



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Método de purificación de amiboporo
de *Entamoeba histolytica*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

DOLORES MONTEERRUBIO MENDOZA

TUTOR

M. en C. AUGUSTO J. GONZÁLEZ CANTO

MÉXICO, D.F. 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



“La amiba histolytica puede hacer todo lo que hace un león incluso comerse a un hombre.”

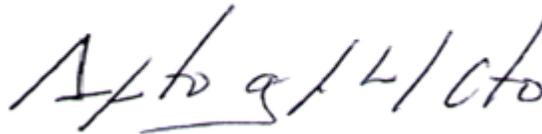
Anónimo

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Fernando Ramos Reyes
VOCAL	M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán
SECRETARIO	M. en C. Augusto José González Canto
1er. SUPLENTE	Biól. Jovanny Fernando Yonatán Olvera Bautista
2º SUPLENTE	Dr. Luis Felipe Jiménez García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL. DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL. FACULTAD DE MEDICINA. UNAM. CAMPUS HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "EDUARDO LICEAGA"



TUTOR DEL TEMA: M. en C. Augusto José González Canto

(Nombre y firma)

Agradecimientos

A mis padres:

Ocotlán Mendoza Bedolla†

Gustavo Monterrubio Padrón

Con gran admiración y respeto por la vida
y ejemplo que me han dado.

A mi hija: Sophie

Por ser mi compañera, de toda la vida con gran cariño

A mis hermanos:

Ma.Esther,

Gustavo A, José E, Ma.Ocotlán, Jesús A y Alma F.

Por su comprensión y cariño

De manera muy especial.

Al jurado gracias por su apoyo y acertados comentarios.

Al M. en C. Augusto J. González por su asesoramiento en la realización de este trabajo.

A Mario Nequiz por el apoyo en la realización de la técnica de electroelución y proporción de amibas.

A Luz Adriana Rodríguez G, por su valioso apoyo técnico en el laboratorio.

A Marco E. Gudiño Zayas por el apoyo en la realización del material gráfico de este trabajo.

Y de manera muy especial a las personas que tuvieron que ver en la participación de este trabajo.

Resumen

En México los factores socioeconómicos, culturales y educativos paupérrimos han contribuido a la alta prevalencia de la amibiasis, una enfermedad producida por el parásito protozoo *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad es cosmopolita y se distribuye principalmente en países en vías de desarrollo ocupando el tercer lugar de las parasitosis a nivel mundial. Se calcula que cada año ocurren 50 millones de casos sintomáticos (enfermos), de los cuales 100,000 son mortales que representa el 20 % de la población. En México se estima que aproximadamente el 10% de la población se ha infectado con esta enfermedad. Fue nombrada *E. histolytica*, debido a su capacidad de destruir tejidos del huésped y lisis cualquier célula blanco. En esta actividad lítica, se involucran varias moléculas efectoras, vinculadas con su virulencia; como lectinas (adhesión), fosfolipasas (histólisis), proteasas de cisteína (degradación intracelular), y amiboporo (formadora de poros). La amibiasis se puede clasificar como asintomática o sintomática de acuerdo al grado de daño causado. El daño ocasionado puede ser en diferentes grados; desde la destrucción de la mucosa del epitelio intestinal, causando disentería o diarrea mucosanguinolenta y colitis, hasta daño extracelular originando abscesos hepáticos.

Una de las moléculas propuestas para desencadenar el daño celular es el amiboporo, existen diversas aportaciones que nos permiten ir integrando el comportamiento de dicha molécula. El amiboporo es un péptido de 8.3 kDa, el cual se ha propuesto que tiene la propiedad de crear canales en la membrana de la célula blanco a través de los cuales fluyen libremente iones y moléculas lo que rompe el gradiente iónico en el citoplasma, indispensable para las funciones vitales de la célula.

En el presente trabajo, se obtuvo la molécula del amiboporo a partir de la cepa virulenta HM1: IMSS mediante las técnicas de cromatografía (filtración molecular e intercambio iónico) y electroelución con un 93% de pureza de acuerdo a los resultados obtenidos en la secuenciación de la región amino terminal que corresponden a los 77 aminoácidos de la estructura primaria.

Una vez obtenida la molécula pura se tendría a bien utilizarla como antígeno para la producción de anticuerpos policlonales y conocer por otro lado la clase de muerte que induce sea por apoptosis o necrosis en diferentes tipos celulares entre otras funciones.

Abreviaturas

ABS	Absorbancia
AHA	Absceso hepático amibiano
ATP	Adenosinetriphosphate / Trifosfato de adenosina
BSA	Bovine seric albumine / Albúmina sérica bovina
Buffer MES	2-(n-Morpholino)Ethanesulfonicacid/ Ácido 2-n-morfolino etanosulfónico
CMQ	Cromatografía de intercambio iónico
DMSO	Dimethylsulfoxide /Dimetilsulfóxido
E	Entamoeba
E-64	<i>N</i> -[(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane / <i>N</i> -[(L-3-trans-carboxirano-2-carbonilo)-L-Leucil]amino-4-guanidinobutano
EDTA	Ethylene diaminetera acetic acid/ Ácido etilendiaminotetracético
kDa	KiloDalton
HPLC	High performance liquid chromatography / Cromatografía líquida de alta presión
M	Molar
µg	Microgramos
mL	Mililitros
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
Nm	Nanómetro
mM	Milimolar
NK	Natural Killer/Células asesinas naturales
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis/ Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Phosphate buffered saline / Buffer de fosfatosalino
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride / Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate/Dodecilsulfatosodico
TEMED	N, N, N, N- Tetramethylethylenediamine / Tetrametiletilonodiamina
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethane / Tris-hidroximetil - aminometano
TYI-S-33	TripticaseinyeastIronserum/Tripticaseina,levadura,hierro,suero y ensayo #33

Contenido

I. Introducción	1
1.1 Historia de la amibiasis	1
1.2 Características morfológicas	4
1.2.1 Trofozoíto	4
1.2.2 Quiste	5
1.3 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	6
1.4 Clasificación taxonómica	8
1.5 Características morfológicas de las diferentes especies de <i>Entamoeba</i>	8
1.6 Patogenicidad de <i>Entamoeba histolytica</i>	10
1.7 Formas de infección (amibiasis intestinal y AHA)	11
1.8 Metabolismo	12
II. Factores de virulencia	13
2.1 Lectinas	13
2.2 Fosfolipasas	13
2.3 Proteasas de cisteína	13
2.4 Amiboporo	14
III. Planteamiento del problema	16
3.1 Objetivo general	16
3.1.1 Objetivos específicos	16
3.2 Hipótesis	16
IV. Metodología	17
4.1 Cultivo masivo de amiba	17
4.2 Sobrenadante amibiano	17
4.3 Cromatografía en columna de filtración	17
4.3.1 Prueba de actividad	18
4.3.2 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	19
4.3.3 Electroforesis (gel de poliacrilamida)	19
4.4 Cromatografía por intercambio iónico	10
4.5 Electroelución en gel	20

4.6	Secuenciación de la proteína	21
V.	Resultados	22
5.1	Ensayo de despolarización de membrana por extracto amibiano	22
5.2	Electroforesis de poliacrilamida al 12% del extracto amibiano	23
5.3	Perfil cromatográfico de la columna de filtración	24
5.4	Electroforesis de poliacrilamida al 12% de la fracción de filtración con actividad de porina	25
5.5	Ensayo de actividad en liposomas a través del espectrofluorómetro de las diferentes fracciones (46-54) de la columna de filtración	26
5.6	Perfil cromatográfico de intercambio iónico (columna M. Q.)	30
5.7	Electroforesis de poliacrilamida al 12% de las diferentes fracciones de la columna de intercambio iónico	32
5.8	Actividad despolarizante en liposomas de la fracción de 0.1 M de NaCl en la columna de M.Q.	32
5.9	Análisis electroforético de las diferentes fracciones de purificación	33
5.10	Electroforesis nativo de las fracciones de electroelución y con actividad de porina	34
5.11	Rendimiento del sobrenadante amibiano en las diferentes fases de purificación	35
5.12	Electroforesis del amiboporo puro	36
5.13	Secuenciación del péptido	37
VI.	Discusión	39
VII.	Conclusiones	41
VIII.	Perspectivas	41
IX.	Bibliografía	42

I. Introducción

1.1 Historia de la amibiasis

La amibiasis es una enfermedad causada por el protozoo *Entamoeba histolytica*. Debido a que este padecimiento posiblemente es muy antiguo quizás desde que el hombre habita en la tierra ha recibido diferentes nombres a través del tiempo de acuerdo a las manifestaciones que se presentaban en el órgano dañado. La humanidad ha venido padeciendo desde tiempos inmemorables el azote de la disentería descrito por Celso e Hipócrates (460 a 377 a. C.) con el nombre de “flujo de vientre”. Posteriormente en el Antiguo Testamento y la medicina Interna Clásica de Huang Ti (140 a 87 a. C.) integró el término de disentería [1].

En los tiempos de Hipócrates, en el siglo V a. C. se mencionaba con frecuencia la disentería (diarrea mucosanguinolenta) término que se daba a cualquier estado en que la inflamación del colon estaba asociada con la evacuación frecuente de heces con sangre, manifestación común de la amibiasis invasora. Los médicos romanos e individuos que practicaban el arte de curar durante la Edad Media dejaron también evidencias del conocimiento de dicha enfermedad (disentería). Fue hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando se estudió un caso de disentería en el que se detectó una gran abundancia de amibas de una especie desconocida en las heces de un paciente. Estos protozoarios fueron identificados como agentes causantes de la enfermedad asociada con la disentería y otras manifestaciones de la infección amibiana [2].

En el año de 1846, un médico inglés al servicio del ejército publicó un libro en el que se describen observaciones detalladas de autopsias practicadas a personas fallecidas de amibiasis la cual se refiere a la hepatitis primaria como una forma insidiosa supurativa, que hace su aparición en etapas avanzadas de la enfermedad como complicación de la disentería [3]. Entre los años 1860 y 1865 se dieron las primeras descripciones de *E. histolytica* como causa de enfermedad por los científicos Wilhelm Lambl y Morris J. Lewis [4]. Diez años más tarde se realizaron estudios más específicos para encontrar el origen de tan misteriosa enfermedad siendo el Dr. Miguel Jiménez quien iniciara la punción y canalización del absceso hepático en sus lecciones dadas en las escuelas de Medicina en México [5]. En 1875, el ruso Fedor Aleksandrovitch Losch publicó el artículo “Desarrollo masivo de amibas en el intestino grueso”, en el que describe en síntesis la historia de un campesino ruso que sufría de lo que se podía considerar una típica disentería amibiana con evacuaciones sanguinolentas, en las cuales, encontró un gran número de amibas móviles, algunas de las cuales contenían eritrocitos en su citoplasma. Con ello descubrió el agente causal de la enfermedad, y reprodujo la disentería en

forma experimental encontrando numerosos microorganismos a los que llamó *Amoeba coli* pero no consideró a la amiba como el agente causal [6].

En 1886, el médico griego Stephanus Kartulis publicó, sus observaciones en 150 pacientes egipcios con disentería, en los cuales demostró la presencia de amibas. Afirmó que la amiba era el agente etiológico de la disentería tropical y que el absceso hepático amibiano (AHA) era una secuela de la disentería amibiana [7]. En ese mismo año, Roberto Koch fue el primero en mostrar las amibas en cortes histológicos de úlceras de la pared intestinal. Así mismo Jaroslav Hlava en 1887, encontró trofozoítos en casos de disentería apoyando la idea del papel patógeno de estos parásitos [1].

William Osler en 1890, observó el primer caso de AHA en un joven médico que tuvo disentería y desarrolló posteriormente dicho absceso que le produjo la muerte. Alrededor de 1893, Quincke y Roos, descubrieron la forma quística de la amiba disentérica y su papel en la diseminación de dicha enfermedad y pusieron de manifiesto la existencia de otra especie de amiba distinta a la patógena hasta entonces conocida, cuyo citoplasma contenía en sus vacuolas materiales de desecho, pero que no podía fagocitar eritrocitos [8].

En 1891, Councilman y Lafleur patólogos norteamericanos dirigieron un estudio detallado de pacientes con disentería y absceso hepático confirmando la patogenicidad y reafirmando los términos AHA y amibiasis. Reconocieron a la amibiasis como una entidad patológica definida, y propusieron para el agente causal el nombre de *Amoeba dysenterae* [9].

En 1904 el término “amibiasis” fue creado por Musgrave y Clegg para indicar la infección con *E. histolytica*, independientemente de que esta enfermedad esté acompañada o no de síntomas. También publicaron un artículo en el que consideraron que todas las especies de amibas presentes en el intestino humano son patógenas, o pueden serlo [10].

En 1908, una de las aportaciones relacionadas con *E. histolytica*, fue el descubrimiento en detalle de los caracteres distintivos de las formas quísticas de dos especies que se encuentran con frecuencia, en el intestino humano. Schaudinn en ese mismo año definió las características estructurales y dio el nombre científico de *E. histolytica* [1]. Por otra parte, Walter y Sellards en 1913, demostraron la patogenicidad de *E. histolytica* y la inocuidad de *E. coli* en un estudio en el que inocularon a voluntarios con quistes de amibas. Enfatizaron el papel importante de los quistes en la transmisión de la amibiasis facilitando así el desarrollo de futuras medidas de prevención [11].

En 1925 Boeck y Drbohlav, describieron el primer medio de cultivo mixto, de preparación bifásica a base de huevo con solución salina isotónica, en el cual la *E. histolytica* se multiplicaba con relativa facilidad. En 1936 Bernardo Sepúlveda publicó un número especial de la revista del

centro de asistencia médica para enfermos pobres, dedicado íntegramente a la amibiasis y en 1970 creó el centro para el estudio de la amibiasis, realizando estudios clínicos y estimuló a grupos de investigadores no solo mexicanos sino de diversas partes del mundo a participar en los seminarios internacionales sobre amibiasis, los cuales se siguen llevando a cabo en México aún después de su muerte, acaecida en 1985 [12]. En 1961, Diamond, logró producir un medio axénico que ha permitido el desarrollo del parásito en cultivo libre de contaminación. Este hecho que favoreció notablemente el estudio experimental y conocimiento de diversos aspectos del parásito permitiendo así grandes avances en el campo de la amibiasis. El medio de cultivo bifásico para *E. histolytica*, consiste de una plataforma de agar, enriquecido con suero y cubierta con un caldo de nutrimentos diluido de la misma composición que la plataforma, suplementado con vitaminas y un extracto de embrión de pollo libre de células [13]. Posteriormente en 1968 este mismo autor diseñó un medio monofásico el cual llamo TPS-1, compuesto por tripticasa de caseína, Panmede (un extracto de hígado) y complementado con suero de caballo. El medio permitió por primera vez el cultivo masivo de *E. histolytica* para obtención de antígenos empleados con fines diagnósticos, para pruebas serológicas, bioquímicas y estudios encaminados al desarrollo de medicamentos antiamebianos [14]. El Panmede producía rendimientos muy variables, pero más tarde, Diamond, en 1978 creó el medio TYI-S-33, un medio más efectivo que el TPS-1, debido a que producía rendimientos más altos y menos variables, el Panmede se sustituyó por extracto de levaduras, suplemento de hierro, vitamina B12, ácido tióctico y tween 80. El cultivo axénico cambió el panorama y dotó al experimentador de condiciones adecuadas para analizar el efecto devastador de las amibas patógenas, tanto en modelos de laboratorio, *in vitro*, como en modelos de animales en los que ahora solamente se inoculan amibas [15].

En 1983, Orozco logró demostrar cómo las variaciones en la virulencia de una cepa amibiana van acompañadas de modificaciones concomitantes en su fagocitosis; si se eliminan de una población heterogénea los elementos más fagocíticos disminuye la virulencia; si por el contrario, se recupera la virulencia de una cepa a través de pases sucesivos por el hígado de animales, el resultado será, junto con el incremento de la virulencia, el aumento de la capacidad fagocítica de esa cepa [16]. Asimismo, en 1982, Martínez Palomo hizo una revisión de los hallazgos principales de la biología de *E. histolytica*, donde se resumen, además unos de los problemas principales sobre amibiasis [7]. Posteriormente en 1993, Diamond y Clark utilizaron toda evidencia bioquímica, inmunológica y genética para distinguir a *E. histolytica* como cepa patógena y a *E. dispar* como comensal (no patógena) [17].

En 1997, el comité de la Organización Mundial de la Salud (WHO) reunido en la Ciudad de México respaldó la separación de las cepas patógenas de las no patógenas en dos especies diferentes [18].

1.2 Características morfológicas

1.2.1 Trofozoíto

Forma móvil e invasora con un diámetro que varía de 12 – 60 μm . Es una célula pleomórfica que en movimiento presenta una forma alargada, con lobópodos salientes y una cola o uroide rastrero, mientras que en reposo presenta una forma esférica. La superficie celular presenta numerosas aberturas de 0.2-0.4 μm de diámetro que corresponden a las bocas de vesículas micropinocíticas. El uroide aparece como una cola formada de pliegues irregulares de la membrana y procesos filiformes llamados filopodios [19]. El trofozoíto se alimenta por fagocitosis y digestión interna de nutrimentos del tejido celular y eritrocitos. Se encuentra en los tejidos, en la mucosa del colon y en las heces líquidas. Invade la mucosa intestinal y el epitelio que reviste el intestino grueso, así como diferentes tejidos del organismo humano (cerebro, pulmón, corazón, hígado y piel). Evade con éxito las respuestas de defensa molecular y celular del huésped humano [20] (Fig. 1).

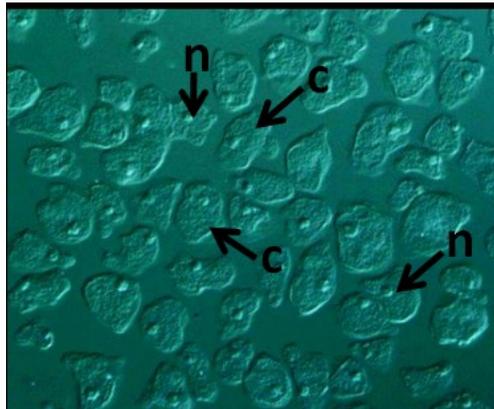


Figura 1. Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*; n) núcleo, c) citoplasma. Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) 40X. Foto tomada por Marco Gudiño.

1.2.2 Quiste

Forma inmóvil e infectiva con un diámetro que varía de 8 a 20 μm . Los quistes son esféricos o ligeramente ovalados y contienen de uno a cuatro núcleos. El tamaño y el número de núcleos varían dependiendo de la especie. La membrana nuclear es delgada y muestra condensaciones de cromatina agregadas a la superficie interna. La pared se forma del citoplasma que le sirve como protección cuando las condiciones ambientales le son desfavorables para la reproducción [21]. Dentro del quiste pueden visualizarse los cuerpos cromatoidales y los núcleos. El núcleo se alarga y se divide dando origen a un quiste binucleado. Posteriormente una segunda división forma un quiste tetranucleado. El glucógeno y cuerpos cromatoidales son gradualmente consumidos cuando el quiste envejece. El quiste es la forma resistente ya que puede sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses en un ambiente húmedo. La información referente al proceso de enquistamiento y desenquistamiento proviene de estudios realizados con *Entamoeba invadens*, una especie de amiba que infecta reptiles [22]. A diferencia de *E. histolytica*, *E. invadens* puede enquistar en cultivo mediante choque osmótico o privación de glucosa entre otras cosas. El enquistamiento de *E. invadens* está mediado por galactosa y N-acetil glucosamina, ya que la adición de cualquiera de estos dos azúcares inhibe la enquistación [23]. Una proteína abundante designada “Jacob” ha sido purificada de los quistes de *E. invadens*, es capaz de unirse tanto a residuos de quitina como de galactosa, desempeñando un papel importante en la formación de la pared del quiste [24] (Fig 2).



Figura 2. Quistes de *E. histolytica* con diferente grado de maduración; n) núcleo, c) citoplasma. Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) 100X. Foto tomada por Marco Gudíño.

1.3 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica pasa por cuatro estadios con diferente morfología (quiste, metaquiste, trofozoíto y prequiste). La forma habitual de la infección humana por *E. histolytica* es la ingestión de quistes maduros del parásito que pueden venir en el agua o en los alimentos, contaminados [25].

Los quistes llegan al estómago y por la acción de los jugos gástricos inician el proceso de desenquistamiento, reblandeciéndose la pared de resistencia, pasan al intestino y ahí es donde se liberan las amibas metaquísticas, crecen y se transforman en trofozoítos maduros que se dividen por fisión binaria. Los trofozoítos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, alimentándose de bacterias y restos celulares donde pueden vivir, en la luz o en las paredes intestinales. En la mayor parte de las infecciones los trofozoítos se agregan en la capa de mucina y forman nuevos quistes, resultando en una infección asintomática. Solo el 10% son sintomáticas y el resto son portadores (fig. 3 **a** -infección asintomática). En algunos casos, sin embargo la adherencia y lisis del epitelio del colon, mediado por la lectina específica N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNac), inicia la invasión del colon por los trofozoítos [26] y continua con un evento de actividad citolítica por un péptido que forma canales en la membrana fosfolipídica llamado amiboporo [27] y por último con la participación de una variedad de proteasas producidas por el parásito para realizar fenómenos citotóxicos y citolíticos y finalizar con la muerte de la célula blanco [28]. Los neutrófilos respondiendo a la invasión contribuyen al daño celular en el sitio de invasión. Los trofozoítos se sitúan en la pared del intestino, sobre la superficie de las glándulas de Liéberkhüm e invaden la mucosa. El periodo varía entre 48 horas y 7 días (fig. 3). Una vez que el epitelio intestinal es invadido, una extensión extraintestinal al peritoneo, hígado y otros sitios puede seguir. Algunos trofozoítos son arrastrados con la corriente intestinal y entonces se enquistan y son eliminados con las heces. Estos pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales y nuevamente el ciclo inicia cuando los quistes son nuevamente ingeridos por otra persona (fig. 3 **b** -infección sintomática) [29].

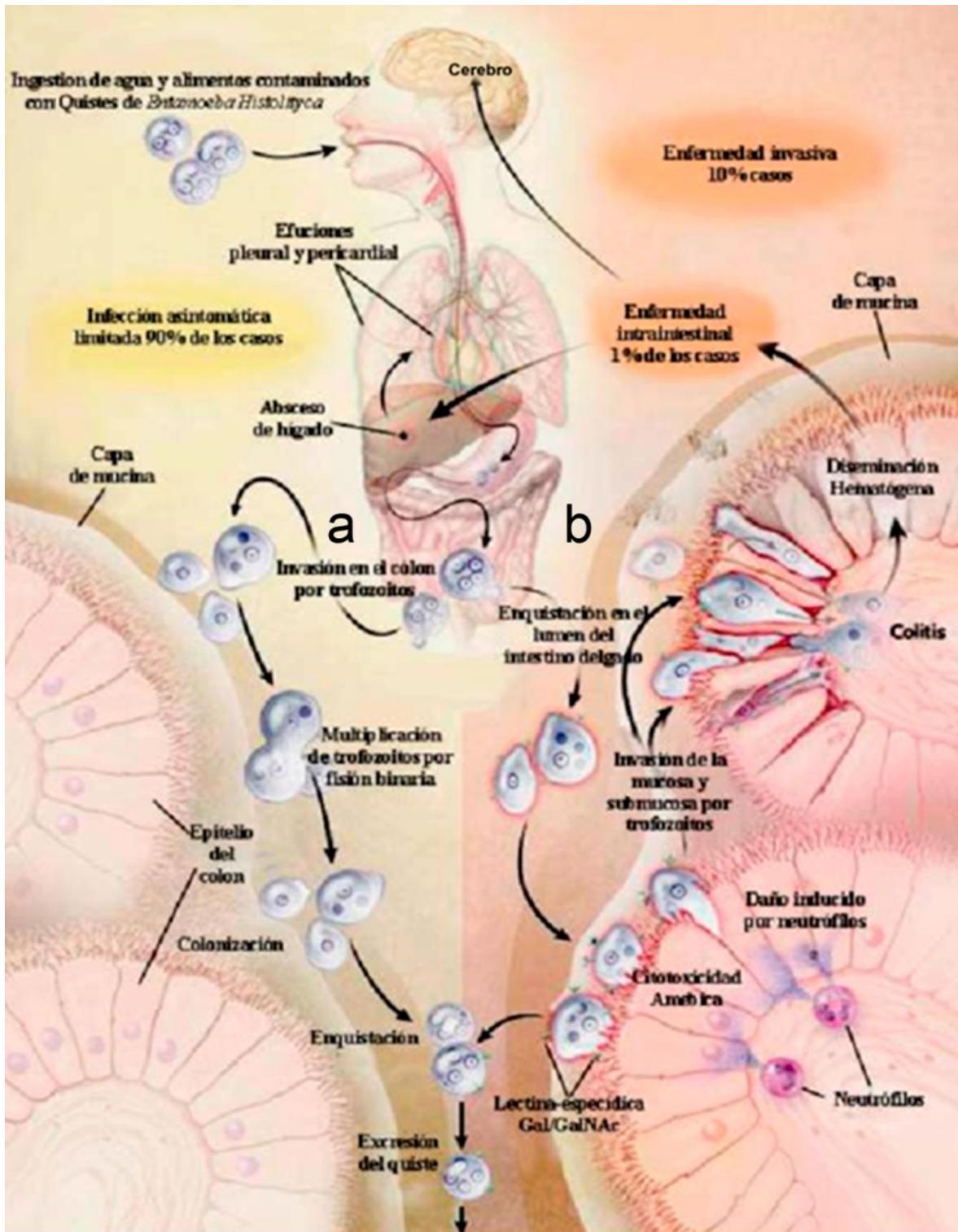


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (N. ENGL. J. MED. 2003)

1.4 Clasificación taxonómica [30, 31]

Imperio: Eukarya Corliss, 1994

Reino: Protista Goldfuss, 1818

Súper grupo: Amoebozoa (Luhe, 1913) Cavalier-Smith, 1998

Orden: Endamoebida Cavalier-Smith, 1993

Clase: Entamoebidea Cavalier-Smith, 1993

Familia: Entamoebidae (Chatton, 1925) Cavalier-Smith, 1993

Género: Entamoeba Levine et al, 1980

Especie: *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) Walker, 1911

Clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica* utilizando el esquema de Adl et al., 2012.

1.5. Características morfológicas entre las diferentes especies de *Entamoeba*.

En la tabla 1 se muestran las características de las diferentes especies de *Entamoeba*.

Entamoeba histolytica se diferencia de las demás especies de *Entamoeba* por su tamaño del quiste (tetranucleado) y trofozoíto. Además en el interior presenta cúmulos de glucógeno en el citoplasma, vacuolas con eritrocitos y bacterias. El nucléolo en forma de anillo se encuentra en la periferia de la membrana interna del núcleo. El humano único hospedero.

Tabla 1. Características morfológicas de las diferentes especies de *Entamoeba*.

ESPECIE	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. gingivalis</i>	<i>E. polecki</i>
PATOGENICIDAD	Patógena	No patógena	No patógena	No patógena	No patógena	No patógena
MORFOLOGIA	Polimórfica	Alargada	Polimórfica	Polimórfica	Polimórfica	Polimórfica
CITOPLASMA	Presenta cúmulos de glucógeno en el citoplasma, vacuolas con eritrocitos y bacterias	No presenta cúmulos y la cubierta de glucoproteína es más delgada	En su endoplasma se aprecian algunas vacuolas digestivas que contienen bacterias	Sus vacuolas no contienen eritrocitos	Vacuolas digestivas con leucocitos y células epiteliales semi-digeridas	Numerosas vacuolas, aunque nunca eritrocitos
NÚMERO DE NÚCLEOS	Quiste tetranucleado y cuerpos cromatoidales. El nucléolo en forma de anillo se encuentra en la periferia de la membrana interna del núcleo [32]	Quiste tetranucleado	Quiste con 8 núcleos y cuerpos cromatoidales	Quiste tetra y octonucleados con cuerpos cromatoidales	Generalmente ausencia de quiste, uninucleado	Quiste uninucleado
TAMAÑO DE TROFOZOÍTO	Trofozoítos de 10-60 μm	Trofozoítos de 8-20 μm	Trofozoítos de 15-50 μm	Trofozoítos de 5-10 μm	Trofozoítos de 5-35 μm	Trofozoítos de 10-25 μm
HOSPEDERO	Humano único hospedero	Patógena de gato	Humano, otros primates, y perros como hospederos	El humano y otras especies como hospederos	Hombre, otros primates, perros y gatos como huéspedes	Parásito de cerdos
FACTOR DE VIRULENCIA	Muestra eritrofagocitosis	No muestra eritrofagocitosis	No muestra eritrofagocitosis	No muestra eritrofagocitosis	Ingiere bacterias, leucocitos - eritrocitos	No muestra eritrofagocitosis

1.6 Patogenicidad de *Entamoeba histolytica*

La patogenicidad de un microorganismo se define como la capacidad que tiene para causar daño en un hospedero específico, mientras que su virulencia es el grado o medida en que lo produce [4].

La invasión de la mucosa intestinal por *E. histolytica* lleva a la formación de la característica úlcera en forma de matraz. Se considera que la migración subsecuente desde las lesiones del colon a otros tejidos toma lugar por una distribución hematógena. Un rasgo característico de la invasividad y patogenicidad de la amiba es la habilidad del organismo para adherirse, lisar y fagocitar las células intestinales y otros tejidos del huésped [33].

En México, formas severas de infección amebica fueron y serán todavía comunes. Como comensal, *E. histolytica* no produce síntomas en gente con una condición conocida como amibiasis luminal. Como patógeno, causa amibiasis invasiva en la cual amibas virulentas invaden la mucosa intestinal y produce disentería y ocasionalmente amebomas [6].

Es a través de una extensión vía sanguínea que las amibas pueden originar lesiones extraintestinales, mayormente absceso de hígado. Mientras que la mayor parte de los casos de amibiasis intestinal invasiva se manifiesta como diarrea o disentería. *E. histolytica* es un parásito considerado altamente patógeno, el cual produce severas lesiones principalmente en el hígado, formando AHA, en colon (colitis fulminante o ulcerativa) e inclusive en otros órganos y puede causar la muerte en el ser humano [19].



Figura 4. Amibiasis extraintestinal e intestinal en humano. A) Absceso hepático y B) Ulceras colónicas (N. ENGL. J. MED. 2003)

1.7 Formas de infección (amibiasis intestinal)

Amibiasis asintomática

Esta forma de amibiasis es la no invasiva y la mayoría de las infecciones asintomáticas son debidas a *E. dispar*, que vienen a ser portadores inocuos. Los portadores asintomáticos de *E. histolytica*, de los cuales hay pocos, son los de importancia en la transmisión de la enfermedad. En un estudio epidemiológico realizado en el Sur de África se observó que el 90 % de los portadores asintomáticos eliminaron la infección y solo el 10 % desarrolló colitis amibiana, lo que sugiere que probablemente solo ese 10 % estaba infectado con *E. histolytica* [6, 34].

Amibiasis sintomática

Se presenta cuando hay invasión de trofozoítos a la pared del colon, con producción de lesiones. Se caracteriza por dolor abdominal, evacuaciones constantes la cual puede ir acompañada de moco y sangre, en la mitad de los pacientes puede presentarse tenesmo. Algunas veces hay formación de úlceras de 3 mm que con frecuencia están en el ciego, el recto, colon y ocasionalmente se involucra al íleon en su parte final. Las úlceras son inicialmente superficiales, con bordes hiperémicos y una base necrótica cubierta de un exudado amarillento. Hay mucosa normal entre cada sitio de invasión. En raras ocasiones se pueden asociar vasos sanguíneos en la base de la úlcera provocando sangrados severos. Incluso la úlcera puede llegar a perforarse causando peritonitis y en casos extremos la muerte.

La colitis amibiana fulminante es el resultado de una ulceración confluyente y necrosis en el colon. El intestino se dilata, particularmente en la porción transversal. Los pacientes se ponen febriles y muestran signos de hipovolemia y desbalance electrolítico. Los especímenes obtenidos por cirugía muestran áreas extensivas de necrosis y entre ellas hay porciones intactas [6, 34].

El ameboma o granuloma amibiano es causado por invasiones repetidas del colon por *E. histolytica* que puede complicarse con una infección piogénica. Los amebomas se pueden encontrar en el colon pero son más frecuentes en el ciego (40%) y en la unión rectosigmoide (20%). Las lesiones regularmente son únicas e involucran pequeños segmentos del colon. Histológicamente el ameboma no es fibroso y contiene en el tejido gránulos con linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células gigantes. Hay ligera inflamación la cual es debida al edema producido [6, 34].

Entamoeba histolytica puede infectar casi cualquier órgano del cuerpo, incluyendo el hígado, cerebro, pulmón y piel. La forma mas frecuente de amibiasis extraintestinal es el absceso hepático amibiano. Esta condición resulta de la migración de trofozoitos, desde el colon al hígado por el sistema porta [34, 35].

1.8 Metabolismo

Entamoeba histolytica es un aerobio facultativo con enzimas glucolíticas específicas de metabolismo fermentativo, encontradas previamente en ciertas bacterias, tales como; alcohol deshidrogenasa, piruvato y ferredoxin-oxidoreductasa. Los carbohidratos glucosa y galactosa son la principal fuente de energía del parásito. La captación de glucosa requiere de un sistema de transporte específico, que proporciona aproximadamente 100 veces la cantidad de glucosa que el parásito incorpora por endocitosis. La glucosa 6-fosfato es degradada a piruvato por medio de la vía Embden-Meyerhof; dando como producto final dióxido de carbono y etanol [36]. Una característica especial es que el pirofosfato inorgánico, que es considerado un producto terminal del metabolismo, es utilizado por las amibas como fuente de energía reemplazando al ATP en varias reacciones glucolíticas. Las amibas son fermentadoras obligadas que carecen de piruvato deshidrogenasa y enzimas para la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs. Las enzimas fermentadoras incluyen a la piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa, ferredoxina y alcohol deshidrogenasa que son muy similares a las enzimas equivalentes en bacterias anaerobias. La enzima alcohol deshidrogenasa y la ferredoxina se encuentran en el citosol, mientras la piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa se localiza en la membrana plasmática y en la estructura citoplásmica que corresponde a la mitocondria rudimentaria.

La síntesis de ácidos nucleicos depende de la recuperación de purinas preformadas ya que *E. histolytica* carece de la síntesis de *novo* de purinas. En cambio, pueden sintetizar bases de pirimidina de *novo* o también se pueden recuperar del medio.

Los trofozoítos también tienen un metabolismo aerobio, y muestran una gran afinidad al O₂ a pesar de la carencia de mitocondrias funcionales y del ciclo de ácidos tricarboxílicos. Se transfieren electrones de sustratos reducidos a oxígeno molecular a través de una sucesión de acarreadores, que incluyen hierro y flavinas. No se encuentran en las amibas catalasas, peroxidasas u otras enzimas, que contengan grupos hemo [36, 37].

II. Factores de virulencia

Se han propuesto que existen moléculas específicas que forman parte del proceso multifactorial como factores de virulencia, las cuales toman parte en la adherencia a la membrana celular y por lo tanto en la lisis celular [38].

2.1 Lectinas

Las lectinas son proteínas de superficie que reconocen carbohidratos, en especial una adhesina específica para la galactosa y la N-acetil-D-galactosamina que participa en el proceso de adherencia del parásito a células y a la superficie de la mucosa intestinal y quizá en el efecto citotóxico. Una adhesina amibiana que corresponde a una lectina heterodimérica transmembranal con un peso molecular de 260 kDa, constituida por una subunidad ligera, y una subunidad pesada; ambas subunidades de la lectina son codificadas cada una, por una familia de varios genes [39].

2.2 Fosfolipasas

Estas moléculas están implicadas en la citotoxicidad amibiana, enzimas del grupo de las acil hidrolasas que se clasifican de acuerdo al enlace que rompen dentro de la estructura de un fosfolípido. En *E. histolytica* se han descrito dos fracciones subcelulares amibianas: una dependiente de calcio asociada a la fracción de membrana con pH óptimo alcalino y otra independiente de calcio asociada a la fracción citosólica con pH óptimo ácido. La inhibición de éstas en las amibas resulta con la disminución del efecto citolítico sobre líneas celulares. Las células afectadas por la actividad citotóxica de *E. histolytica* sufren un patrón de fragmentación del ADN característico de una apoptosis [40,41].

2.3 Proteasas de cisteína

En *E. histolytica* se han descrito diversas proteasas con pesos moleculares que oscilan en un rango de 16 y 96 kDa. Actualmente la investigación genómica ha identificado 50 genes que codifican proteasas de cisteína. La mayor parte de estas pertenecen a la superfamilia de la papaína C₁. Estas enzimas están expresadas como zimógenos con un predominio hidrofóbico de 12-20 residuos, y un prodominio de 55-148 residuos y un dominio catalítico de 190-488 y seis residuos de cisteína, que forman los puentes disulfuro para estabilizar la estructura terciaria [42]. Estas proteasas son capaces de degradar proteínas de matriz extracelular como colágena, laminina además, activan complemento fragmentado C₃ y pudieran ser causa de la rápida afluencia de los leucocitos polimorfonucleares a la vecindad de las amibas en las lesiones

agudas experimentales. Participan más directamente en la supervivencia de la amiba en los tejidos que en la producción del daño. Enzimas con capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos y con cisteína en el sitio activo [43].

2.4 Amiboporo

Los amiboporos son una familia de péptidos formadores de poros con un peso molecular de 8.3 kDa, capaces de formar canales de iones en membranas lipídicas de diversos tipos celulares. Tienen la peculiaridad de insertarse y despolarizar la membrana de la célula blanco [44, 45].

La capacidad de *E. histolytica* de lisar células en contacto deriva de los amiboporos, los cuales existen como tres isoformas A, B y C con una proporción de 35:10:1 respectivamente y con una longitud de 77 residuos de aminoácidos, ocho residuos de lisina más uno de histidina [46].

El amiboporo puede encontrarse en forma soluble, sin embargo también tiende a agregarse constituyendo estructuras insertables de membrana, de forma análoga a las proteínas que constituyen el complejo de ataque de membrana del sistema de complemento de organismos superiores. El oligómero tipo poro que resulta de la agregación de varias moléculas de amiboporo forma un canal a través de la membrana plasmática, permitiendo el paso libre de agua, iones, y otras pequeñas moléculas y lisando así a la célula blanco [47].

Por similitud secuencial, los amiboporos han sido agrupados en la familia parecida a las saponinas (SAPLIP). Aunque los miembros de la familia de SAPLIP tienen diferentes funciones biológicas, todos ellos pueden interactuar con lípidos. Con una excepción, todos ellos poseen seis residuos de cisteína conservados que están involucrados en la formación del patrón de puente disulfuro característico de esta familia de proteínas. A pesar de esta enorme distancia evolutiva, los amiboporos revelan una similitud secuencial con las moléculas efectoras de membrana permeabilizante de linfocitos de mamíferos tal como el asesino natural-Lisina NK de porcino y granulicina en humanos.

Como sus complementos amebicos, las proteínas de mamíferos viven en granulos intracelulares y pueden lisar bacterias y células eucariontes. Los mecanismos que son propuestos para explicar cómo las proteínas parecidas a saponinas forman poros en la membrana, indican que la distribución de carga en la superficie de estas es la base de su capacidad de anclaje y formación de poro en la membrana [48].

La resolución máxima estructural tridimensional de un amiboporo natural monomérico purificado que se encuentra en la amiba patógena se ha obtenido por espectroscopia homonuclear NMR. La estructura revela que la distribución de carga sobre la superficie del amiboporo A difiere marcadamente a partir de otros miembros de la familia de proteínas similares a saponina, a

saber el asesino natural-lisina de porcino NK y granulisina humano con sus epitopos cargados positivamente y que se sugiere ser responsables de la interacción en la membrana; el amiboporo A muestra un área extendida de superficie hidrofóbica. Aún más se reporta que la dimerización de este péptido es un prerrequisito para el anclaje en la membrana y formación del poro. Este mecanismo de dimerización es un paso de activación pH dependiente de la lisis celular por el amiboporo A, el cual es mediado por un residuo de histidina clave localizado en la interface del dímero [27].

La actividad permeabilizante (formación de poro) de los amiboporos es fuertemente dependiente del pH y depende de la protonación de un único, libre y accesible residuo de histidina. A pH bajo (entre pH 4 y pH 6) el residuo de histidina protonado provoca la dimerización de proteína como un resultado de interacción electrostática con un lado de la cadena de aminoácido cargado negativamente más probablemente que de un residuo de aspartato (D63) del segundo monómero. Protonación del único residuo de histidina y el proceso de dimerización parece ser indispensables para la actividad. Remarcadamente uno de los lados de la superficie de esta proteína soluble en agua es exclusivamente hidrofóbica. Bajo el modelo propuesto de dimerización antiparalela cabeza-cabeza, esta región hidrofóbica es extendida sin ninguna interrupción y aún más puede ser prolongada por más dímeros llevando a una estructura como anillo (estructura hexamérica) con una superficie exterior hidrofóbica y un interior predominantemente hidrofílico [48].

El péptido activo ha sido localizado en granulos citoplásmicos en el interior de la amiba el cual no se secreta en el medio extracelular, dicha localización parece apoyar la propuesta de Andra y col, de que la principal función de los amiboporos es la de perforar bacterias ingeridas por la amiba y que servirán como fuente de nutrientes para la misma [49,50].

III. Planteamiento del problema

La amibiasis ha sido y continuará existiendo como un problema de salud a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo y aún en países desarrollados, debido a la migración de poblaciones procedentes de zonas altamente endémicas o viajeros que regresan de estas zonas. Esta enfermedad es el resultado de factores interrelacionados que vislumbran aspectos sociales, económicos, culturales y políticos. Afecta a millones de individuos sanos y en caso de no instituirse un tratamiento oportuno, da lugar a complicaciones fatales como la amibiasis hepática, cerebral, pulmonar etc. Por lo anterior se requiere estudiar e investigar aún más las moléculas amibianas que se involucran con la patogenia de *Entamoeba histolytica*.

3.1 Objetivo general

Purificación del amiboporo de *E. histolytica* por técnicas de cromatografía (filtración molecular e intercambio iónico) y electroelución.

3.1.1 Objetivos específicos

Determinación de la actividad del amiboporo en cada fase de purificación por despolarización de membrana de liposomas, mediante un espectrofluorómetro.

Cuantificación de proteína por el método de Lowry de las fracciones correspondientes de cada fase de purificación.

Determinación del grado de pureza del amiboporo por electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) en condiciones desnaturizantes (SDS) y no desnaturizantes (16%).

Secuenciación del amino-terminal del péptido amiboporo.

3.2 Hipótesis

Si se purifica y caracteriza el péptido porina y se mantiene la actividad en el modelo de permeabilidad de liposomas, entonces tendremos la posibilidad de utilizarlo en modelos celulares, y conocer el comportamiento de dicha molécula en células blanco.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Cultivo masivo de amibas

Cultivo de trofozoítos

Trofozoítos de *E histolytica* cepa HM-1IMSS (7×10^8) se cultivaron en medio de cultivo TYIS-33 a 37°C por 72 horas (fase logarítmica de crecimiento del parásito), las amibas fueron tratadas durante unos minutos a 4°C para su cosecha [15]. El medio con los trofozoítos se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos; los trofozoitos se lavaron con amortiguador de fosfato de sodio 15 mM, pH 7.2, NaCl 0.15 M (PBS) para eliminar el medio de cultivo. Finalmente, las amibas cosechadas se fraccionaron para obtener un botón de 4×10^9 /tubo, los cuales fueron almacenados a -70°C en un ultracongelador.

4.2 Sobrenadante amibiano

El sobrenadante amibiano se preparó resuspendiendo el botón amibiano, con 4×10^9 de trofozoitos en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de una solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM pH 7.8, y adjuntando los inhibidores: E-64 10 μM , benzamidina 6.4 mM y fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) 0.5 mM. Posteriormente se dividió el contenido en tubos de 50 mL con un mismo volumen y se congelaron y descongelaron las muestras por cuatro veces consecutivas provocando lisis celular (criofractura). La suspensión se centrifugó a 18,000 r.p.m. por una hora a 4°C . Finalmente, se obtuvo el sobrenadante en un matraz Erlenmeyer, se alicoteó en tubos de 15 mL con 8 mL cada uno y se almacenó a -70°C .

4.3 Cromatografía en columna de filtración.

Se inyectaron fracciones de 8 mL de sobrenadante amibiano (15.5 mg proteína/ml) a la columna de filtración, (Superdex 200) habiendo equilibrado previamente la columna de filtración y el cromatógrafo con solución amortiguadora Tris 0.02 M, pH 7.8 y E-64 10 μM . La filtración en gel se corrió en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con un flujo de 1 mL/min a 4°C . Se colectó un total de 80 fracciones de 5 mL, en un colector automático Micro Fractionator (Gibson) y se determinó la absorbancia de cada fracción por espectrofotometría a 280 nm. En esta fase de purificación se obtuvo 10 corridas de sobrenadante amibiano de las cuales se gráfica, el número de fracciones en función de la absorbancia. Posterior a esto se realizó la actividad despolarizante en liposomas de cada uno de los 80 tubos de cada corrida así como del extracto amibiano y de un control negativo (solución amortiguadora). Se seleccionaron las fracciones

que presentaron mayor actividad (fracciones 46-54) de cada corrida, en tubos de 50 ml y se almacenaron a 4°C. Finalmente se determinó la concentración por el método de Lowry [51] y pureza de la proteína por análisis electroforético (SDS-PAGE) de alícuotas de 1 mL.

Una vez que se verificó la actividad de porina de las fracciones (46-54) de cada corrida se concentró cada muestra de 50 mL a un volumen final de 5mL por ultrafiltración con un filtro de Amicon (AmiconCorporation) con membrana de limite de exclusión de 3000 (M-3 de Millipore) y se centrifugo a 18,000 r.p.m. por 20 minutos. Se colectó el sobrenadante con actividad de porina y se realizaron alícuotas de 10 mL y centrifugaron a 10,000 r.p.m. por 3 minutos y se dializó en una membrana semipermeable de 2, 000 de retención y colocándola en una solución amortiguadora Tris 0.02 M, pH 7.8, sin E-64. Se realizaron 2 cambios de la solución amortiguadora cada 3 horas manteniéndose a una temperatura de 4°C.

4.3.1 Prueba de actividad

Para determinar la actividad de porina del sobrenadante amibiano y de las diferentes fases de purificación se elaboró una suspensión de liposomas. En un tubo se pusieron 40 mg de fosfatidilcolina + 0.5 mL de "buffer K" y se agitó por 10 minutos en el vortex. La mezcla se colocó en el sonicador por cinco minutos en atmósfera de nitrógeno y se congeló en nitrógeno líquido por 16 segundos(s) para colocarla nuevamente en el sonicador por 30 s. Se alicoteó 100 µl de la muestra y congeló a -20° C.

Se utilizaron dos microtubos de plástico los cuales se llenaron de nitrógeno y se agregó 20 mg de liposomas en los tubos y se vertió a ambos con buffer de incubación y se dejaron por 5 min en el agitador. Más tarde se colocaron en el sonicador 3 veces por 30 s y se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron para colocarlos nuevamente en el sonicador. Posteriormente se vertió la suspensión de liposomas en un buffer de incubación de Na₂ SO₄ y K₂ SO₄ utilizando 2 mL de la mezcla en relación (1995 µl Na + 5µl K) más 10 µl de liposomas, la cual se colocó en una celda de un espectrofluorómetro. Se usaron dos jeringas Hamilton, una con 1µl de cianina (colorante) y la segunda con 1µl de valinomicina la cual se diluyó en dimetilsulfóxido (DMSO) a una dilución 1:10 de una solución preparada previamente. Se añadió la cianina, como marcador de la reacción y posteriormente se agrego la solución de valinomicina a una concentración de 1 nM, utilizada como control positivo en dicho ensayo. En una celda de plástico con magneto se vertió la mezcla de la solución de incubación y de liposomas, observando en la pantalla del espectrofluorómetro todo el proceso; a los 34 s se inyectó el colorante (cianina), y a los 150 s la valinomicina y posteriormente a los 250 s, se agregaron 20 µl de la muestra amibiana. La actividad se evaluó a una longitud de onda de 620

nm de excitación y a 670 nm de emisión usando 20 μ l de las muestras de cada fase de purificación.

4.3.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

La cuantificación de proteína se realizó a las muestras obtenidas en las diferentes fases de purificación. Se realizó la curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) como referencia para obtener la concentración de proteína presente en las muestras en un rango de 20 a 100 μ g de la curva patrón. Las muestras problema se hicieron por duplicado y se colocaron 100 μ l de una dilución 1:100 correspondiente a las muestras antes mencionadas.

4.3.3 Electroforesis (gel de poliacrilamida)

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y no desnaturizantes. Los geles desnaturizantes con un gel separador (inferior) al 12 % y 16 % y un gel concentrador (superior) al 4 %, utilizando concentraciones de 20 y 40 μ g de proteína de cada fase de purificación, usando estándares de bajos pesos moleculares como punto de referencia. La electroforesis se corrió a 100 volts, durante 2 horas en una cámara, Miniprotean II de Bio-Rad y los geles se tiñeron con azul de Coomassie y con tinción de plata.

4.4 Cromatografía por intercambio iónico

Se inyectaron 10 mL con una cantidad (18.7 mg) de proteína de la muestra dializada a una columna de intercambio iónico marca mono Q[®] HR5/5 equilibrada con solución amortiguadora Tris 0.02 M, pH 7.8 y 10 μ M de E-64. Se colectaron fracciones de 2.5 mL, las cuales se obtuvieron en un colector automático marca Micro Fractionator (Gibson) con capacidad para 80 tubos. Se llevaron a cabo 2 procesos de elusión donde se utilizaron el buffer "A" (Tris 0.02 M, pH 7.8 + E-64 10 μ M) y de buffer "B" (Tris 0.02 M, pH 7.8 + E-64 10 μ M + NaCl 1 M) para obtener una concentración de NaCl 0.1 M, y la solución "Buffer B" con una concentración 1 M de NaCl para el desprendimiento de componentes proteicos. Se realizaron cinco corridas y se determinó la concentración por Lowry y absorbancia de cada una de las fracciones de las corridas obteniendo un cromatograma (Fig.19). A su vez se monitoreó la actividad de membrana en liposomas de cada fracción. Posteriormente se colectaron las fracciones de cada pico en tubos de 50 mL y se concentró la proteína de la muestra que corresponde al pico 2 (fracciones 28-35) por ser el único que presentó actividad de porina, obteniendo nuevamente la concentración de proteína y calculando el total de proteína (mg/ml) por el método de Lowry. Se

centrifugó 1 mL de la muestra y se dializó colocándola en una membrana de 2000 de retención con una solución amortiguadora Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M.

4.5 Electroelución en gel

Equipo de Prep-Cell

La muestra obtenida de la cromatografía de intercambio iónico con actividad de porina fue inyectada en el sistema de electroelución Prep-Cell de Bio-Rad, modelo 491. El gel nativo se montó en el tubo de 37 mm de diametro. La muestra se concentró a 1 mL (10 mg) más 0.8 mL de buffer amortiguador de muestra no desnaturizante (5.4 mL H₂O, 1 mL Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.8 mL glicerol y 0.4 mL azul de bromofenol al 0.5%), toda la corrida fue a 4°C y fue sometida en diferentes condiciones, (Tabla 2).

Tabla 2. La muestra se sometió con las siguientes condiciones de corrida:

Volumen de la muestra total	1 mL
Proteína inyectada	10 mg
Tubo del gel	37 mm
Gel separador	7.5 %
Gel concentrador	4 %
Corriente inicial por 1 hr	10 Watts y posteriormente 12 watts constante
Volumen de fracciones colectadas	6 mL
Flujo de elusión	0.75 mL/min
Tiempo de corrida	20 h

Se realizó una corrida y de las fracciones obtenidas por electroelución (1-80), se elaboraron geles nativos y desnaturizantes. Se analizaron en gel de electroforesis PAGE; al 12 % y se tiñeron con nitrato de plata identificando las fracciones con peso molecular cerca de los 8 kDa

que presentaron actividad de porina (38-41) y se obtuvo una muestra de las fracciones con la molécula pura y con actividad para la realización de un gel SDS-PAGE.

4.6 Secuenciación de la proteína

La proteína pura en electroforesis y con actividad de porina se dializó con buffer 0.01 M de MES y después con agua desionizada y se liofilizó la proteína concentrada que fue de 100 µg. Esta muestra fue enviada a la Universidad de Yale, USA para la secuenciación amino terminal.

V. RESULTADOS

5.1 Ensayo de despolarización de membrana de sobrenadante amibiano

A partir de fracciones de 8 mL de sobrenadante amibiano se determinó la actividad del péptido por despolarización de membrana en liposomas.

En la figura 1 se muestra la prueba de ensayo para verificar el funcionamiento del sistema usando una solución amortiguadora (control negativo) la cual no provocó un cambio drástico de despolarización en los liposomas (Fig. 5).

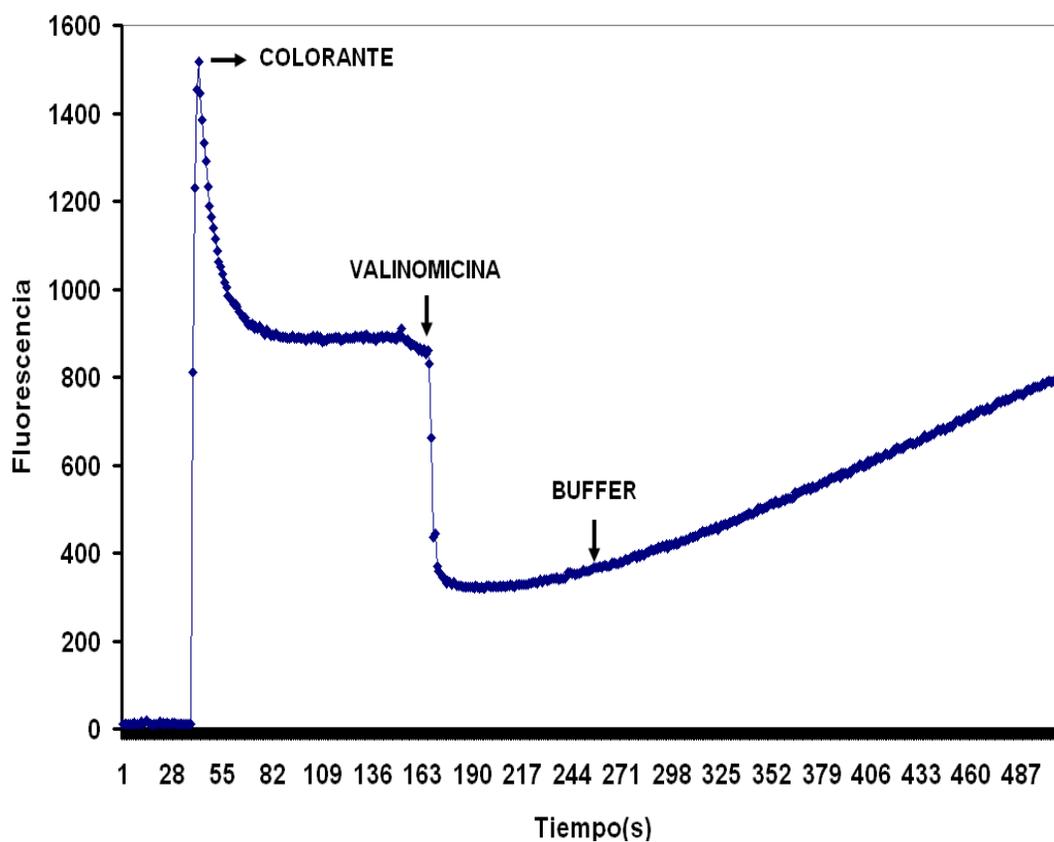


Figura 5. Actividad despolarizante en liposomas con 20 μ l de muestra control (buffer de Tris 0.02 M pH 7.8 + 10 μ M E-64).

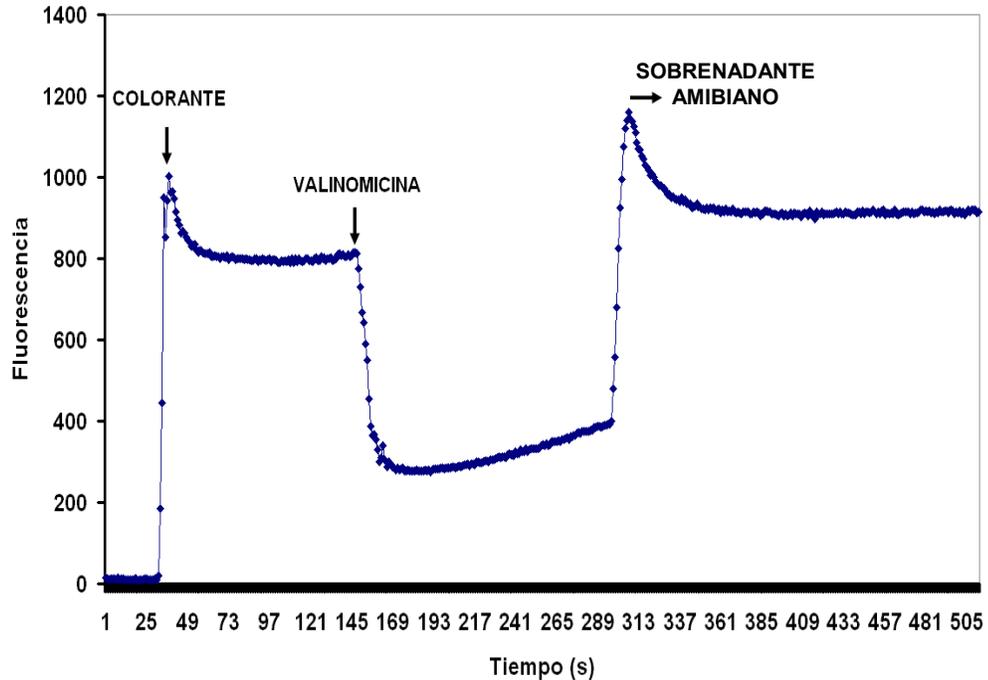


Figura 6. Actividad despolarizante en liposomas de 20 μ l de sobrenadante amibiano. Se observa un cambio de fluorescencia al agregarse al medio de liposomas una muestra de 20 μ l de sobrenadante amibiano (310 μ g) presentándose una diferencia con respecto a la muestra control y demostrando actividad despolarizante en la membrana, por lo tanto se procedió con el método de purificación de cromatografía de filtración molecular.

5.2 Electroforesis de poliacrilamida al 12 % del extracto amibiano

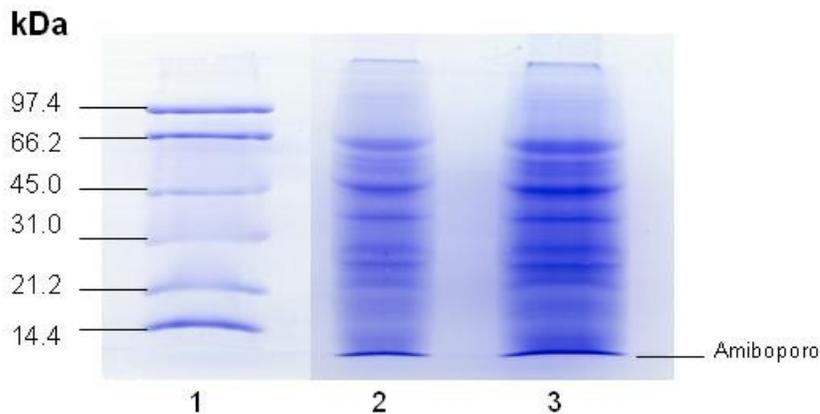


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE al 12 % de sobrenadante amibiano. Carril 1: estándar de bajo peso molecular, carril 2: extracto crudo 20 μ l (310 μ g) y carril 3: extracto crudo 40 μ l (620 μ g) respectivamente a una corriente constante de 100 volts, revelando con tinción de Coomassie.

El gel de electroforesis de sobrenadante amibiano presenta bandas de proteína con un amplio rango de pesos moleculares con respecto a los pesos moleculares estándar de referencia.

5.3 Perfil cromatográfico de la columna de filtración.

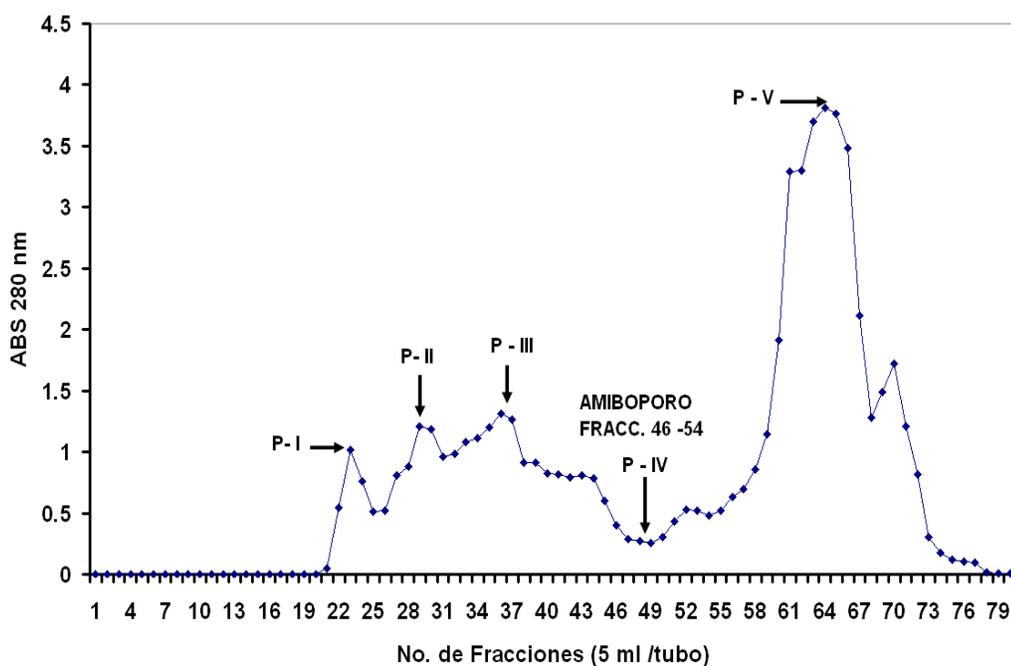


Figura 8. Cromatograma de sobrenadante amibiano en Superdex 200

En el cromatograma se observa la formación de diferentes picos y valles que corresponden a proteínas de mayor a menor peso molecular infiriendo que las fracciones que se encuentran en el valle formado entre los picos 3 y 5 es donde se encuentra la molécula de interés. Se monitorearon las fracciones con actividad de despolarización de membrana en liposomas, que corresponden a la zona 46-54 y posteriormente se concentraron. Se determinó la pureza de la muestra concentrada por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

5.4 Electroforesis de poliacrilamida al 12 % de la fracción de filtración con actividad de porina.

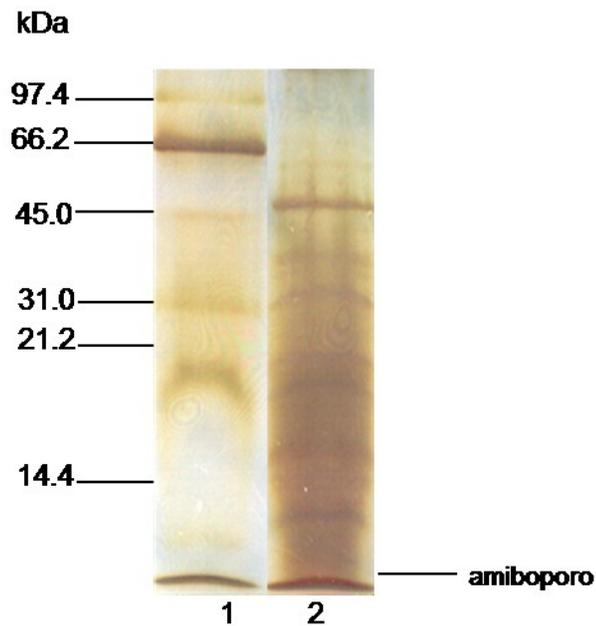


Figura 9. Electroforesis SDS PAGE al 12 %. Carril 1: estándar de bajo peso molecular y carril 2: fracciones 46-54 de la cromatografía en columna de filtración, en tinción de plata.

En el análisis electroforético de la muestra concentrada de la cromatografía de filtración molecular se observó menor número de bandas de proteínas con respecto al sobrenadante amibiano.

5.5 Ensayo de actividad en liposomas a través del espectrofluorómetro de las diferentes fracciones (46-54) de la columna de filtración.

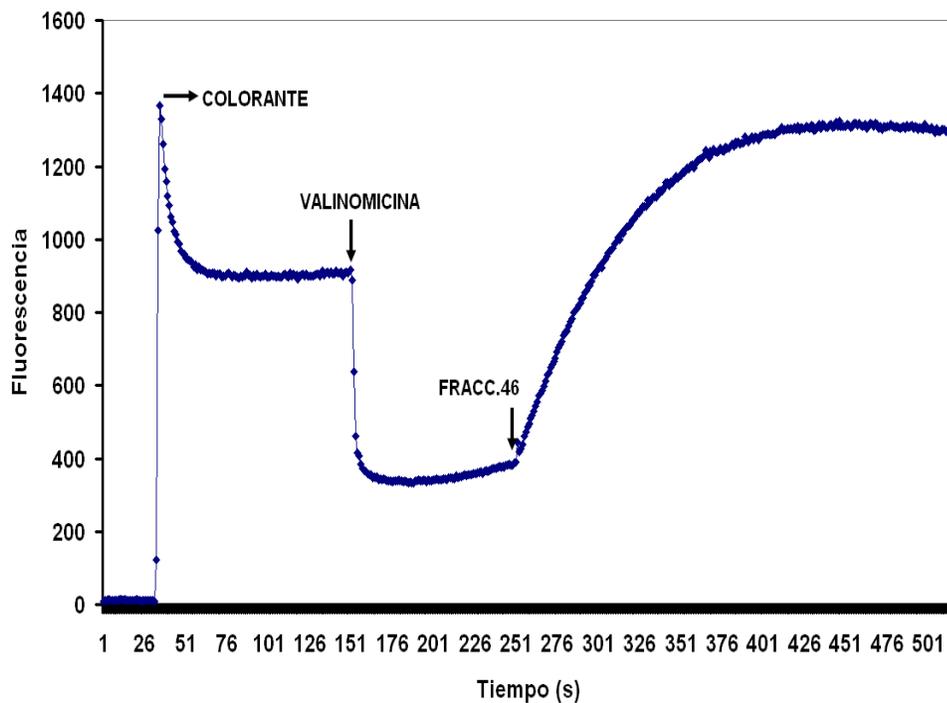


Figura 10. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 46 de filtración. Utilizando 20 μ l de muestra.

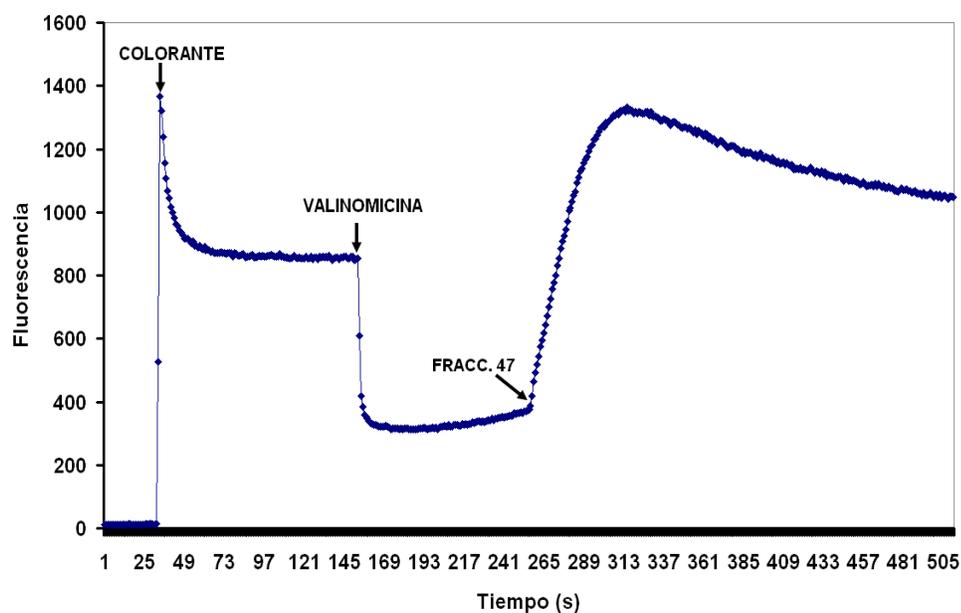


Figura 11. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 47 de filtración para cada uno de los ensayos utilizado para cada fracción el volumen de 20 μ l.

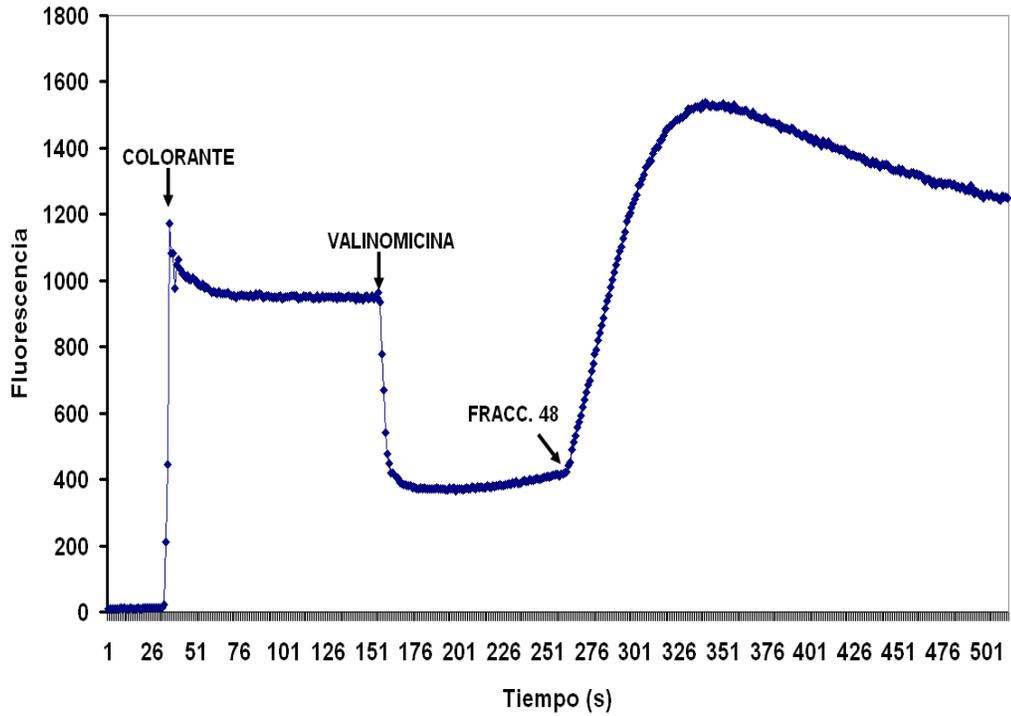


Figura 12. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 48. Magnitud del volumen para cada uno de los ensayos espectrofluorométricos fue 20 μ l.

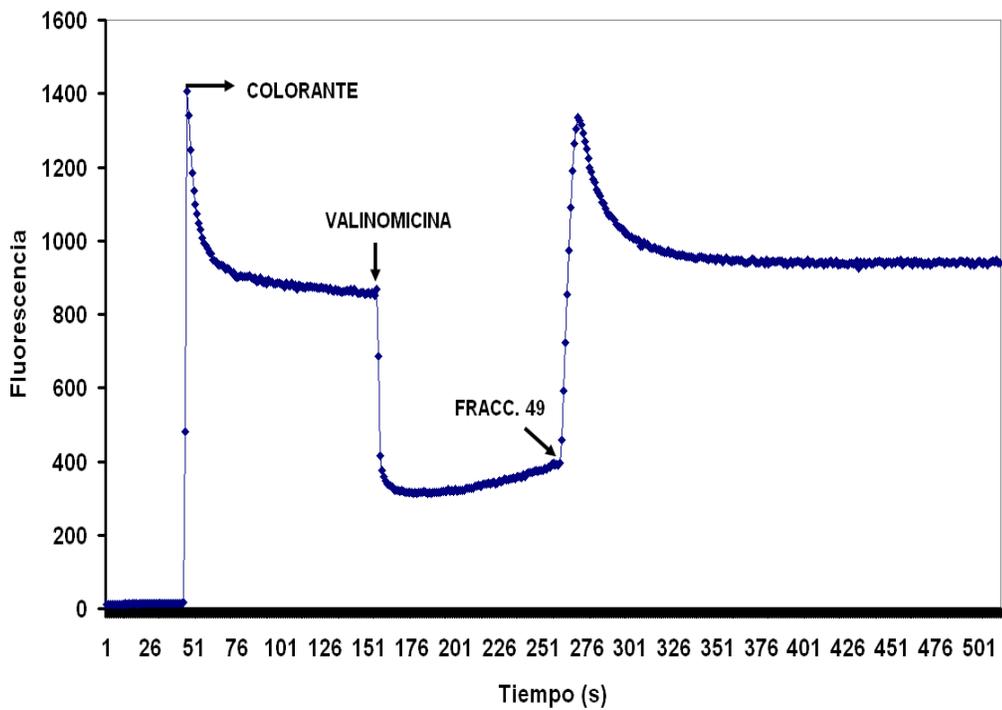


Figura 13. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 49. Volumen de la fracción utilizada 20 μ l

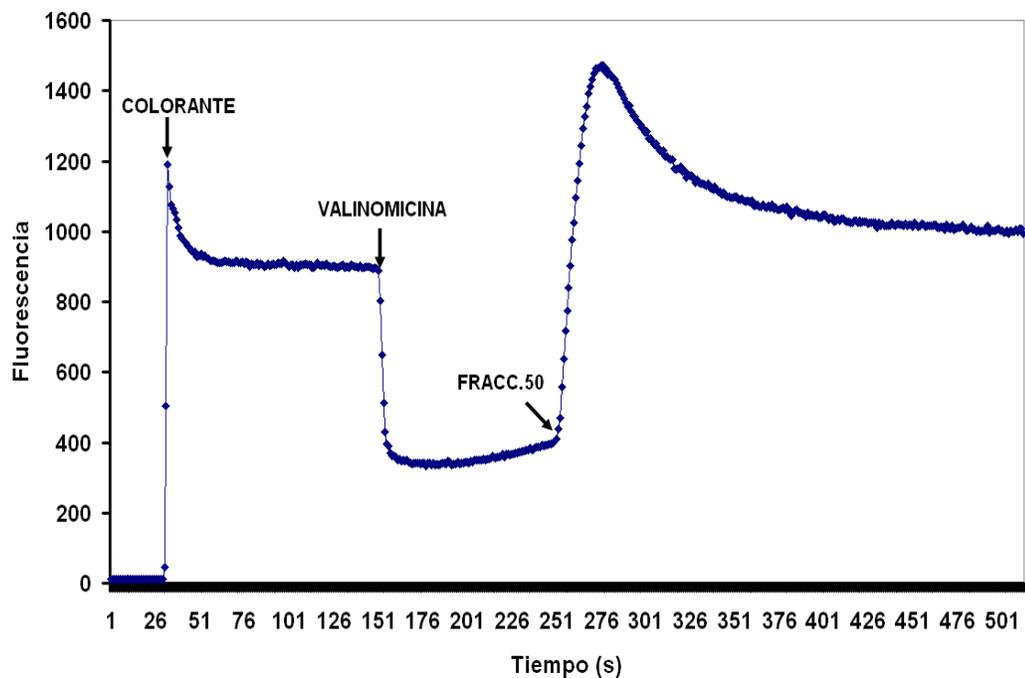


Figura 14. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 50. Utilizando un volumen de 20 μ l.

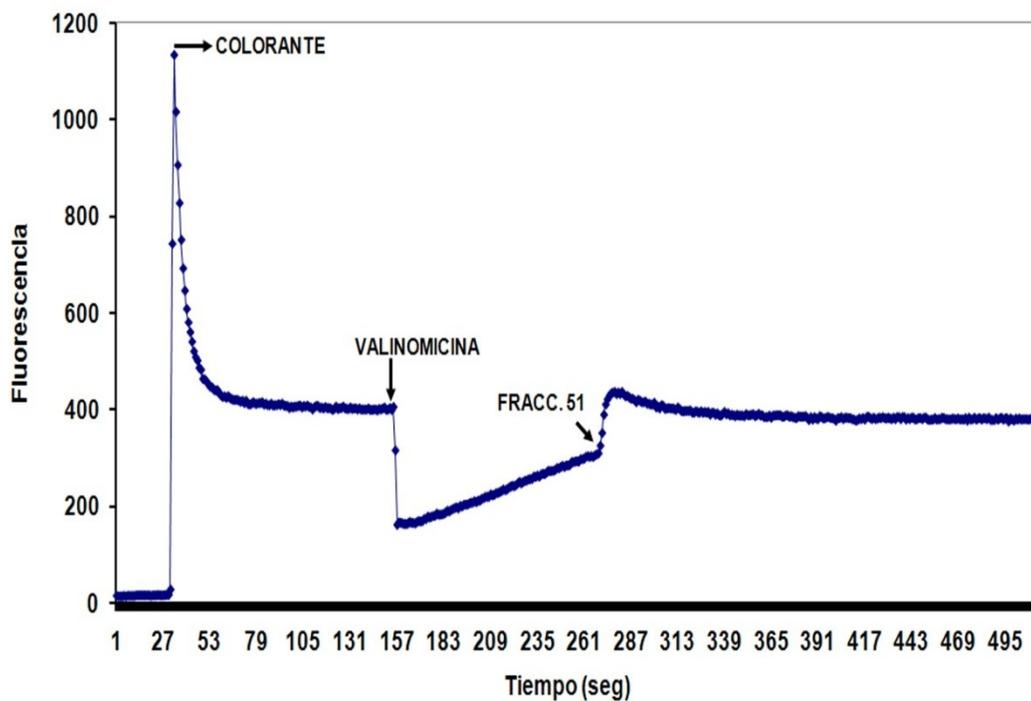


Figura 15. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 51. Utilizando un volumen de 20 μ l.

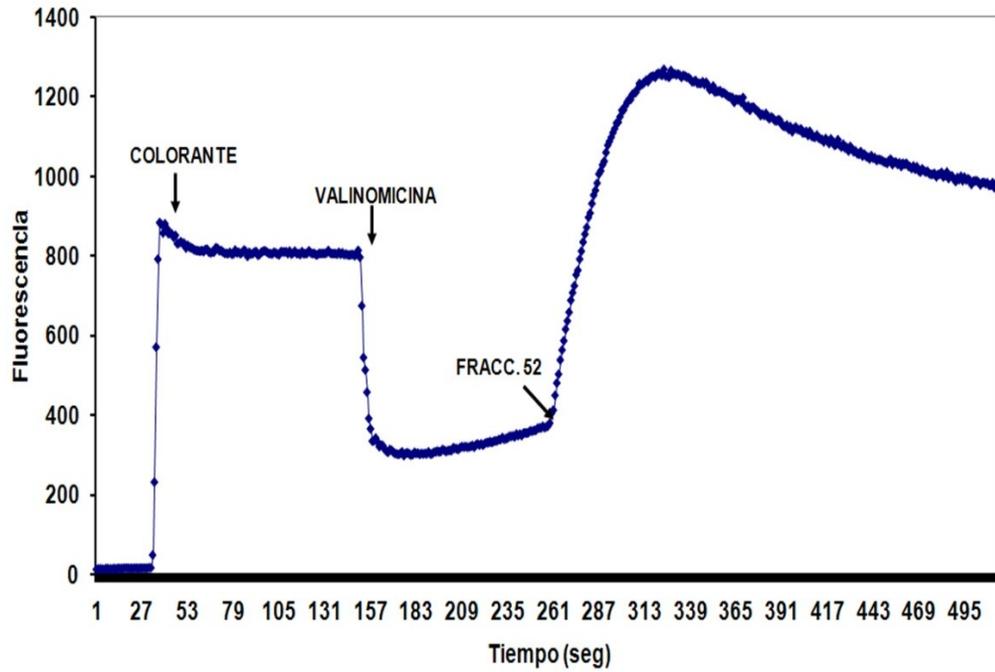


Figura 16. Actividad despolarizante en liposomas de la fracción 52. Utilizado un volumen de 20 μ l.

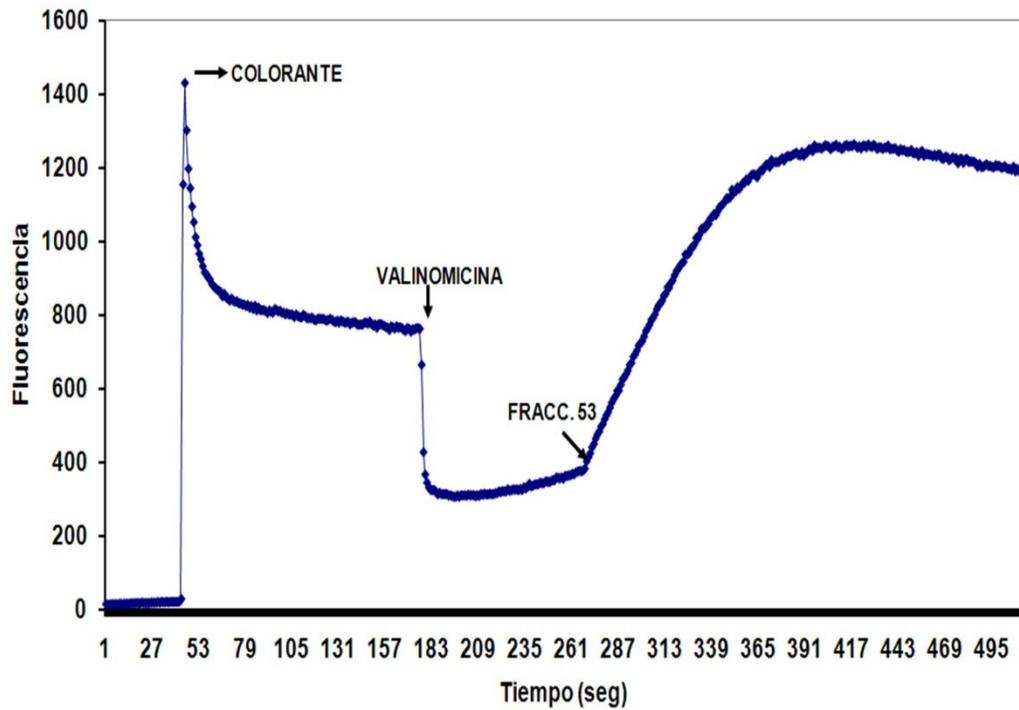


Figura 17. Actividad despolarizante en liposomas de la fraccion 53. Utilizado un volumen de 20 μ l.

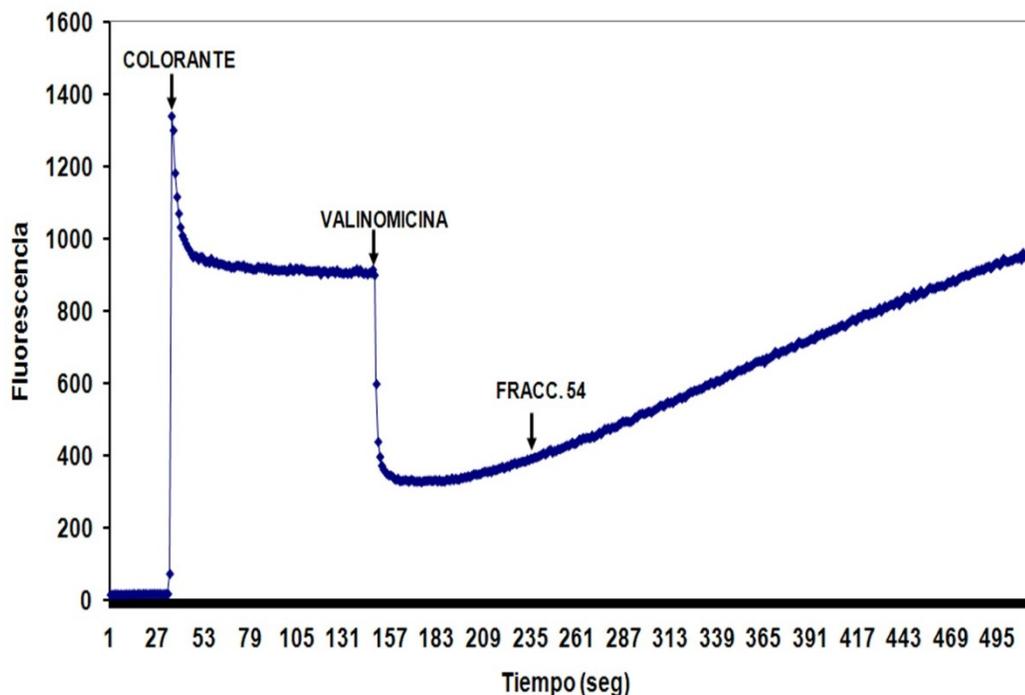


Figura 18. Actividad despolarizante en liposomas de las fracción 54. Volumen utilizado fue 20 μ l.

5.6 Perfil cromatográfico de intercambio iónico (columna M. Q.)

Una vez analizado el gel de la zona de las fracciones 46-54, se continuó con el proceso de purificación, únicamente con las fracciones con actividad y a su vez concentrada, la cual se inyectó a una columna de intercambio aniónico MQ con buffer Tris 0.02 M pH 7.8 y 10 μ M de E-64, a diferente concentración de NaCl (0.1 y 1 M). En esta columna es donde hubo retención de proteínas que presentan una carga complementaria a la matriz del gel la cual tiene una carga negativa y la molécula del amiboporo quedará retenida en la matriz ya que posee carga positiva, hasta que pase la carga iónica del solvente mediante la incorporación de NaCl al medio de elusión, neutralizando la fuerza que retiene a las proteínas en la columna por lo que esta eluída y posteriormente se determina en qué fracción se encuentra la actividad de porina, en el ensayo despolarizante de liposomas.

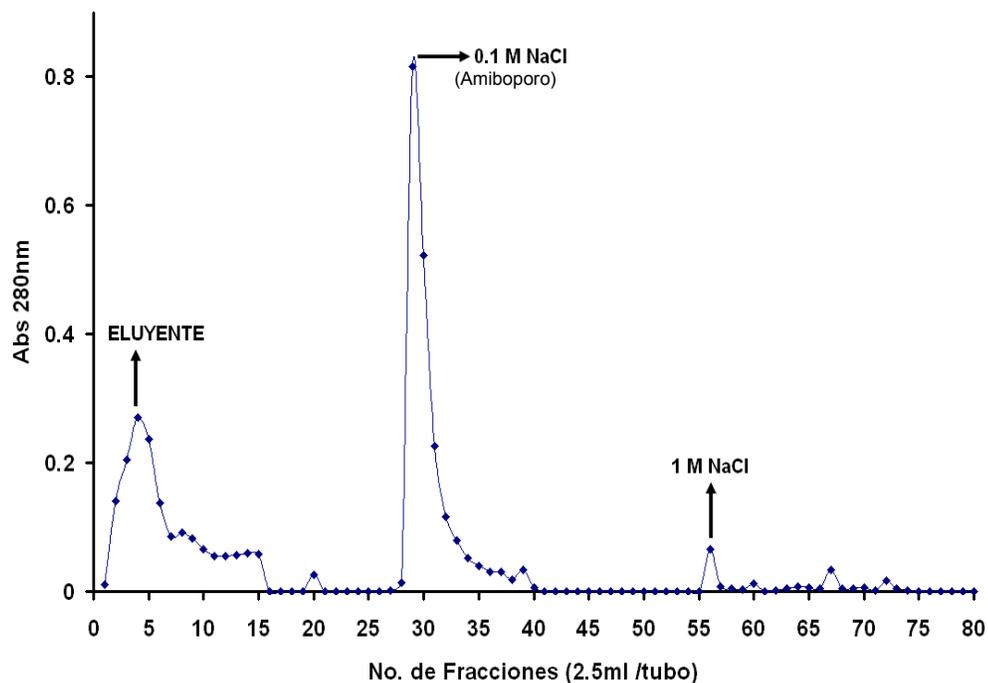


Figura 19. Cromatograma de la muestra con actividad de porina y concentrada que proviene de la columna de filtración y utilizada en la columna de intercambio iónico, Buffer-Tris 0.02 M, pH 7.8 + 10 μ M de E-64 y Buffer-Tris 0.02 M, pH 7.8 + 1 M de NaCl.

La figura 19 muestra un cromatograma de 3 picos, donde el pico I corresponde al eluyente, el pico II a 0.1 M de NaCl y el pico III a 1 M de NaCl, conteniendo el pico II la actividad despolarizante de liposomas y la mayor concentración de proteínas. Una vez verificada la actividad de porina se concentró y analizó la muestra en geles de poliácridamida.

5.7 Electroforesis de poliacrilamida al 12 % de las diferentes fracciones de la columna de intercambio iónico

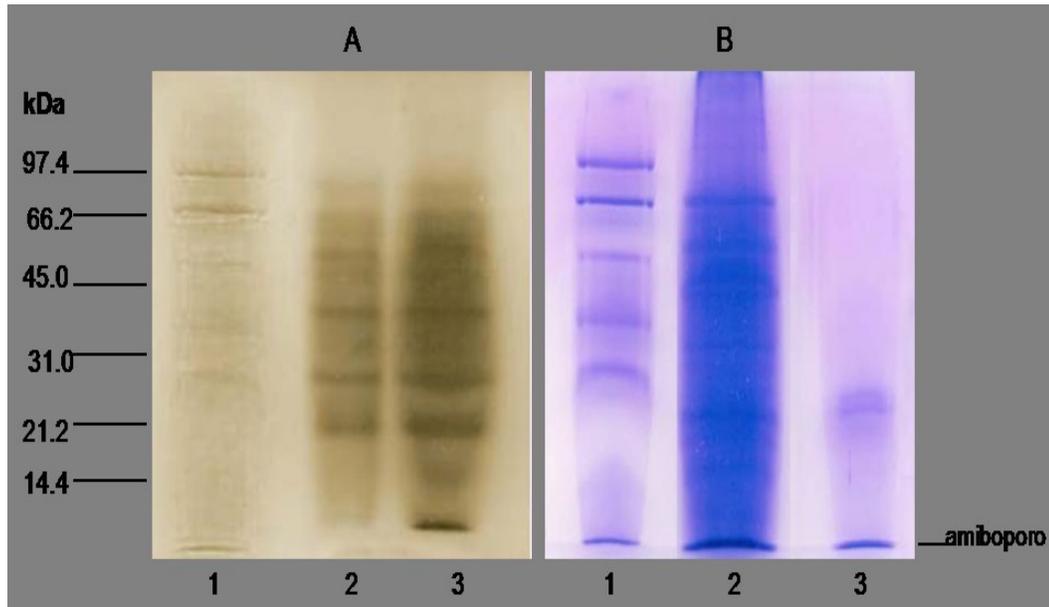


Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Carril 1: estándar de bajo peso molecular, carril 2: extracto crudo- 40 µl (620 µg), carril 3: fracciones 28-38 de la cromatografía en columna de intercambio iónico, (A) en tinción de plata 50 µl (775 µg) y (B) azul de Coomassie.

5.8 Actividad despolarizante en liposomas de la fracción de 0.1 M de NaCl en la columna de M. Q.

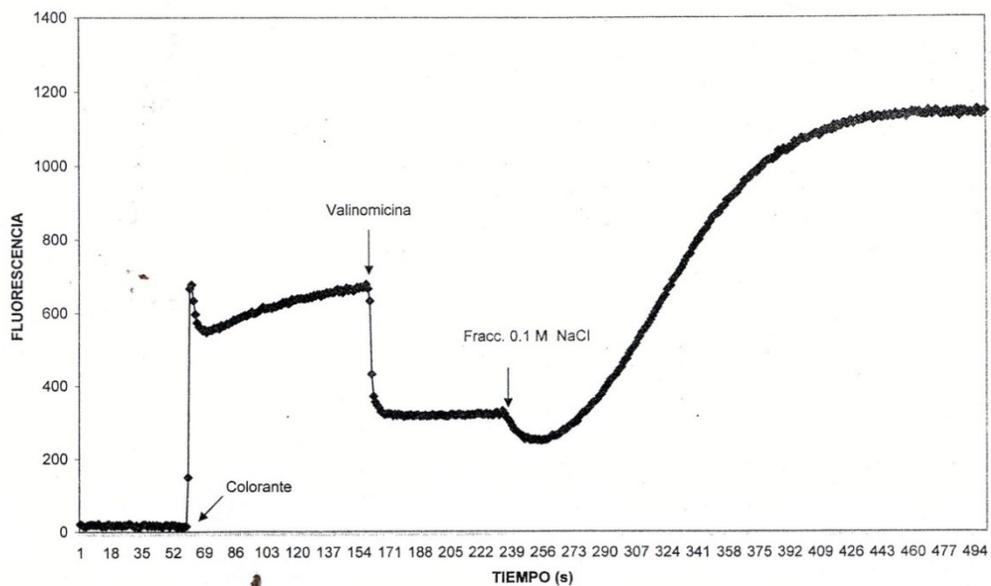


Figura 21. Actividad de porina en liposomas con una concentración de NaCl 0.1 M volumen de muestra aplicada en los liposomas fue 20 µl.

La muestra que se obtuvo de la columna de intercambio iónico (0.1 M de NaCl y concentrada) con actividad despolarizante en liposomas en el gel de electroforesis presenta varias bandas correspondientes a diferentes proteínas por lo tanto se procedió a purificarlas por el sistema de electroelución en gel (fig.20).

5.9 Análisis electroforético de las diferentes fracciones de purificación.

En el gel de la fig. 22 de las diferentes fases de purificación cromatográfica se observan claramente la disminución de bandas de proteína hasta obtener una banda de bajo peso molecular (-14 kDa) que corresponde al amiboporo. Se observan las fases de purificación del amiboporo, el carril 1 representa el estándar de bajos pesos moleculares, entre 97 y 14 kDa, en el carril 2 se observan varias bandas de proteína del sobrenadante amibiano, en el carril 3 se observa con claridad una disminución en el número de bandas proteicas que corresponden a la fase de purificación de filtración y se observa una banda que está por debajo de los 14 kDa y finalmente en el carril 4 que corresponde a la fase de purificación de intercambio iónico se observan dos bandas proteicas donde probablemente la banda superior sea un contaminante y la banda inferior que esta por debajo de los 14 kDa la cual corresponde a la molécula del amiboporo.

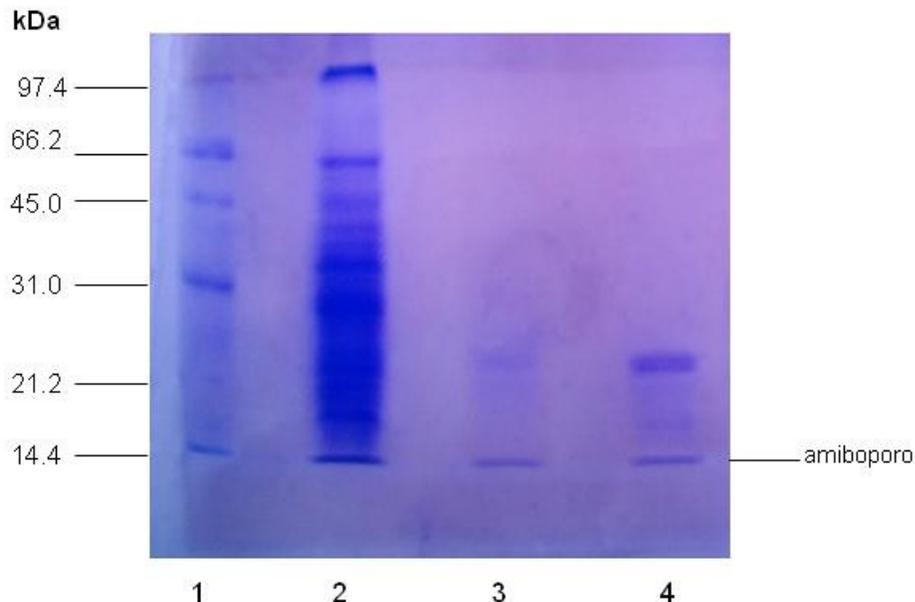


Figura 22. Electroforesis SDS PAGE al 16 % de las diferentes fases de purificación cromatográfica. Carril 1: estándar de bajo peso molecular, carril 2: sobrenadante amibiano, carril: 3 fracción de la columna de filtración molecular y carril 4: fracción obtenida de la columna de intercambio iónico (0.1 M de NaCl), en tinción de Coomassie.

5.10 Electroforesis nativo de las fracciones de electroelución y con actividad de porina.

Fase final de la purificación, la cual se llevó a cabo en el sistema de electroelución durante 20 horas aproximadamente en donde se recolectó en el colector de fracciones y desde luego el péptido purificado.

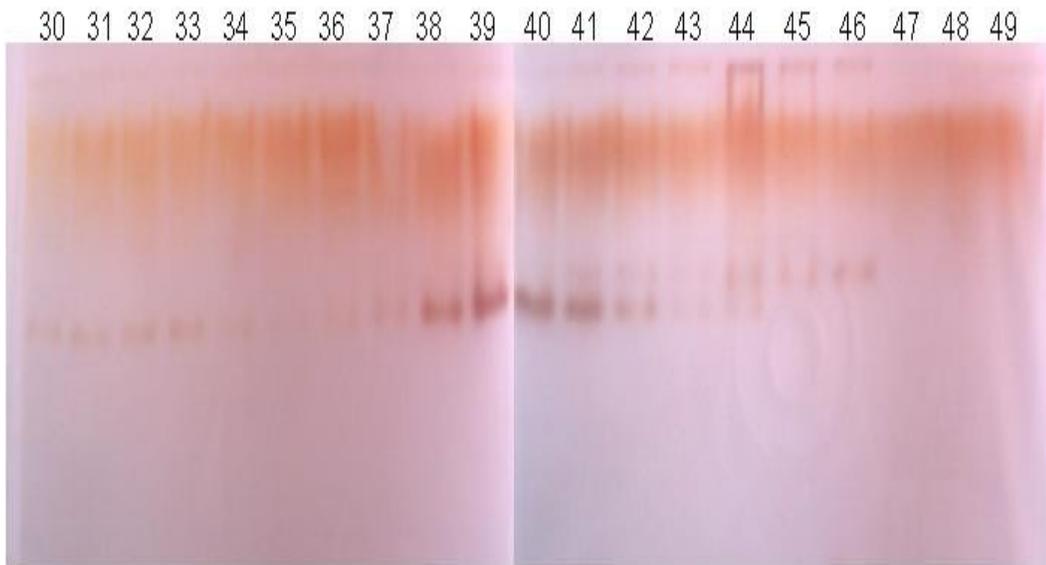


Figura 23. Electroforesis no desnaturizante PAGE al 12 % de las fracciones 30-39 y 40-49.

El análisis en geles de poliacrilamida de las fracciones del electroeluctor que presentaron una banda proteica y que a su vez se monitorearon con la actividad despolarizante en liposomas y que presentaron actividad de porina (38-41) se juntaron y nuevamente se valoró la actividad espectrofluorométrica; resultado que se señala en la figura 23.

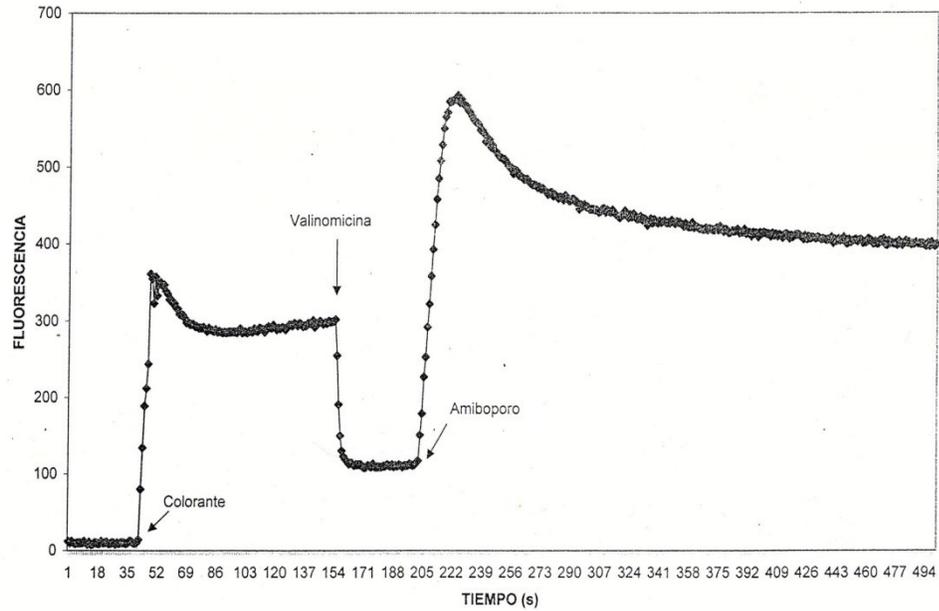


Figura 24. Actividad despolarizante en liposomas de la proteína pura obtenida de las fracciones 38-41 del electroelutor volumen utilizado de 20 μ l (5 μ g).

5.11 Tabla 3. Rendimiento del sobrenadante amibiano en las diferentes fases de purificación.

CUANTIFICACIÓN Y RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA (LOWRY)						
Secuencia de purificación	[] de proteína	Vol. de "corrida"	[] total	No. de "corridas"	Recuperación	Proteína total
Extracto amibiano	15.5 mg/mL				100 %	1240 mg
Columna de filtración	15.5 mg/mL	8 mL	124 mg	124 mg/10X	7.540 %	93.5 mg
Columna de intercambio iónico	1.87 mg/mL	10 mL	18.7 mg	18.7 mg/5X	1.613 %	11 mg
Sistema de electroelución	10 mg/mL	12 mL	10 mg	10 mg/1X	0.064 %	0.8 mg

En la tabla 3 se muestra el porcentaje de rendimiento de la molécula del amiboporo de *E. histolytica* durante el proceso de purificación a partir del sobrenadante amibiano. Se partió con un producto inicial de 1240 mg que corresponde al 100 % de extracto amibiano y de esta cantidad total de proteína se obtuvieron 93.5 mg, que corresponde al 7.540 % de la primera fase de purificación por columna de filtración molecular. El rendimiento y la cantidad de proteína disminuyeron a un 1.613 % que corresponden a 11 mg de proteína total al pasar por la segunda fase de purificación por la columna de intercambio iónico. En la fase final de la purificación de electroelución en gel se obtuvieron 0.8 mg de proteína total pura con un rendimiento final de 0.064 %.

5.12 Electroforesis del amiboporo puro

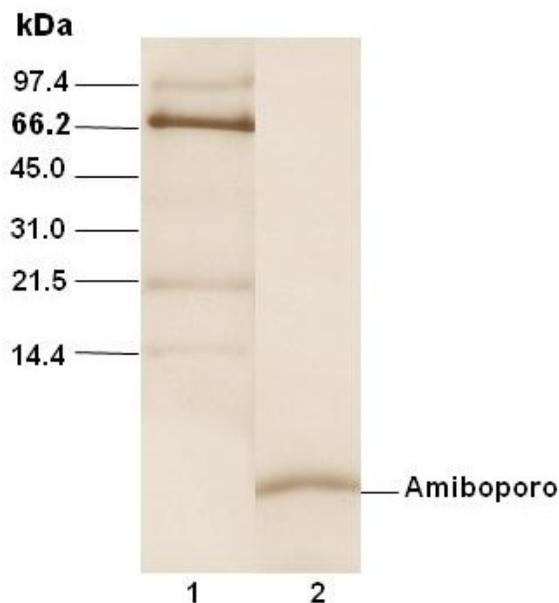


Figura 25. Electroforesis SDS PAGE al 16 % con tinción de solución de plata. Carril 1: estándar de bajo peso molecular y carril 2: amiboporo puro.

En la fig.25 se observa solo una banda protéica por debajo de los 14.4 kDa que corresponde a la molécula del amiboporo pura.

Para verificar que nuestra proteína pura correspondía al amiboporo se mandó a secuenciar a la Universidad de Yale, U.S.A.

5.13 Tabla 4. Secuenciación del péptido [52]

HHMI Biopolymer Facility / W. M. Keck Biotechnology									
Resource Laboratory at Yale University									
Submitter:						Sequence #		T0721	
Sample Name:		Ameboporo							
Sequence 2 (N+1):	G	E	I	L		N	L		T
Sequence 1 (N):	GLY-	GLU-	ILE-	LEU-	X-	ASN-	LEU-	X-	THR-
Cycle # :	GLU-1	ILE-2	LEU-3	X-4	ASN-5	LEU-6	X-7	THR-8	GLY-9
Sequence 2 (N+1):	GLY-	LEU-	ILE-	ASN-	THR-	LEU-	GLU-	ASN-	LEU-
Sequence 1 (N):	LEU-	ILE-	ASN-	THR-	LEU-	GLU-	ASN-	LEU-	
Cycle # :	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Yield (pmol):		ILE (2)		40.32	Yield (pmol):		LEU (3)		26.86
Seqstd yield:		NL (6)		2.07	Seqstd carryover:		NL (6)		N/A
Seqstd rep yield:						NL (6, 11)		93.9 %	
Comentarios:	Mezclas de secuencias N y N+1 que corresponden a la proteína formadora de poros de <i>E. histolytica</i> , residuos 22 – 39, en la base de datos NCBI – NR.								
Comments:	Mixture of the N and N+1 sequences matching pore-forming protein from ENTAMOEBA HISTOLYTICA, residues 22-39, in the NCBI NR database.								

Sequence read by Matt Berberich

Como se observa en la tabla 4, la secuencia de residuos 22-39 corresponden a la proteína formadora de poros “amiboporo” de *Entamoeba histolytica* presentando una pureza de 93.9 %. De acuerdo a su secuencia la proteína corresponde a la molécula del amiboporo tipo A.

El nombre de la muestra: amiboporo

Secuencia 2 (n+1)		Secuencia 1(N)	
G	Glycine; glicina	GLY	Glycine; glicina
E	Glutamic acid; ácido glutámico	GLU	Glutamic acid; ácido glutámico
I	Isoleucine; isoleucina	ILE	Isoleucine; isoleucina
L	Leucine; leucina	LEU	Leucine; leucina
N	Asparagine; asparagina	ASN	Asparagine; asparagina
T	Threonine; treonina	THR	Threonine; treonina
		X	Sin nomenclatura

VI. Discusión

La amiba es un endoparásito que daña principalmente el hígado y el intestino aunque también puede dañar otros tejidos. Representando actualmente un alto índice de mortalidad y morbilidad.

Para entender los mecanismos de muerte celular que induce dicho parásito, es necesario purificar moléculas como el amiboporo el cual podría estar involucrado en el proceso de citotoxicidad o citólisis.

En este proyecto se purificó la molécula de amiboporo mediante cromatografía de filtración, cromatografía de intercambio iónico [53] y finalizando por la electroelución nativa. Dichas técnicas presentan ciertas ventajas debido a que las muestras se procesan en columnas y buffers con respecto a otras técnicas de separación en donde se utilizan solventes orgánicos que podrían dañar la estructura tridimensional de la muestra. El análisis de la pureza se observó por la electroforesis con SDS [54], obteniendo el resultado de una banda proteica por debajo del PM de referencia de 14 kDa correspondiente también en los geles nativos de electroforesis. Dicho resultado electroforético concuerda con lo reportado por Leippe y colaboradores, que la porina amibiana tiene un peso molecular de 8.3 kDa en algunos casos puede migrar como un agregado a la altura de un peso molecular de 30 kDa. Por medio de la espectrofotometría de masas y secuenciación de proteína se obtiene el número y tipo de aminoácidos adquiriendo así el tipo de amiboporo sea el A, B ó C y en la molécula purificada fue el A.

Aunque se reconoce que el método de purificación realizado por Leeipe fue principalmente por cromatografía, se tuvo a bien en este proyecto modificar la última fase de purificación que fue por electroelución. La purificación fue llevada a cabo en una manera similar a la descrita por Leippe, por cromatografía. Un paso adicional fue incluido: fracciones eluidas con 0.1 M de NaCl de la cromatografía de intercambio aniónico MQ, que contenía amiboporos fueron combinadas y sometidas a electroelución no desnaturalizada en un equipo de electroelución. Las fracciones fueron colectadas y analizadas en geles al 12 %, usando PAGE no desnaturalizado, y teñido con plata. Los amiboporos fueron concentrados y almacenados a -70°C. Esta modificación pudo haber originado un cambio en el resultado obtenido de 93.9 % de pureza.

Para la purificación de la molécula del amiboporo se partió inicialmente de 1240 mg que corresponde al 100 % extracto amibiano y donde solo recuperamos 93.5 mg de proteína total de la primera fase de purificación (columna de filtración molecular) resumido esto quiere decir que la cantidad de proteína y rendimiento disminuyó a un 7.5 %. En la segunda fase de purificación (columna de intercambio iónico) disminuyó la concentración a 18.7 mg, con un rendimiento total

de 1.6 % y una concentración de proteína total pura de 800 µg con un rendimiento final de 0.064 %.

Los datos obtenidos en el espectrofluorómetro con respecto a la actividad, realizada en liposomas [55] concuerdan con los resultados de despolarización que fueron realizadas inicialmente por Loew (1983) y posteriormente por Leippe (1991) con la muestra purificada de amiboporo.

La actividad citolítica de *E. histolytica* ha sido atribuida a un péptido de 77 residuos nombrado amiboporo el cual ejerce actividad formadora de poros y lisa células de huésped así como de bacterias [56]. El péptido amibiano ha sido estructuralmente caracterizado y comparte similitudes con proteínas parecidas a las saponinas [57] polipéptidos similarmente muy largos en tamaño de una estructura enlace-disulfido α - helicoidal. Notablemente, ha sido mostrado que 2 miembros de esa familia de proteínas, nombradas NK lisina y granulisina, son péptidos efectores de linfocitos citolíticos de mamíferos con un tipo de actividad citolítica y antibacterial [58, 59].

El amiboporo descrito en el trabajo, muy probablemente puede que sea idéntico al amiboporo que describió en su momento Leippe, et al (1992) y por Rosenberg, et al porque en los dos casos del procedimiento de purificación se utilizó la misma cepa de *Entamoeba histolytica*. El procedimiento del método de purificación del amiboporo propuesto en parte por Leippe, nos ha permitido obtener la molécula con un grado de pureza de alrededor de 93.9 %, aunque no se tiene hoy en día otros métodos de purificación para poder discriminar el porcentaje de rendimiento de dicha molécula por lo que permaneceré con la pregunta sin responder de ¿Qué tanta ventaja nos ha dado el método empleado?

Con respecto a otras bases moleculares sea por inserción de plásmidos (transfección) o por proteínas recombinantes se obtendría una mayor producción de la molécula y un mayor rendimiento; pero el efecto de su estado natural representaría una desventaja en cuanto a su funcionalidad y por lo tanto en una reducción en la patogenicidad del parásito y que tal vez no es lo mismo que se obtenga del mismo organismo que de otro organismo modificado.

Otro aspecto que fue de suma importancia en el proceso de la purificación fue el utilizar inhibidores de proteasas, como el E-64, benzamidina y el fluoruro fenilmetilsulfonil dado que los reportes realizados en el estudio de las amibas describen una gran presencia de enzimas amibianas y con ello evitar la participación enzimática y por ende de la alteración de la molécula de interés.

VII. Conclusiones

Se obtuvo el amiboporo tipo A de *Entamoeba histolytica* de una cepa virulenta (HM1: IMSS) con un grado de pureza de 93.9 % por medio de las cromatografías de filtración molecular, intercambio iónico y electroelución. El ameboporo tipo A presentó actividad de porina en liposomas.

VIII. Perspectivas

El haber obtenido esta molécula con un cierto grado de pureza y con actividad de porina, es fundamental utilizarla para producir anticuerpos policlonales antiameboporo en conejos y emplearlos en la identificación de dicha molécula en la membranas de células blanco, previamente incubada con *Entamoeba histolytica*. Y a si mismo establecer la diferencia entre las cepas virulentas y no virulentas con respecto a la producción del amiboporo. Por otro lado se puede utilizar dicho anticuerpo como prueba de diagnóstico en suero de pacientes con abscesos hepáticos amebianos.

IX. Bibliografía

1. Pinilla E.A., López C.M. and Viasus F.D. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. Revista Medica de Chile. **136**: 118-124
2. Martínez-Palomo, A. 1986. Amibiasis. Editorial Médica Panamericana. S.A. México, D.F. pp. 11-16.
3. Martínez-Palomo, A. 1995. La amibas, enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica. México. No. 47. pp. 46-51, 68-84.
4. Pérez-Tamayo R. 1986. Pathology of amebiasis, en Martínez- Palomo A (ed.) Amebiasis. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp. 45-85.
5. Crónica de una Polémica Centenaria. 2005. http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen_1/ciencia2/47/htm/sec_5.html pp. 1-10
6. Martínez-Palomo, A., Kreier, J.P., Baker J.R. (Editores) 1993. Parasitic amebas of the intestinal tract. Parasitic Protozoa. Academic Press. New York. Segunda edición. pp. 99-119.
7. Romero-Caballero R. 1994. Introducción de Amibiasis, Segunda Revisión de Expertos en Amibiasis. SEARLE, Primera Edición. pp. 47-55.
8. Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitology Today. **4**: 111-118.
9. Jackson, T.F. 1998. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. International Journal for Parasitology. **2**(1): 181-186.
10. Espinosa-Castellano, M. and Martínez-Palomo, A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clinical Microbiology Reviews. (2): 318-331.
11. Ravdin, JI. 1995. Amebiasis. Clinical Infectious Diseases. **20** (6): 1453-64; 1465-6.
12. Sepúlveda, B. 1982. Amebiasis: host-pathogen biology. Reviews of Infectious Diseases. (6): 1247-1253.
13. Diamond, SL. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science (134): 336-337.
14. Diamond, SL. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* – like amebae. Journal of Parasitology. **2**(54): 1047-1056.

15. Diamond, SL. Harlow, DR. and Connick, CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **72** (4):431-432.
16. Orozco, E. Guarneros, G. Martínez-Palomo, A. and Sánchez T.1983. Phagocytosis as a Virulence Factor. *Entamoeba histolytica*. Journal of Experimental Medicine. **158** (5): 1511-1521.
17. Tannich, E. 1998. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. Transection Real Society Tropical Medicine Hygiene. **92** (6): 593-596.
18. WHO/PAHO/UNESCO report.1997. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico. Epidemiological Bulletin. **18** (1): 13-4.
19. Martinez-Palomo A.1982. The Biology of *Entamoeba histolytica*. Tropical Medicine Research Studies Series. John Wiley and Sons, Chichester. pp. 161
20. Martinez-Palomo A. 1988. Biology of amebiasis: Progress and perspectives. The Biology of Parasitism. (P.T.Englund and A. Sher.Eds). A. R. Liss, New York. pp: 61-67.
21. Burton J.B., Cheng C.T.1979. Human Parasitology. 2nd Edition. Academic Press. University of Chicago Press. pp: 60-71.
22. Eichinger D.1997. Encystation of *Entamoeba* parasites. Bioessays. **19**:633-639.
23. Cho J. & Eichinger D. *Crithidia fasciculata* induces encystation of *Entamoeba invadens* in a galactose-dependent manner.1998. Journal of Parasitology.**84**:705-710.
24. Frisardi M. Ghosh S.K., Field J., Van Dellen K., Rogers R., Robbins P & Samuelson J. 2000. The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five cys-rich, chitin-binding domains. Infection and Immunity.**68**: 4217-4224.
25. Martínez-Palomo, A. and Espinosa-Cantellano M. 1998. Intestinal amoebae. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Cox, FEG. Kreier, J.P and Wakelin, D. (Editores). Arnold, Londres. pp: 157-177.
26. Haque, R., Huston, C., Hughes, M., Houpt, E. and Petri, W. Jr. 2003. Amebiasis. The New England Journal of Medicine. April 17,**348** (16): 1565-1573.
27. Hecht, O., Van Nuland, NA., Schleinkofer, K., Dingley, AJ, Bruhn, H., Leippe, M., and Grötzinger, J. 2004. Solution Structure of the Pore-forming Protein of *Entamoeba histolytica*. Journal of Biological Chemistry. **279** (17): 17834-17841.
28. Olivos A, Monfort I, Tello E y Pérez Tamayo R. 2002. Purificación y participación de la proteasa de cisteína 2 de *Entamoeba histolytica* en el absceso hepático amibiano experimental. XXXIII Congreso Nacional de Microbiología. Monterrey. Revista Latinoamerica de Microbiología. **44** (1): 495.

29. Ortíz-Ortíz, L. 1994. Amebiasis in parasitic infections and immune system. Academic press, Inc. New York, pp. 145-162.
30. Adl, M., Simpson, AG., Farmer, MA., Andersen, RA., Anderson, OR., Barta, JR., Bowser, SS., Brugerolle, G., Fensome, RA., Frederiq, S., James, TY., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, CE., Lewis, LA., Lodge, J., Lynn, DH., Mann, DG., McCourt, RM., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, SE., Nerad, TA., Shearer, CA., Smirnov, AV., Spiegel, FW. and Taylor, MF. 2005-2012. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis of taxonomy of protists. The Journal Eukaryotic Microbiology. **52** (5): 399-451. **59**(5):429-493.
31. Walker G. G.R. Dorrel., Schlacht. A and Dacks B.J. 2011. Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists. Parasitology. **138**,1638-1663. Cambridge University Press.
32. Vázquez E., Zavala C., Chávez B. G., Echeverría M., Vázquez N., Segura V., Jiménez G. 2009. Evidencia Ultraestructural del Nucléolo de *Entamoeba histolytica*. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. **12** (1): 34-37.
33. Mann B.J and Loftus B.J. 2002. The Molecular Biology and Pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. From: Pathogen Genomics: Impact on Human Health. Series title Infectious Disease. Shaw Karen Humana Press. Department of Infectious Diseases, Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development. N.J., U.S.A. pp: 281-302.
34. Collier L., A. Balows and M. Sussman M. 1998. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. vol.5. Arnold, London, Sydney, Auckland, New York.
35. Salles, JM., Moraes, LA and Salles, CM. 2003. Hepatic Amebiasis. Brazil Journal Infectious Disease. **7**(2): 96-110.
36. Pieulle, L., Nouailler, M., Morelli, X., Cavazza, C., Gallice, P., Blanchet, S., Bianco, P., Guerlesquin, F. and Hatchikian, EC. 2004. Multiple orientations in a physiological complex: The pyruvate-ferredoxin oxidoreductase-ferredoxin system. Biochemistry **43** (49): 15480-15493.
37. Anderson J. and Loftus J. 2005. *Entamoeba histolytica*: Observations on metabolism based on the genome sequence. Experimental Parasitology. **110**:173-177.
38. Gilchrist, CA and Petri, WA. 1999. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. Current Opinion in Microbiology. **2** (4): 433-437.
39. Petri Jr. W., Haque. R. and Mann, J. 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. Annual Review of Microbiology. **56**:39-64.
40. Ravdin J.I., Murphy C.F., Guerrant R.L. & Long-Krug. 1985. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the citopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Journal Infectious Disease. **152**:542-549.

41. Long-Krug, SA. Fisher, KJ. Hysmith, RM. and Ravdin, JI. 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. Journal Infectious Disease. **152** (3): 536-541.
42. He C, Nora GP, Schneider EL, Kerr ID, Hansell E, Hirata K, Gonzalez D, Sajid M, Boyd SE, Hruz P, Cobo ER, Le C, Liu WT, Eckmann L, Dorrestein PC, Hought ER, Brinen LS, Craik CS, Roush WR, McKerrow J, Reed SL. 2010. A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. Journal Biological Chemistry. **285** (24): 18516–18527
43. Que, X., and Reed, SL. 2000. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. Clinical Microbiology Review. **13** (2): 196-206.
44. Lynch E.C., Rosenberg I. and Gitler, C. 1982. An ion channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. EMBO Journal. **1**:801-804.
45. Leippe M. 1997. Amoebapores. Parasitology Today. **13**:178-183.
46. Leippe M., Andra J., Nickel R., Tannich E., and Muller-Eberhard H.J. 1994. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. Molecular Microbiology. **14**:895-904.
47. Zhai, Y. and Saier HM. Jr. 2000. The amoebopore superfamily. Biochimica et Biophysica Acta. **1469** (2): 87-99.
48. Leippe M., Bruhn H., Hecht O. and Grotzinger J. 2005. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. Trends of Parasitology. **21**: 5-7.
49. Leippe M. and Muller-Eberhard H.J. 1994. The pore forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. Toxicology. **87**: 5-18.
50. Andra J., Herbst R. and Leippe M. 2003. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. Developmental & Comparative Immunology. **27**: 291-304.
51. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randal R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol-reagent. Journal of Biological Chemistry. **193**:265-275.
52. Lide D.R. 1991. Handbook of Chemistry and Physics. 72nd Edition. CRC Press, Boca Raton FL.
53. Leippe M., Ebel S., Schoenberger O., Horstmann R and Muller-Eberhard H. 1991. Pore forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Procedure National Academic Science. USA. **88**: 7659-7663.

54. Wu X. and Koiwa H. 2012. One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis gel. *Analytical Biochemistry* **421** (1): 347-349.
55. Pick U. 1981. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **212** (1): 186-194.
56. Beninghausen, O. and Leippe, M. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infectious Immunology*. **65** (9): 3615-3621.
57. Minford, RS. Sheppard, P O., O'Hara, PJ. 1995. Saposin-like proteins (SAPLIPS) carry out diverse functions on a common backbone structure. *Journal Lipid Research*. **36** (8): 1653-1663.
58. Bruhn, H. and Leeipe, M. 2001. Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores. *Biochimica et Biophysica Acta* **1514** (1): 14-20.
59. Leippe, M., Andr a, J., M ller-Eberhard, HJ. 1994. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Procedure National Academic Science USA* **91**(7): 2602-2606.