones obtenidas en gradientes de Percoll-NaCl	39
Figura 15. Distribución de proteína la lo largo del gradiente de sacarosa (10-65%)	41
Figura 16. Esquema de fraccionamiento en gradiente de sacarosa	42
Figura 17. Representación gráfica de la distribución porcentual de Sec61 α en los gradientes de sacarosa	43
Figura 18. Proyección ecuatorial de máxima intensidad de trofozoítos	45
Figura 19. Distribución de actividades enzimáticas y marcadores moleculares a lo largo del gradiente de sacarosa	46
Figura 20. Distribución de Sec61 α en los pellets de la centrifugación diferencial	50
Figura 21. Distribución de Sec61 α en las fracciones del gradiente de sacarosa	52

Figura 22. Distribución de marcadores moleculares en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial	54
Figura 23. Distribución de marcadores moleculares a partir de P14, en fracciones obtenidas en gradientes de sacarosa	55
Figura 24. Distribución de marcadores moleculares en fracciones obtenidas en gradiente de sacarosa	57
Tabla 1. Comparación de soluciones para homogenización	28

Resumen

La existencia de organelos como el retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi, componentes de la ruta secretoria de *E. histolytica* es un tema aún en debate. Sin embargo, se han identificado actividades enzimáticas así como diferentes marcadores moleculares amibianos involucrados en la glicosilación, tráfico de proteínas y transporte vesicular en eucariotes. En el presente trabajo, se describe un nuevo protocolo de fraccionamiento subcelular, así como la caracterización de fracciones subcelulares de trofozoitos de *E. histolytica* utilizando como marcadores específicos las actividades enzimáticas de Dolicol-fosfato-manosa sintetasa (DPMS), N-acetil-glucosaminil fosfotransferasa/N-acetil-glucosaminil transferasa (NAGPT/NAGT), y los marcadores moleculares de RE, Sec61 α y STT3, en gradientes isopícnicos de sacarosa.

Se estandarizó un nuevo protocolo de fraccionamiento subcelular de *E. histolytica*. Este protocolo permite una separación fina de los componentes amibianos y permite darles seguimiento. Nuestros resultados indican que las actividades enzimáticas típicas de RE se enriquecen en fracciones con densidad de flotación entre 1.12 - 1.15 g/ml. Los marcadores moleculares presentaron una distribución más amplia que las actividades enzimáticas y se detectaron entre los 1.11 a los 1.2 g/ml, resultados que concuerdan con la distribución encontrada por microscopia confocal anteriormente en nuestro laboratorio. Estos resultados hacen pensar que en la amiba pudiera existir un mecanismo de secreción de proteínas similar al modelo de maduración de cisternas descrito para el aparato de Golgi de algas verdes.

Además se hizo una comparación entre amibas provenientes de líneas celulares en cultivo y de absceso hepático axenizadas, entre las cuales no se observaron diferencias en la distribución de estos marcadores moleculares.

Introducción

1. *Entamoeba histolytica*

1.1 Amibiasis

Entre las 24 grandes enfermedades o complejos de enfermedades del mundo en desarrollo, la amibiasis ha sido clasificada en la posición decimocuarta y es causada por *Entamoeba histolytica*, protozooario parásito que se hospeda en el lumen del intestino grueso humano. La amibiasis invasiva es un problema de salud pública mundial, la infección es endémica y 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. En 1989, la incidencia mundial de infección por *E. histolytica* fué estimada en el 12% (Martínez Palomo, 1989) y desde 1986 se consideró como la tercera causa de mortalidad debida a enfermedades parasitarias (después de Malaria y la Esquisostomiasis), con un estimado de entre 50,000 y 100,000 muertes por año (Walsh, 1986). En 1994 se calculaban 50 millones de personas infectadas, de ellas había un millón en México donde se reportaban 1000 muertes anuales debidas a amibiasis (Caballero-Salcedo *et al.*, 1994). Para 1996, las encuestas seroepidemiológicas en México estimaban que 8.3% de los individuos eran seropositivos, representando un aumento de 2 - 2.5% en 10 años (Carrero y Laclette, 1996).

1.2 Biología

La *Entamoeba histolytica* (Phylum: Sarcomastigophora; Subphylum: Sarcodina; Superclase: Rhizopoda; Clase: Lobosea; Orden: Amoebida; Suborden: Tubulina; Familia: Entamoebidae; Género: Entamoeba) está incluida dentro de las siete especies de amiba que se consideran habitantes comunes del tracto intestinal humano siendo la única de importancia médica. Cuatro pertenecen al género Entamoeba: *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli* y *E. dispar*. Las otras tres especies representan diferentes géneros: *Endolimax nana*, *Iodamoeba buetschlii*, y *Dientamoeba fragilis*, aunque se considera a esta última como un flagelado aberrante. Durante mucho tiempo se consideró que como

comensal, la *E. histolytica* no producía signos o síntomas en personas que presentaban lo que se conoce como Amibiasis Luminal. Las amibas virulentas invaden la mucosa intestinal y producen disentería y amebomas; a través de lesiones que la comunican con el torrente sanguíneo, se pueden difundir y causar lesiones extraintestinales como los abscesos hepáticos, causando amibiasis invasiva. Ahora se sabe que los diferentes cuadros los producen amibas de distintas especies aunque morfológicamente idénticas: *E. histolytica* es el patógeno responsable de causar Amibiasis Invasiva y *E. dispar* quien es un comensal del intestino (Martínez Palomo, 2000; Jackson, 1998; Espinosa-Castellano *et al.*, 1998).

1.3 Ciclo de vida

Aunque el hombre es el único hospedero, el ciclo de vida de *E. histolytica* no ha sido estudiado en humanos. Sin embargo, la descripción del ciclo está basada en estudios realizados en monos y se ha extrapolado al humano (Dobell, 1928). El ciclo, que inicia al ingerir quistes presentes en agua o alimentos contaminados, comprende cuatro estadios consecutivos: trofozoitos, prequistes, quistes y formas metaquísticas.

Los trofozoitos, o forma replicativa, son los que producen el cuadro patológico al infectar la mucosa del colon; es un protozoo pleomórfico, de 10 a 60 μm de diámetro, se multiplica por fisión binaria y se enquista, produciendo quistes tetranucleados típicos, después de dos divisiones nucleares sucesivas de quistes uninucleados. De cada quiste emerge una sola amiba metaquística tetranucleada, que produce a su vez ocho trofozoitos uninucleados después de su división. Los quistes aparecen cuando las condiciones de viabilidad para el trofozoito son desfavorables. Al transformarse en quiste, la amiba

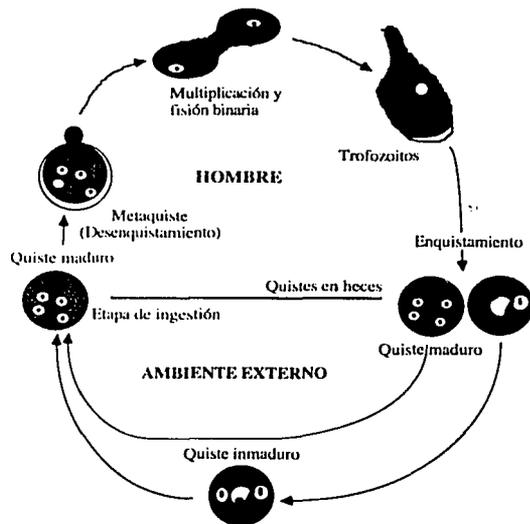


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*

elimina los nutrientes y adquiere una forma esférica para constituir un prequiste mononucleado. Al madurar, el quiste se recubre con una resistente membrana externa y el núcleo se divide. Los quistes inmaduros contienen dos núcleos; los maduros, que miden entre 10 y 18 μm de diámetro, tienen cuatro núcleos (Fig. 1) (Martínez Palomo 1989; Martínez Palomo 2000; Jackson, 1998).

1.4 Bioquímica

Bioquímicamente, *E. histolytica* presenta un metabolismo que no asemeja al de los eucariotes más complejos sino más bien al de los procariotes. Por ejemplo, carece de hemoproteínas, glutatión, ciclo de Krebs, vía colateral de las pentosas y su glicólisis no está regulada alostéricamente. Es un aerobio facultativo que carece de mitocondrias y cuyas enzimas glicolíticas son similares a las de bacterias. No cuenta con citocromos, sin embargo los electrones se transfieren de sustratos reducidos al oxígeno a través de acarreadores como flavinas y centros de Fe (no hemo). No hay catalasas, peroxidasas u otras enzimas con grupos hemo, no obstante, el trofozoito puede vivir en una atmósfera de hasta 5% de oxígeno. Los carbohidratos son la principal fuente de energía. El catabolismo de la glucosa se caracteriza por la degradación a través de la vía de Embden Meyerhof en la que el lactato no es el producto final -sino el etanol y el CO_2 - y no se ha reportado que exista una lactato deshidrogenasa. El pirofosfato ha reemplazado al ATP como fuente de energía en varias reacciones glicolíticas (Martínez Palomo, 1989; Martínez Palomo, 2000; Carrero *et al.*, 1996).

1.5 Organización celular

A nivel celular, el trofozoito de *E. histolytica* es un eucariote primitivo porque carece de los siguientes componentes citoplasmáticos: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplásmicos, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (RE) bien desarrollados, mitocondrias y peroxisomas. Presenta una población heterogénea de vacuolas con tamaño (0.5-9.0 μm de diámetro) y forma diversos, cuya función ha sido asociada a una alta actividad fagocítica. *E. histolytica* no es el único protozoario que carece de estructuras citoplasmáticas, algunos protozoarios como *Giardia lamblia* y *Vairimorph necatrix* también

carecen de estructuras tales como las mitocondrias (Martínez Palomo, 1989; Martínez Palomo, 2000; Carrero *et al.*, 1996).

A nivel de microscopía electrónica e histología no se han encontrado estructuras similares al RE y al aparato de Golgi en el citoplasma de *E. histolytica* (Fig. 2), pero sí se ha observado la existencia de un retículo membranoso compuesto de túbulos finos, este sistema se ha interpretado como la contraparte del Retículo Endoplásmico Liso, aunque no siempre se encuentra en réplicas de criofractura. Se han hecho estudios que sugieren que algunas vacuolas citoplásmicas puedan corresponder a componentes del RE y del aparato de Golgi (Martínez Palomo 1989; Mazzuco *et al.*, 1997; Martínez Palomo, 2000).

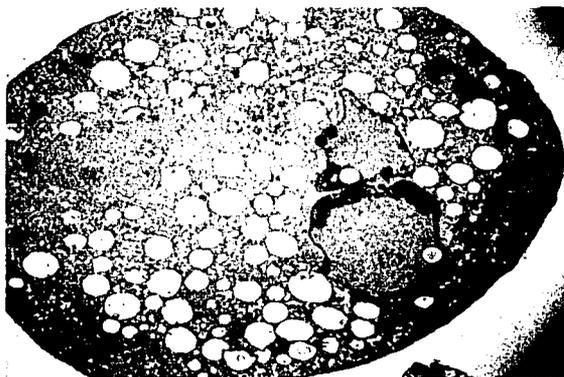


Figura 2. Micrografía electrónica de *E. histolytica*. Se representa al trofozoito de *E. histolytica* con la característica población de vesículas heterogéneas (Cortesía Dra. Rosana Sánchez López).

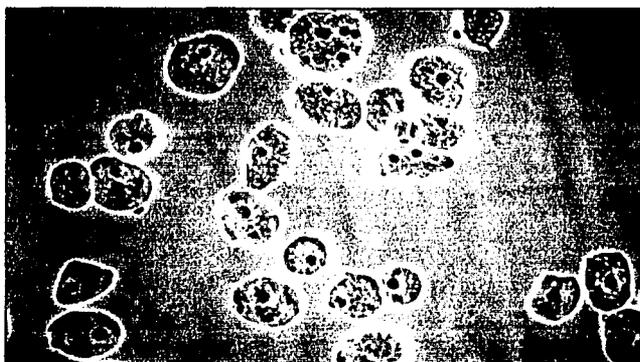
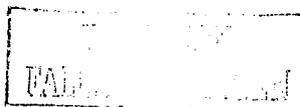


Figura 3. Trofozoitos de *E. histolytica* vistos por contraste de fases (Cortesía Dr. Roberto Stock Silberman). Nótese la diferencia en cuanto a número y tamaño de núcleos.

E. histolytica también presenta organelos y estructuras celulares que son comunes con el resto de los eucariotes, como son el núcleo y los ribosomas. El núcleo tiene forma esférica y su diámetro mide alrededor de la quinta o sexta parte de la amiba completa. Algunas



veces los trofozoitos poseen más de un núcleo (Fig. 3); al parecer, este hecho tiene que ver con que la división celular no está sincronizada con la división nuclear. En la división celular no hay evidencia de que se condensen todos los cromosomas, sin embargo, es el único momento en que se pueden observar estructuras microtubulares y microfilamentosas (Argüello *et al.*, 1992). Otra estructura común con el resto de los eucariotes son los ribosomas que parecen estar organizados en arreglos helicoidales y se observan frecuentemente asociados a vacuolas con una cisterna membranosa, aunque no se han encontrado ribosomas libres ni unidos a membrana (Martínez Palomo, 1989).

1.6 Genoma

A nivel molecular, *E. histolytica* presenta también diferencias con los eucariotes avanzados. El tamaño del genoma se calcula entre 2.2 a 3.7×10^8 Kb (Bhattacharya *et al.*, 2000) y, aunque la ploidía es incierta, parece estar organizado en 31-35 cromosomas de entre 0.3 y 3.3 Mb (Willhoeft y Tannich, 1999). La cromatina se organiza en partículas similares a nucleosomas que se condensan por proteínas de unión a DNA que difieren de las histonas típicas (Torres-Guerrero *et al.*, 1991). El contenido global de G+C es de 22% y se sabe que en las secuencias codificantes es de 33%, donde también se muestra una preferencia de A+T del 82% en la tercera posición del codón (Tannich y Horstmann, 1992). Las regiones intergénicas y las regiones 5' y 3' no traducidas de los mRNA son relativamente cortas (Petter *et al.*, 1992; Bruchhaus *et al.*, 1993). La mayoría de los genes carecen de intrones y cuando los hay, son de menos de 100 pb (Bhattacharya *et al.*, 2000). Aunque la mayoría del DNA está contenido en el núcleo, se ha encontrado DNA en vesículas nucleares tanto libres en el citoplasma como dentro de una estructura tipo kinetoplasto (EhkO) (Solís *et al.*, 2002). También existen varias copias de plásmidos (episomas), que parecen contener su propio origen de replicación. Estas estructuras de 25 kb de longitud (existen alrededor de 200 por célula) contienen a los genes ribosomales (Bhattacharya *et al.*, 1989, Hubber *et al.*, 1989).

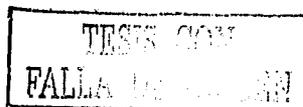
1.7 Patogenicidad

Dentro del colon, el trofozoito de *E. histolytica* puede producir una infección asintomática que se puede convertir en una infección patogénica causando úlceras, disentería y eventualmente amibiasis extraintestinal (Gilchrist y Petri, 1999). En la invasión del trofozoito a la mucosa se pueden distinguir varias etapas: adhesión a la mucosa intestinal, muerte celular por contacto, disrupción de la pared intestinal y transporte a través del torrente sanguíneo (Das *et al.*, 1999). La adhesión de los trofozoitos a las células blanco ocurre principalmente por medio de una lectina de 170 kDa que se une a residuos terminales de Gal-GalNAc de glicoproteínas presentes en la superficie de la célula blanco (Petri *et al.*, 1989). Otras moléculas involucradas en la adhesión del trofozoito incluyen una lectina de 220 kDa (Rosales-Encina *et al.*, 1989), una adhesina de 112 kDa (Arroyo y Orozco, 1987) y un lipofosfoglicano (Stanley *et al.*, 1992). Una vez que los trofozoitos de *E. histolytica* establecieron contacto directo con la célula blanco, se lleva a cabo un segundo evento de patogenicidad que incluye la secreción de mediadores líticos como péptidos formadores de poro o amibaporo (Leippe *et al.*, 1991), cisteín proteasas (Que y Reed, 2000) fosfolipasa A (Long-Krug *et al.*, 1985), colagenasa (Muñoz *et al.*, 1984) y metalocolagenasa (McKerrow *et al.*, 1993). Por último, *E. histolytica* fagocita a las células previamente lisadas y degrada cada uno de los componentes orgánicos ingeridos por medio de enzimas hidrolíticas localizadas en las vacuolas citoplásmicas de los trofozoitos (Martínez-Palomo, 1989).

2. Secreción

2.1 Generalidades

Tanto en las células procariones como eucariotes, los procesos especializados como la secreción y la transducción de señal, así como las reacciones enzimáticas del metabolismo, entre otros, se organizan en membranas y en compartimentos rodeados por membranas. La bioquímica característica de cada compartimento y la especificidad y direccionalidad de los procesos secretorios sólo se pueden mantener si existen mecanismos para que las



proteínas recién sintetizadas lleguen selectivamente a su blanco, para atravesar membranas impermeables y para su modificación conformacional.

En procariontes (v.gr. *E. coli*) la secreción de proteínas hacia el espacio periplásmico y el ensamblaje de proteínas en la membrana externa se logran dirigiendo a las proteínas nacientes del citoplasma mediante señales adecuadas. En los eucariotes, la vía de tráfico de proteínas a membrana plasmática y de secreción involucra a una serie de compartimentos (RE y aparato de Golgi) a través de los cuales un gran número de proteínas pasan en una ruta hacia su destino final, por ejemplo el espacio extracelular (Rothblatt *et al.*, 1994). Actualmente se aceptan dos modelos que explican esta ruta: el de transporte vesicular y el de maduración de cisternas.

2.2 Secreción en Eucariotes

De acuerdo con el modelo de transporte vesicular (Fig. 4), las proteínas de secreción recién sintetizadas, así como las destinadas al lumen o a la membrana del RE, el aparato de Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática pasan primero por el RE. Dentro de este compartimento, los polipéptidos sintetizados *de novo* pueden sufrir un proceso proteolítico o ser glicosilados. Además, están expuestos a un ambiente oxidativo, a las chaperonas del RE y a enzimas que promueven el plegamiento, la formación de puentes disulfuro e isomerización. A excepción de aquellas que se retienen selectivamente, por ser miembros residentes del RE (y los que se degradan por errores en el ensamblaje), todas las proteínas recién sintetizadas migran hacia el aparato de Golgi donde pueden ser glicosiladas nuevamente o sufrir cambios en los oligosacáridos añadidos en el RE y ser dirigidas hacia lisosomas, membrana plasmática o gránulos de secreción (Rothblatt *et al.*, 1994).

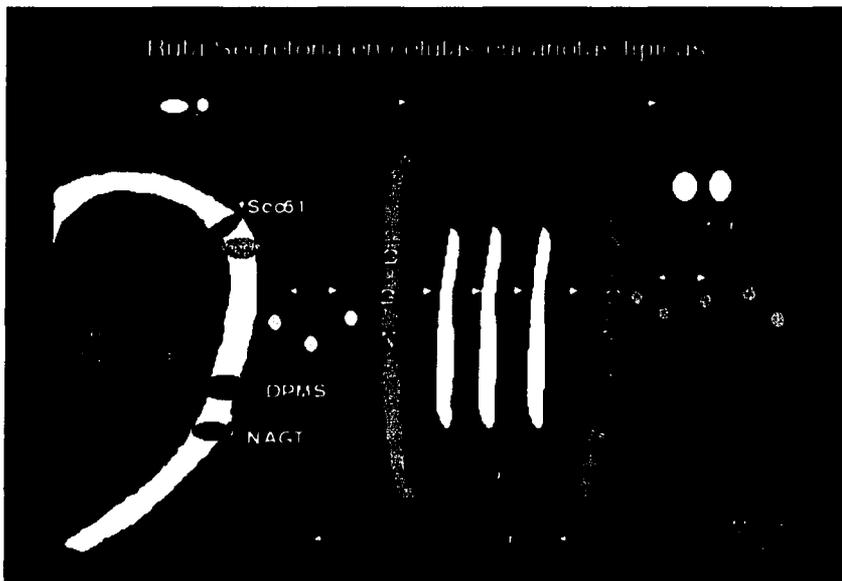


Figura 4. Ruta Secretora típica de células eucariotas. Se resaltan los marcadores utilizados en esta tesis.

En las células de mamífero, la importación de proteínas al RE ocurre co-traduccionalmente. La proteína naciente presenta en el extremo amino terminal una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos llamada péptido señal (Blobel y Sabatini, 1971). El péptido señal es guiado a la membrana del RE por al menos dos componentes: una partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y por un receptor SRP. El SRP se une al péptido señal tan pronto como el péptido emerge del ribosoma, esto causa una pausa en la síntesis de la proteína que da tiempo al ribosoma de unirse a la membrana del RE y así asegurar que la proteína no se libere al citosol. SRP se une a su receptor, presente en la membrana del RE, y una vez establecido el contacto entre el ribosoma y el poro de translocación, SRP se libera. La proteína pasa a través del canal formado por el complejo Sec61 (Sec61 α , β y γ en mamíferos) mientras se está traduciendo el mRNA (Johnson y van Waes, 1999). Una vez dentro del RE, el péptido señal es cortado y la proteína puede sufrir varios cambios como la formación de puentes disulfuro, cortes proteolíticos específicos, adición y modificación de carbohidratos y plegamientos. Muchas proteínas son transitorias en el lumen del RE pero existen otras que son residentes y que se encuentran

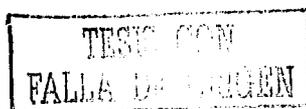
en altas concentraciones. Algunas de estas proteínas actúan como catalizadores de manera que ayudan al plegamiento y ensamblaje correcto de las proteínas que se translocan al RE. Las proteínas del lumen del RE tienen una señal de retención compuesta por cuatro aminoácidos (KDEL/HDEL) en el extremo carboxilo terminal que es responsable de mantener a la proteína en el RE (Munro y Pelham, 1987; Pelham, 1996); las proteínas de membrana tienen otras señales de retención, aparte del KDEL, como KKXX (X es cualquier aminoácido) ó RKR (Ma y Jan, 2002). Si la proteína no posee señales de residencia en el RE, continúa su camino hacia el complejo de Golgi. En su paso por el complejo de Golgi, las proteínas pueden sufrir O-glicosilación y rearrreglo de azúcares, sulfatación, fosforilación y degradación. La exportación de proteínas desde el RE involucra la formación de vesículas y su fusión con la red *cis*-Golgi (CGN), el primer compartimento del aparato de Golgi. Las proteínas exportadas desde el RE entran a *cis*-Golgi por CGN y luego se mueven a través de las cisternas intermedias del Golgi y finalmente a *trans*-Golgi donde se completa el procesamiento de glicosilación. A partir de la red *trans*-Golgi (TGN) las proteínas se segregan a diferentes vesículas de transporte y de ahí a sus destinos finales (membrana plasmática, lisosomas o vesículas de secreción). El destino final de una proteína está determinado por señales que pueden tomar forma de cortas secuencias de aminoácidos o modificaciones covalentes de la proteína. Las vesículas que exportan proteínas desde el RE hacia el aparato de Golgi incluyen a proteínas que residen en el lumen del RE. La función de la señal de retención de RE (etiqueta KDEL, KKXX ó RKR) no es mediante el anclaje al RE de las proteínas que la llevan al lumen del RE, sino que estas proteínas son selectivamente retransportadas al RE después del transporte hacia *cis*-Golgi. En *cis*-Golgi, la proteína ERD2 reconoce la secuencia KDEL y empaca a las proteínas que llevan esa señal en vesículas especiales que las regresan al RE (Semenza y Pelham, 1992). La secuencia KKXX es reconocida por la subunidad α de las proteínas COPI y la secuencia RKR podría ser reconocida por componentes de COPI ó por proteínas adaptadoras como en el caso de la secuencia KDEL, al ser reconocidas, las proteínas son regresadas al RE (Ma *et al.*, 2002; Zerangue *et al.*, 2001).

El modelo de maduración de cisternas se propuso originalmente para describir el funcionamiento del aparato de Golgi en algas verdes. Actualmente, se propone que un mecanismo similar podría funcionar en algunas células de mamífero como las células de glándula mamaria, los hepatocitos, los fibroblastos y las células uroteliales (Mironov *et al.*, 1997). En este modelo, el material que sale del RE converge hacia el complejo de Golgi y forma una nueva cisterna "cis". El material que no será secretado (como las proteínas residentes del RE) es regresado del cis-Golgi al RE, mientras que al mismo tiempo, los componentes que definen al compartimento medial (por ejemplo las enzimas del Golgi medial) viajan en dirección retrógrada hacia los elementos cis. De esa manera, el compartimento cis adquiere características del compartimento medial y se convierte en un compartimento medial. Se ha postulado que son las vesículas COPI quienes transportan a las enzimas del Golgi en dirección retrógrada mientras la cisterna migra en dirección anterógrada. El proceso se repite (el compartimento medial se convierte en trans) hasta que la carga alcanza la red trans Golgi. Finalmente, el material a secretar que está en el TGN se libera progresivamente a través de la formación de gránulos de secreción, vesículas u otros mecanismos hasta que se consume el organelo. Las proteínas características del TGN se reciclan hacia el trans-Golgi, transformándolo así en el siguiente TGN listo para secretar. La característica esencial de este mecanismo es la maduración de la cisterna, con la consecuencia de que la carga progresa y es modificada conforme la cisterna madura (Mironov *et al.*, 1997; Glick *et al.*, 1997).

2.3 Secreción en *E. histolytica*

Las vías de secreción en *E. histolytica* han sido poco exploradas y aún no se sabe si exista un sistema de secreción equivalente al RE y al aparato de Golgi, aunque se ha sugerido que algunas vesículas podrían estar involucradas en estos procesos (Mazzuco *et al.*, 1997).

Existen estudios que evidencian la secreción activa por *E. histolytica* de una gran variedad de proteínas, algunas involucradas directamente con la patogenicidad; algunas de estas proteínas sufren modificaciones *post*-traduccionales, como glicosilación y degradación del péptido señal (Martínez Palomo, 1989; Vargas-Rodríguez *et al.*, 1998). Una de estas



proteínas es la lectina Gal/GalNAc, que es una proteína de membrana plasmática. Dicha lectina presenta el corte proteolítico de su péptido señal, como sucedería en la traslocación al RE en eucariotas típicos. Además pudo marcarse con [3 H]glucosamina, lo que indica que es una glicoproteína (Petri, *et al.*, 1989). Otra proteína de membrana que sufre modificaciones post-traduccionales es la proteína rica en Serinas (SREHP). Esta proteína es fosforilada y sufre O-glicosilación ya que se han encontrado residuos terminales de GlcNAc unidos a Serina/Treonina y múltiples sitios potenciales para este tipo de glicosilación (Stanley *et al.*, 1995). Dentro de los factores importantes para la virulencia de *E. histolytica* están los lipofosfoglicanos (LPGs). Recientemente se ha sugerido que estos LPGs son en realidad proteofosfoglicanos (PPGs) unidos por un ancla de glicosil-fosfatidil inositol (GPI). El polipéptido de estos PPGs es modificado con cadenas de azúcares que tienen la estructura general $[Glc\alpha-6]_nGlc\beta-6Gal$ ($n = 2 - 23$) y que se unen a través de residuos de fosfo-serina (Moody-Haupt *et al.*, 2000). La ruta biosintética para los PPG o para cualquier glicoconjugado en *E. histolytica* aún no ha sido elucidada.

Para identificar compartimentos análogos al RE y al aparato de Golgi, algunos grupos, entre otros el nuestro, se han dedicado a la identificación de marcadores moleculares característicos de compartimentos involucrados en el tráfico de proteínas. Se han identificado a la GlcNAc-1-P transferasa (NAGPT) y a la GlcNAc transferasa (NAGT), dos enzimas involucradas en la etapa temprana de la N-Glicosilación en ameba (Vargas-Rodríguez *et al.*, 1998). También se ha purificado y caracterizado la Dolicol Fosfato Manosa Sintetasa (DPMS), enzima esencial en la biosíntesis del dolicol-oligosacárido a ser transferido en bloque a proteínas nacientes y blanco de N-glicosilación (Villagómez-Castro *et al.*, 2000). Otros grupos de investigación han reportado la utilización de marcadores moleculares para el estudio del RE (BiP) y del tráfico vesicular (Proteínas Rab) (Gosh *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000).

En nuestro laboratorio se han caracterizado los siguientes genes que codifican para proteínas involucradas en la etapa temprana del tráfico de proteínas en eucariotes: SRP54 es una proteína del complejo SRP, encargado de la conducción de las proteínas nacientes hacia y a través de la membrana del RE (Ramos *et al.*, 1997); la proteína Sec61 α forma

parte estructural del poro responsable de la translocación de proteínas al RE, así como la translocación de proteínas de degradación del RE hacia el citoplasma (Siminovich, 1999; Sánchez-López *et al.*, 2000-b); STT3 es una de las subunidades del complejo oligosacariltransferasa presente en RE y responsable de la primera etapa del proceso de glicosilación de proteínas (Gutiérrez *et al.*, 2000); PDI o proteín-disulfuro isomerasa, es una enzima de lumen de RE que cataliza la formación de puentes disulfuro en proteínas que circulan por este compartimiento celular (Ramos y Alagón, 2000); ERD2, es el receptor de secuencias KDEL (Gutiérrez, 1999; Sánchez-López *et al.*, 1997). En mamíferos, la proteína de unión a GTP Rab8 está involucrada en tráfico vesicular entre el *trans*-Golgi y la membrana plasmática (Juárez *et al.*, 2001).

3. Fraccionamiento Subcelular

3.1 Generalidades

Una herramienta útil para entender las múltiples actividades llevadas a cabo por las células es fraccionar sus componentes. Desde sus inicios, el fraccionamiento de células ha proporcionado información sobre la composición y función de los organelos celulares. El fraccionamiento celular también ha facilitado el estudio de la biogénesis de los componentes celulares, el transporte intracelular, el ensamblaje de la membrana y por lo tanto, los elementos que regulan o controlan dichos eventos (Fleischer y Kervina, 1974).

El proceso de fraccionamiento involucra dos etapas principales: (1) la ruptura de la organización celular (homogenización) y (2) el fraccionamiento del homogenado para separar las diferentes poblaciones de organelos y de estructuras macromoleculares. La ruptura de las células se puede lograr mediante choque osmótico, vibración ultrasónica o por fuerza mecánica. Los métodos de ruptura menos agresivos dejan los núcleos, el Golgi, mitocondrias y otras estructuras membranosas intactas; el *homogenado*, si está en el medio adecuado, retiene la mayoría de la actividad bioquímica original. Los homogenados generalmente se fraccionan mediante una serie de centrifugaciones diferenciales a las que

siguen las centrifugaciones a través de gradientes diseñados para separar los organelos y partículas en base al tamaño, la densidad y las propiedades de sedimentación (Pasquali *et al.*, 1999). La centrifugación diferencial es una secuencia de centrifugaciones en que se va aumentando la velocidad y que separa los componentes basándose en los coeficientes de sedimentación de cada partícula; cada coeficiente es función del tamaño y la forma de las partículas. La centrifugación diferencial enriquece más que purifica las partículas aún después de varias centrifugaciones. El siguiente paso en el fraccionamiento es la centrifugación a través de un gradiente en el que la purificación de los componentes es por densidad (Fig. 5). Los medios más utilizados para la formación de los gradientes son: Sacarosa, Percoll®, Accudenz®, Nycodenz® y Ficoll®. Cada uno de estos medios tiene ventajas y desventajas pero el más utilizado es y ha sido la sacarosa (Spector *et al.*, 1998).

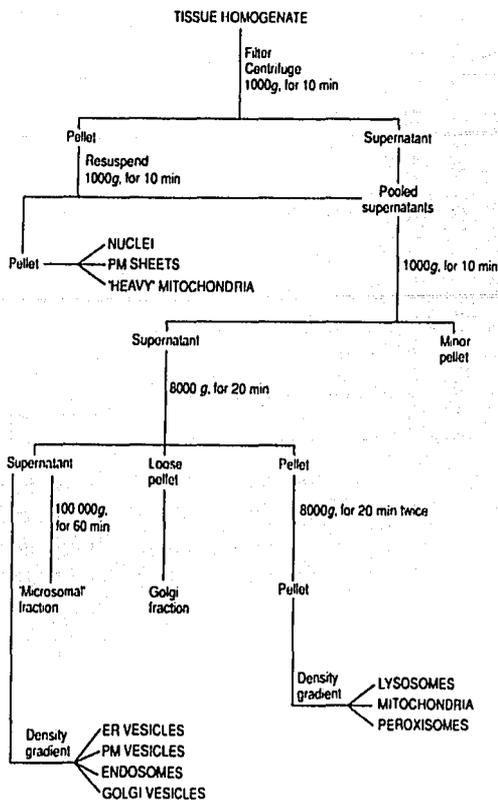


Figura 5. Protocolo generalizado de fraccionamiento subcelular. Este esquema se basa en el procedimiento utilizado para muestras de hígado de ratón (Evans, 1992).

3.2 Fraccionamiento Subcelular en *E. histolytica*

El fraccionamiento celular ha demostrado ser un acercamiento importante para entender el funcionamiento de la morfología en general de las células al asignar ciertas funciones a diferentes fracciones subcelulares dependiendo de las actividades enzimáticas asociadas a éstas. Esta técnica se ha utilizado para estudiar la ruta secretoria ya que se purifican los

organelos responsables de funciones específicas, como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas y membrana plasmática entre otros (Palade, 1975).

Entamoeba invadens fue el primer miembro del género *Entamoeba* en ser utilizado para aislamiento de membranas celulares. La idea era que al no presentar organelos como mitocondrias y retículo endoplásmico, se podría utilizar a este organismo como un modelo ideal para el aislamiento de membrana plasmática, libre de contaminantes. Después de centrifugar el *homogenado* celular, se recuperó un pellet que se analizó por centrifugaciones sucesivas en gradientes discontinuos de sacarosa. De esta manera, se aislaron dos fracciones de membranas que se consideraron como membrana plasmática y como membranas de vacuolas. Sin embargo, no se hizo ninguna caracterización excepto por microscopía electrónica (Spies y Elbers, 1972). Los siguientes estudios (pocos) en *E. invadens* emplearon enzimas como marcadores endógenos para la caracterización de las fracciones subcelulares. Uno de ellos se diseñó en particular para el aislamiento de fagolisosomas y membrana plasmática, esto se logró mediante centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente continuo de sacarosa. Se utilizaron como marcadores fosfatasa ácida, catalasa, peroxidasa y glucosa-6-fosfatasa, las tres últimas para comprobar la no contaminación de las fracciones; la actividad de glucosa-6-fosfatasa no se encontró asociada con alguna membrana en particular (Van Vliet *et al.*, 1976). Ahora se sabe que hay una ausencia total de catalasas y peroxidasas en *E. invadens*, como ya se sabía en *E. histolytica* (McLaughlin y Aley, 1985, Weinbach y Diamond, 1974). En otro trabajo se empleó 5'-mononucleotidasa como marcador de membrana plasmática, sin embargo, los autores no detectaron la presencia de esta enzima, ni siquiera en presencia de Mg^{2+} . Recuperaron la membrana plasmática después de una centrifugación a $1600 \times g$ y el sobrenadante lo sometieron a una serie de centrifugaciones diferenciales y gradientes discontinuos de sacarosa (McLaughlin y Meerovitch, 1975).

En el primer estudio de fraccionamiento subcelular de membranas de *E. histolytica* se obtuvieron dos fracciones, una enriquecida en vesículas de digestión y otra enriquecida en membrana plasmática utilizando gradientes discontinuos de sacarosa posteriores a una

centrifugación diferencial. Se utilizaron como marcadores 5'-mononucleotidasa para la membrana plasmática y la fosfatasa ácida para las vacuolas de digestión. Las dos actividades enzimáticas se distribuyeron de igual manera tanto en la centrifugación diferencial como en el gradiente de densidad y se concluyó que no hubo una buena separación de la membrana plasmática (Serrano *et al.*, 1977). El siguiente intento por purificar la membrana plasmática de *E. histolytica* lo hicieron Aley y colaboradores en 1980. En la ausencia de un marcador confiable de membrana plasmática, marcaron las células con ^{125}I , en seguida incubaron las células con concanavalina A (Con A) antes de la ruptura, con el fin de aislar la membrana plasmática como agregados grandes evitando así la contaminación con el material interno. A pesar de esto, no encontraron evidencia de una fosfatasa ácida distintiva de la membrana plasmática aunque si encontraron un enriquecimiento de 20 veces de una Ca^{++} -ATPasa en esta fracción. A pesar de que esta Ca^{++} -ATPasa también se encontró en el resto de las fracciones subcelulares, parecía ser la actividad enzimática de membrana plasmática más confiable (Aley *et al.*, 1980 a y b).

Recientemente ha habido esfuerzos por separar componentes citoplásmicos de *E. histolytica* y la mayoría de ellos se han basado en el protocolo de Aley (1980 a) como un método de separación de la membrana plasmática. Métodos como la centrifugación diferencial han llevado a la obtención de fracciones de membranas internas mixtas en las que se han ensayado diferentes actividades enzimáticas como: DPMS y α -glucosidasas (Vargas-Rodríguez *et al.*, 1998; Villagómez-Castro *et al.*, 1998; Zamarripa-Morales, *et al.*, 1999). Utilizando diferentes velocidades de centrifugación (10,000, 17,500 y 160,000 x g) y gradientes continuos de sacarosa, se ha localizado la alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD. La actividad de esta enzima presenta un patrón similar de sedimentación al de la alcohol deshidrogenasa de *E. coli* y no parece comportarse como una enzima de membrana (Ávila *et al.*, 2002). En otros estudios se ha empleado la centrifugación secuencial en gradientes de sacarosa donde se enriqueció una fracción de membranas que probablemente representan al RE amibiano por contener actividades de DPMS, NAGPT/NAGT, y UDPasa, así como la proteína calnexina (detectada con anticuerpos heterólogos) (Rocha, 2001; Villagómez-Castro, 2000). En un estudio donde se utilizan

gradientes de Percoll® se ha separado la membrana plasmática y el amebaporo (Rosenberg y Gitler, 1985) y no se ha empleado el protocolo de Aley como base ya que hay estudios que demuestran que la Con A estimula la liberación del amebaporo y de proteasas activadas por tiores. En este estudio se sugiere que la Con A podría introducir un sesgo en la distribución de los componentes intracelulares (Young *et al.*, 1982). Sin embargo, el método de separación de membrana plasmática según Aley sigue siendo el más utilizado.

4. Justificación

Durante mucho tiempo se consideró que *E. histolytica* no poseía organelos internos tales como RE, aparato de Golgi, etc. Sin embargo, recientemente se han identificado marcadores moleculares característicos de compartimentos involucrados en el tráfico de proteínas (Sánchez-López *et al.*, 2000-a). Así mismo, existen estudios que evidencian la secreción activa por *E. histolytica* de una gran variedad de proteínas, algunas involucradas directamente con la patogenicidad (Martínez-Palomo, 1989). Se sabe también que algunas de estas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales, como glicosilación y degradación del péptido señal (Vargas-Rodríguez *et al.*, 1998; Petri, *et al.*, 1989; Stanley *et al.*, 1995; Moody-Haupt *et al.*, 2000).

A partir de estos datos se vislumbra la presencia de una vía secretoria activa en *E. histolytica*, aunque existen diversos aspectos que aún se desconocen acerca de la maquinaria secretoria de este organismo. Todavía no se sabe en qué compartimento se lleva a cabo la glicosilación de proteínas, ni qué estructuras realizan funciones de transporte. En este sentido, es necesario determinar la existencia de un sistema funcional equivalente al RE y al aparato de Golgi. La respuesta a estas preguntas podría dar elementos en el conocimiento del desarrollo evolutivo de las estructuras y moléculas que participan en el movimiento intracelular de las proteínas (rutas secretoria y endocítica), así como su papel biológico en este organismo de interés biomédico.

El fraccionamiento celular ha demostrado ser un acercamiento importante para entender el funcionamiento de la morfología en general de las células al asignar ciertas funciones a

diferentes fracciones subcelulares dependiendo de las actividades enzimáticas asociadas a éstas. Sin embargo, existen pocos estudios de este tipo en *E. histolytica* y la mayoría se han basado en el protocolo de Aley y colaboradores (1980 a). Este protocolo se basa en la adición de Con A para la separación de la membrana plasmática. Sin embargo, se ha sugerido que la Con A podría introducir un sesgo en la distribución de los componentes intracelulares (Young *et al.*, 1982). Además, este protocolo se limita a la separación de la membrana plasmática dejando el resto de las membranas internas como un conjunto. Resulta necesario, pues, un protocolo que enriquezca ciertas estructuras celulares con funciones tipo RE a las que después pueda dárseles seguimiento.

5. Hipótesis

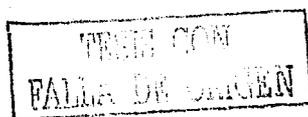
En el presente trabajo nos hemos planteado como hipótesis que el análisis de la expresión de marcadores moleculares de estructuras tipo RE debería proporcionar alguna evidencia bioquímica de la existencia de compartimentos celulares con funciones involucradas en el tráfico y procesamiento de proteínas, típicas de este organelo, en *E. histolytica*.

6. Objetivos

En este proyecto, se propone un estudio sistemático de la distribución de marcadores moleculares y actividades enzimáticas propias de RE en fracciones subcelulares de trofozoitos de *E. histolytica*.

Específicamente se pretende lo siguiente:

- Determinar las condiciones de homogenización de trofozoitos de *E. histolytica*.
- Determinar las condiciones de fraccionamiento subcelular.
- Caracterización de las fracciones subcelulares por ensayos tipo Slot Blot utilizando anticuerpos específicos de un marcador molecular de retículo endoplásmico (Sec61 α , STT3 y PDI).



- Caracterización de actividades enzimáticas tipo RE presentes en las distintas fracciones subcelulares obtenidas (DPMS y NAGPT/NAGT).
- Comparar las fracciones de amibas provenientes de absceso hepático con las fracciones provenientes de amibas de cultivo.

7. Materiales

7.1 Amortiguadores (Buffers)

PBS: NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 70 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, pH 7.0

PBS-A: NaCl 175 mM, Fosfatos 15 mM, pH 7.2

BH: Sacarosa 200 mM, EDTA 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, PMSF 5 mM, E64 0.5 mM.

BH-A: Tris HCl 50 mM pH 7.5, E64 10 μM

BR: Sacarosa 300 mM, EDTA 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, PMSF 5 mM, E64 0.5 mM.

TBST: Tris HCl 10 mM pH 7, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%

Percoll-NaCl: 9 partes (v/v) de Percoll[®], 1 parte (v/v) de NaCl 1.5 M (Percoll 90% - NaCl 0.15 M) (Percoll[®] Methodology and applications, PHARMACIA)

Percoll-Sac: 9 partes (v/v) de Percoll[®], 1 parte (v/v) de Sacarosa 2.5 M (Percoll 90% - Sacarosa 0.25 M)

Solución Stock de acrilamida: Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%

Buffer Separador para SDS-PAGE: Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8

Buffer Concentrador para SDS-PAGE: Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8

Buffer de Muestra para SDS-PAGE (SB2X): glicerol 10%, SDS 2.5%, Tris 50 mM pH 6.8, β-ME 5%, azul de bromofenol 0.002%

TANK Buffer: Tris 25 mM, glicina 19 mM, SDS 0.1%, pH 8.6

Buffer de transferencia de proteínas semi-seca: Glicina 39 mM, Tris-Base 48 mM, SDS 0.04%, Metanol 20%, pH 7

7.2 Células

7.2.1 Amibas

Se utilizaron trofozoítos de la cepa HK9 y HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* cultivados en condiciones axénicas (Diamond *et al*, 1978). Se utilizaron también trofozoítos provenientes de absceso hepático de hamster cultivados en condiciones axénicas (donados por el laboratorio del Dr. Ruy Pérez-Tamayo).

7.2.2 Mamífero

Se utilizó la línea celular HeLa, proveniente de cáncer cervical humano.

Se utilizaron también hibridomas de ratón generados en el laboratorio del Dr. Alagón (M. en C. Carlos González, Biól. Judith Sánchez)

7.3 Medios de Cultivo

7.3.1. Amibas: Medio TYI-S-33 ó BI-S-33 (Diamond *et al*, 1978)

Peptona de biotriptasa	3.65%
Dextrosa	1.21%
NaCl	1.24%
KH ₂ PO ₄	0.07%
K ₂ HPO ₄	0.12%
L-cisteína hidrociorada	0.12%
Acido ascórbico	0.02%
Citrato de amonio férrico	0.006%

Luego de la esterilización se agrega:

Suero de ternera fetal (inactivado a 65°C)	15%
Vitaminas-Tween 80	3%

7.3.2. Mamífero: DMEM adicionado con suero fetal bovino (SFB - 10%)

7.4 Cómputo

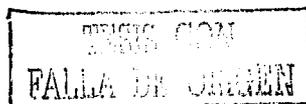
Se utilizaron las versiones para Macintosh de los siguientes programas:

Excel (Microsoft)

Kaleida Graph 3.0.1 (Abelbeck Software)

NIH Image 1.62

Photoshop 2.5 (Adobe)



7.5 Equipo

Campana de flujo laminar, serie FL-1796 (Veco)

Incubadora para cultivos celulares Controlled Environment, modelo 6200 (NAPCO)

Microscopio invertido BIOSTAR, serie 1820 (American Optical)

Centrífuga GS-15R; Rotores: S4180, F2402 (Beckman)

Centrífuga J2-21; Rotor: JS-13 (Beckman)

Ultracentrífuga XL-90; Rotor: VT150 (Beckman)

Airfuge; Rotor: A100-30 (Beckman)

Ultracentrífuga Óptima TL; Rotor: TLA100.4 (Beckman)

Fraccionador de Gradiente: AutoDensi Flow (Labconco)

Colector de Fracciones Modelo 2128 (BioRad)

FPLC Pump P500 (Pharmacia)

Refractómetro Abbe Modelo 10450 (American Optical)

Osmómetro Crioscópico: Osmomat 030 (Genoschech)

Slot Blot PR648 (Amersham Pharmacia Biotech)

Contador de centelleo líquido LS-6500 (Beckman).

Homogenizador Potter-Elvehjem con pistilo de Teflón (3 ml)

8 Métodos

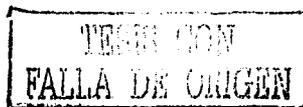
8.1 Cultivo de células

Trofozoítos: Se cultivaron en medio TYI-S-33 a 37°C.

HeLa e Hibridoma: Estas líneas celulares fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, en estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO₂.

8.2 Homogenización de Células

Se cosecharon 1×10^7 amibas colocando los tubos de cultivo en hielo por 5 min, se agitaron y centrifugaron a 1732 rpm (500 x g) por 10 min, a 4°C (Centrifuga Beckman GS-15R,



rotor S4180). Las células se lavaron en medio TYI sin suero (1 ml por cada 10 ml del volumen original), centrifugando a $500 \times g$, a 4°C , durante 10 min. Se resuspendieron (10^7 amibas/ml) en BH y se colocaron en un homogenizador Potter-Elvehjem donde se dieron 5 golpes, se permitió el choque osmótico por 3 min y se dieron 5 golpes más.

Para las células HeLa el protocolo fue el mismo, con excepción de la cosecha y el lavado que fue con solución HANK's. Las células se cosecharon con ayuda de un gendarme y después se centrifugaron a $500 \times g$, por 5 min, a 4°C .

8.2.1 Homogenización según método de Aley (Aley et al., 1980)

Los trofozoítos (aprox. 4.5×10^8) se lavaron 2 veces con PBS-A y una vez con PBS-A adicionado de MgCl_2 10 mM. El pellet se resuspendió en PBS-A- MgCl_2 y se le añadió Con A a una concentración final de 0.2 mg/ml. Las células se dejaron en reposo en hielo durante 15 min, con agitación ocasional y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS-A adicionado de MnCl_2 (0.25 mM) y CaCl_2 (0.5 mM). La pastilla celular se lavó una vez con BH-A y se colocó en el tubo del homogenizador Potter Elvehjem, en hielo, permitiendo la lisis osmótica durante 10 min. Los trofozoítos se homogenizaron con 25 golpes del pistilo. Se recuperó el homogenado total.

8.3 Fraccionamiento según método de Aley (Aley et al., 1980)

El homogenado total, del inciso anterior, se colocó sobre un gradiente discontinuo formado por Sacarosa 20% en BH-A sin E-64 y Manitol 0.5 M en el mismo buffer (volúmenes iguales de cada uno de los componentes del gradiente). El gradiente se centrifugó a $280 \times g$ durante 30 min, a 4°C . Se recuperó la fase superior del gradiente (Manitol 0.5 M) que contenía las membranas internas amibianas y el citosol. Las membranas plasmáticas permanecieron en la fase inferior de sacarosa al 20% (Aley et al., 1980).

8.4 Centrifugación diferencial

Se centrifugó el homogenado total (proveniente del inciso 8.2) a $500 \times g$, durante 15 min, a 4°C (Centrifuga Beckman GS-15R, Rotor F2402). Con el fin de purificar la fracción nuclear, el pellet se resuspendió en BR y se colocó sobre un colchón de sacarosa 1M para ser centrifugado a $6000 \times g$, durante 12 min, a 4°C (Centrifuga Beckman J2-21, Rotor JS-13). Se obtuvo un pellet (P500) enriquecido en núcleos intactos según se observó en el microscopio óptico. El pellet (P500) se resuspendió en BR para centrifugarlo en un gradiente. En paralelo, el sobrenadante libre de núcleos de la centrifugación a $500 \times g$ (SN500) se centrifugó a 14 PSI ($\sim 57,000 \times g$) durante 30 min, a 4°C (Beckman Airfuge, Rotor A100-30). El pellet (P14) se resuspendió en BR y se guardó en hielo para análisis subsecuentes. El sobrenadante (SN14) se centrifugó a 20 PSI ($\sim 95000 \times g$) durante 90 min, a 4°C (Beckman Airfuge, Rotor A-110). El pellet (P20) resultante se resuspendió en BR y se guardó en hielo en espera de ser analizado, lo mismo que el sobrenadante (SN20).

8.5 Centrifugación en Gradiente

8.5.1 Percoll®.

Se colocó la mezcla de Percoll-NaCl o Percoll-Sac en los tubos y sobre ellos se colocaron las muestras provenientes del inciso anterior (P500, P14, P20 y SN20). El gradiente (5 ml) se autoformó al centrifugar a $50,000 \times g$ (30,000 rpm) durante una hora a 4°C (Ultracentrifuga Óptima TL, rotor TLA100.4). Se colectaron 22 fracciones de $200 \mu\text{l}$ a las que se intentó medir concentración de proteína por los métodos BCA (Pierce) y Bradford (BioRad), sin éxito.

8.5.2 Sacarosa

Se corrieron 2 tipos de gradiente de sacarosa. Uno para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial y otro para las muestras provenientes del fraccionamiento según el método de Aley. En el primer caso, se formaron 4 gradientes lineales de sacarosa (10 - 65% p/v), con soluciones preparadas en PBS, en el mezclador de gradiente del FPLC (Pump

TRABAJO CON
FALLA DE CARGEN

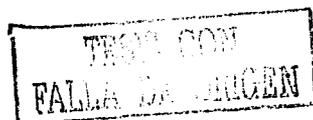
P500, Pharmacia). Sobre ellos se cargaron 0.15 - 2.5 mg de proteína de las muestras provenientes de la centrifugación diferencial (P500, P14, P20 y SN20 respectivamente) haciendo un volumen total de 5 ml. Los gradientes se centrifugaron a $200,000 \times g$ (61,000 rpm), durante 2 horas, a 4°C (Ultracentrifuga Óptima TL), en un rotor de ángulo fijo (TLA100.4) pre-enfriado a 4°C . Se colectaron las fracciones con un fraccionador de gradiente (Auto-Densi Flow, LABCONCO) acoplado a un colector de fracciones (Bio-Rad, Modelo 2128). Se obtuvieron 21 fracciones con un volumen aproximado de $200 \mu\text{l}$ c/u. En cada fracción se midió la concentración de proteína (BCA -Pierce), el índice de refracción (densidad) y la distribución de marcadores moleculares por Slot Blot.

Para la muestra proveniente del fraccionamiento de Aley, se formó un gradiente lineal de sacarosa del 10 al 65 % (40 ml) con soluciones preparadas en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Posteriormente se colocaron 10 - 30 mg de proteína de la fase de manitol 0.5 M (inciso 7.3) y se centrifugó durante 4 h, a 4°C en un rotor VT150 a una velocidad de $220,000 \times g$ (Ultracentrifuga XL-90, Beckman). Al final de la corrida se obtuvieron 32 fracciones de 1.3 ml y a cada una se le determinó el índice de refracción (densidad), la concentración de proteína (BCA -Pierce), se ensayaron las actividades enzimáticas de interés y la distribución de marcadores moleculares por Slot Blot.

8.6 Preparación de lisados celulares

Trofozoítos a una densidad celular de 2×10^4 células/ μl se lisaron al agregar un volumen igual de Buffer de Muestra 2x y se agitaron en vórtex durante 1 minuto.

Las células HeLa se lavaron con Hank's y después se añadió Tripsina (0.25%) para desprender la monocapa. Se retiró la tripsina y se lavaron con DMEM centrifugando a $500 \times g$ durante 5 min. Los hibridomas (cultivo en suspensión) se lavaron también con DMEM centrifugando a $500 \times g$ durante 5 min. El proceso de lisado fue idéntico al proceso de amiba.



8.7 Electroforesis de proteínas

Se llevaron a cabo para separar proteínas según tamaño (SDS-PAGE), de acuerdo a técnica descrita previamente (Laemmli, 1970). Los geles se hicieron al 12.5 % de acrilamida. Las electroforesis se llevaron a cabo en Tank Buffer, a 100 V.

8.8 Transferencia de proteínas

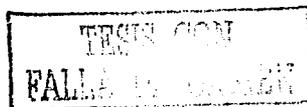
Para los ensayos de Western Blot, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) después de la electroforesis. Los geles y los papeles de filtro se sumergieron durante 1 min en el buffer de transferencia semi-seca. La membrana se equilibró 5 min en el mismo buffer. Luego se montó el sandwich de manera de que el gel y la membrana quedaran entre 6 papeles filtro Whatman 3MM y se transfirió durante 1 h, a 400 mA, en una cámara de electrotransferencia semiseca HEP-1 (OWL).

8.9 Inmovilización de proteínas

Para los ensayos de Slot Blot, se utilizó membrana de PVDF (*Immobilon P*, Millipore). La membrana se sumergió durante 1 minuto en Metanol y luego se equilibró 10 min en PBS. Enseguida se colocó en el Slot Blot (PR648 -Amersham Pharmacia Biotech) y en cada slot se colocó la muestra respectiva; de cada muestra se cargó el equivalente de 5 µg de proteína en un volumen final de 0.5 ml. Se permitió 1 h de acoplamiento a la membrana a TA y después se aplicó vacío.

8.10 Western Blots (WB)/ Slot Blots (SB).

Las proteínas transferidas o inmovilizadas en membranas (PVDF o nitrocelulosa) fueron inmunodetectadas de la manera siguiente: se bloqueó la membrana 12 horas a TA en agitación, con 5% de leche (en polvo, Carnation: Instant Nonfat Dry) en TBST. La detección se llevó cabo con 1 µg/ml de anticuerpo primario específico de conejo (anti-Sec61 α y anti-STT3) o con una dilución 1:4000 de suero de conejo (anti-PDI), en TBST con 0.1% de leche (en polvo), 1 h en agitación a TA. Se lavó tres veces la membrana



durante 10 min en TBST. Se incubó la membrana 1 h, a TA, en agitación con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (ZYMED) diluido a 1 : 1000 en TBST 0.1% de leche (en polvo). Se lavó la membrana 3 veces durante 10 min y se reveló la reacción con NBT/BCIP (Kit 10X, ZYMED). La reacción se detuvo con EDTA 5 mM.

8.11 Actividad de DPMS

La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl₂ 7.5 mM, Igepal CA-630 al 0.1% (p/v), DTT 20 mM, 0.0052 μ Ci (11,000 cpm) de GDP-¹⁴C-Man, 5 - 6 μ g de Dol-P y 100 μ l de la fracción (enzima) en un volumen total de 300 μ l. Después de 60 min de incubación a 37°C, se detuvo la reacción adicionando 700 μ l de agua desionizada y 2 ml de cloroformo:metanol (1:1, v:v), se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 350 x g por 5 min. Posteriormente, se extrajo el producto radioactivo recuperando la fase orgánica (fase inferior) la cual se colocó en otro tubo de ensaye; a la fase acuosa remanente se le adicionó 1 ml de cloroformo, se agitó nuevamente en vortex y se centrifugó 5 min recuperando la fase orgánica la cual se combinó con la fase orgánica previamente separada. A esta mezcla se le adicionó 1 ml de cloroformo:metanol:agua (3:48:47, v:v:v) para lavar por centrifugación la fase orgánica en la cual se encontraba el producto radioactivo. Una vez lavada, la fase orgánica se colocó en un vial, se evaporó el solvente mediante una corriente de aire caliente, se adicionaron 10 ml de líquido de centelleo no acuoso al residuo y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6500.

8.12 Actividad de NAGPT/NAGT

Se siguió el protocolo descrito por Vargas-Rodríguez et al (1998). La mezcla de incubación contenía 100 μ l de la fuente enzimática, MgCl₂ 7.5 mM, Igepal CA-630 al 0.01% (p/v), 15-20 μ g de Dol-P, 0.01 μ Ci (22,000 - 25,000 cpm) de UDP-N-acetil-D-[U-¹⁴C]glucosamina y amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 en un volumen final de 300 μ l. La mezcla se incubó 30 min, a 37°C, se detuvo la reacción adicionando 700 μ l de agua desionizada y posteriormente se siguió el protocolo de extracción del glicolípido como ya se describió para la DPMS.

9. Resultados y Discusión

9.1 Condiciones de homogenización de trofozoítos de *E. histolytica*

El primer paso básico en los procesos de fraccionamiento subcelular es la homogenización del tejido o células a estudiar. Al homogenizar se pretende romper de manera uniforme la mayoría de las células y al mismo tiempo conservar las estructuras internas en forma de vesículas y con la orientación correcta de las membranas. La mayoría de los métodos de homogenización involucran una fuerza física para romper la membrana externa y se aconseja no utilizar detergentes ya que estos afectan las membranas celulares. En este paso se busca un método en el que se lise aproximadamente el 90% de las células al tiempo que se conservan las membranas subcelulares y se recomienda comprobar la eficiencia de la homogenización mediante microscopía (Evans, 1992).

Tomando en cuenta lo anterior, se buscaron condiciones de homogenización en las que se obtuviera un alto porcentaje de amibas lisadas pero con una mayor proporción de núcleos intactos. Consideramos que al estar intactos los núcleos, el resto de las membranas internas también lo estarían. Se recomienda utilizar un amortiguador hipo-osmótico para que la ruptura celular se de con facilidad (Evans, 1992), por lo que se probaron soluciones amortiguadoras con osmolaridades diferentes (hipo-osmóticas) al medio de cultivo de los trofozoítos (TYI-S). Como alternativa al método descrito por Aley (1980), en el que se utiliza una solución de lisis de Tris 50 mM, se probaron diferentes buffers y condiciones de homogenización basándose principalmente en las condiciones descritas por Van Vliet y colaboradores (1976) en donde reportan una solución de sacarosa 10% (300 mM) en EDTA 1 mM y NaHCO_3 10 mM para la homogenización de los trofozoítos de *E. histolytica*. Por esta razón, se prepararon soluciones de sacarosa con diferentes osmolaridades tomando como referencia la osmolaridad del medio de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de soluciones para homogenización. Osmolaridad del medio de cultivo de los trofozoítos y de las soluciones utilizadas para la homogenización celular.

Soluciones	mOsmol/kg H ₂ O
H ₂ O (blanco)	2
TYI-S-33	356
TYI-S-33 (Sin Suero)	367
PBS (1X)	349
Sacarosa 50mM, EDTA 1 mM, NaHCO ₃ 10 mM	72
Sacarosa 200 mM, EDTA 1 mM, NaHCO ₃ 10 mM	249
Sacarosa 300 mM, EDTA 1 mM, NaHCO ₃ 10 mM	362

Con los datos de la osmolaridad, se decidió probar soluciones de sacarosa de 50, 100, 200 y 300 mM, así como de PBS (1X y 0.8X) para la ruptura de los trofozoítos en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem. Se dieron golpes con el pistilo y se comprobó al microscopio la ruptura celular así como la conservación estructural de los núcleos. Utilizando PBS 1X se dieron 25 golpes del pistilo del Potter y no se observó, a nivel de microscopio óptico, una lisis celular. Se probó PBS 0.8X (osmolaridad calculada de 230 mOsmol/kg H₂O) y tampoco se observó una ruptura celular. Con la solución de 50 mM sacarosa, después de 5 golpes ya no se observaban células intactas pero tampoco se observaban núcleos. Se probó un buffer con 100 mM sacarosa en el que se observó una ruptura celular de aproximadamente 80%, sin embargo, hubo una recuperación de núcleos de sólo 50% después de 10 golpes del homogenizador y una pausa intermedia 3 minutos para permitir el choque osmótico. El buffer con 200 mM Sacarosa dió un 90% de lisis celular y un 90% de núcleos intactos en las mismas condiciones que el buffer anterior, es decir, con 10 golpes del pistilo y 3 minutos intermedios para permitir el choque osmótico. El último buffer que se probó fue el de 300 mM sacarosa en el que se empezó a notar la lisis celular después de 30 golpes con el pistilo del homogenizador. Con estos datos se decidió utilizar el buffer con 200 mM Sacarosa para la homogenización de los trofozoítos.

9.2 Especificidad de anticuerpos

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la ruta secretoria de trofozoitos de *E. histolytica*, por esta razón se han clonado y caracterizado genes amibianos que codifican para proteínas que juegan un papel clave en la vía de tráfico intracelular y secreción de proteínas en células eucariotes típicas. Estas proteínas han sido empleadas como marcadores moleculares que permiten determinar cuáles son los equivalentes funcionales del RE y del aparato de Golgi. En este trabajo se utilizaron tres marcadores de la ruta secretoria, dos específicos para *E. histolytica* (Sec61 α y STT3) y uno para células de mamífero (PDI). En el laboratorio se habían clonado fragmentos de los genes que codifican para STT3 y Sec61 α en un vector de expresión. La construcción contenía, previa al fragmento de la proteína en cuestión, una etiqueta de 6X Histidinas y la proteína DHFR. Las proteínas se expresaron en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad a Niquel. Los anticuerpos contra las proteínas amibianas se produjeron a partir de esas proteínas recombinantes inoculadas en conejos y se purificaron por cromatografía de afinidad (Sec61 α : manuscrito en preparación. STT3: Gutiérrez, 2001). Los anticuerpos anti-PDI (suero de conejo, StressGen) fueron amablemente proporcionados por el laboratorio de la Dra. Susana López (IBT/UNAM).

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos, se realizaron ensayos de Western Blot (Wb) como se describe en Materiales y Métodos. Se prepararon lisados celulares (trofozoitos, células HeLa, hibridoma) y se cargó el equivalente de 100,000 células en geles de poliacrilamida-SDS. En un carril paralelo, se cargaron 50 ng de proteína recombinante (6XHIS-DHFR-Sec61 α ó 6XHIS-DHFR-STT3) como control positivo. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos anti-Sec61 α , -STT3 o -PDI, según cada caso (Fig. 6). También se probaron los anticuerpos amibianos en los lisados de células de mamífero ya que estos están dirigidos contra una región muy conservada de las proteínas; sin embargo, no se detectó un reconocimiento por parte de los anticuerpos (datos no mostrados).

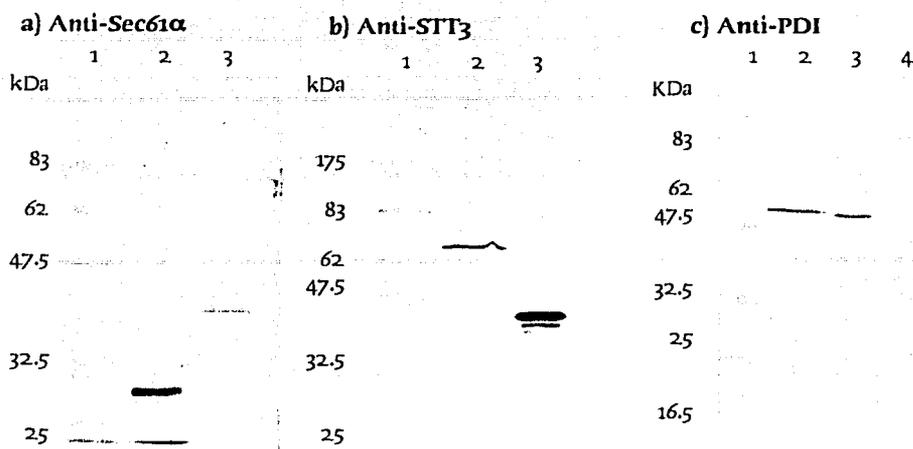


Figura 6. Especificidad de anticuerpos anti marcadores de RE. a) WB con anti-Sec61 α . 1: Marcadores de Peso Molecular; 2: Proteína recombinante 6XHis-DHFR-Sec61 α ; 3: lisado amibiano. b) WB con anti STT3. 1: Marcadores de Peso Molecular; 2: lisado amibiano; 3: Proteína recombinante 6His-DHFR-STT3. c) WB con anti PDI. 1: Marcadores de Peso Molecular; 2: lisado de HeLa; 3: lisado de hibridomas; 4: lisado de trofozoitos.

En la figura 6a se muestra el WB con los anticuerpos anti-Sec61 α . Se detecta una banda única en el lisado amibiano correspondiente a una proteína con peso aproximado de 43 kDa. Este peso es similar al calculado para la Sec61 α de *E. histolytica* (42 kDa) (Sánchez-López *et al.*, 2000-b). En la misma figura se muestra el reconocimiento a la proteína recombinante (30 kDa). En la figura 6b se muestra el WB con los anticuerpos anti-STT3 y también se detecta una banda única de aproximadamente 65 kDa en el lisado amibiano que corresponde al peso reportado para esta proteína (Gutiérrez, 2001). La figura 6c es el WB con los anticuerpos anti-PDI. Se esperaba encontrar una proteína de 58 kDa en los lisados de HeLa e hibridoma como lo reporta el proveedor (StressGen), y así fue. En ese mismo ensayo se corrió un lisado amibiano para ver si habría reconocimiento a alguna proteína de amiba por parte de los anticuerpos anti-PDI no siendo este el caso. Por lo que, lamentablemente, no pudimos incluir estos anticuerpos en nuestro estudio de lisados amibianos.

Dado que los anticuerpos anti-Sec61 α y anti-STT3 reconocían bandas únicas en los lisados celulares, se decidió realizar ensayos de Slot Blot en vez de Western Blot para la caracterización de las fracciones subcelulares.

9.3 Condiciones de Fraccionamiento Subcelular

9.3.1 Centrifugación Diferencial

Con la idea de identificar los equivalentes funcionales del RE en trofozoitos de *E. histolytica*, optamos por la caracterización de fracciones subcelulares mediante marcadores moleculares y actividades enzimáticas propias de RE. Rutinariamente, la mayoría de los organelos subcelulares provenientes de células de mamífero se han aislado por centrifugación diferencial y purificado por un gradiente de sacarosa (Graham, 1990). Con este dato estandarizamos un protocolo de fraccionamiento subcelular para *E. histolytica* que incluye el paso de centrifugación diferencial seguida por la purificación en gradientes de sacarosa.

Durante la homogenización de células de mamífero el RER se fragmenta en vesículas (microsomos) que sedimentan de manera heterogénea entre velocidades de 30,000 a 100,000 $\times g$ (Spector *et al.*, 1998), aunque también se han reportado velocidades tan bajas como 100 $\times g$ (Shore y Tata, 1977). Los protocolos de fraccionamiento subcelular generalmente incluyen una centrifugación a baja velocidad para remover los núcleos, restos celulares y células no lisadas (Morand y Kent, 1986). Con esto en mente, se probaron diferentes velocidades de centrifugación con el fin de obtener estructuras celulares enriquecidas en Sec61 α . Primero se trabajó con un esquema de centrifugaciones sucesivas a 4°C y durante 15 min cada una (Ultracentrifuga Optima TL, Rotor TLA100.2). Cada centrifugación generó un pellet y un sobrenadante, siendo éste el que se sometió a la centrifugación sucesiva, como se ilustra en la figura 7.

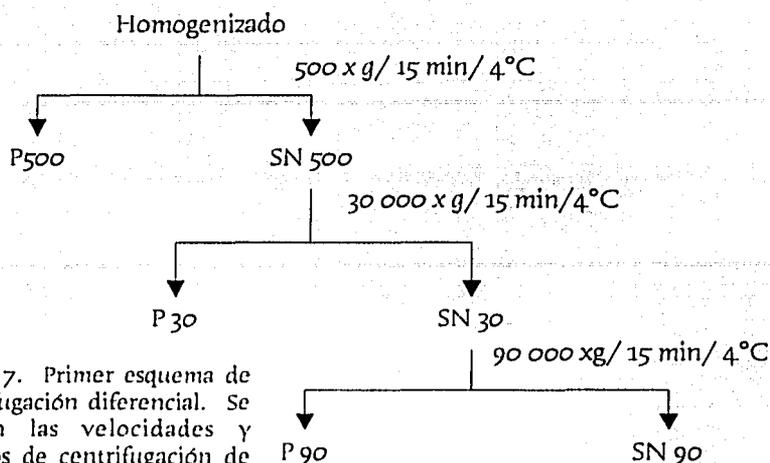


Figura 7. Primer esquema de centrifugación diferencial. Se anotan las velocidades y tiempos de centrifugación de cada etapa.

Se tomó muestra del homogenizado así como de cada pellet y sobrenadante para analizar por Slot Blot con el anticuerpo anti-Sec61 α (Fig. 8a). De cada fracción se cargó la misma cantidad de proteína total (5 μ g, máxima capacidad de pegado de proteína a la membrana de PVDF) para determinar el enriquecimiento del marcador revelado por el anticuerpo correspondiente. Con ayuda del equipo Scanner (Modelo Epson Perfection 1650) se digitalizó la señal presente en cada carril del Slot Blot y con apoyo del programa NIH Image 1.62 se calculó la densitometría de la señal (Fig. 8b). La sumatoria de los valores de densitometría de P500, P30, P90 y SN90 se designó como el 100% de la señal de Sec61 α por microgramo de proteína, a partir del cual se determinó el valor porcentual de la señal presente en cada μ g de proteína por fracción (%). Como se ilustra en la Fig 8c, el porcentaje de cada una de estas fracciones fue graficado para poder analizar de manera cualitativa la distribución de Sec61 α en la célula. Cada esquema de centrifugación diferencial fue probado al menos en tres experimentos independientes y se ilustra un experimento representativo. Todos los datos de Slot Blot de fracciones obtenidas por centrifugación diferencial presentados en este trabajo a partir de este punto se procesaron de manera similar y sólo se ilustrará la distribución porcentual obtenida por μ g de proteína

de cada fracción. Con este primer esquema de centrifugación, al hacer la caracterización por Slot Blot con anticuerpos anti-Sec61 α , resultaba mayormente enriquecida la fracción nuclear (P500, 56%) en comparación con el resto de las fracciones (Fig. 8c).

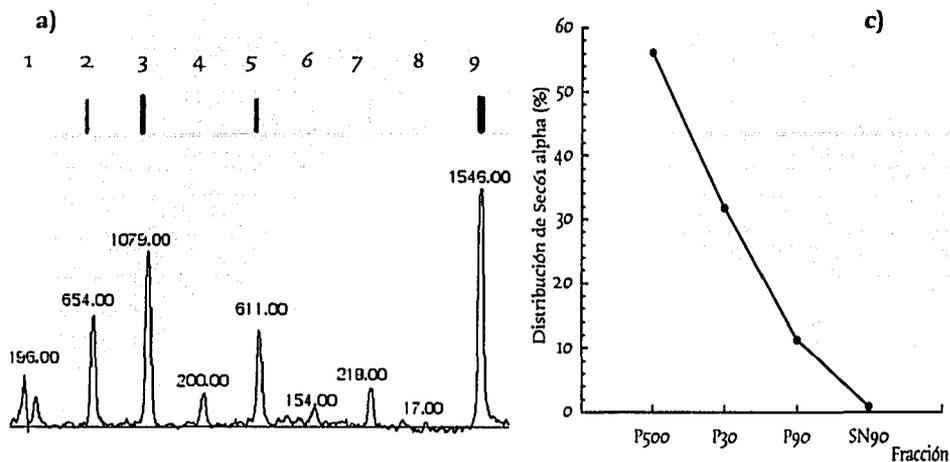


Figura 8. Análisis de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. a) Slot Blot con anticuerpos anti-Sec61 α : 1) Extracto total, 2) Homogenizado, 3) P500, 4) SN500, 5) P30, 6) SN30, 7) P90, 8) SN90, 9) Proteína recombinante 6His-DHFR-Sec61 (50 ng). b) Valores densitométricos del ensayo por Slot Blot, alineados al carril correspondiente. c) Representación gráfica de la distribución porcentual obtenida a partir de la densitometría, donde 100% es la sumatoria de los valores P500, P30, P90 y SN90 por μg de proteína presente en cada fracción.

Al ver que P500 era la fracción con mayor contenido de Sec61 α / μg de proteína y para excluir que el valor obtenido no correspondiera sólo a la fracción nuclear sino que ésta estuviera contaminada con restos celulares o células no lisadas, se añadió un paso más al protocolo inicial. Dicho paso incluyó una purificación de los núcleos a través de un colchón de sacarosa 1 M, centrifugando a 6,000 $\times g$, por 12 min, a 4°C. Este lavado es el que se utiliza comúnmente en el laboratorio para el aislamiento de núcleos de amiba. Además se decidió incrementar los tiempos de centrifugación post-nucleares como se sugiere en la literatura (Evans, 1992) y como se indica en la figura 9, a fin de obtener fracciones con mayor proporción del marcador. Con este esquema logramos determinar la señal de Sec61 α por μg de proteína nuclear (26 %), mientras que la señal por μg de

proteína asociada al el pellet generado en la centrifugación a $30,000 \times g$ (P₃₀) corresponde al 44%. También se observó una distribución de aproximadamente 20% en el pellet de la centrifugación a $90,000 \times g$ (P₉₀, Fig. 10), lo que no es inusual ya que esa velocidad está comprendida en el rango de sedimentación reportado para microsomas provenientes de células de mamífero (Spector et al., 1998).

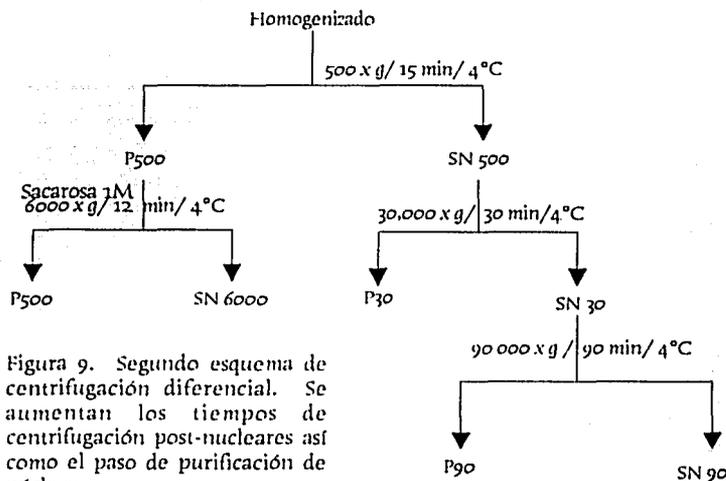


Figura 9. Segundo esquema de centrifugación diferencial. Se aumentan los tiempos de centrifugación post-nucleares así como el paso de purificación de núcleos.

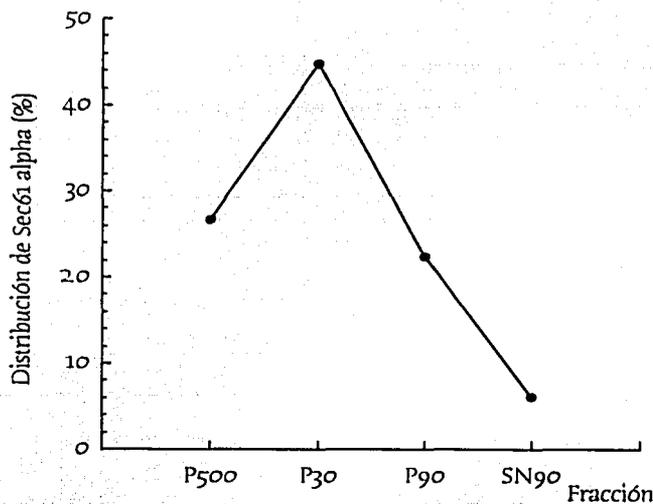


Figura 10. Distribución de Sec61 α en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Efecto de mayor tiempo de centrifugación sobre la distribución de la señal de Sec61 α en las diferentes fracciones.

Buscando obtener una fracción con mayor proporción de Sec61 α , se decidió probar velocidades más altas en las centrifugaciones post-nucleares ya que la fracción microsomal en células de mamífero sedimenta a velocidades variadas entre 30,000 y 100,000 x g (Spector *et al.*, 1998). En los esquemas subsecuentes de centrifugación diferencial, se utilizó una Aerofuga (Beckman) para centrifugar el sobrenadante post-nuclear (SN500) a una presión constante de 14 PSI, que equivale aproximadamente a 57,000 x g, durante 30 min. Se obtuvieron un pellet (P14) y un sobrenadante que se recentrifugó a 20 PSI (aprox. 95,000 x g), por 90 min. Los pellets (P14 y P20) y el último sobrenadante (SN20) se analizaron por Slot Blot con los anticuerpos anti-Sec61 α . Con este protocolo P14 contenía el 51 % de Sec61 α mientras que cada una de las fracciones restantes contenía menos del 20 % (Fig. 11).

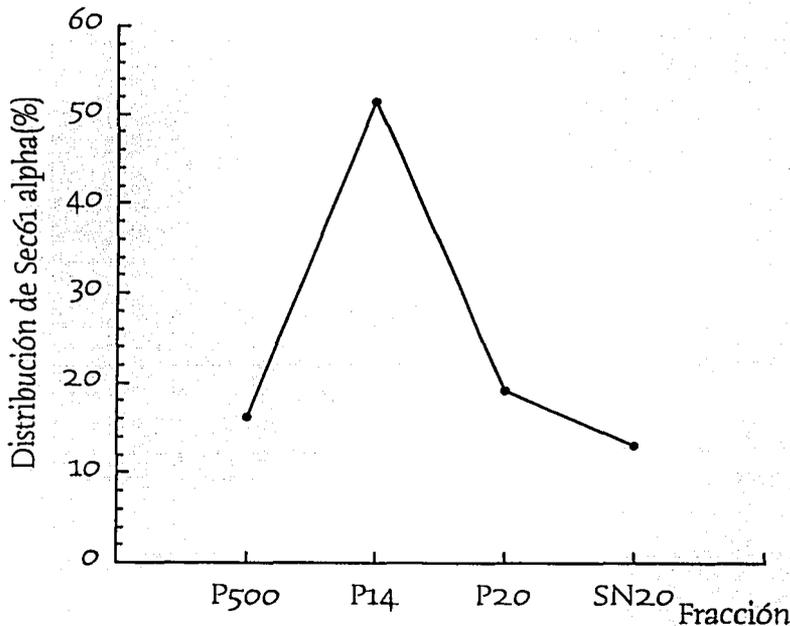


Figura 11. Distribución de Sec61 α en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Efecto producido al aumentar las velocidades de centrifugación sobre la distribución de la señal de Sec61 α .

Se intentó aumentar aún más la proporción de la señal en la fracción intermedia o pellete de la primera centrifugación post-nuclear subiendo la velocidad de la centrifugación a 15 PSI (aprox. 70,000 x g). Sin embargo, no se logró el resultado esperado (datos no mostrados).

Recapitulando, se probaron cuatro condiciones de centrifugación diferencial, se caracterizaron las fracciones obtenidas utilizando el anticuerpo anti-Sec61α y mediante densitometría se determinó el porcentaje del marcador por μg de proteína presente en cada fracción. Se optó por un esquema de centrifugación diferencial en el que inicialmente se separan los núcleos mediante una centrifugación a 500 x g. Posteriormente se centrifuga la fracción post-nuclear a 14 PSI (aprox. 57,000 x g) y una última centrifugación del sobrenadante generado en la centrifugación previa a 20 PSI. Adicionalmente, la fracción nuclear se centrifuga a través de un colchón de sacarosa 1M, a 6000 x g para eliminar los restos celulares o células no lisadas (Fig. 12). Es importante mencionar que mientras que los valores densitométricos que se detectan en el Slot Blot de P14 oscilan entre 5000 y 7000 pixeles, los valores observados para P20 y SN20 son generalmente bajos (entre 200 y 2000 pixeles), sin embargo consideramos importante incluirlos en nuestro análisis pues reflejan claramente el patrón de distribución del marcador analizado.

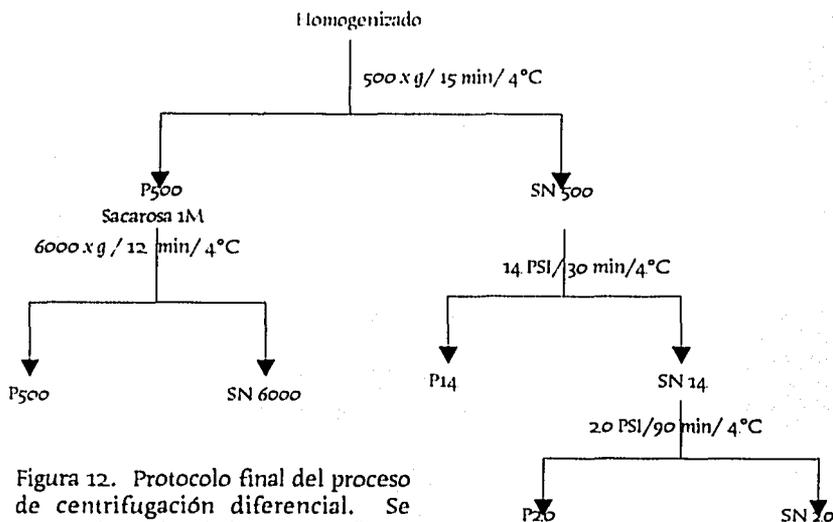
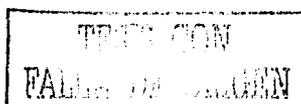


Figura 12. Protocolo final del proceso de centrifugación diferencial. Se anotan las velocidades y tiempos de centrifugación.



9.3.2 Centrifugación en Gradiente

Con el fin de subfraccionar con mejor resolución los diferentes componentes presentes en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, se propone la separación isopícnica en gradientes de densidad, tomando ventaja de las diferencias de densidad que existen entre las membranas. El medio más utilizado para los gradientes de densidad es la sacarosa, sin embargo, este medio tiene algunas desventajas. La más importante está relacionada con la osmolaridad. La mayoría de los gradientes reportados van del 10 al 40% de sacarosa (a veces llegan a concentraciones mayores), lo que significa que son hiper-osmóticos. Los organelos y vesículas tienden a colapsarse a medida que bajan a través del gradiente. Este colapso tiene que ver con la pérdida de agua dentro de las membranas. Como el estado de hidratación de las proteínas y membranas es importante para su función, este proceso puede ser dañino para las fracciones (Graham *et al.*, 1990). No obstante, los gradientes de sacarosa siguen siendo los más utilizados en la literatura, por lo que consideramos importante realizar algunos ensayos con gradientes de sacarosa y, dependiendo de los resultados valorar su utilización. Como alternativa a la sacarosa, existen otros medios como la polisacarosa (Ficoll®), los compuestos iodados (Nicodenz®, Optiprep®, etc) y la sílica coloidal (Percoll®). En este trabajo probamos 2 tipos de gradientes de densidad: Percoll® y Sacarosa.

9.3.2.1 Percoll®

Después de haber obtenido una fracción enriquecida en el marcador de Retículo Endoplásmico (Sec61 α) mediante la centrifugación diferencial, se procedió a la separación en gradientes de Percoll®. El Percoll® es una suspensión coloidal de partículas de sílica con diámetros de 10 a 30 nm dependiendo del grado de hidratación y cuya osmolaridad es estabilizada con sodio. Estas partículas están cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) para proteger a las células de la acción tóxica de la sílica coloidal (Pertoft, 2000; Evans, 1992; Percoll® Methodology and Applications, Pharmacia). La diferencia en capas de hidratación genera un gradiente de densidad cuando se centrifuga una suspensión de Percoll® en presencia de NaCl 0.15 M ó sacarosa 0.25 M.



Percoll-0.15 M NaCl

Percoll-0.25 M Sacarosa

Figura 13. Gradientes de Percoll monitoreados con marcadores de densidad. (50000 x g, 1 h)

Percoll-NaCl: (de arriba a abajo) azul, 1.018 g/ml; amarillo, 1.035 g/ml; verde, 1.051 g/ml; rosa, 1.064 g/ml; azul, 1.074 g/ml; amarillo, 1.087 g/ml; verde, 1.102 g/ml; rosa, 1.119 g/ml; morado, 1.138 g/ml.

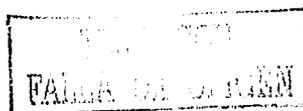
Percoll-Sac: (de arriba a abajo) azul, 1.042 g/ml; amarillo, 1.056 g/ml; verde, 1.063 g/ml; rosa, 1.078 g/ml; azul, 1.085 g/ml; amarillo, 1.101 g/ml; verde, 1.112 g/ml; rosa, 1.133 g/ml; morado, 1.152 g/ml.

gradiente de Percoll - Sac, a pesar de centrifugar a 60,000, 70,000 y 100,000 x g durante 60 minutos, nunca se obtuvo una separación eficiente de los marcadores (datos no mostrados). Dado que la viscosidad del Percoll® es una función de la fuerza iónica y ésta es menor en las soluciones salinas comparadas con el agua, los gradientes auto-formados se crean más rápido en NaCl 0.15 M que en la sacarosa iso-osmótica (0.25 M); esta podría ser una razón por la que no se vió una separación tan eficiente en el gradiente con Percoll-Sac (Pertoft, 2000).

Una vez estandarizadas las condiciones para el gradiente de Percoll, estas se aplicaron para generar gradientes (5 ml) en los cuales separar las muestras provenientes de la

Se ajustó la osmolaridad del Percoll® con NaCl 0.15 M (Percoll-NaCl) ó sacarosa 0.25 M (Percoll-Sac), como lo indica el proveedor (Percoll® Methodology and Applications, Pharmacia). Con las suspensiones de Percoll® se probaron diferentes condiciones de centrifugación a fin de obtener una buena resolución de los marcadores (perlas) de densidad comerciales (Percoll® Methodology and Applications, Pharmacia). Se realizaron centrifugaciones a 30,000 x g, durante 30, 60 y 90 minutos sin llegar a observar una separación de las perlas de densidad.

Dado que la centrifugación a 30,000 x g no fue exitosa, se llevó a cabo una centrifugación a 50,000 x g durante 60 minutos y se obtuvo una buena separación de los marcadores de densidad pero sólo con la solución Percoll - NaCl (Fig. 13). Con respecto al



centrifugación diferencial. El gradiente se autoformó en las condiciones ya mencionadas y se fraccionó a mano, yendo de menor a mayor densidad. Se colectaron 21 fracciones que fueron analizadas por Slot Blot con el anticuerpo anti - Sec61 α . Para la caracterización de las fracciones se utilizó el mismo volumen de cada fracción ya que no fue posible cuantificar la concentración de proteína, ni por el método de BCA (Pierce), ni por el método de Bradford (BioRad). Se encontró que, para los 4 gradientes (P500, P14, P20 y SN20), la mayoría de la señal estaba concentrada alrededor de la fracción 10, la cual presenta una densidad aproximada de 1.035 g/ml (Fig. 14).

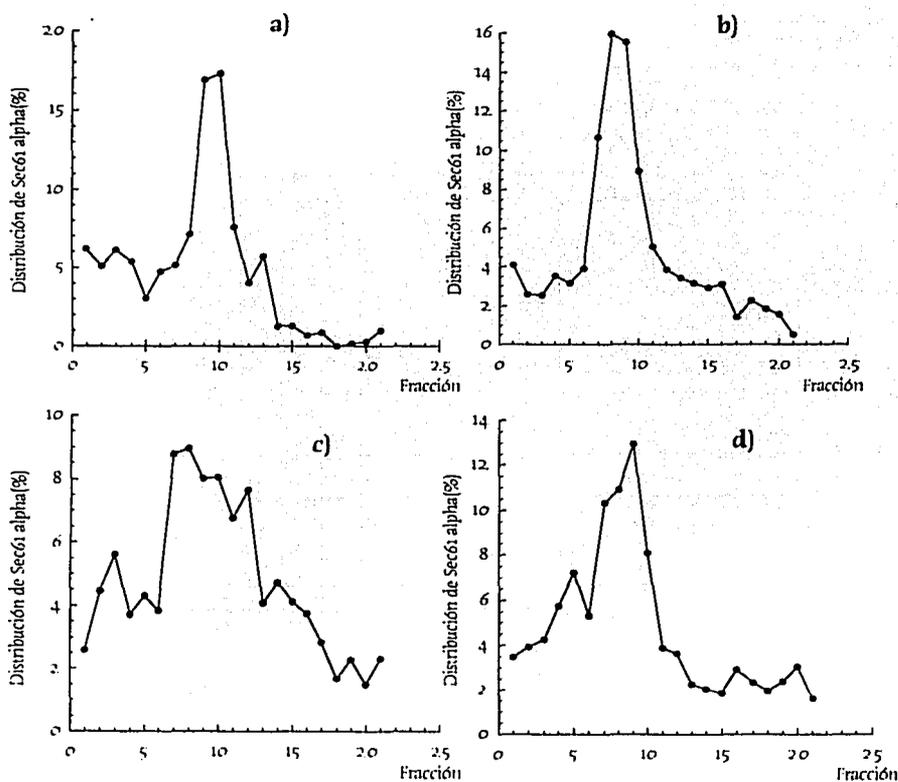


Figura 14. Distribución de Sec61 α en fracciones obtenidas en gradientes de Percoll-NaCl. a) Muestra proveniente de P500, b) Muestra proveniente de P14, c) Muestra proveniente de P20 y d) Muestra proveniente de SN20.

La densidad del RE en gradientes de Percoll® para células de mamífero no se ha reportado. Sin embargo, en un estudio en células CHO y HeLa, el RE se distribuyó en fracciones de densidades mayores a las fracciones donde se distribuían las actividades enzimáticas del aparato de Golgi (Morand *et al.*, 1986). La densidad del aparato de Golgi, de hepatocitos de ratón, en gradientes de densidad de Percoll® está reportada entre 1.028 y 1.057 g/ml de Percoll® (Evans, 1992).

No se pudo cuantificar proteína en las fracciones obtenidas en los gradientes de Percoll® y tampoco se contaba con una referencia exacta de la densidad esperada para el RE en este tipo de gradientes. Esto nos llevó a analizar la sacarosa como medio para la generación de gradientes de densidad por ser el medio más utilizado.

9.3.2.2 Sacarosa

Si bien, el 50-60% del marcador Sec61 α se enriquece en la fracción P14 se consideró importante determinar si las estructuras celulares que contienen Sec61 α asociadas a P500, P20 y SN20 presentan densidades similares a las enriquecidas en P14. Así, cada una de las fracciones fue analizada en paralelo en ambos gradientes de sacarosa (10-65% p/v en un volumen final de 5 ml). En este tipo de gradiente se han aislado actividades enzimáticas propias de RE en ameba (Rocha, 2001; Villagómez-Castro, 2000; Ávila *et al.*, 2002). Para estos gradientes se probaron 3 diferentes velocidades de centrifugación (100,000 x g, 120,000 x g y 200,000 x g durante 2 h, a 4°C) según lo reportado por Rocha (2001). De cada gradiente se colectaron 21 fracciones de aproximadamente 200 μ L cada una, las cuales se colectaron mediante un fraccionador de gradiente adaptado a un colector de fracciones. En cada ocasión se midió la concentración de proteína por el método de BCA (Pierce) y la densidad (en función del índice de refracción de las muestras) de las fracciones de cada gradiente. Para los casos de 100,000 y 120,000 x g se observó una distribución uniforme de la concentración de proteína a lo largo del gradiente, por lo que se determinó que no eran las velocidades adecuadas (datos no mostrados). Como se muestra en la figura 15, en los gradientes centrifugados a 200,000 x g, la concentración de proteína aumenta conforme aumenta la densidad de las fracciones obtenidas lo cual

concuera con lo reportado (Evans, 1992). Este aumento en la concentración de proteína no sucede en las fracciones de la muestra SN20 (Fig. 15-d). Esto puede deberse a que las proteínas contenidas en esta muestra están en su mayoría solubles en vez de asociadas a estructuras membranosas. Se determinó que la densidad del gradiente, que aumenta de forma lineal, tiene un rango de 1.02 a 1.2 g/ml de Sacarosa como se muestra en la misma figura. Con estos resultados, se decidió centrifugar los gradientes subsecuentes a $200,000 \times g$ (Fig. 16), para posteriormente caracterizar las fracciones utilizando el anticuerpo anti-Sec61 α .

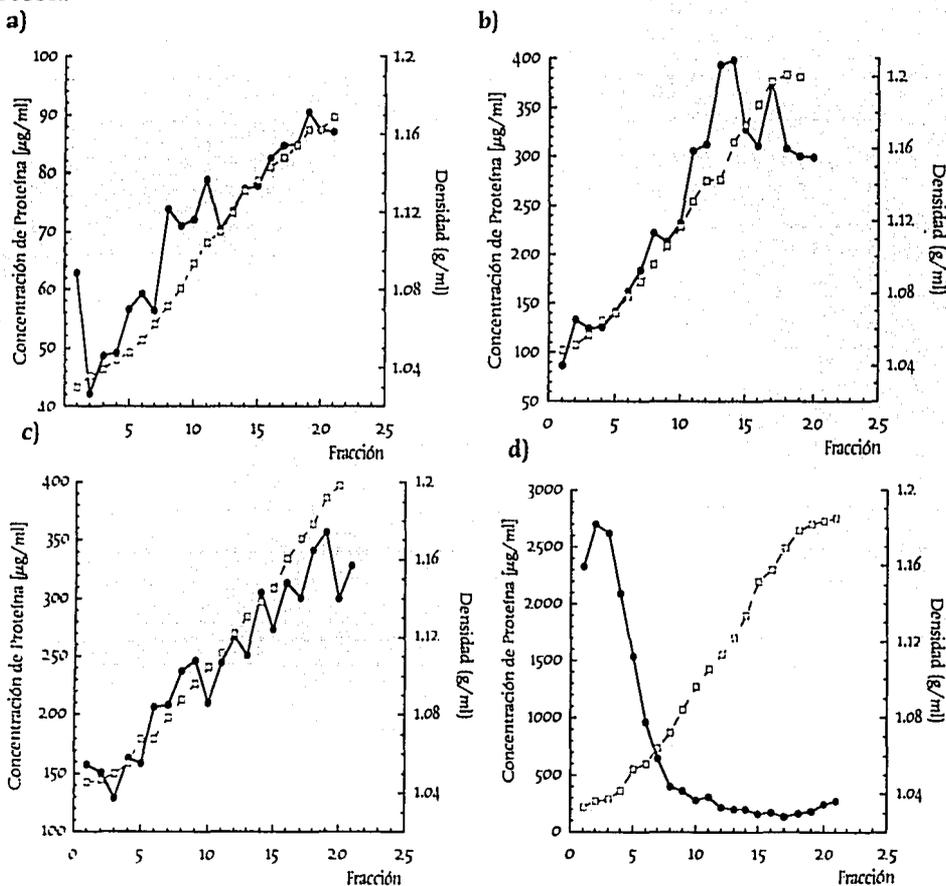


Figura 15. Distribución de proteína a lo largo del gradiente de sacarosa (10-65%). La centrifugación fue a $200,000 \times g$. (●) Concentración de proteína γ (□) densidad de las fracciones obtenidas en cada gradiente. a) P500, b) P14, c) P20 y d) SN20.

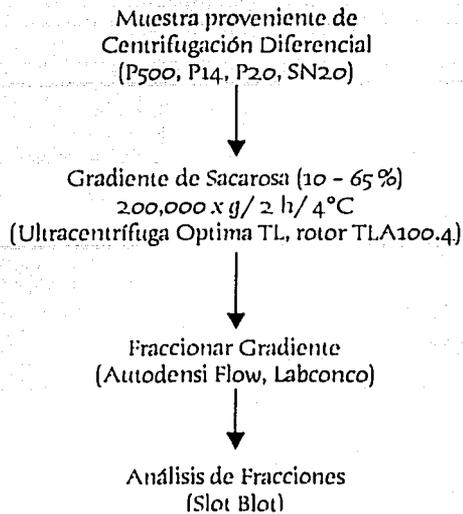


Figura 16. Esquema de fraccionamiento en gradiente de sacarosa. Las muestras provenientes de la centrifugación diferencial se someten a este proceso con el fin de obtener mejor resolución de la distribución del marcador.

La caracterización, utilizando el anticuerpo anti-Sec61 α , de las fracciones obtenidas de los gradientes centrifugados a 200,000 x g se muestra en la figura 17. Esta figura contiene gráficas representativas de 9 experimentos independientes. Se utilizó el valor densitométrico del homogenizado de trofozoítos para normalizar los valores de las fracciones y la sumatoria de los valores normalizados se tomó como el 100% de la distribución del marcador. Antes de hacer un análisis de los resultados del fraccionamiento de la muestra P14, es importante recordar que las muestras provenientes de las fracciones P500, P20 y SN20 contienen, cada una, menos del 20 % de Sec61 α . Hay que enfatizar que los resultados obtenidos a partir de dichas fracciones sólo pueden ser analizados en términos del patrón de la gráfica de distribución (Figuras 17-a, c y d, respectivamente).

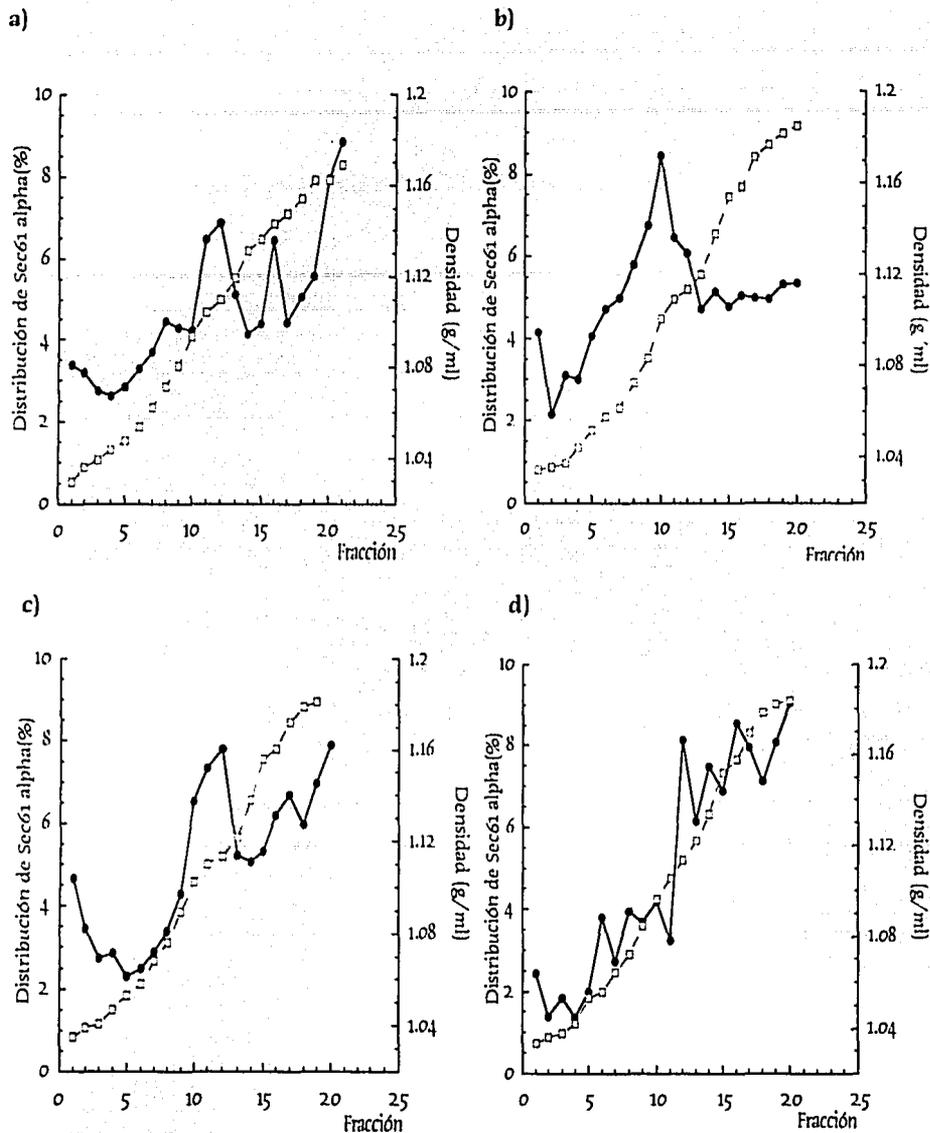


Figura 17. Representación gráfica de la distribución porcentual de Sec61 α en los gradientes de Sacarosa. La sumatoria de las fracciones corresponde al 100%. (●) Sec61 α . (□) Densidad de la fracción. a) P500. b) P14. c) P20. d) SN20.

Ahora bien, respecto al fraccionamiento del marcador molecular Sec61 α presente en P14, éste se detecta a lo largo del gradiente de sacarosa (Fig. 17-b). La señal es claramente mayor (>5%) entre las fracciones 8 y 12, con densidades entre 1.07 y 1.13 g/ml con un marcado incremento de la señal en la fracción 10 con densidad de 1.1 g/ml. Esta densidad es similar a la previamente reportada para RE en amiba, medido por actividades enzimáticas (Villagómez-Castro, 2000; Rocha, 2001, Ávila *et al.*, 2002). Es importante mencionar que en algunos gradientes con muestra P14 la señal detectada en fracciones con mayor densidad es mayor al 5%.

Algunos gráficos reportados en la literatura respecto a fraccionamiento subcelular de RER de células de mamífero sobre gradientes de sacarosa muestran un comportamiento similar, donde es posible detectar actividades tipo RER en fracciones con densidades de 1.11 g/ml (Shore y Tata, 1977). En el caso particular de trofozoitos de amiba donde no parece haber un sistema endomembranoso continuo, los resultados presentados en este trabajo refuerzan la hipótesis postulada en nuestro laboratorio, la cual propone que actividades tipo RE y aparato de Golgi pudieran estar asociadas a algunas de las múltiples vacuolas y vesículas existentes en el trofozoito, lo que explica la señal detectada en fracciones del gradiente de sacarosa con alta densidad. Esta amplia distribución del marcador correlaciona con lo previamente encontrado por Roberto Stock y Andrés Saralegui de nuestro laboratorio en un estudio por inmuno-microscopía confocal (datos no publicados). Utilizando los mismos anticuerpos anti-Sec61 α en inmunocitoquímicas, se ha observado una distribución "punteada" heterogénea del marcador dentro del trofozoito. Resultados similares fueron obtenidos al analizar la distribución del otro marcador de RE, STT3, estudiado en nuestro laboratorio (Figura 18-b). La figura 18 ilustra de manera representativa las imágenes observadas, haciendo notar que en trofozoitos de amiba, ni Sec61 α ni STT3 están asociados a estructuras celulares perinucleares características de un retículo endoplásmico en una célula eucariote (Fig. 18).

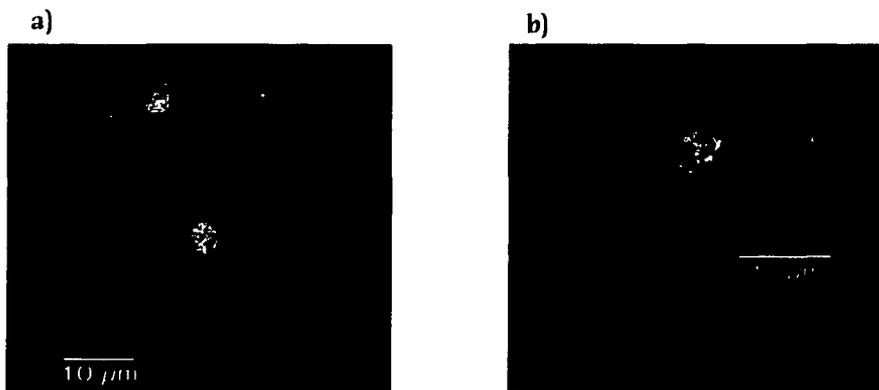


Figura 18. Proyección ecuatorial de máxima intensidad de trofozoítos. Los trofozoítos fueron permeabilizados con 0.2% Triton x 100. En rojo se muestran los núcleos teñidos con Ioduro de Propidio. En verde la localización de a) Sec61 α y b) STT3. Como primer anticuerpo se utilizó el mismo anticuerpo que para los Slots Blots a una concentración de 5 μ g/ml. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 488, a una dilución de 1:1000. Imágenes proporcionadas por Andrés Saralegui.

9.4 Caracterización de las fracciones subcelulares con apoyo de actividades enzimáticas (DPMS, NAGPT/NAGT)

Como parte de la caracterización de las fracciones subcelulares, se determinó la actividad de dos enzimas (Dolicol Fosfato Manosa Sintetasa -DPMS- y N-Acetil Glucosaminil Fosfotransferasa/N-Acetil Glucosaminil Transferasa -NAGPT/NAGT-), propias de RE, en colaboración con el grupo del Dr. Everardo López-Romero. En un estudio sistemático, el grupo del Dr. López-Romero ha reportado la localización de la actividad de estas enzimas en fracciones subcelulares con densidades que oscilaron entre 1.10 y 1.16 g/ml (Rocha, 2001; Villagómez-Castro, 2000). A partir de estos datos se decidió determinar si los marcadores de RE, Sec61 α y STT3, se enriquecían en las mismas fracciones que las actividades enzimáticas de DPMS y NAGPT/NAGT. Siguiendo el protocolo del grupo del Dr. López-Romero, las fracciones subcelulares se obtuvieron centrifugando el homogenizado de trofozoítos (protocolo modificado de Aley y colaboradores, 1980) sobre un gradiente continuo de sacarosa 10 - 65 % (p/v) a 220,000 x g durante 4 h. Se colectaron y analizaron 31 fracciones. Se encontró que las actividades de DPMS y NAGPT/NAGT se localizan en fracciones con densidad 1.12 - 1.15 g/ml, como antes

reportado por este grupo. En el experimento ilustrado en la figura 19, se observan dos picos de actividad adicionales, contenidos en fracciones de alta densidad. La distribución de la señal de Sec61 α en este gradiente, y en otros experimentos de este tipo, resultó ser más amplia (1.11 - 1.2 g/ml) que la de las actividades de DPMS y NAGPT/NAGT (Fig. 19), inclusive que la ilustrada en la figura 17-b. En tanto que resultados preliminares, en la gráfica se incluye la distribución de STT3 analizada en uno de los gradientes de sacarosa realizados. A reserva de confirmar la distribución de este marcador, se plantea la necesidad de profundizar el estudio de biología celular y bioquímica de estas proteínas, marcadores de funciones tipo RE, en trofozoitos de amiba.

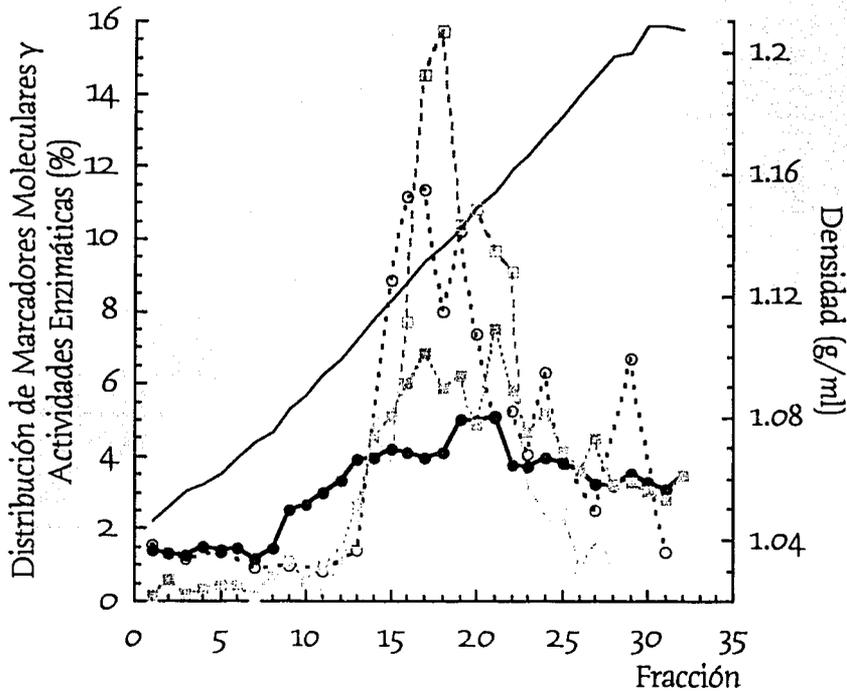


Figura 19. Distribución de actividades enzimáticas y marcadores moleculares a lo largo del gradiente de sacarosa. (●) Sec61 α . (■) STT3. (▣) NAGPT/NAGT. (○) DPMS. La densidad se representa como una línea continua en azul.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una interpretación a la diferencia en la distribución de la señal de Sec61 α , entre los gradientes de las figuras 17 y 19, se refiere a las condiciones experimentales utilizadas. Es decir, el homogenado del experimento ilustrado en la figura 19 se obtiene resuspendiendo los trofozoitos en un buffer tipo PBS e incubación con concanavalina A para facilitar la separación de la membrana plasmática una vez lisado el trofozoito; mientras que el homogenado de amibas analizado en la figura 17 proviene de células resuspendidas en buffer "estabilizado" con sacarosa y selección, por centrifugación diferencial, de aquellas estructuras membranales que sedimenten a 14 PSI. Quizás la sacarosa sea necesaria para estabilizar algunas interacciones entre membranas internas y macromoléculas, por ejemplo, ribosomas. Tal es el caso de la enzima glucosa-6-fosfatasa, propia del RE_r, cuya actividad en microsomas de células de mamífero fraccionados sobre gradientes de sacarosa se observa a densidades entre 1.18 y 1.23 g/ml (Evans, 1992). Sin embargo, cuando la fracción microsomal post-nuclear de hígado de rata se procesa en presencia de 500 mM KCl y 20 mM EDTA y se emplea además un desintegrador Ultra-Turrax, para eliminar la asociación con ribosomas y mitocondrias, las fracciones de gradiente de sacarosa con actividad de glucosa-6-fosfatasa se desplazan a densidades menores entre 1.11 y 1.16 g/ml (Shore y Tata, 1977).

En el caso del trofozoito de *E. histolytica*, amitocondriado, hay observaciones importantes de remarcar. Por un lado, la expresión de marcadores tipo SRP54 y Sec61 α sugiere una interacción funcional tipo ribosoma-membrana (con función de RE). Por otro lado, estudios de microscopía electrónica muestran la organización de polisomas en estructuras helicoidales detectándose en ocasiones asociados a vacuolas (Martínez-Palomo, 1989). Sin embargo, no existen datos bioquímicos que confirmen tal asociación o que permitan especular respecto a su posible función. Por lo que no es de excluir que, la distribución de Sec61 α a lo largo del gradiente de sacarosa, en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, refleje una posible interacción entre distintas membranas que dependiendo de la osmolaridad o la fuerza iónica del medio se pueden romper o desestabilizar generando una gama de densidades.

Los datos obtenidos en esta tesis, en conjunto con los datos generados por microscopía confocal en nuestro laboratorio, nos hacen suponer que los marcadores moleculares tipo RE en *E. histolytica* pudieran estar repartidos en vesículas o vacuolas distribuidas por toda la célula, aunque tal vez no en todas las estructuras membranosas que los contenga, los marcadores se encuentren funcionalmente activos.

Resulta muy tentador pensar que el trofozoito de amiba haya desarrollado un mecanismo de síntesis, transporte y secreción de proteínas donde ambas actividades tipo RE y aparato de Golgi se efectúen mediante un proceso similar al modelo de maduración de cisternas de Golgi descrito para algas verdes. Una consecuencia de la hipótesis de maduración de cisternas es que la distribución de las enzimas del Golgi es en forma de gradientes de concentración más que de separaciones absolutas. Dado que el empaquetamiento de las enzimas del Golgi en las vesículas COPI es un proceso estocástico, las moléculas individuales de cada enzima no están restringidas a una posición particular dentro de las cisternas. Por ejemplo, si una enzima se concentra en la cisterna cis, alguna molécula de esta enzima podría estar en las cisternas medial y trans, aunque no necesariamente de forma activa (Glick et al., 1997).

Tomando en cuenta el modelo de maduración de cisternas se puede especular, contrariamente a la ruta secretoria típica, que las proteínas del RE (por ejemplo Sec61 α) se localicen en estructuras membranosas similares a vesículas de transporte retrógrado, pero no necesariamente en forma activa. Resulta interesante saber cuáles de los marcadores se distribuyen de manera idéntica a su actividad enzimática. Para contestar esto se podría analizar la distribución de las proteínas DPMS y NAGPT/NAGT. Para ello se podrían generar anticuerpos específicos contra estas proteínas y con ellos analizar las fracciones subcelulares en gradientes de sacarosa. De esta manera se determinaría si la distribución de la proteína en este tipo de gradientes es similar a la de las actividades enzimáticas correspondientes. La importancia de realizar experimentos de citolocalización de la DPMS y NAGT en trofozoitos es evidente.

Otra interpretación de la distribución de Sec61 α respecto a la actividad de las enzimas DPMS y NAGT podría ser basada en la posibilidad de que, si bien son marcadores

moleculares de RE rugoso, en amiba Sec61 α presente una citolocalización mas générica que la de DPMS y NAGT. De acuerdo al mecanismo de síntesis y transporte de proteínas a lo largo de la ruta secretoria en células eucariotes típicas, las proteínas deben ser translocadas al RE a través del poro formado por el complejo Sec61; la transferencia en bloque del oligosacárido a la proteína naciente (etapa inicial de N-glicosilación) sucede a la translocación. Si bien es sabido que no todas las proteínas translocadas al RE serán sustrato para N-glicosilaciones, es posible que ambas reacciones se realicen en el mismo entorno de la membrana del RE (Johnson *et al.*, 1999). La ruta de biosíntesis del dolicol-oligosacárido precursor de la N-glicosilación es un proceso multienzimático donde las primeras reacciones se llevan a cabo en la cara citoplasmática del RE rugoso mientras que las reacciones terminales se realizan en la cara luminal del mismo (Burda y Aebi, 1999). Para determinar si en los trofozoitos de *E. histolytica* el marcador molecular tipo RE Sec61 α está presente en las mismas estructuras membranosas que DPMS y NAGPT/NAGT se podrían hacer co-inmunoprecipitaciones con los anticuerpos correspondientes. Asimismo, sería interesante inmunopurificar las membranas que contienen Sec61 α y preguntarse si presentan actividad de DPMS y NAGPT/NAGT.

Sería importante realizar, en paralelo, experimentos de inmuno-microscopía confocal pues nos daría aproximación comparativa de la distribución celular de estas enzimas respecto a Sec61 α .

9.5 Comparación de las fracciones subcelulares de amibas provenientes de absceso hepático con las fracciones subcelulares de amibas de la línea celular HM1

Actualmente, se está iniciando una línea de investigación en nuestro laboratorio donde se utilizan amibas colectadas de absceso hepático de hámster (o sea con patogenicidad comprobada). Con estas amibas, una vez axenizadas, se pretenden evaluar fenotipos no presentes en amibas típicas de cultivo ya que el cultivo de amibas *in vitro* se realiza en condiciones nutricionales muy ricas, lo cual podría llevar a que se perdieran, a lo largo de generaciones, los fenotipos necesarios para la patogenicidad.

Datos generados en el laboratorio mediante técnicas de inmunocitoquímica sugieren diferencias en el patrón de citolocalización de marcadores moleculares entre trofozoitos de una línea celular (Fig. 18) y los provenientes de hámster infectado con *E. histolytica* (Saralegui, datos preliminares no publicados). En éstos últimos, la señal de Sec61 α y STT3 parece estar más localizada en ciertas zonas de la célula y no tan heterogéneamente distribuido como en el caso de los trofozoitos de la línea celular. De esta observación surge la pregunta ¿hay diferencias estructurales, bioquímicas y funcionales entre la ruta secretoria de los trofozoitos de cultivo y los aislados de absceso hepático? Se planteó un estudio comparativo entre fracciones subcelulares de trofozoitos de la línea celular HM1 y de amibas colectadas a partir de absceso hepático de hámster y axenizadas. Las muestras se procesaron de acuerdo a los protocolos de homogenización y fraccionamiento por centrifugación diferencial y gradiente de sacarosa definidos en este trabajo (Figs. 12 y 16). Los resultados obtenidos con ambos tipos celulares son muy similares. P14 contiene aproximadamente el 50% de Sec61 α , mientras que cada una de las fracciones P500, P20 y SN20 representa menos del 20% (Fig. 20).

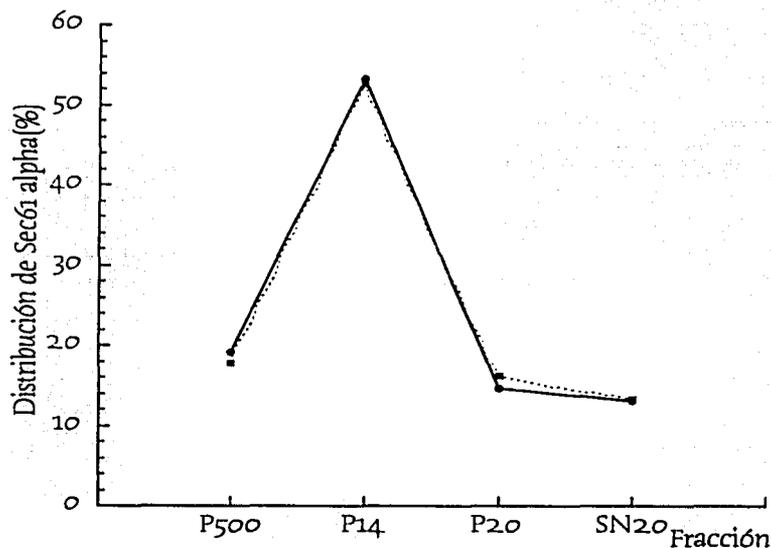


Figura 20. Distribución de Sec61 α en los pellets de la centrifugación diferencial. Se comparan las fracciones provenientes de amibas de hígado (■) y amibas de cultivo (●).

De igual manera, no se detectan diferencias significativas en la distribución de la señal de Sec61 α en gradientes de sacarosa entre los trofozoitos HM1 y los provenientes de hámster infectado (Fig. 21). Si bien, al ser analizada por inmunocitoquímica, la señal de los marcadores moleculares parece estar mas localizada en los trofozoitos colectados de absceso hepático que en las amibas cultivadas de rutina en el laboratorio no se detecta una diferencia a nivel de fraccionamiento subcelular. Es decir, Sec61 α pudiera estar contenido en estructuras celulares de densidad similar en ambos tipos de trofozoitos pero que a nivel celular, su distribución sea diferente.

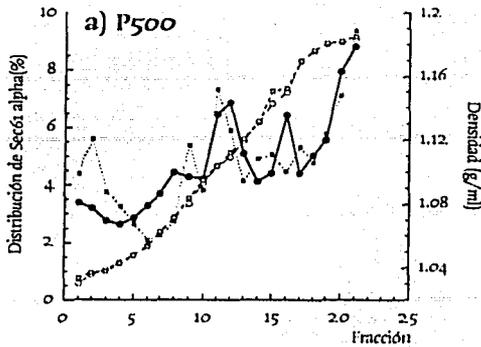
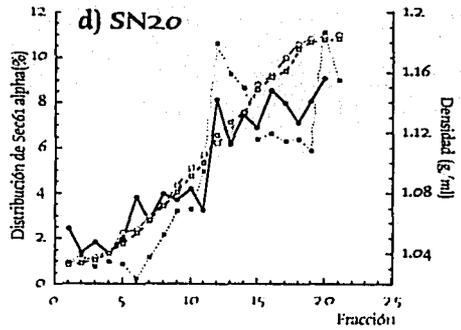
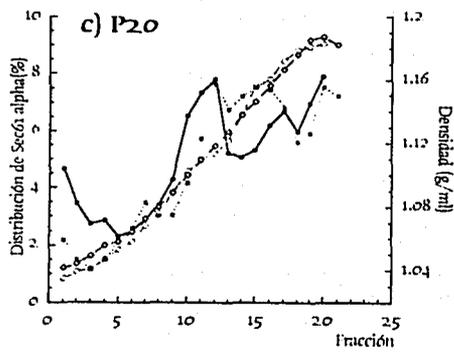
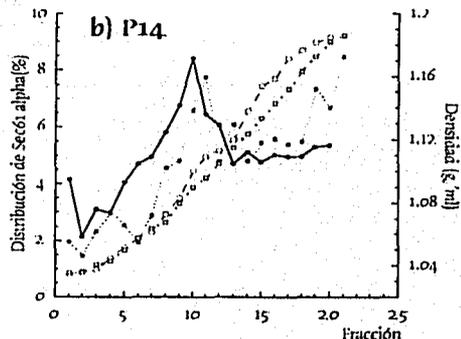


Figura 21. Distribución de Sec61 α en las fracciones del gradiente de sacarosa. Se compara el patrón de distribución en las amebas de cultivo (*) con el patrón de las amebas de hígado (*). Se grafica también la densidad para cada gradiente (o-amebas de cultivo; □-amebas de hígado).



HEBETS CON
FALSA EN CUBEN

9.6 Comparación entre el fraccionamiento subcelular de células HeLa y trofozoitos de *E. histolytica* (línea celular HM1)

Teniendo en cuenta las peculiaridades celulares, estructurales y bioquímicas de *Entamoeba histolytica* no es de sorprender que no se haya obtenido un patrón de fraccionamiento de Sec61 α similar al ya bien caracterizado fraccionamiento de microsomas de células de mamífero. No obstante, y en el ánimo de validar las condiciones experimentales definidas en este trabajo, se realizaron algunos fraccionamientos subcelulares, tanto de células HeLa como de trofozoitos de la línea celular HM1, siguiendo tanto los protocolos estandarizados en este trabajo (Figs. 12 y 16) como el esquema de fraccionamiento de células HeLa reportado en la literatura (Nilsson *et al.*, 1994). Dado que los anticuerpos anti-Sec61 α de amiba no reconocen la proteína correspondiente en células HeLa, se utilizaron anticuerpos anti-PDI (StressGen). La Protein Disulfuro Isomerasa o PDI es un marcador molecular del lumen de RE.

Utilizando las condiciones de fraccionamiento por centrifugación diferencial establecidas en este trabajo, se encontró que, al igual que en la muestra de trofozoitos, en la fracción P14 (14 PSI o $\sim 57,000 \times g$) de células HeLa se localiza el 56% de la señal del marcador de RE PDI, mientras que en el resto de las fracciones, el marcador se distribuye en menos del 20% de PDI en cada fracción (Fig. 22). La distribución de PDI lograda con este esquema concuerda con los reportes en la literatura, donde se sugiere que para sedimentar microsomas, se debe centrifugar a velocidades entre 30,000 y 100,000 $\times g$ (Evans, 1992).

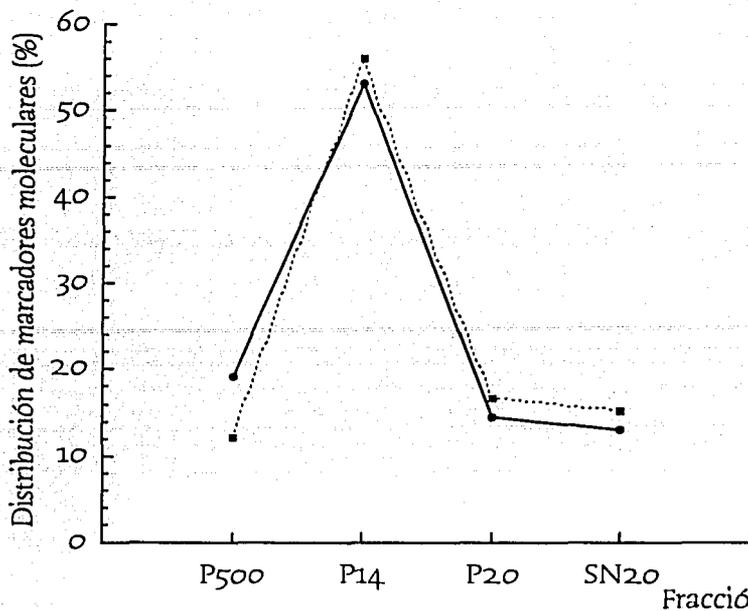


Figura 22. Distribución de marcadores moleculares en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. (•) Distribución de Sec61 α en homogenizado de trofozoitos. (■) Distribución de PDI en homogenizado de células HeLa.

Siguiendo el protocolo descrito en este trabajo (Fig. 16), las fracciones de la centrifugación diferencial se cargaron sobre gradientes de sacarosa (10-65 %). En las muestras provenientes de P500, P20 y SN20, de las células HeLa, PDI se distribuye de manera similar a Sec61 α en las fracciones del P500, P20 y SN20 de los trofozoitos (datos no mostrados). Esto podría deberse a la γ de por sí poca señal del marcador en estas fracciones (menos del 20% cada una). Sin embargo, la distribución de los marcadores en el P14 fue diferente. PDI se localiza preferentemente en las fracciones con mayor densidad del gradiente (1.16 a 1.2 g/ml) comparado con la distribución de Sec61 α que en fracciones de ameba tiende a enriquecerse más hacia la zona media del gradiente, es decir, entre 1.10 y 1.15 g/ml (Fig. 23).

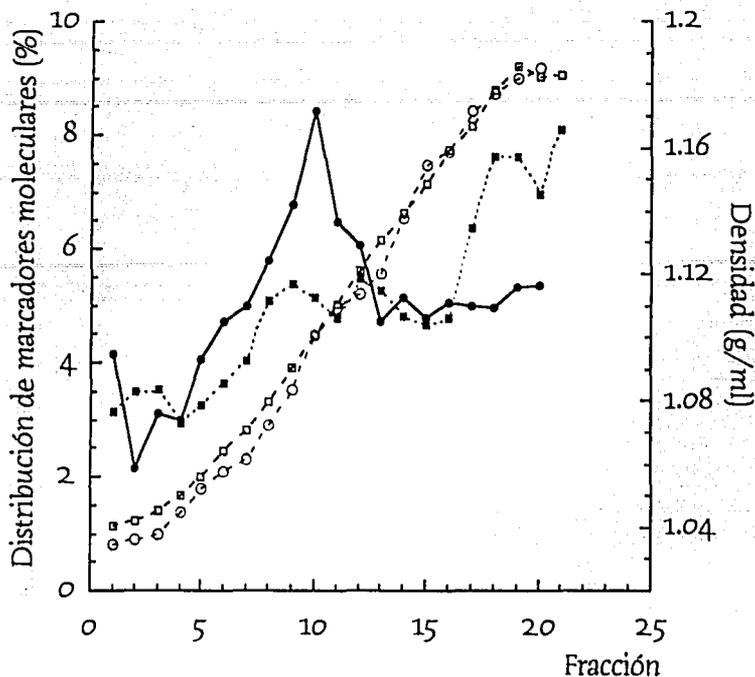


Figura 23. Distribución de marcadores moleculares a partir de P14, en fracciones obtenidas en gradiente de sacarosa. (●)Distribución de Sec61 α , utilizando trofozoitos, en el gradiente de sacarosa. (■)Distribución de PDI, utilizando células HeLa, en el gradiente de sacarosa. Se grafica también la densidad para cada gradiente (○-trofozoitos; □ - células HeLa).

No existen reportes en la literatura acerca de la distribución de PDI en gradientes de sacarosa, sin embargo se sabe bien la distribución de otros marcadores de RE en este tipo de gradientes. Mediante la actividad de la NADH-citocromo C reductasa, se ha reportado que el RE de células HeLa se distribuye en fracciones de alta densidad en gradientes de sacarosa del 20-65% (valores no reportados, Röttger *et al.*, 1998). Los datos, para células HeLa, obtenidos con el protocolo de fraccionamiento subcelular estandarizado en este proyecto correlacionan con lo reportado para el RE de estas células.

De la misma manera en que se comprobó si el protocolo de fraccionamiento de este proyecto funcionaba con células de mamífero, se probó un protocolo de fraccionamiento reportado para células HeLa pero utilizando trofozoitos de *E. histolytica*. Se utilizó una modificación del método reportado por Nilsson y colaboradores (1994) en el que se lavaron las células dos veces con TEA-KCL, pH 7.4 (Trietanolamina 10 mM, KCl 150 mM) centrifugando a 500 x g, durante 10 minutos, a 4°C. Después se lavaron con KEHM, pH 7.4 (KCl 50 mM, EGTA 10 mM, HEPES 50 mM, MgCl₂ 1.92 mM) centrifugando a 500 x g, 10 minutos a 4°C. Las células HeLa se homogenizaron con 20 golpes del homogenizador Potter-Elvehjem en KEHM con inhibidores de proteasas (Complete, Roche) mientras que 10 golpes del pistilo del homogenizador Potter-Elvehjem fueron suficientes para homogenizar trofozoitos en el mismo buffer KHEM adicionado con inhibidores de proteasas (E64 0.5 mM y PMSF 5 mM). Se produjo un sobrenadante post-nuclear centrifugando a 1,800 x g, durante 5 minutos, a 4°C. El sobrenadante (0.5 ml) se cargó sobre 2 ml de un gradiente continuo de sacarosa de 20-65% (Ultracentrífuga Optima TL, rotor TLS 55, 20000 rpm/2 hr) del que se colectaron 12 fracciones de aproximadamente 200 µl. Las fracciones se caracterizaron con los anticuerpos anti-PDI (HeLa) o anti-Sec61α (amiba).

Bajo estas condiciones experimentales, la distribución del marcador de RE, PDI, en las fracciones provenientes de células HeLa fue muy diferente a la distribución de Sec61α encontrada en la muestra de amiba. PDI se distribuyó de la manera en que se reportó la distribución del RE de las células HeLa. Es decir, hubo una mayor distribución de este marcador en las fracciones con mayor densidad del gradiente (Röttger *et al.*, 1998 -valores de densidad no definidos en el citado trabajo). Contrariamente, la distribución de Sec61α fue uniforme a lo largo del gradiente (Fig. 24) ya que no se detecta un pico definido.

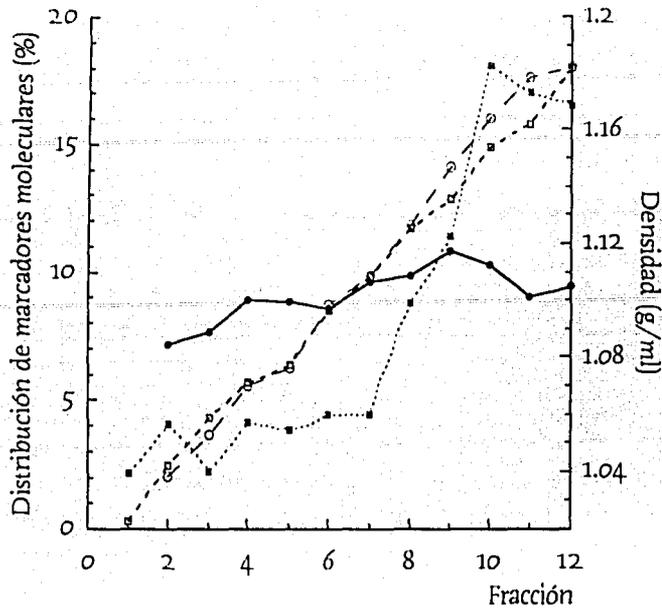


Figura 24. Distribución de marcadores moleculares en fracciones obtenidas en gradiente de sacarosa. (●) Distribución de Sec61 α , utilizando trofozoitos, en el gradiente de sacarosa. (■) Distribución de PDI, utilizando células HeLa, en el gradiente de sacarosa. Se grafica también la densidad para cada gradiente (○-trofozoitos; □ - células HeLa).

La distribución uniforme de Sec61 α en este gradiente podría deberse a las condiciones de homogenización o a la naturaleza de las estructuras celulares amebianas con función tipo RE. A pesar de que se verificó la preservación de los núcleos, por microscopía después de la homogenización, podría ser que el buffer de homogenización no sea el indicado para preservar las estructuras subcelulares de la ameba. Se sabe que la presencia de TEA 10 mM en el medio hace que las células de mamífero sean lo suficientemente frágiles para ser homogenizadas con facilidad en homogenizadores tipo Dounce o Potter-Elvehjem (Evans, 1992). Podría ser que la presencia de TEA en el buffer de lavado resulte agresiva para la estabilidad de las estructuras membranosas internas del trofozoito y que, sin embargo, sea suficiente para preservar las de las células HeLa.

10. Conclusiones

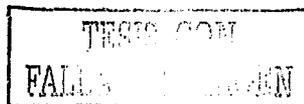
- Se probaron 4 soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa y 2 soluciones con diferentes concentraciones de PBS. El buffer de homogenización que se escogió fue el que tenía una concentración de sacarosa 2.00 mM, EDTA 1 mM y NaHCO_3 10 mM; es ligeramente hipo-osmótico y con sólo 10 golpes del homogenizador se obtiene aproximadamente 90% de amibas lisadas y el 90% de núcleos intactos.
- Se probaron cuatro condiciones de centrifugación diferencial. Se caracterizaron las fracciones obtenidas utilizando el anticuerpo anti-Sec61 α y mediante densitometría se determinó el enriquecimiento en el marcador. Se optó por un esquema de centrifugación diferencial que incluye una centrifugación a 500 x g por 15 minutos, una a 14 PSI por 30 minutos y otra a 20 PSI por 90 minutos, con una centrifugación del pellet nuclear a través de un colchón de sacarosa 1M, a 6000 x g.
- Se estandarizaron las condiciones para los gradientes de Percoll[®] (50,000 x g por 60 minutos) donde se enriquecieron fracciones (7 - 12) en el marcador Sec61 α . Sin embargo, nunca se logró cuantificar proteína y tampoco se contó con una referencia exacta de la densidad esperada para el RE en gradientes de esta suspensión, por lo que se decidió no utilizar en lo subsecuente este tipo de gradientes.
- En gradientes continuos de Sacarosa (10 - 65 %) se observó que Sec61 α se enriquece a partir de la fracción 10, la cual corresponde a una densidad de 1.1 g/ml.
- La distribución de Sec61 α en las fracciones subcelulares de amibas provenientes de absceso hepático es similar a la distribución del marcador en las fracciones subcelulares de amibas provenientes de cultivo axénico.

- Se encontró que las actividades de DPMS y NAGPT/NAGT se localizan en fracciones con densidad 1.12 - 1.15 g/ml y que la distribución de Sec61 α y STT3 es más amplia (1.11 - 1.2 g/ml) que la de las actividades enzimáticas.

11. Perspectivas

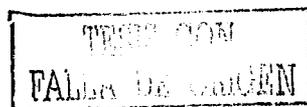
- Generar anticuerpos contra las enzimas DPMS y NAGPT/NAGT y determinar si la localización de la enzima es idéntica a la localización de la actividad.
- Realizar inmunoprecipitaciones con los anticuerpos Sec61 α y STT3 y determinar si las enzimas DPMS y NAGPT/NAGT se encuentran en las mismas fracciones.
- Analizar las fracciones subcelulares por microscopía electrónica y técnicas de inmunoro para ver el tipo de estructuras en las que se localizan los marcadores.

ESTA TESIS NO SALIRÁ
DE LA BIBLIOTECA



12. Literatura Citada

- Aley, S.B.; Scott, W.A. y Cohn, Z.A. (1980 a) Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 152(2): 391-404.
- Aley, S.B.; Scott, W.A. y Cohn, Z.A. (1980 b) Isolation of the plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd* 11(Supl. 1): 41-45.
- Argüello, C.; Valenzuela, B. y Rangel, E. (1992) Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res* 23(2): 77-88.
- Arroyo, R. y Orozco, E. (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23(2): 151-158.
- Ávila, E.E.; Martínez-Alcaraz, E.R.; Barbosa-Sabanero, G.; Rivera-Baron, E.I.; Arias-Negrete, S. y Sazueta-Sandoval, R. (2002) Subcellular localization of the NAD-dependent alcohol dehydrogenase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Parasitol* 88(2): 217-222.
- Bhattacharya, A.; Satish, S.; Bagchi, A. y Bhattacharya, S. (2000) The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 30: 401-410.
- Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A.; Diamond, L.S. y Soldo, A.E. (1989) Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool* 36: 455-458.
- Blobel, G. y Sabatini, D.D. (1970) Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II Location of the polypeptides in rough microsomes. *J Cell Biol* 45: 146-157.
- Bruchhaus, I.; Leippe, M.; Lioutas, C. y Tannich, E. (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA and Cell Biology* 12(10): 925-933.
- Burda, P. y Aebi, M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426: 239-257.
- Caballero-Salcedo, A.; Viveros-Rogel, M.; Salvatierra, B.; Tapia-Conyer, R.; Sepúlveda-Amor, J.; Gutiérrez, G. y Ortiz-Ortiz, L. (1994) Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 50(4): 412-419



- Carrero, J.C. y Laclette, J.P. (1996) Molecular Biology of *Entamoeba histolytica*: A Review. Arch Med Res 27(3): 403-412.
- Das, P.; Debnath, A. y Muñoz, M.L. (1999) Molecular mechanisms of pathogenesis in amebiasis. Indian J Gastroenterol 18(4): 161-166.
- Diamond, L.S.; Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72: 431-432.
- Dobell, C. (1928) Researches on the intestinal protozoa of monkeys and men. I. General introduction. II. Description of the whole life history of *Entamoeba histolytica* in cultures. Parasitology 20: 357-412.
- Espinosa-Castellano, M.; González-Robles, A.; Chávez, B.; Castañón, G.; Argüello, C.; Lázaro-Haller, A. y Martínez-Palomo, A. (1998) *Entamoeba dispar*: Ultrastructure, Surface Properties and Cytopathic Effect. J Euk Microbiol 45(3): 265-272.
- Evans, W.H. (1992) Isolation and characterization of membranes and cell organelles. En: Preparative Centrifugation, a practical approach. The Practical Approach Series. Ed. Rickwood, D. y Hames, B.D. IRL Press at Oxford University Press pp: 233-270.
- Fleischer, S. y Kervina, M. (1974) Subcellular fractionation of rat liver. Methods Enzymol 31: 6-41
- Gilchrist, C.A. y Petri, W.A. (1999) Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. Curr Op Microbiol 2: 433-437.
- Glick, B.S.; Elston, T. y Oster, G. (1997) A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. FEBS Letters 414: 177-181.
- Gosh, S.K.; Field, J.; Frisardi, M.; Rosenthal, B.; Mai, Z.; Rogers R. y Samuelson J. (1999) Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: Localization of Secretory Vesicles, Endoplasmic Reticulum, and Golgi Apparatus. Infect Immun 67(6): 3073-3081.
- Graham, J.M.; Ford, T. y Rickwood, D. (1990) Isolation of the major subcellular organelles from mouse liver using Nycodenz gradients without the use of an ultracentrifuge. Anal Biochem 187: 318 - 323.

- Gutiérrez, A. (1999) Tesis de licenciatura. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra ERD2 de *Entamoeba histolytica*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Gutiérrez, A. (2001) Tesis de maestría. Clonación, expresión y citolocalización de la proteína STT3 de *Entamoeba histolytica*: un marcador molecular de retículo endoplásmico. IBT, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez, A.; Sánchez-López, R.; Ramos, M.A. y Alagón, A. (2000) Cloning of the *Entamoeba histolytica* STT3 Gene, a Subunit of the Oligosaccharyltransferase Complex. Arch Med Res 31: S162-S164.
- Hubber, M.; Koller, B.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Ravel, M.; Rozenblatt, S. y Garfinkel, L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. Mol Biochem Parasitol 32: 285-296.
- Jackson, T.F.H.G. (1998) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. Int J Parasitol 28: 181-186.
- Johnson, A.E. y van Waes, M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 799-842.
- Juárez, P.; Sánchez-López, R., Stock, R.P., Olvera, A., Ramos, M.A. y Alagón, A. (2001) Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 116(2): 223-228.
- Leippe, M.; Ebel, S.; Schoenberger, O.L.; Horstmann, R.D. y Muller-Eberhard, H.J. (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 88(17): 7659-7663.
- Long-Krug, S.A.; Fischer, K.I.; Hysmith, R.M. y Ravdin, J.I. (1985) Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: Description and subcellular localization. J Infect Dis 152(3): 536-41.
- Ma, D. y Jan, L.Y. (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. Curr Op Neurobiol 12: 287-292.
- Martínez Palomo, A. (1989) Amibiasis. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 17-41, 164-183.

- Martínez Palomo, A. (2000) Parasitic amebas of the intestinal tract en: Amibiasis, Obra seleccionada. El Colegio Nacional. México. pp. 99-176.
- Mazzuco, A.; Benchimol, M. y De Souza, W. (1997) Endoplasmic Reticulum and Golgi-like Elements in *Entamoeba*. *Micron* 28 (3): 241-247.
- McKerrow, J.H.; Sun, E.; Rosenthal, P.J. y Bouvier, J. (1993) The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. *Ann Rev Microbiol* 47: 821-853.
- McLaughlin, J. y Aley, S. (1985) The Biochemistry and Functional Morphology of the *Entamoeba*. *J Protozool* 32(2): 221-240.
- McLaughlin, J. y Meerovitch, E. (1975) The surface and cytoplasmic membranes of *Entamoeba invadens* (Rodhain, 1934): I. Gross chemical and enzymatic properties. *Comp Biochem Physiol* 52B: 477-497.
- Mironov, A.A.; Weidman, P. y Luini, A. (1997) Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J Cell Biol* 138(3): 481-484.
- Moody-Haupt, S.; Patterson, J.H.; Mirelman, D. y McConville, M.J. (2000) The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *J Mol Biol* 297: 409-420
- Morand, J.N. y Kent, C. (1986) A one-step technique for the subcellular fractionation of total cell homogenates. *Anal Biochem* 159: 157-162.
- Munro, S. y Pelham, H.R.B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907.
- Muñoz, M.L.; Rojkind, M.; Calderon, J.; Tanimoto, M.; Arias-Negrete, S. y Martínez-Palomo, A. (1984) *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J Protozool* 31(3): 468-470.
- Nilsson, T.; Hoe, M.H.; Slusarewicz, P.; Rabuilla, C.; Watson, R.; Hunte, F.; Watzel, G.; Berger, E.G. y Warren, G. (1994) Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa Cells. *EMBO J* 13(3): 562-574.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358.
- Pasquali, C.; Fialka, I. y Huber, L.A. (1999) Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *J Chromatogr B* 722: 89-102.

- Pelham, H.R. (1996) The dynamic organization of the secretory pathway. *Cell Struct Funct* 21(5): 413-419.
- Percoll® Methodology and Applications. Density Marker Beads for calibration of gradients of Percoll®. Pharmacia Laboratory Separation Division. S-751 82 Uppsala, Suecia.
- Pertoft, H. (2000) Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll®. *J Biochem Biophys Methods* 44: 1-30.
- Petri Jr, W.A.; Chapman, M.D.; Snodgrass, T.; Mann, B.J.; Broman, J. y Ravdin, J.I. (1989) Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 264(5): 3007-3012.
- Petter, R.; Rozenblatt, S.; Nuchamowitz, Y. y Mirelman, D. (1992) Linkage between actin and ribosomal protein L21 genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 56: 329-333.
- Que, X. y Reed, S.L. (2000) Cystein Proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 13(2): 196-206.
- Ramos, M.A.; Mercado, G.C.; Salgado, L.M.; Sánchez-López, R.; Stock, R.P.; Lizardi, P. M. y Alagón, A. (1997) *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol Biochem Parasitol* 88: 225-235.
- Ramos, M.A. y Alagón, A. (2000) Molecular cloning of a gene encoding a PDI-like protein from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31(4): S173-S175.
- Rocha, R. (2001) Tesis de Maestría. Identificación y caracterización de un organelo amibiano equivalente al retículo endoplásmico. IIBE, Universidad de Guanajuato.
- Rodríguez, M.A.; García-Pérez, R.M.; García-Rivera, G.; López-Reyes, I.; Mendoza, L.; Ortiz-Navarrete, V. y Orozco, E. (2000). An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene and protein: function and cellular localization. *Mol Biochem Parasitol* 108: 199-206.
- Rosales-Encina, J.L.; Meza, I.; López de León, A.; Talamás-Rohana, P. y Rojkind, M. (1989) Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 156(5): 790-797.

- Rosenberg, I. y Gitler, C. (1985) Subcellular fractionation of amoebapore and plasma membrane components of *Entamoeba histolytica* using self generating Percoll gradients. *Mol Biochem Parasitol* 14: 231-248.
- Rothblatt J, Novick P, Stevens T. (1994) *Guidebook to the secretory pathway* Oxford University Press.
- Röttger, S.; White, J.; Wandall, H.H.; Olivo, J.; Stark, A.; Bennet, E.P.; Whitehouse, C.; Berger, E.G.; Clausen, H. y Nilsson, T. (1998) Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 111: 45-60.
- Sánchez-López, R.; Gama-Castro, S.; Lizardi, P.M. y Alagón A. (1997) The Secretory Pathway of *Entamoeba histolytica*: Characterization and Expression of the ERD2 Gene. *Arch Med Res* 28 (Suppl): S59-S61.
- Sánchez-López, R.; Gama-Castro, S.; Ramos, M.A.; Merino, E.; Lizardi, P.M. y Alagón, A. (1988) Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol* 92: 355-359.
- Sánchez-López, R.; Gutiérrez, A.; Juárez, P.; Olvera, A.; Olvera, F.; Ramos, M.A.; Sánchez, R.; Saralegui, A.; Stock, R.P. y Alagón, A. (2000-a) Molecular Genetics of the Secretory Pathway in *Entamoeba histolytica*: An Overview. *Arch Med Res* 31: S151-S152.
- Sánchez-López R, Siminovich B, Alagón A. (2000-b) *Entamoeba histolytica* codes for a protein homologue of the Sec61 alpha subunit, a component of Endoplasmic Reticulum translocon. *Arch Med Res* 31(4): S168-S170.
- Semenza, J.C. y Pelham, H.R.B. (1992) Changing the Specificity of the Sorting Receptor for Luminal Endoplasmic Reticulum Proteins. *J Mol Biol* 224: 1-5.
- Serrano, R.; Deas, J.E. y Warren, L.G. (1977) *Entamoeba histolytica*: membrane fractions. *Exp Parasitol* 41: 370-384.
- Shore, G.C. y Tata, J.R. (1977) Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J Cell Biol* 72: 714-725.

- Siminovich, B.A. (1999) Tesis de maestría. Identificación y caracterización de un fragmento del gen SEC61 de *Entamoeba histolytica*. IBT, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Solís, F.; Orozco, E., Córdova, L.; Rivera, B.; Luna-Arias, J.P., Gómez-Conde, E. y Rodríguez, M.A. (2002) *Entamoeba histolytica*: DNA carrier vesicles in nuclei and kinetoplast-like organelles (EhkOs). *Mol Genet Genomics* 267(5): 622-628.
- Spector, D.L.; Goldman, R.D. y Leinwand, L.A. (1998) *Cells: A laboratory Manual*. Volume 1: Culture and biochemical analysis of cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press pp: 34-55.
- Spies, F. y Elbers, P.F. (1972) Axenic mass cultivation of *Entamoeba invadens* and cell membrane isolation. *J Protozool* 19: 102-107.
- Stanley, S.L.Jr.; Huizenga, H. y Li, E. (1992) Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 50(1): 127-138.
- Stanley, S. L.Jr.; Tian, K.; Koester, J.P. y Li, E. (1995) The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem* 270(8): 4121-4126
- Tannich, E. y Horstmann, R.D. (1992) Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Mol Evol* 34: 272-273.
- Torres-Guerrero, H.; Peattie, D.A. y Meza, I. (1991) Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 45: 121-130.
- Van Vliet, H.H.D.M; Spies, F.; Linnemans, W.A.M., Klepke, A.; Op den Kamp, J.A.F. y Van Deenen, L.L.M. (1976) Isolation and characterization of subcellular membranes of *Entamoeba invadens*. *J Cell Biol* 71: 357-369.
- Vargas-Rodríguez, L.; Villagómez-Castro, J.C.; Flores-Carreón, A.; López-Romero, E. (1998) Identification and characterization of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *E. histolytica*. *Int. J. Parasitol* 28: 1333-1340.
- Villagómez-Castro, J.C. (2000) Tesis de doctorado. Glicosilación de proteínas en *Entamoeba histolytica*: estudio sobre la dolicol fosfato manosa sintasa. IIBE, Universidad de Guanajuato.

- Villagómez-Castro, J.C.; Calvo-Méndez, C.; Várgas-Rodríguez, L.; Flores-Carreón, A. y López-Romero, E. (1998) *Entamoeba histolytica*: Solubilization and biochemical characterization of Dolichol Phosphate Mannose Synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp Parasitol* 88: 111-120.
- Villagómez-Castro, J.C.; Calvo-Méndez, C.; Flores-Carreón, A. y López-Romero, E. (2000) Partial purification and characterization of dolichol phosphate mannose synthase from *Entamoeba histolytica*. *Glycobiology* 10(12): 1311-1316.
- Walsh, J.A. (1986) Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8: 228 - 238.
- Weinbach, E. y Diamond, L.S. (1974) *Entamoeba histolytica*: I. Aerobic metabolism. *Exp Parasitol* 35: 232-234.
- Willhoeft, U. y Tannich, E. (1999) The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 41-53.
- Young, J.D.E; Young, T.M.; Lu, L.P.; Unkeless, J.C. y Cohn, Z.A. (1982) Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 156: 1677-1690.
- Zamarripa-Morales, S.; Villagómez-Castro, J.C.; Calvo-Méndez, C.; Flores-Carreón, A. y López-Romero, E. (1999) *Entamoeba histolytica*: Identification and properties of membrane-bound and soluble α -Glucosidases. *Exp Parasitol* 93: 109-115.
- Zerangue, N.; Malan, M.J.; Fried, S.R.; Dazin, P.F.; Jan, Y.N.; Jan, L.Y. y Schwappach, B. (2001) Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *PNAS* 98(5): 2431-2436.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN