

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Aislamiento y purificación de
una cisteína proteasa activa de
70 kDa de *Entamoeba
histolytica*”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

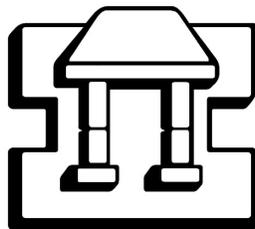
BIOLOGA

PRESENTA:

DORA FANNY ALVAREZ ROLDAN

ASESOR

Dr. RICARDO MEJIA ZEPEDA



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2006



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.

AGRADECIMIENTOS

Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría y que obtiene la inteligencia

Proverbios 3:13

- *Agradezco infinitamente a mi director de tesis **Dr. Ricardo Mejía Zepeda** por todo su apoyo incondicional y consejos que me brindó para realizar esta tesis, por ser una persona ejemplar y principalmente por aceptarme como su alumna ¡Gracias por todo Doc!.*
- *Agradezco al Dr. Rafael Villalobos por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el laboratorio 7 de la UBIMED, por todo el apoyo que nos brindó y por ser una persona con grandes valores.*
- *Agradezco a todos mis maestros de la carrera que me ayudaron a lograr alcanzar una de mis grandes metas, gracias por aportar sus conocimientos y experiencias.*

DEDICATORIA

El que habita al abrigo del Altísimo, morará bajo la sombra del Omnipotente

Salmo 91:1

- *Te agradezco **Dios** por dejarme ver terminado uno de mis más grandes sueños, por darme la esperanza y la fe de querer salir adelante.*
- *Dedico esta tesis a mis padres Cecilio Y Balvina por darme todo lo que yo he necesitado y por creer en mí **¡Los amo!***
- *A mis hermanos: Chiquis y su esposo Sihanouk, a Cecilio, Sandy, Cheo y Rebequita por compartir un largo rato de su vida conmigo. A mis sobrinos los “remolinos” Jafet y Benja.*
- *A mis amigos de carrera Neto, Erika, Maribel, Lauris gracias por todos tus consejos y por escucharme, a Keila y Norma que siempre me hacían reír ¡les deseo lo mejor!, a toda la liga de la justicia ¡son geniales!, a Denisse ¡Gracias por todo tu apoyo!*
- *A los doctores y compañeros del Laboratorio 7: Normis, el Doc Max, Paco, Consuelo, a Rita, Viki, Jade, Martita, Fernanda, Jes, Abril, gracias por dejarme ser parte de sus vidas.*
- *A Cristina por apoyarme y dedicar parte de su tiempo conmigo ¡Que Dios te bendiga!*
- *A Roge porque eres muy especial para mí, por formar parte esencial de mi vida y por apoyarme en mis metas ¡TE AMO!.*

INDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1 Historia.....	6
2.2 Epidemiología.....	8
2.2.1 Epidemiología en México.....	8
2.3 Ciclo de vida.....	9
2.4. Taxonomía y morfología.....	11
2.4.1 Trofozoito.....	11
2.4.2 Quiste.....	12
2.5 Proteasas como factor de virulencia.....	13
2.5.1 Cisteín proteasas.....	14
2.5.2 Mecanismo de acción de las cisteín proteasas.....	14
2.5.3 Modelo de cisteín proteasas durante la infección de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i>	15
2.5.4 Inhibidores de cisteín proteasas.....	16
2.6 Antecedentes.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos particulares.....	21
4. METODOLOGÍA.....	22
4.1 Cultivo y manejo de <i>E. histolytica</i> : cepa HM1: IMSS.....	22
4.1.1 Inhibición de proteasas.....	23
4.1.2 Procesamiento de los extractos de <i>E. histolytica</i>	23
4.2 Cromatografía en columna de exclusión molecular.....	23
4.3 Ultrafiltración.....	25
4.4 Cromatografía en columna de intercambio iónico.....	26

Dora Fanny Alvarez Roldán

4.5 Cromatografía de afinidad.....	26
4.6 Cuantificación de proteínas.....	28
4.6.1 Detección de proteínas por luz UV (280 nm).....	28
4.6.2 Cuantificación de proteínas por el método de micro Bradford.....	28
4.6.3 Cuantificación de proteínas por el método de Schacterle y Pollack, modificado por Pugley y Schanaitman.....	29
4.7 Electroforesis de las proteínas de <i>E. histolytica</i>.....	30
4.8 Zimograma.....	32
4.9 Transferencia electroforética semi-seca a membrana IMMOBILOM™.....	34
4.10 Estructura primaria de la enzima de 70 kDa de <i>E. histolytica</i>.....	35
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Localización de una cisteín proteasa de alto peso molecular... 	37
5.2 Calibración de la columna de exclusión molecular.....	38
5.3 Obtención de la cisteín proteasa de 70 kDa por exclusión molecular (fase soluble).....	41
5.3.1 Identificación de la cisteín proteasa (fase soluble) en geles de poliacrilamida.....	43
5.4 Obtención de la cisteín proteasa de 70 kDa por exclusión molecular (fase no soluble).....	44
5.5 Obtención de la cisteín proteasa de 70 kDa de <i>E. histolytica</i> por intercambio iónico.....	44
5.6 Actividad proteolítica de las cisteín proteasa presentes en las fracciones de exclusión molecular e intercambio iónico.....	46
5.7 Inhibición de la cisteín proteasa con ZnCl₂ (inhibidor reversible)47	
5.8 Obtención de cisteín proteasas de <i>E. histolytica</i> por ultrafiltración.....	48

5.9 Actividad proteolítica de las fracciones de ultrafiltración.....	50
5.10 Aislamiento de cisteín proteasas por afinidad.....	50
5.10.1 Actividad proteolítica en las fracciones colectadas por afinidad.....	52
5.11 Tabla comparativa de métodos.....	54
5.12 Cisteín proteasa de 70 kDa y virulencia de <i>E. histolytica</i>.....	55
5.13 Transferencia de la cisteín proteasa de 70 kDa de <i>E. histolytica</i> a una membrana PVDF.....	57
5.13.1 Concentración relativa de la banda de 70 kDa de <i>E. histolytica</i>.....	57
5.14 Secuenciación de la cisteín proteasa de 70 kDa de <i>E. histolytica</i>.....	59
6. DISCUSIÓN.....	61
7. CONCLUSIONES.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA.....	70

1. RESUMEN

Entamoeba histolytica es el parásito que causa la amibiasis intestinal. Se calcula que a nivel mundial cada año origina de 40 000 a 50 000 fallecimientos, principalmente en países subdesarrollados incluyendo México.

Se han identificado cisteín proteasas de gran importancia en la patogenicidad del parásito *E. histolytica*. El objetivo de este trabajo es aislar y purificar una cisteín proteasa activa de aproximadamente 70 kDa de *E. histolytica*.

Las técnicas que se utilizaron para aislar la enzima fueron: lisado de amibas por congelación-descongelación y por sonicación. Inhibición para metaloproteasas, aspártico proteasas, serín proteasas y un inhibidor reversible para cisteín proteasas. Cromatografía en columna de exclusión molecular (Sephadex G100). Ultrafiltración con membranas (límite de retención de 50 kDa). Cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa). Cromatografía de afinidad (tiopropil sepharose 6B Y E-64). SDS-PAGE 10% y zimogramas copolimerizados con gelatina y/o hemoglobina. Transferencia electroforética semi-seca a membrana PVDF.

Se aisló una cisteín proteasa de 70 kDa. Dicha proteína al parecer es aniónica. La ultrafiltración concentra una mayor cantidad de proteína. Por afinidad se logró aislar proteínas de la fracción soluble. Se comprobó la actividad de hemoglobinasas en zimogramas.

Con base en los pesos moleculares mostrados por la electroforesis se cortó la banda de 70 kDa y se transfirió a una membrana de PVDF y esta banda se analizó por espectrometría de masas y se obtuvieron los patrones de fragmentación, los cuales se analizaron en base de datos, dándonos una homología del 16% con las siguientes enzimas: Acil-CoA sintetasa (*Ferroplasma acidarmanus*) y una DNA helicasa RecQ ATP-dependiente (*Burkholderia mallei*).

Esta cisteín proteasa puede estar involucrada en la virulencia del parásito, ya que la banda de 70 kDa aparecía en el cultivo virulento y no aparecía en el cultivo que se mantuvo por un largo tiempo en el laboratorio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Historia

La organización mundial de la salud define a la amibiasis: “como la condición de portar el parásito *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas” (Bernal, 2001).

Entamoeba histolytica fue reconocida por Lösch en un paciente con disentería en 1875; sin embargo, el autor no estableció la causa-efecto entre la amiba y los síntomas del paciente. El nombre de la especie fue introducido más tarde por Schaudin en 1903. Desde entonces, la relación hospedero-parásito ha sido motivo de controversias y gran confusión por la notoria discrepancia entre el número de individuos infectados y la baja frecuencia de la enfermedad, la cual afecta a un 10% de los parasitados (Bernal, 2001).

En la búsqueda de una explicación acerca de esta enfermedad, Kuenen y Swellengrebel en 1913 consideraron al protozoo como comensal que, bajo la influencia de ciertos estímulos, invadía tejidos. Dobell en 1919 consideró que *E. histolytica* era un parásito tisular obligatorio y que la enfermedad ocurría cuando se rompía el equilibrio entre el paciente y la amiba (Riquelme y Miranda, 2004).

En 1978, Sargeant logró determinar dos tipos de patrones electroforéticos, los cuales denominó “zimodemos patógenos” y “zimodemos no patógenos” (Sargeant *et al*, 1978), en los cuales se obtienen patrones de enzimas glucolíticas en un gel de electroforesis, para diferenciar las subespecies que se

encuentran en un área geográfica, basándose en la movilidad de las bandas para cada uno de los grupos (Miles *et al*, 1977).

Sargeaunt en conjunto con otros investigadores de Estados Unidos, México, Europa, Israel, India, Japón y Sur de África, estudiaron la distribución mundial del parásito basándose en los zimodemos de alrededor de 10000 casos de pacientes con amibiasis. Todos los pacientes con amibiasis invasiva estaban infectados con amibas que presentaban zimodemos patógenos y aquellos con infecciones asintomáticas tenían zimodemos patógenos y no patógenos (Riquelme y Miranda, 2004). Los estudios de Sargeaunt permitieron llegar a la conclusión de que la amiba clásicamente conocida como *E. histolytica* en realidad comprende dos especies morfológicamente idénticas: *E. histolytica* responsable de la enfermedad y *E. dispar* que es un comensal intestinal. La primera puede ser asintomática y desaparecer espontáneamente o hacerse invasiva y producir la enfermedad, la segunda habita como un comensal inocuo (Sargeaunt *et al*, 1978).

E. histolytica está distribuida en todo el mundo, pero sólo en un pequeño porcentaje de personas infectadas aparecen síntomas; esta pequeña incidencia de manifestación ha originado confusiones sobre la patogenicidad de dicho microorganismo y su relación con otras amibas intestinales. Se sabe ahora con base en los análisis de zimodemos de enzimas glucolíticas, RNA ribosómico y de antígenos, que existen dos cepas independientes pero morfológicamente idénticas de dicho organismo: *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* este último es un comensal inocuo (Wolfe, 2001).

2.2 Epidemiología

A nivel mundial la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte. Alrededor del 10 al 20 % de la población mundial se considera infectada y el 10 % de ésta sufre la enfermedad (Conde-Bonfil y de la Mora-Zerpa, 1992)

La amibiasis invasiva es un problema grave en países tropicales y en desarrollo y se ha calculado que a nivel mundial cada año surgen 40 a 50 millones de casos de la enfermedad, que originan 40 000 a 50 000 fallecimientos (Wolfe, 2001).

La amibiasis es más frecuente en regiones con climas cálidos y templados, pero más aún en áreas pobres y mal saneadas donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas y excretas, de ahí que sea más frecuente la infección y la enfermedad (Riquelme y Miranda, 2004).

Está universalmente aceptado que el hecho de habitar en zonas endémicas es un factor que condiciona un elevado riesgo de infección. La amibiasis intestinal afecta y es más letal en infantes y en personas de la tercera edad, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 30 y 45 años, y se asocia con una alta mortalidad (Riquelme y Miranda, 2004).

2.2.1 Epidemiología en México

Los estudios serológicos de México indican que casi el 9% de la población se ha infectado con *E. histolytica* (Barwick *et al*, 2002). Se estima que 20% de la población total es portadora asintomática, el 2% padece la enfermedad y entre

0.1% y 0.2% muere a causa de esta (en números: 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil muertes al año). Con base en estos datos, puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Conde-Bonfil y de la Mora-Zerpa, 1992).

2.3 Ciclo de vida de *E. histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* es relativamente sencillo. La infección se inicia con la ingesta de quistes provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. En el intestino delgado ocurre la llamada desenquistación, dada por las condiciones favorables en el interior (temperatura mayor que en el exterior, pH ácido, presión de oxígeno baja).

El proceso de desenquistamiento consiste en la división del quiste cuatrinucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoitos.

Los trofozoitos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo, penetran la mucosa con la ayuda de algunas enzimas (cisteín proteasas), produciendo una úlcera mediana, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares (Que y Redd, 2000).

Si pasan los trofozoitos a la sangre, por el sistema portal infecta al hígado, provocando un absceso hepático, si llega al pulmón produce absceso pulmonar, y si llega al cerebro produce un absceso cerebral. Finalmente, los trofozoitos pueden enquistarse completando el ciclo.

En la mayoría de los individuos infectados, *E. histolytica* habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (Riquelme y Miranda,2004).

CICLO DE VIDA DE *Entamoeba histolytica*

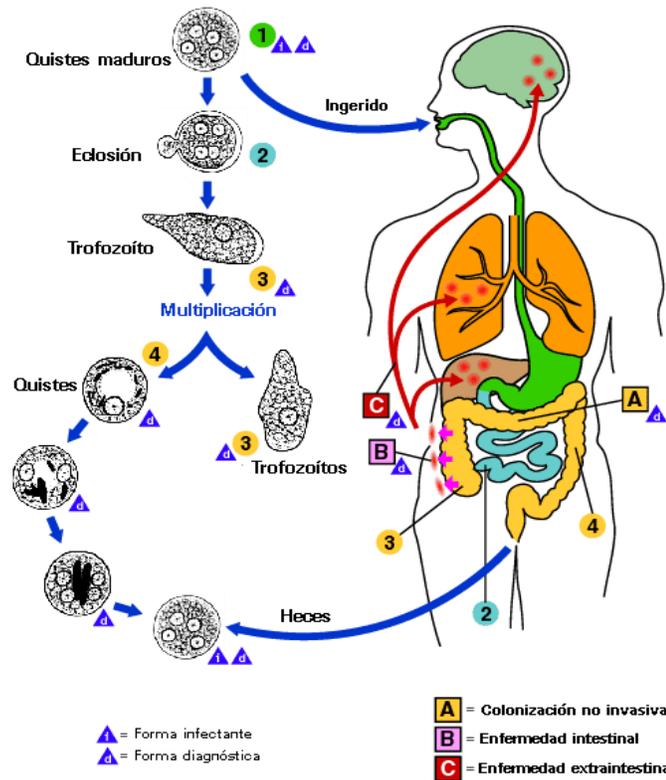


Fig. 1 Esquema simplificado del ciclo de vida de *E. histolytica*. (1) Ingestión de quistes por medio de alimentos o bebidas contaminadas, (2) Etapa de desenquistamiento ocurrida en el intestino delgado, (3) Fase activa: los trofozoitos migran hacia el intestino grueso, (4) Enquistamiento. Los quistes son desechados nuevamente por las heces fecales. En muchos casos los trofozoitos actúan como comensales en el intestino grueso (A. colonización no invasiva). En algunos casos los trofozoitos invaden la mucosa intestinal (B. Enfermedad intestinal) o a través del fluido sanguíneo migran hacia otros órganos como son el hígado, pulmones y cerebro (C. Enfermedad extraintestinal). Imagen adaptada de www.drondonpediatra.com.

2.4 Taxonomía y morfología

E. histolytica es un protozooario perteneciente a la subfamilia Sarcodina y a la familia Entamoebidae. Existen varias especies que infectan al hombre, siendo *E. histolytica* la que causa la patología sistémica de mayor gravedad (Aucott *et al*, 1993).

2.4.1 Trofozoito

El trofozoito de *E. histolytica* es un anaerobio facultativo de 10-40 μm de diámetro, muy activo y pleomórfico. Su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes como son: citoesqueleto estructurado, microtúbulos citoplasmáticos, mitocondrias y sistema de lisosomas primarios y secundarios. Se alimenta por fagocitosis y digestión intracelular de nutrientes, posee un núcleo organizado, genoma complejo y superficie constituida por una sola membrana plasmática. Su tamaño es de apenas 4 a 5 veces mayor que un glóbulo rojo (Martinez, 1987).

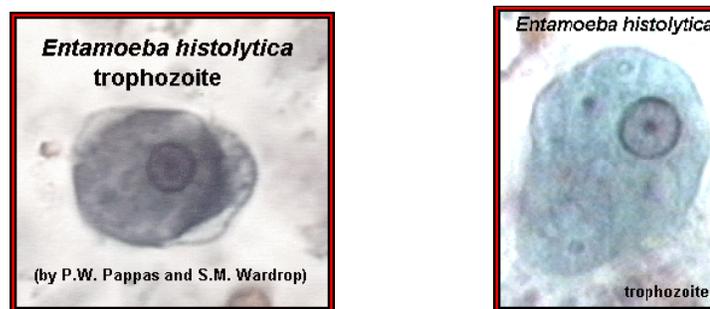


Fig. 2 Fotografías de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Imagen tomada de <http://www.umanitoba.ca>

Visto al microscopio, el citoplasma de los trofozoitos es hialino, aparece como un conjunto de vacuolas dispuestas en una matriz granular (Riquelme y Miranda, 2004).

La movilidad de los componentes citoplasmáticos de la amiba, su desplazamiento relativamente rápido sobre el sustrato, la explosiva formación de pseudópodos y la voraz capacidad de ingerir partículas y células de todo tipo que se encuentren en su camino, constituyen los atributos más llamativos de las amibas patógenas (Riquelme y Miranda, 2004).

Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria y se enquistan, produciendo a su vez quistes cuadrinucleados (Riquelme y Miranda, 2004).

2.4.2 Quiste

Los quistes son una etapa resistente del ciclo de vida de *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del huésped por semanas o meses (Riquelme y Miranda, 2004). Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 μm de diámetro, las cuales, en muestras sin teñir, se pueden ver como cuerpos hialinos con pared refringente.

El proceso de enquistamiento de la amiba se da cuando las condiciones le son desfavorables a los trofozoitos.

Los prequistes poseen de 1 a 2 núcleos, cuando se divide el núcleo por mitosis forman un quiste maduro con cuatro núcleos (Riquelme y Miranda, 2004).

El quiste posee una membrana bilaminar, con la presencia de cuatro núcleos.

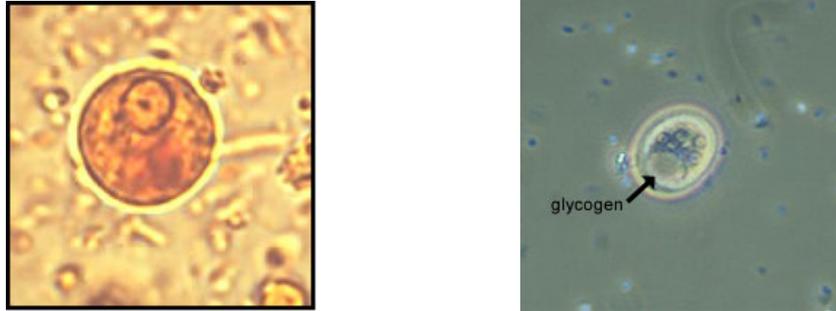


Fig. 3 Fotografías de quistes de *Entamoeba histolytica*. Imagen tomada de www.provlab.ab.ca

2.5 Proteasas como factor de virulencia

Muchos parásitos patógenos que habitan en el intestino, que es rico en suplementos nutricionales, producen proteasas para aumentar su potencial patogénico (Wolfe, 2001), estas proteasas se expresan con frecuencia en diversas etapas del ciclo de vida del parásito para apoyar la réplica y la metamorfosis del parásito. Durante la infección con *E. histolytica*, las proteasas secretadas por el parásito pueden dañar las células huésped y los tejidos finos, contribuyendo al daño del tejido del huésped y a la invasión del parásito (McKerrow *et al*, 1993).

Diversas moléculas amibianas que participan en la virulencia del parásito han sido objeto de una investigación intensa. Con el desarrollo de cultivos axénicos de este parásito ha sido posible identificar varios factores que contribuyen a la virulencia de las cepas aisladas, incluyendo las cisteína proteasas, metaloproteasas y serín proteasas. Algunos investigadores han hipotetizado que la invasión y la destrucción del tejido por cepas virulentas de *E. histolytica*, requiere la expresión y liberación de proteasas, principalmente del tipo de las

cisteín proteasas. Algunas de éstas son capaces de degradar sustratos específicos como la matriz extracelular, colágena, fibronectina y hemoglobina (Luna *et al*, 2001).

2.5.1 Cisteín proteasas

Las cisteín proteasas son conocidas por ser factores importantes en la patogenicidad del parásito *E. histolytica* (Bruchhaus *et al*, 2003), estas proteasas son secretadas en grandes cantidades por el parásito y pueden romper proteínas de la matriz extracelular para facilitar la invasión amíbiana (Stanley, 2001).

Las cisteín proteasas purificadas de cultivos axénicos de *E. histolytica* rompen colágeno, elastina, fibrinógeno y laminina, elementos de la matriz extracelular que los trofozoitos degradan durante la invasión (Que y Redd, 2000).

En varios extractos de *E. histolytica* se observan cisteín proteasas con masas moleculares que van de 10 a 96 kDa. En zimogramas utilizando los extractos de *E. histolytica* revelan de cuatro a seis bandas con actividad enzimática (Que y Redd, 2000).

2.5.2 Mecanismo de acción de las cisteín proteasas

La catálisis de las cisteín proteasas se realiza a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo de cisteína y uno de histidina. El nucleófilo es un ión tiolato en lugar de un grupo hidroxilo. El ión tiolato se estabiliza a través de la formación de un ión apareado con un grupo imidazol de la histidina.

El nucleófilo que ataca es el ión apareado tiolato-imidazol en ambos pasos (Luna *et al*, 2001).

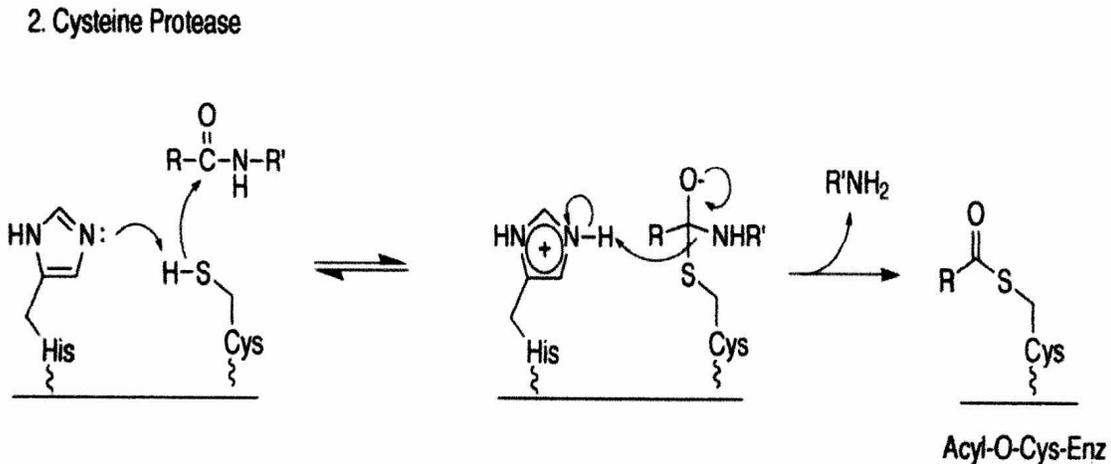


Fig. 4 Mecanismo de acción de las cisteín proteasas.

2.5.3 Modelo de cisteín proteasas durante la infección por *E. histolytica* y *E. dispar*.

E. dispar expresa por lo menos tres cisteín proteasas (EdCP1, EdCP2 y EdCP3) pero no invade. *E. histolytica* expresa por lo menos cinco cisteín proteasas, ACP1, ACP2 ACP3, EhCP5 y EhCP112. Las cisteín proteasas extracelulares rompen las IgA, degradan la matriz extracelular y activan el complemento y degradan las IgG para evitar la respuesta inmune del hospedero, demostrando la eficacia de las cisteín proteasas para causar infección (Que y Reed, 2000).

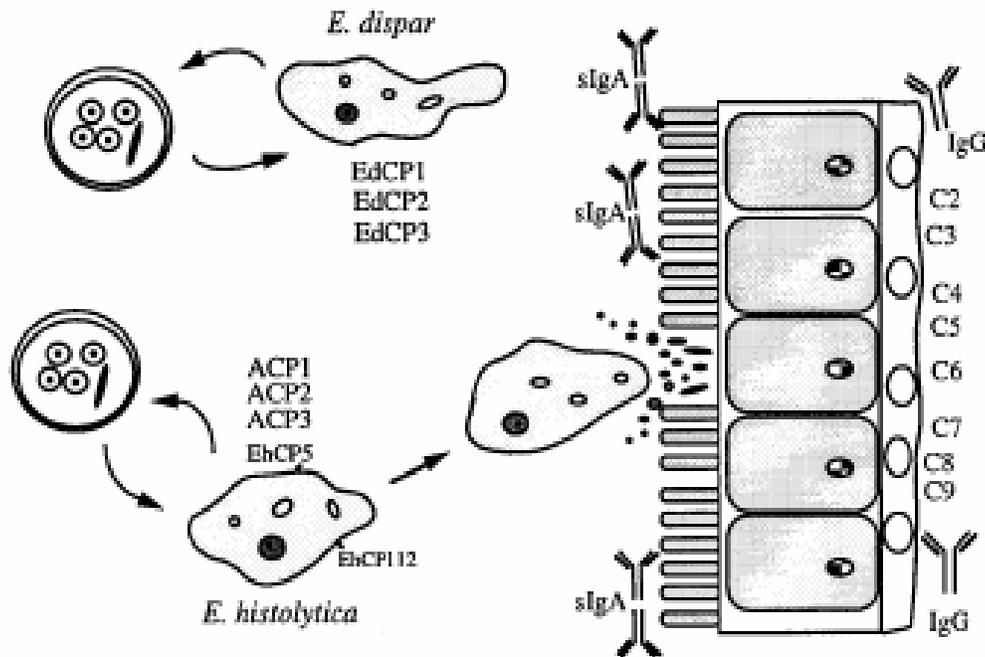


Fig. 5 Modelo de expresión de las cisteín proteasas, durante la infección de *E. histolytica* y *E. dispar*. Esquema tomado de Que y Reed (2000).

2.5.4 Inhibidores de cisteín proteasas

Las cisteín proteasas se caracterizan por poseer un grupo tiol, y en general pueden ser inhibidas por el L-trans-(epoxysuccinil)-L-leucine 4-guanidinobutilamide (E-64) y por reactivos como el *p*-hydroxy-mercuribenzoic acid (PHMBA), estos son inhibidores específicos. Para activar a las cisteín proteasas se puede utilizar ditioneitol (DTT) y 2-mercaptoetanol (Que y Redd, 2000).

Tabla 1. Modelo de inhibidores para proteasas

INHIBIDOR	DESCRIPCION
EDTA	Inhibidor reversible de amplio espectro de metaloproteasas
Pepstatina A	Inhibidor de proteasas ácidas, incluyendo pepsina, renina y catepsina. Pentapéptido derivativo. Inhibidor reversible de aspártico proteasas.
PMSF	Inhibidor irreversible de serín proteasas por sulfonilación del residuo de serina en el sitio activo de la proteasa.
ZnCl₂	Inhibidor reversible de cisteín proteasas, el cual bloquea más de 70% de la actividad proteolítica.
E-64	Inhibidor irreversible no competitivo de papaina y otras cisteín proteasas, formando un enlace tioéter con el grupo sulfhidrilo en el centro activo de la enzima.

2.6 ANTECEDENTES

E. histolytica tiene la capacidad de invadir tejidos y causar enfermedad sintomática. En general la patogenia depende de las enzimas que libera, de su asociación con otras bacterias, del estado inmunológico y nutricional del huésped y de la obtención de hierro presente en la hemoglobina, el cual facilita la invasión del parásito en el hospedero (Riquelme y Miranda, 2004). El hierro es un cofactor importante para el metabolismo de todos los seres vivos. Debido a la baja concentración de hierro libre en los fluidos del cuerpo, los microorganismos patógenos han desarrollado la habilidad de obtener hierro de las proteínas del hospedero, en las cuales este metal está presente, esta habilidad se describe como un factor de virulencia ya que le permite al microorganismo patógeno multiplicarse (Serrano-Luna *et al*, 1998).

Los trofozoitos degradan eritrocitos humanos y el 96% de la hemoglobina ingerida es hidrolizada en tres horas (Mora-Galindo *et al*, 2004). La invasión y destrucción del tejido por cepas virulentas de *E. histolytica*, requiere la expresión y liberación de proteasas, principalmente de cisteín proteasas (Luna *et al*, 2001).

Por medio de electroforesis en gel se han encontrado proteasas, específicamente cisteín proteasas, las cuales cumplen diferentes funciones como degradación de hemoglobina (hemoglobinasas) y de histolisinas, degradación de componentes de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, laminina y colágeno (Riquelme y Miranda, 2004).

Las cisteín proteasas de *E. histolytica* juegan un papel importante entre el parásito y el huésped, incluyendo la adquisición de nutrientes, facilitación de la invasión en el tejido y la defensa durante un ataque inmune (Que y Reed, 2000).

Actividades proteolíticas de los extractos de *E. histolytica* vistas en zimogramas copolimerizados con hemoglobina, muestran pesos moleculares de cisteín proteasas de aproximadamente 116, 82 y 21 kDa. Esta actividad en hemoglobina se observa a pH neutro (Serrano-Luna *et al*, 1998).

El efecto de varios inhibidores en la actividad enzimática, puede ayudar a la purificación de enzimas específicas (Spinella *et al*, 1999). La actividad proteolítica de los trofozoitos lisados pueden ser inhibidas selectivamente por cationes metálicos divalentes de la serie IIB y VIII B (Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+}) resaltando al $ZnCl_2$ como un inhibidor reversible específico de cisteín proteasas, bloqueando la actividad de las proteasas en un 70% en zimogramas. Para las cisteín proteasas este inhibidor posee baja toxicidad en concentraciones relativamente altas, además de poseer alta solubilidad (Franco *et al*, 1999).

El E-64 es un inhibidor irreversible de cisteín proteasas, el cual es producido por un hongo conocido como *Aspergillus japonicus* y actúa como inhibidor específico de cisteín proteasas. La actividad inhibitoria es el resultado del puente de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas entre el inhibidor y el sitio catalítico de las cisteín proteasas. Este inhibidor puede ser utilizado para purificar cisteín proteasas como la papaina, utilizando una cromatografía de afinidad ya que este inhibidor se une irreversiblemente a la resina conocida como tiopropil Sepharose 6B; el inhibidor que se unió a la resina, aún puede unirse

reversiblemente a la proteína en su sitio catalítico, sin afectar su actividad (Govrin, 1999).

Es evidente la importancia de las cisteín proteasas como uno de los factores que promueven la virulencia de *E. histolytica*. Entre más se conozca sobre éstas proteínas, contaremos con más y mejores herramientas que en un futuro puedan llevar a contrarrestar el daño que ocasionan y de esta manera disminuir la virulencia de *E. histolytica* y desde luego el daño que puede causar. La actividad de cisteín proteasas con actividad de hemoglobinasas las hacen candidatos importantes del daño a eritrocitos, de lo cual se vale la amiba, al parecer, para proveerse de hierro del medio, además de amino ácidos. Por esta razón, entre otras, me interesa estudiar una cisteín proteasa con actividad de hemoglobinasas que es de alto peso molecular. Gracias a las metodologías descritas en las investigaciones antes referidas, se utilizaron como una herramienta para aislar dicha proteasa sin perder su actividad y después purificarla para analizar la secuencia de amino ácidos constituyentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Purificar una cisteín proteasa de 70 kDa de *Entamoeba histolytica*

3.2 Objetivos particulares

- Determinar el método más sencillo, directo y eficiente para la purificación de la cisteín proteasa de 70 kDa.
- Aislar la cisteín proteasa de *E. histolytica* evitando perder su actividad.
- Encontrar un sistema amortiguador en que se inhiba la actividad de las cisteín proteasas sin que se pierda su actividad irreversiblemente.
- Comparar los resultados con los obtenidos en otros trabajos sobre cisteín proteasas de pesos moleculares similares.
- Obtener la cantidad suficiente de la enzima para secuenciarla.
- Analizar por espectrometría de masas los patrones de fragmentación de la cisteín proteasa de 70 kDa.
- Comparar el grado de homología de los fragmentos trípticos de la cisteín proteasa de 70 kDa en una base de datos.

4. METODOLOGIA

4.1 cultivo y manejo de *E. histolytica*: cepa HM1: IMSS

Las amibas se mantuvieron en medio BI-S-33 (Biotriptasa Bioxon, México), (tabla 2), se incubaron por 72 horas a 37°C. Después de este tiempo, cuando las amibas llegaron a confluencia, los trofozoitos se incubaron en un baño frío durante 5 minutos y se colectaron por centrifugación a 500g por 5 minutos (centrífuga mod. Hermle Z 383K).

Tabla 2. MEDIO DE CULTIVO BI-S-33, pH 6.8 (1000 ml)

Componente	cantidad (g)
Biosate	34.48
Glucosa	11.51
NaCl	2.298
K ₂ HPO ₄	1.408
KH ₂ PO ₄	0.69
L-hidrocloruro de cisteina	1.15
L-ácido ascórbico	0.23
Citrato de amonio férrico	0.032

Las amibas se lisaron por una de las dos siguientes formas: la primera por congelación-descongelación usando hielo seco y acetona para alcanzar una temperatura aproximada a -70°C (www.chemistry.ohio-state.edu/ehs/handbook/gases/coldtrap.htm), en donde se colocó la muestra para

congelarla y posteriormente se pasó a un recipiente con agua hirviendo para descongelar la muestra logrando el rompimiento de las células, la segunda forma fue por sonicación (ultrasonicador modelo GE130PB). Se sonicó a espacios de 10 segundos, a una potencia de salida de 2 watts, manteniendo la muestra en hielo todo el tiempo.

4.1.1 Inhibición de proteasas

Se agregaron inhibidores (ver tabla 1, Pág. 18) para proteasas como fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) 1mM; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2.5mM; pepstatina A 1mM. Los extractos de *E. histolytica* también se inhibieron con cloruro de zinc ($ZnCl_2$) 2.5mM.

4.1.2 Procesamiento de los extractos de *E. histolytica*

Se trabajó con los extractos de *E. histolytica* y se separó la fase soluble de la no soluble por centrifugación para conocer la ubicación de la proteína deseada, la fase soluble se mantuvo en un amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, $ZnCl_2$ 2.5 mM, NaCl 200 mM y la fase no soluble se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, $ZnCl_2$ 2.5 mM, NaCl 200 mM y SDS al 0.5%.

4.2 Cromatografía en columna de exclusión molecular

Se utilizó como resina: sephadex G-100 (Pharmacia), la cual tiene un límite de retención de hasta 100 kDa.

Se pesó 800 mg de resina para una columna de 1 X 20 cm posteriormente se hidrató en un volumen de 15 ml de agua desionizada.

Se determinó el volumen muerto con azul dextran (Sigma) a una concentración de 1mg/ml y se vertió en la columna un volumen de 200 μ l, posteriormente se colectaron fracciones de 500 μ l aproximadamente y se leyeron a 620 nm en un espectrofotómetro de luz UV (modelo Ultrospec 3300 pro).

Para conocer los tiempos relativos de retención de la resina, se utilizaron proteínas de peso molecular conocido: β -galactosidasa (116 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa). Se vertió en la columna un volumen de 200 μ l, en una concentración de 90 μ g de cada una de las proteínas. Posteriormente se colectaron fracciones de 650 μ l y se determinó el contenido de proteína por luz UV (280 nm) y microbradford (595 nm) de cada una de las fracciones colectadas.

Se utilizaron dos columnas de exclusión molecular, una para la fase soluble y la otra para la fase no soluble de los extractos de *E. histolytica*.

Se calibraron las columnas con la resina durante 24 h en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, ZnCl₂ 2.5 mM, NaCl 200 mM para la fase soluble y para la fase insoluble se utilizó el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, ZnCl₂ 2.5 mM, NaCl 200 mM con SDS al 0.5%.

Se depositaron 900-950 μ l de muestra en la columna correspondiente para cada fase (soluble e insoluble). Se colectaron fracciones de 500 μ l aproximadamente. Posteriormente se detectó y cuantificó proteína por luz UV y

micro Bradford para las fracciones de la fase soluble y para la fase no soluble se determinó por luz UV y por el método de Schacterle y Pollack (1973) modificado por Pugley y Schnaitman (1978).

4.3 Ultrafiltración

Se utilizó un sistema de ultrafiltración Amicon (Millipore) y membranas de polietersulfona con un límite de retención de 50 kDa de 44.5 mm de diámetro.

En este sistema se llevó la muestra a un volumen de 10 ml en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, ZnCl₂ 2.5 mM, NaCl 200 mM para la fracción soluble y un amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, ZnCl₂ 2.5 mM, NaCl 200 mM con SDS al 0.5% para la fracción no soluble.

En la cámara de ultrafiltración se utilizó nitrógeno como gas presurizador inerte a una presión de 50 lb/pulg² (3.5 kg/cm²). Se colectó la muestra agregando un amortiguador (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, ZnCl₂ 2.5 mM, NaCl 200 mM). Se enjuagó la membrana con agua bidestilada, posteriormente recibe un tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M durante 30 minutos, se lava con agua desionizada y se conserva en una solución de etanol al 10% y agua y se mantiene en refrigeración.

La muestra retenida por las membranas se llevó a un volumen de 1 ml y se cuantificó proteína (UV y micro Bradford) para la fase soluble y para la fase no soluble se determinó por el método de Schacterle y Pollack (1973) modificado por Pugley y Schnaitman (1978).

4.4 Cromatografía en columna de intercambio iónico

Se utilizó una cromatografía de intercambio iónico (Deutscher, 1990) y se utilizó como resina: celulosa-DEAE. Se pesó 800 mg aproximadamente para una columna de 1 x 5 cm en un volumen aproximado de 5 ml.

Se hidrató la resina con agua desionizada durante 4 h y se desgasificó al vacío durante 30-60 min. Se lavó la resina con una solución de HCl 1N (3 volúmenes) durante 5 min. Se lavó hasta quedar la resina con agua hasta un pH neutro y se retiraron las partículas finas que quedaron en suspensión. Luego se lavó con NaCl 1M (3 volúmenes) durante 5 min. Después se lavó con agua desionizada hasta tener pH neutro y se retiraron las partículas en suspensión.

Posteriormente se pasó el extracto de *E. histolytica* (900-950 μ l) en la columna de intercambio iónico y se retuvo por unos minutos la muestra, posteriormente se utilizaron amortiguadores (Tris HCl 20 mM, pH 7.4; ZnCl₂ 2.5 mM) con distintas concentraciones de NaCl (10 mM, 200 mM y 1 M).

Se colectaron fracciones de 3.0 ml aproximadamente de muestra para cada uno de los amortiguadores utilizados. Posteriormente se cuantificó proteína de las fracciones por luz UV y micro Bradford.

4.5 Cromatografía de afinidad

Se utilizó una cromatografía de afinidad (Govrin, 1999) y se utilizó como resina tiopropil sepharose 6B (Sigma-Aldrich) y un inhibidor irreversible E-64 (Sigma-Aldrich).

Se pesó 300 mg de tiopropil sepharose 6B y se lavó con 10 ml de agua bidestilada. Posteriormente se lavó la columna con amortiguador de carbonato de sodio 60 mM, pH 10.5.

Se disolvió el inhibidor E-64 (5 mg) en etanol. Se diluyó en el amortiguador de carbonato de sodio (NaCO_4) a 20 mg/ml.

Posteriormente se adicionó el inhibidor a la columna. Se incubó 24 h a 35°C con rotación constante.

Se monitoreó el corte S-S por la reacción de Ellman: remover alícuotas de 10 μl (sin esferas) y medición de los productos de reacción con los grupos sulfidril liberados a 412 nm.

Después de 24 h, ya que la reacción procedió muy lenta, se elevó el pH a 11.5 y la reacción continuó por 24 horas más.

Después de la segunda incubación la columna se lavó con 20 ml de amortiguador para remover los péptidos que no reaccionaron.

El amortiguador se cambia a fosfato de potasio 20 mM pH 7. Para apagar los grupos tioles sin reaccionar, las esferas reaccionan primero por 30 minutos con 0.5 ml de ditioneitol (DTT) 0.1M.

Posteriormente se lavó la columna con 20 ml de amortiguador de fosfato de potasio (KH_2PO_4) 5 mM. Se incubó por 2 h con 0.5 ml de N-etilmaleimida (NEM). Se lavó la columna con amortiguador de fosfato de potasio.

Se vertió en la columna 550 μg (500 μl) aproximadamente de proteína de la fracción soluble del extracto de *E. histolytica* utilizando un amortiguador de fosfatos en presencia de ZnCl_2 .

Se eluyó la muestra y se colectaron cuatro fracciones de 500 μ l aproximadamente, posteriormente se cuantificó proteína (micro Bradford) y se concentró la muestra en un liofilizador (modelo LABCONCO freozone 6) durante 12 horas, posteriormente se llevó la muestra liofilizada a un volumen de 100 μ l y se analizó su actividad en un gel de electroforesis copolimerizado con gelatina, para conocer la actividad proteolítica de las proteínas afines al E-64.

4.6 Cuantificación de proteínas

4.6.1 Detección de proteína por luz UV (280 nm)

Se detectó la proteína de las fracciones de filtración en gel (fase soluble e insoluble) y de la ultrafiltración (fase soluble e insoluble) y se leyó la absorbancia por luz UV en un espectrofotómetro (Ultrospec 3300 pro) a 280 nm.

Posteriormente se analizaron los valores de absorbancia en un gráfico para conocer las fracciones en las que se detectó proteína.

4.6.2 Cuantificación de proteína por el método de micro Bradford

Para la estimación de las proteínas totales, se escogió una modificación del método de Bradford (1976) (micro Bradford), considerando su precisión, rapidez y sensibilidad.

Para esta técnica se realizó una curva de calibración con BSA (albúmina de suero bovino) en concentraciones de 0-10 μ g a intervalos de 2 μ g y de la muestra problema de *E. histolytica* se utilizó 10 μ l, posteriormente todas se aforaron a 200

µl con agua bidestilada y se les agregó a cada una 1 ml de reactivo de Bradford, (Disolver 100 mg de azul brillante Coomassie G en una mezcla de 100ml de ácido fosfórico al 85% y 50ml de etanol al 95%. Tras disolución completa del colorante, llevar a un litro con agua bidestilada) se mezcló cada tubo y se leyó a 595 nm. Simultáneamente al procesamiento de las muestras se desarrolló una curva patrón de seroalbúmina bovina en el rango de 0 a 10 µg a intervalos de 2 µg, para conocer la concentración de proteína de la fase soluble de los extractos de *E. histolytica*.

4.6.3 Cuantificación de proteína por el método de Schacterle y Pollack (1973) modificado por Pugley y Schnaitman (1978)

La cuantificación de proteína no soluble se llevó a cabo por el método de Schacterle y Pollack (1973) modificado por Pugley y Schnaitman (1978). El procedimiento se describe a continuación:

La muestra se resuspendió en 2.0 ml de solución acuosa de SDS al 5%, se agitó vigorosamente y se dejó en incubación a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos, para permitir la solubilización de las membranas. Transcurrido ese tiempo, se adicionó 1.0 ml de reactivo alcalino (solución de NaOH 2%, Na₂CO₃ 10%, KNAC₄O₆.4H₂O 0.10% y CuSO₄ 0.078%) y finalmente 0.25 ml de reactivo de Fenol Folin-Ciocalteau 2 N (Sigma). El desarrollo de color de esta reacción se llevó a cabo por incubación de las muestras a 56-57°C por 5 min en baño María. Se midió la absorbancia de las muestras a 650 nm.

Simultáneamente al procesamiento de las muestras se desarrolló una curva patrón de seroalbúmina bovina en el rango de 0 a 40 µg a intervalos de 5 µg, para la cual se emplearon los mismos reactivos y procedimiento que para las muestras de membranas.

Todos los puntos de la curva patrón y de las muestras se hicieron por duplicado.

4.7 Electroforesis de las proteínas de *E. histolytica*

La separación de proteínas presentes en los extractos de *E. histolytica* se realizó mediante un corrimiento electroforético (Hunkapiller *et al.*, 1983) en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), usando la técnica desarrollada por Laemmli (1970), que posee mayor sensibilidad para el análisis y detección de las proteínas y péptidos (Hunkapiller *et al.*, 1983)

La técnica se aplicó usando un gel de separación al 10% (tabla 3), en cada carril del gel se cargó una muestra de 20 µl (25 µg de proteína) dejando un carril para el marcador de pesos moleculares (20-118 kDa). La electroforesis se realizó en una cámara vertical mini PROTEAN® System (BIO-RAD) a 100 volts durante 90 minutos.

Tabla 3. Gel de poliacrilamida-bis

Gel separador 10%	ml
Agua bidestilada	4.0
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 2.7%	3.3
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.0	2.5
SDS 10%	0.1
NaCl 20%	0.2
PSA	0.04
TEMED	0.01
Gel concentrador 4%	ml
Agua bidestilada	1.4
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 2.7%	0.33
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.25
SDS 10%*	0.02
PSA *	0.02
TEMED*	0.002

* ver tabla de abreviaturas, Apartado I

Posteriormente se colocó la muestra con 20 μg (15 μl) de proteína aproximadamente, según los resultados calculados en la recta de ajuste hecha con los valores obtenidos de la técnica de determinación de proteína.

Se añadió 4 μl del buffer de muestra y 2 μl de β -mercaptoetanol y se agita la muestra y se coloca en baño María durante 5 minutos a partir de que el agua está en ebullición, este proceso sólo se aplica para las muestras en las cuales se desea conocer los pesos moleculares. Posteriormente se cargó la muestra en

cada uno de los pozos con una jeringa Hamillton. Se corre la electroforesis a 100 volts durante 90 minutos.

Para teñir los geles se utilizó una solución de azul de Coomassie R-250 0.1%, metanol 40 % y ácido acético 10% este es un método estándar para detección de proteínas (el límite de visibilidad requerido es de 0.1-1.0 µg de proteína por banda) Para quitar el exceso de colorante en el gel se lavó con ácido acético al 10%.

4.8 Zimograma

Esta técnica posee el mismo principio que SDS-PAGE, ya que puede copolimerizarse el gel con un sustrato degradable como gelatina, hemoglobina, caseína, entre otros (Luna *et al*, 2001).

Para determinar la presencia de actividad proteolítica se realizaron zimogramas copolimerizado con sustratos degradables como gelatina (Sigma) al 0.1% y/o hemoglobina (Sigma) al 0.05% (tabla 4). Los geles copolimerizados con gelatina al 0.1% son más inespecíficos a la actividad proteolítica y los geles copolimerizados con hemoglobina son específicos para hemoglobinasas.

La muestra se prepara con el buffer de muestra, y no se coloca β-mercaptoetanol y no se deja en ebullición, ya que si se dejara la muestra se degradaría y la actividad proteolítica disminuiría.

**Tabla 4. Gel de poliacrilamida-bis
(copolimerizado con sustrato degradable*)**

Gel separador 10%	ml
Agua bidestilada	3.0
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 2.7%	3.3
* Gelatina 0.1% o hemoglobina 0.05%	1.0
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.0	2.5
SDS 10%	0.1
NaCl 20%	0.2
PSA	0.04
TEMED	0.01
Gel concentrador 4%	ml
Agua bidestilada	1.4
Acrilamida 30%, bis-acrilamida 2.7%	0.33
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.25
SDS 10%	0.02
PSA	0.02

La técnica se aplicó usando un gel de separación al 10%, en cada carril del gel se cargó una muestra de 20 μ l (20-25 μ g de proteína) dejando un carril para el marcador de pesos moleculares (20-118 kDa). La electroforesis se realizó en una cámara vertical mini PROTEAN® System (BIO-RAD) a 100 volts durante 90 minutos.

Enseguida el gel se colocó en agitación en una solución con Tritón X-100 al 2.5% durante una hora, para retirar el exceso de SDS que puede interferir con las actividades proteolíticas.

Posteriormente para activar el gel se coloca en un buffer de activación (Tabla 5) y se dejó incubando 24 horas a 37°C en un incubador (modelo HEPA CLASS 100).

Tabla 5. Buffer de activación (30 ml)

Componente	concentración
Tris-HCl, pH 7.5	0.05 M
EDTA	0.0025M
β-mercaptoetanol	10%

Finalmente se tiñó con la solución de Coomassie para geles de acrilamida y se lavó con ácido acético al 10%, la degradación se observó como zonas blancas en un fondo azul.

4.9 Transferencia electroforética semi-seca a membrana IMMOBILON™

Se transfirió la proteasa a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF) en una cámara de transferencia semi-seca (BIO-RAD), por 120 minutos a 20 volts, 0,8 mA por cm². Se utilizó la misma solución amortiguadora de transferencia que contiene 3-[ciclohexilamino]-1 ácido propano sulfónico (CAPS) para el cátodo y el ánodo (ver tabla 6)

Tabla 6. Buffer de transferencia (CAPS)

Componente	concentración
CAPS	0.01 M
METANOL	10%
pH	ajustado a 11.0

Luego de la transferencia, la membrana de PVDF se lavó tres veces por diez minutos cada vez, con agua desionizada, y se tiñó con una solución de Coomassie R250 0.1% y metanol 45%.

Posteriormente se lavó con varios cambios de metanol 45% y ácido acético al 10%.

Para finalizar, la membrana se lavó nuevamente con agua desionizada y se dejó secar en papel filtro a temperatura ambiente.

4.10 Estructura primaria de la enzima de 70 kDa de *E. histolytica*

La banda de 70 kDa obtenida de *E. histolytica* en los geles de electroforesis se mandó a analizar en el departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica* se analizó por la técnica de MALDI-TOF, con los fragmentos obtenidos por la digestión con tripsina del purificado se realizó una electroforesis en condiciones ácidas, las bandas se cortaron con un escalpelo y se digirieron con 0.5 µg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0, a

Aislamiento y purificación de una cisteín proteasa activa de 70 kDa de *Entamoeba histolytica*

37°C, por 24 horas. La secuencia se determinó por espectrometría de masas en un espectrómetro Finnigan (MAT, Bremen, Germany) equipado con un láser de luz UV de 337 nm, con bombardeo de protones. Como gas de arrastre se utilizó helio de alta pureza. Se llevó a cabo la hidrólisis trípica de la proteína y se analizaron los patrones de fragmentación. Los masas monoisotópicas se compararon con fragmentos de otras proteínas conocidas de la base de datos del NCBI en la pagina <http://bioinformatics.genomicsolutions.com/service/prowl/profound.html> y se obtuvo su posible identidad por homología con otros péptidos de diferentes especies.

5. RESULTADOS

5.1 Localización de una cisteín proteasa de alto peso molecular

Se realizó una electroforesis desnaturalizante (figura 6-A) y un zimograma (figura 6-B) con el objetivo de determinar el peso molecular y la actividad de la proteasa que deseábamos purificar, de las diferentes fracciones de *E. histolytica*. Al extracto se adicionó un cóctel de inhibidores para: serín proteasas (PMSF), inhibidor para aspártico proteasas (pepstatina A) y un inhibidor para metaloproteasas (EDTA). Los resultados se muestran en las figuras siguientes:

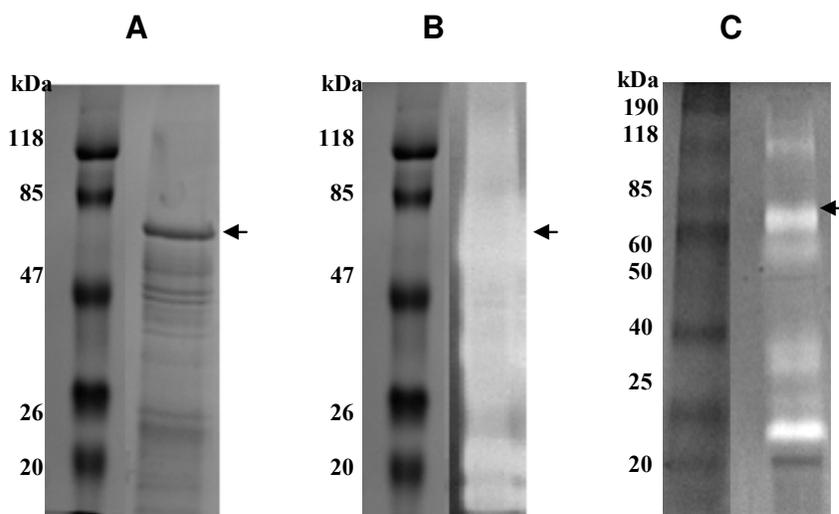


Figura 6. A: SDS-PAGE 10% donde se identifica una proteína de aproximadamente 70 kDa de los extractos de *E. histolytica* (flecha). B: zimograma copolimerizado con gelatina 0.1% para ver actividad de los extractos de *E. histolytica*, se observa que en la zona donde se encuentra la banda de 70 kDa existe actividad proteolítica (flecha). C: zimograma copolimerizado con hemoglobina 0.05%, se observa una banda de 70 kDa con actividad de hemoglobinasas. Los extractos fueron inhibidos con PMSF, EDTA y Pepstatina A.

Se elaboró una curva (figura 7) de pesos moleculares con los marcadores y la distancia que migraban en la electroforesis. La migración de los marcadores de peso molecular describe un comportamiento logarítmico en función del tamaño de la proteína (kDa). Al sustituir la distancia que migró nuestra proteína de interés que deseamos purificar en la ecuación de la gráfica, se obtuvo su peso aproximado. El peso molecular de la proteína que se obtuvo con la ecuación, es de 70 kDa.

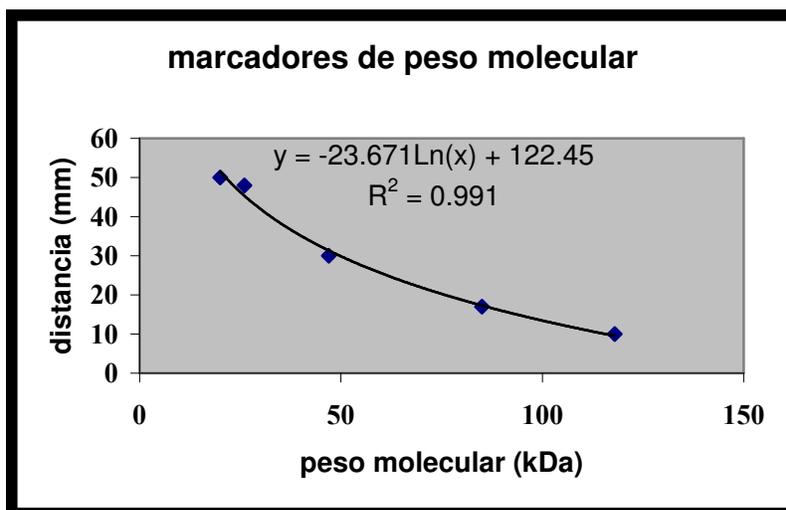


Figura 7. Migración de las proteínas (mm) en SDS-PAGE al 10% en función de su peso molecular. Su migración es descrita por la ecuación en el interior de la figura.

5.2 Calibración de la columna de exclusión molecular

Conociendo el peso molecular aproximado de la enzima, se procedió a calibrar una columna de exclusión molecular de sephadex-G100 para saber el tiempo de retención de la proteasa de 70 kDa de nuestro interés. El volumen muerto de dicha columna se obtuvo utilizando un colorante conocido como azul dextran (2 000 000 Da).

Para obtener las fracciones con el peso molecular deseado se utilizó cuatro proteínas de peso molecular conocido: β -galactosidasa (116 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa), con el objetivo de conocer en qué fracción sale la proteasa de 70 kDa de *E. histolytica*. Las cuatro proteínas de peso molecular conocido se corrieron en la columna de exclusión molecular y se colectaron fracciones de 500 μ l. Posteriormente se cuantificó la proteína de cada una de las fracciones por el método de micro Bradford y con los datos obtenidos de la cuantificación de proteínas se elaboró una gráfica, estos datos se muestran en la figura 8:

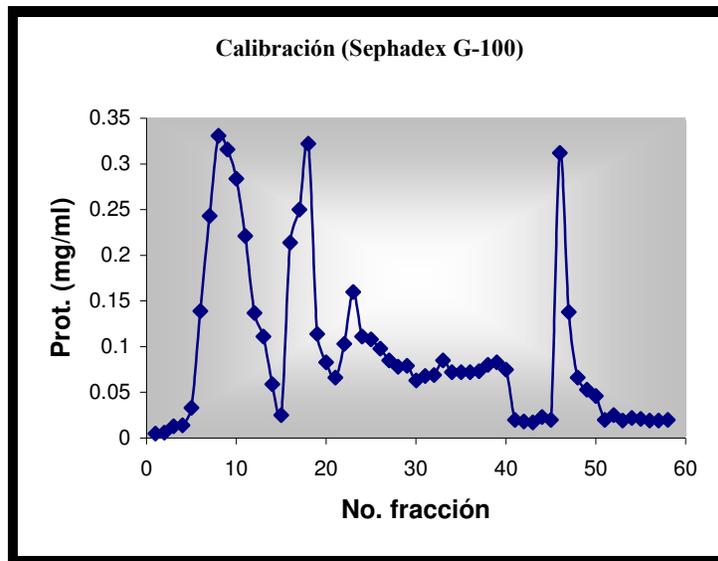


Figura 8. Perfil de elución de proteínas en la columna de exclusión molecular. Se muestran los picos máximos de concentración de las cuatro proteínas: β -galactosidasa (116 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) y la fracción en que salieron.

Se analizó el comportamiento de las cuatro proteínas en la columna de exclusión molecular en función del volumen y número de la fracción. Se utilizaron

las fracciones con mayor concentración de proteína y basándose en su peso molecular se elaboró una curva (figura 9), donde se muestra una ecuación en la cual se interpola el valor del peso molecular de la proteasa de 70 kDa, para obtener el número de fracción en la que debe salir esta proteína. Sustituyendo el peso molecular en la ecuación se esperaría que la proteasa de 70 kDa saliera en la fracción 15.

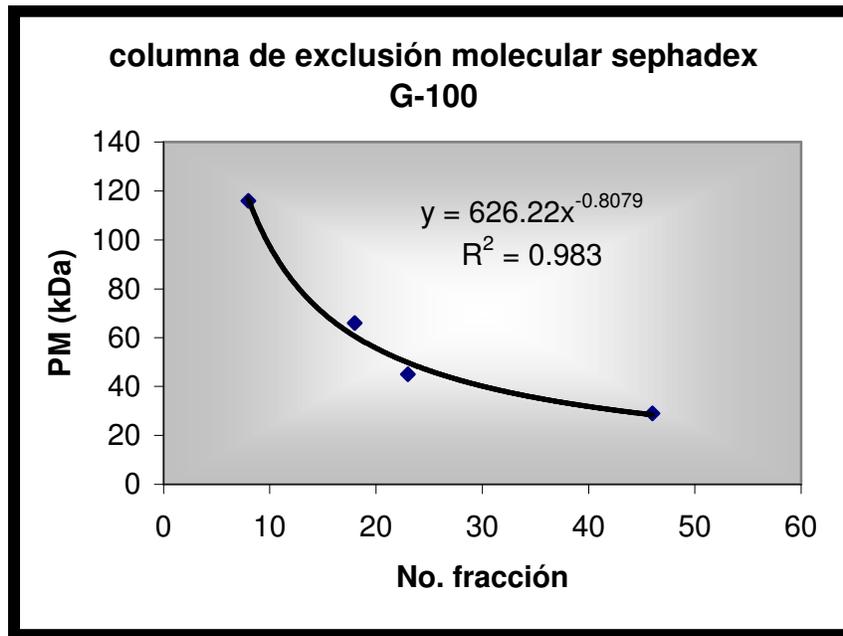


Figura 9. Migración de proteínas en donde se muestran los valores de peso molecular de las cuatro proteínas: β -galactosidasa (116 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa) y las fracciones en que se colectaron.

5.3 Obtención de la cisteín proteasa de 70 kDa por exclusión molecular (fase soluble)

Se separó el extracto de *E. histolytica* en dos fases: soluble en medio acuoso e insoluble, para eluirlos en columnas de exclusión molecular por

separado. Con base en los resultados mostrados en la figura 8 se calculó que la proteasa de 70 kDa saldría en la fracción 15. Se colectaron 53 fracciones de 500 μ l y se detectó proteína a 280 nm, los resultados muestran una mayor absorbancia en las fracciones 7-17 (figura 10). La detección de proteína de la fase soluble se muestra a continuación.

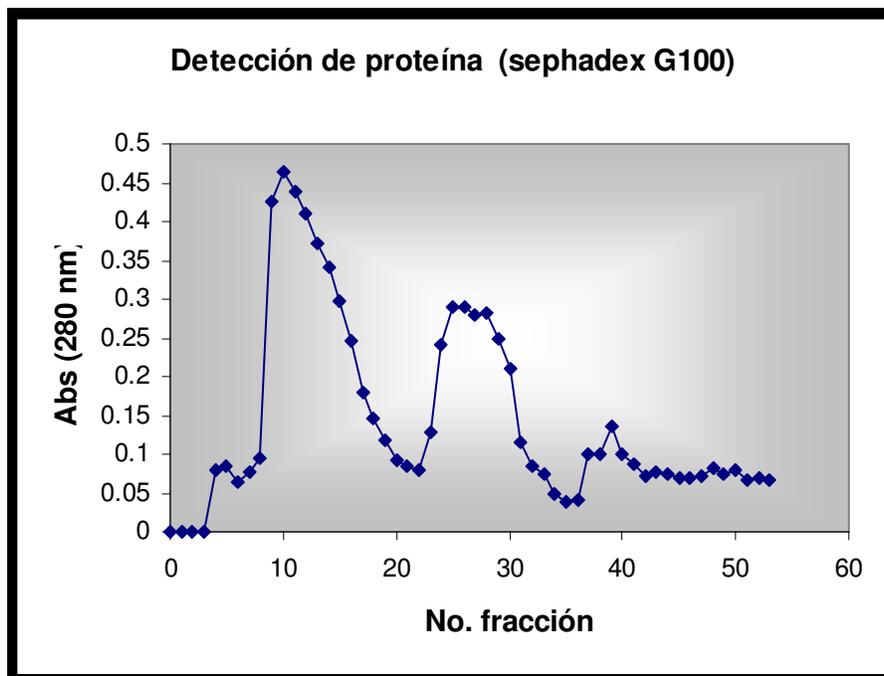


Figura 10. Perfil de elución en exclusión molecular y detección de proteínas por luz UV a 280 nm, se muestra la separación de proteínas en la columna de cromatografía de exclusión molecular, se observa el perfil de elución para cada una de las fracciones de la fase soluble de *E. histolytica* que se colectaron.

Para conocer la concentración de proteína de las fracciones que se colectaron de la columna de exclusión molecular, se cuantificó la proteína por el método de micro Bradford.

En la figura 11 se muestra que la mayor concentración de proteínas se encuentra entre las fracciones de la 7 a la 17, estos datos concuerdan con los datos de la detección de proteína a 280 nm.

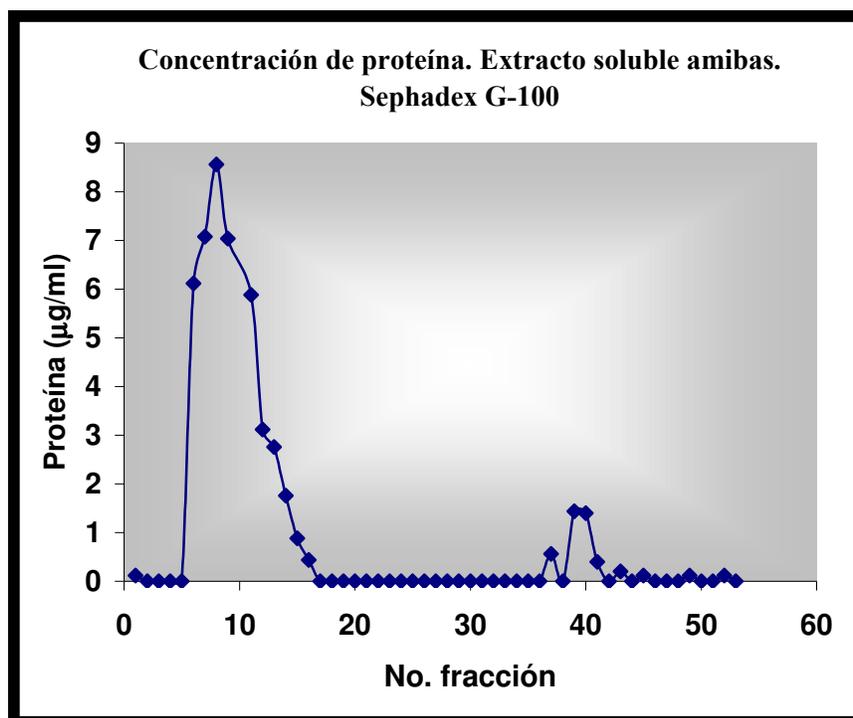


Figura 11. Perfil de elución de las fracciones de la columna de exclusión molecular. Se observa la máxima concentración de proteína de la fase soluble de los extractos de *E. histolytica*.

5.3.1 Identificación de la cisteín proteasa (fase soluble) en geles de poliacrilamida

Se tomó las fracciones alrededor del peso molecular deseado con mayor cantidad de proteína, se corrieron en un gel de poliacrilamida y se determinó el

peso molecular de las proteínas presentes en la fase soluble de los extractos de *E. histolytica*. Para las muestras de la fase soluble de la columna de filtración en gel se tomaron las fracciones de la 7 a la 17.

Las proteínas presentes y los pesos moleculares de las muestras de la fase soluble de los extractos de *E. histolytica* colectadas de la columna de exclusión molecular se observan en la figura 12:

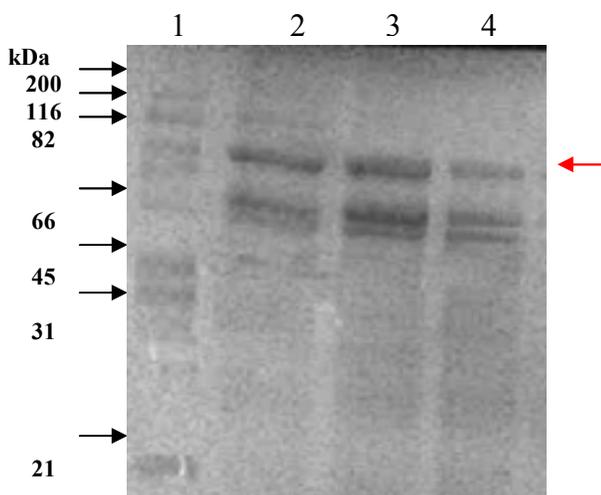


FIGURA 12. Electroforesis (SDS-PAGE 10%) de las fracciones solubles de la cromatografía de filtración en gel (sephadex G-100). Se muestra el marcador con los pesos moleculares del lado izquierdo (carril 1), la fracción 14 (carril 2), la fracción 15 (carril 3), la fracción 16 (carril 4), en estas fracciones se observa una banda que corresponde a una proteína con el peso molecular estimado de 70 kDa (flecha roja).

5.4 Obtención de la cisteín proteasa de 70 kDa por exclusión molecular (fase no soluble)

Se eluyó la fracción no soluble de los extractos de *E. histolytica* en otra columna de exclusión molecular (sephadex G-100) en presencia de SDS. Para

estas fracciones de la fase no soluble del extracto de *E. histolytica* se presentan los picos máximos de absorción a 280 nm. Los datos en la figura 13 muestran que las fracciones 4-7 hay proteína para la fase no soluble de los extractos de *E. histolytica*.

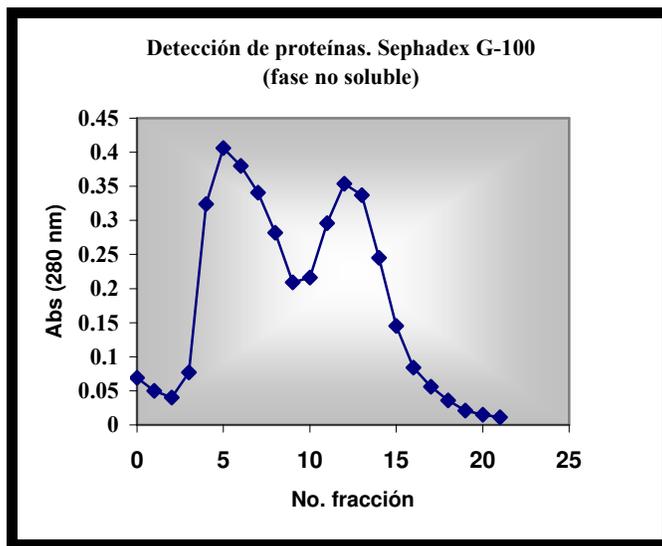


Figura 13. Perfil de elución y detección de proteínas por luz UV a 280 nm. Se muestra la separación de proteínas de cromatografía en columna de exclusión molecular, se observa el perfil de elución para cada una de las fracciones de la fase no soluble de *E. histolytica*.

5.5 Obtención de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica* por intercambio iónico

Se eluyó la fase soluble del extracto de *E. histolytica* en una columna de intercambio iónico con DEAE-celulosa, se colectaron las fracciones y se detectó proteína total con luz UV a 280 nm. Posteriormente se analizó y se cuantificó por el método de micro Bradford (595 nm). De las fracciones que se colectaron, la máxima concentración de proteínas se muestra en la siguiente tabla:

NaCl (fracciones)	Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)
1) 10 mM	1.9
2) 200 mM	10.4
3) 1.0 M	4.3
4) 1.0 M	3.8

TABLA 7: Cuantificación de proteína por el método de micro Bradford (Abs 595 nm) de la fase soluble de los extractos de *E. histolytica* para las fracciones colectadas de la columna de intercambio iónico DEAE-celulosa a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (10 mM, 200 mM y 1.0 M).

En la tabla 7 se muestra la concentración máxima para las cuatro fracciones colectadas de la columna de intercambio iónico. Se tomó la fracción número 2 y se analizó para conocer sus pesos moleculares y para observar su actividad, puesto que las muestras estaban muy diluidas no se pudieron identificar sus pesos moleculares y su actividad se presenta muy difusa (figura 15, carriles 6 y 7). Las proteínas que se unieron a esta columna tienen una naturaleza aniónica, aunque débil, ya que se requirió una concentración baja de sales para precipitarlas como se muestra la tabla 7 (fracción 2).

5.6 Actividad proteolítica de las cisteín proteasas presentes en las fracciones de exclusión molecular e intercambio iónico.

Las muestras con mayor concentración de proteína de la columna de exclusión molecular e intercambio iónico se corrieron en un zimograma

copolimerizado con gelatina porcina, para ubicar la actividad proteolítica para cada una de las técnicas aplicadas. La actividad proteolítica se identifica como una zona blanca en el gel. Las proteínas que degradaron este sustrato corresponden a las fracciones no solubles 4, 5 y 6 (carriles 1, 2 y 3); a las fracciones solubles 14 y 15 (carriles 4 y 5); y a las fracciones de intercambio iónico 2 y 3 (carriles 6 y 7). La actividad de cada una de las fracciones se muestra en la figura 14:

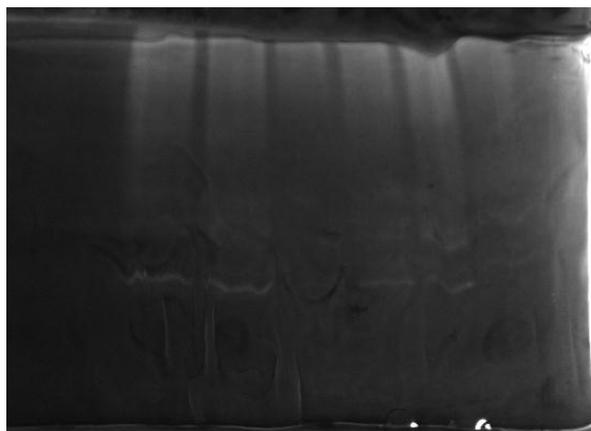


FIGURA 14. Zimograma copolimerizado con gelatina porcina al 0.1% que muestra la actividad proteolítica de las fracciones en las cuales se presenta actividad de alto peso molecular, las fracciones corresponden a las de la fase no soluble (carril 1, 2 y 3), fase soluble (carriles 4 y 5) y las fracciones de intercambio iónico (carriles 6 y 7).

Estos resultados muestran la actividad proteolítica de alto peso molecular para las fracciones de la columna de exclusión molecular y de intercambio iónico.

5.7 Inhibición de cisteín proteasas con $ZnCl_2$ (Inhibidor reversible)

Se realizó un zimograma para conocer la actividad de las proteasas presentes en el extracto de *E. histolytica* tanto de la fase soluble como de la no

Aislamiento y purificación de una cisteín proteasa activa de 70 kDa de *Entamoeba histolytica*

soluble. La mitad del gel con las muestras se incubó con el inhibidor reversible para cisteín proteasas ($ZnCl_2$) y la otra mitad se activó de forma normal. Los resultados muestran una inhibición de la actividad proteolítica en un 90% aproximadamente en presencia de $ZnCl_2$ con respecto al gel activado en ausencia del inhibidor según se muestra en la figura 15

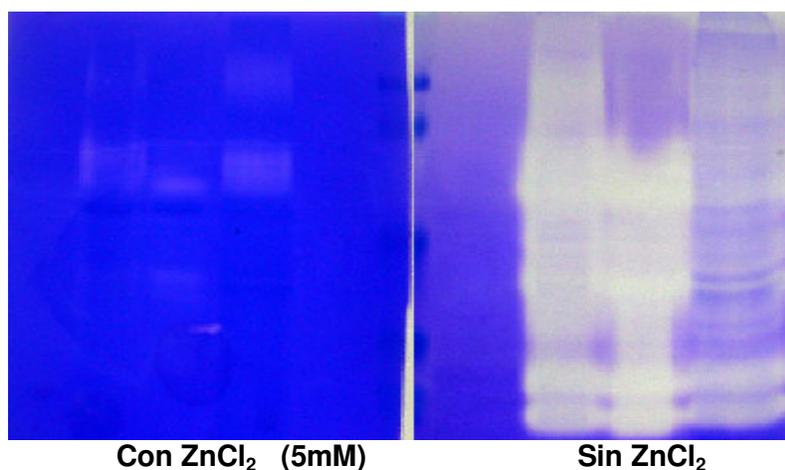


FIGURA 15. Zimograma copolimerizado con gelatina al 0.1%. Las muestras que se utilizaron fueron el extracto total (E) dilución 1:5, la fracción soluble (S) y no soluble (N) de *E. histolytica*.

Se elaboraron zimogramas para conocer el grado de inhibición de varias concentraciones de $ZnCl_2$ sobre la actividad proteolítica. Se copolimerizó el gel de poliacrilamida con gelatina porcina al 0.1% y se incubó a distintas concentraciones del inhibidor 1.0, 2.5 y 5.0 mM. Los resultados muestran que la actividad proteolítica disminuye conforme aumenta la concentración de $ZnCl_2$, como se puede ver en la figura 16:

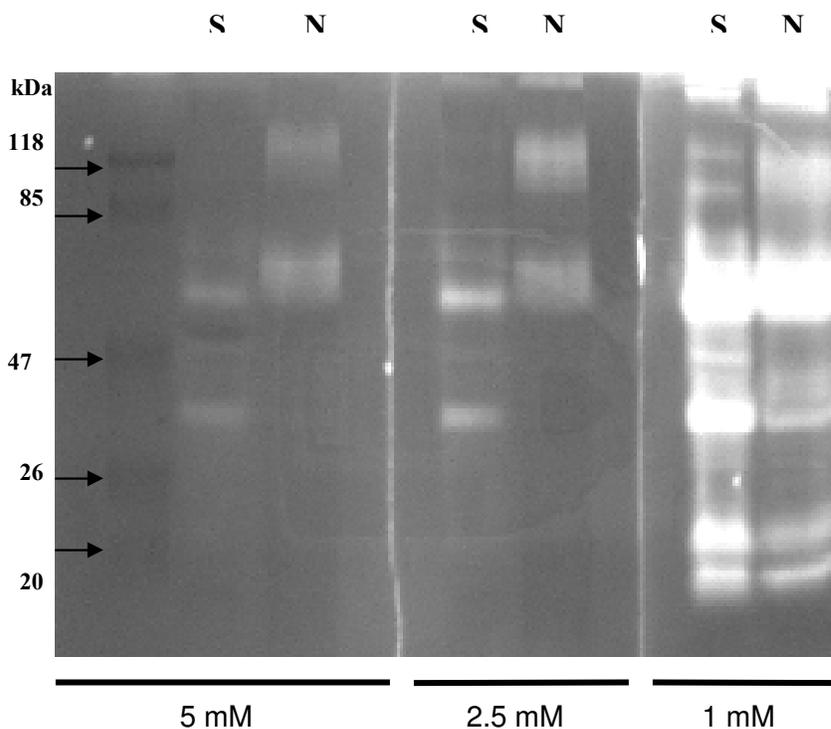


FIGURA 16. Inhibición de las cisteín proteasas de *E. histolytica*, fracciones solubles (S) y no solubles (N), por el ZnCl₂ (inhibidor reversible). Las concentraciones de ZnCl₂ utilizadas fueron 0.5, 2.5 y 5 mM. SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina porcina (0.1%).

5.8 Obtención de cisteín proteasas de *E. histolytica* por ultrafiltración

Utilizando las membranas de ultrafiltración se obtuvo una mayor concentración de proteínas con respecto de la columna de exclusión molecular y de la columna de intercambio iónico. En el sistema de ultrafiltración Amicon se utilizaron membranas con un límite de retención de 50 kDa, usando como gas presurizador inerte al nitrógeno. La muestra se mantuvo en un amortiguador en presencia de ZnCl₂. (5 mM). Se realizó cuantificación de proteínas de las

fracciones que colectamos de la ultrafiltración por el método de micro Bradford para las fracciones solubles y por el método modificado de Schacterle y Pollack para las fracciones no solubles (tabla 8):

MUESTRA	Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)	
Extracto total	1115.0	
Fracción soluble	781.06	
Ultrafiltración soluble (> 50 kDa)	566.6	71%
Fracción no soluble	478.1	
Ultrafiltración (no soluble) (> 50 kDa)	287.08	60%

TABLA 8. Concentración de proteínas y porcentaje que representa el extracto de *E. histolytica* con respecto de las fracciones que se separaron de la fase soluble y no soluble de la ultrafiltración.

En la tabla 8 también se muestran los porcentajes que corresponden a proteínas mayores de 50 kDa separadas por ultrafiltración para ambas fracciones solubles y no solubles.

5.9 Actividad proteolítica de las fracciones de la ultrafiltración

En la figura 17 se observa la actividad proteolítica de las fracciones (soluble e insoluble) de ultrafiltración en un zimograma copolimerizado con gelatina porcina al 0.1%. La actividad proteolítica de cisteín proteasas de las fracciones soluble y no soluble de la ultrafiltración es evidente, se concentra muy bien la muestra,

además de observar la eliminación de proteasas menores de 50 kDa. En la figura 17 se observa la actividad de cisteín proteasas de peso molecular superior a 50 kDa. Durante la ultrafiltración se mantuvo a las proteínas en presencia del amortiguador con $ZnCl_2$.

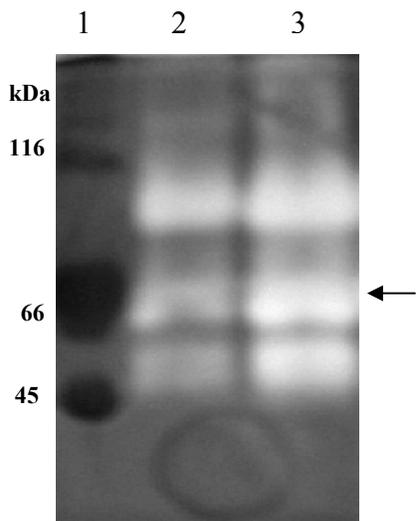


FIGURA 17. Zimograma copolimerizado con gelatina porcina 0.1%. Se muestra los pesos moleculares (carril 1), ultrafiltración no soluble (carril 2) y ultrafiltración soluble (carril 3). Banda de 70 kDa (flecha)

5.10 Aislamiento de cisteín proteasas por afinidad

Las cisteín proteasas de bajo peso molecular (< 50 kDa) se eliminaron mediante la ultrafiltración, como se demostró en la figura 17, de esta manera, se elimina competencia por los sitios de unión al E-64 en la columna de afinidad. Se identificó la banda de 70 kDa de las muestras de ultrafiltración de la fase soluble y se pasó la muestra por la columna de afinidad unida con el inhibidor E-64 para obtener cisteín proteasas de alto peso molecular. El E-64 unido a la columna con tiopropil sepharose 6-B, tiene la capacidad de unirse al sitio catalítico de las cisteín proteasas reversiblemente, ya que el E-64 está unido de forma irreversible a la

resina a través de su grupo tiol, que es el que se une a las cisteín proteasas y las inhibe de forma irreversible. La fracción con proteínas mayores a 50 kDa se mantuvo en presencia de un amortiguador con el inhibidor reversible ($ZnCl_2$) para inhibir la actividad de las cisteín proteasas. Se colectaron 4 fracciones, que posteriormente se liofilizaron y se determinó la concentración de proteína dando los siguientes resultados:

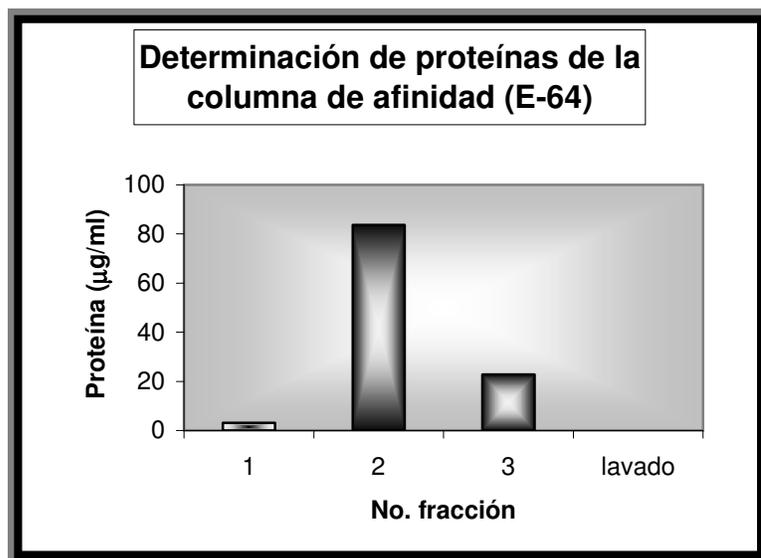


FIGURA 18. Cuantificación de proteína obtenida de las fracciones solubles con la cromatografía de afinidad con E-64. Se observa que la mayor concentración de proteína se da en la fracción 2 (82 µg/ml).

En la figura 18, obtenida de la cromatografía de afinidad, se observa que en la segunda fracción existe la mayor concentración de proteína. Dicha fracción debe corresponder mayoritariamente a cisteín proteasas aisladas de la columna de afinidad. Se deduce que son cisteín proteasas, puesto que el E-64 en la columna se une al sitio catalítico de las cisteín proteasas de modo reversible, además de utilizar un cóctel de inhibidores para otro tipo de proteasas como: serín

proteasas, metaloproteasas y aspártico proteasas. También se utilizó el $ZnCl_2$ como inhibidor reversible para cisteín proteasas y se activaron con EDTA Y β -mercaptoetanol. En esta técnica se encontró proteínas de alto peso molecular y principalmente activas (figura 18), se liofilizó la muestra para concentrar la proteína y poder cargar en el zimograma una mayor cantidad de esta fracción.

5.10.1 Actividad proteolítica en las fracciones colectadas por afinidad

Se tomó la fracción 2 (que se muestra en la figura 18) en donde encontramos la mayor cantidad de proteína de la columna de afinidad con E-64 y se corrió en un zimograma copolimerizado con gelatina porcina al 0.1%, donde los resultados se muestran en la figura 19:

La muestra está inhibida con PMSF, EDTA y pepstatina A. Este cóctel ayuda a inhibir la actividad de otro tipo de proteasas (serín proteasas, metaloproteasas y aspártico proteasas) que pueden interferir con las cisteín proteasas.

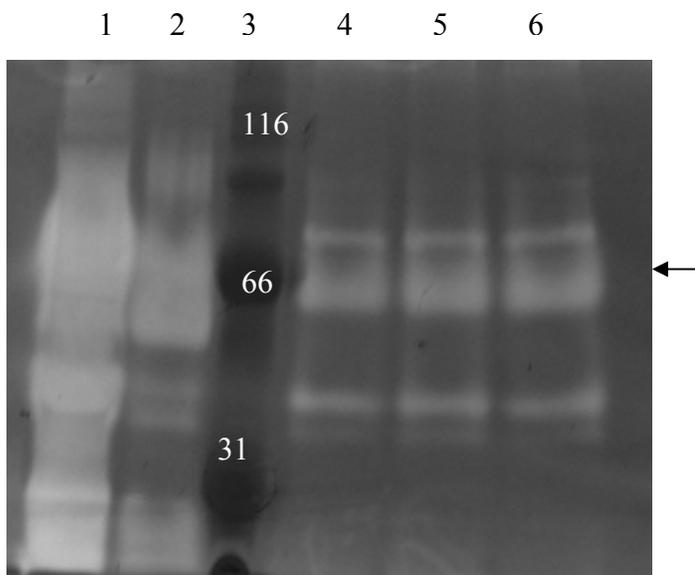


FIGURA 19. Zimograma (10%), copolimerizado con gelatina 0.1%, mostrando la actividad proteolítica de las fracciones de la columna de afinidad donde se observa la fracción soluble (carril 1), la fracción soluble después de la ultrafiltración (carril 2), marcador de pesos moleculares (carril 3), tres repeticiones de la fracción 2 de la columna de afinidad con E-64 (carriles 4, 5 y 6), se observan tres bandas de aproximadamente 45, 70 y 90 kDa. La fracción esta inhibida con PMSF, EDTA y pepstatina A.

En la figura 19 se muestra la actividad de cisteín proteasas aisladas en la columna de afinidad, en las cuales se muestra una banda de 70 kDa (flecha) con una evidente actividad que corresponde a una cisteín proteasa que se separó por afinidad.

5.11 Tabla comparativa de métodos

Con todos los datos que obtuvimos durante el proceso de aislamiento de la proteasa de 70 kDa se elaboró una tabla comparando los métodos de cromatografía (exclusión molecular, intercambio iónico, ultrafiltración y afinidad) empleados para separar la proteína (tabla 9):

Método	Cantidad de proteína (µg/ml)	Actividad proteolítica (gelatina)	Actividad proteolítica (hemoglobina)	Tiempo de obtención (min)
Exclusión molecular Sephadex G-100 (fase soluble)	8.8	Difusa	Nula	120
Exclusión molécula Sephadex G-100 (fase no soluble)	<8.8	Difusa	Nula	90
Intercambio iónico DEAE-celulosa	10.4	Difusa	No	90
Ultrafiltración (soluble)	566.6	Sí	Sí	20
Ultrafiltración (no soluble)	287.8	Sí	Difusa	20
Columna de afinidad (tiopropil sepharose 6B E-64)	82	Sí	No	60

Tabla 9. Comparación de metodologías donde se muestran los resultados obtenidos para cada una de las técnicas empleadas para aislar la cisteín proteasa de 70 kDa.

5.12 Cisteín proteasa de 70 kDa y virulencia de *E. histolytica*

En el transcurso de la purificación de la cisteín proteasa de 70 kDa, con frecuencia ocurría que dicha proteasa desaparecía de los zimogramas sin razón aparente. Se probó la purificación de la cisteín proteasa a partir de extractos hechos con amibas cultivadas bajo diferentes condiciones, tanto en el laboratorio como en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Eventualmente descubrimos que la cisteín proteasa de 70 kDa se expresaba considerablemente más en cepas virulentas de *E. histolytica* que en cepas que han perdido la virulencia. Para corroborar esto, se probó la virulencia de una cepa de *E. histolytica* en hígado de hámster (causante de un daño hepático de alrededor del 40%), así como otra cepa sin virulencia. Al mismo tiempo se comprobó que con el paso del tiempo la virulencia de cepas cultivadas en medio axénico disminuía. En la figura 20 se muestra un zimograma en un gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con hemoglobina humana al 0.05%. Los resultados demuestran una mayor síntesis de la cisteín proteasa de 70 kDa en los extractos de *E. histolytica* virulenta (carril 3) que en la cepa sin virulencia (carril 2). Lo anterior sugiere una posible participación de esta proteasa en la virulencia de *E. histolytica*.

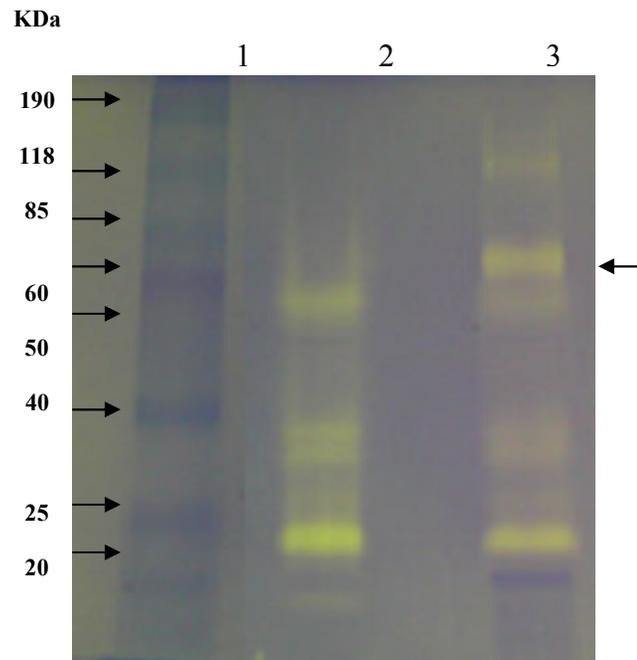


FIGURA 20. Zimograma de la actividad de hemoglobinasas de cepas de *E. histolytica*. Carril 1, marcadores de pesos moleculares; carril 2, extracto de *E. histolytica* no virulenta y carril 3, extracto de *E. histolytica* virulenta (comprobada en hígado de hámster). La flecha (derecha) muestra la actividad de una hemoglobinasa de 70 kDa. Gel SDS-PAGE 10%, copolimerizado con hemoglobina humana al 0.05%, muestra por carril 25 μ g. La muestra está inhibida con PMSF, EDTA y pepstatina A.

Adicionalmente, como se muestra en la figura 20, la cisteín proteasa de 70 kDa también tiene actividad de hemoglobinasa, la cual podría ser importante en la obtención de aminoácidos y hierro para la amiba.

5.13 Transferencia de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica* a una membrana PVDF

Ya identificada la banda que correspondía a la cisteín proteasa que nos interesa la cual tiene un peso molecular de 70 kDa (figura 23), se procedió a cortar la banda de 70 kDa con un bisturí y se corrió en un gel de electroforesis y posteriormente se realizó la transferencia de esta banda de 70 kDa a una membrana de PVDF con el objetivo de secuenciar la región amino terminal de esta proteína.

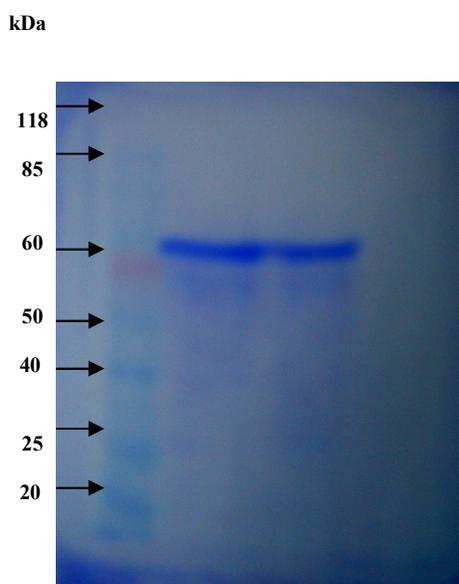


FIGURA 21. Transferencia de la proteasa de 70 kDa de *E. histolytica* a una membrana de PVDF.

5.13.1 Concentración relativa de la banda de 70 kDa de *E. histolytica*

Se elaboró una curva (figura 22) en una electroforesis con una proteína de peso molecular conocido (BSA, 66 kDa), a diferentes concentraciones para conocer la concentración aproximada de la proteína de 70 kDa.

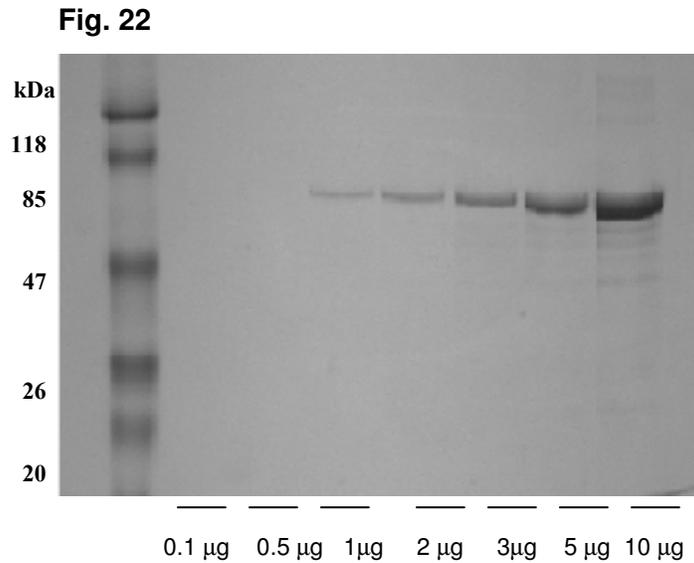


Figura 22. Concentración gradual de proteína (albúmina 70 kDa)

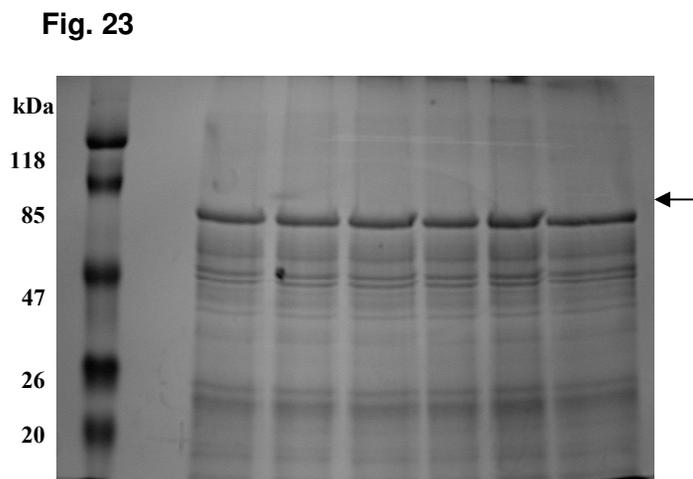


Figura 23. Extracto de *E. histolytica* (fase soluble) en un gel de electroforesis SDS-PAGE 10%, donde se observa la banda de 70 kDa para compararla con la curva de BSA y conocer su concentración aproximada

Con las bandas de BSA en esta curva se puede comparar su concentración y grosor con las bandas de la figura 23 en donde se encuentra la banda de 70 kDa (flecha) que corresponde con respecto a la figura 22 a una concentración aproximada a unos 3 µg/carril.

5.14 Secuenciación de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica*

Se mandó a secuenciar la región amino terminal de la cisteín proteasa de 70 kDa a Facultad de Medicina de la UNAM. Nos fue reportado que la proteasa está bloqueada en su región amino terminal y no se pudo secuenciar, sólo se obtuvieron los datos del análisis por espectrometría de masas de los fragmentos trípticos de la proteína. Se buscó la homología con enzimas de otros microorganismos, y se asignó la secuencia peptídica de la proteína homóloga.

Los fragmentos de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica* tienen homología con fragmentos de la secuencia de una DNA helicasa RecQ dependiente de ATP de *Burkholderia mallei* (tabla 10) y a una Acil-CoA sintetasa de *Ferroplasma acidarmanus* (tabla 14) ambas con una homología del 16%

Masa mono isotrópica	Posición del aminoácido	Secuencia peptídica
931.499	554-561	AWRAETAK
990.523	220-227	SQLLDFIR
1474.726	108-120	DGDIDLLYVAPER
1571.713	317-330	SVEGYQETGRAGR
1608.780	416-429	EAQMALSCVFRAQR
1788.887	264-278	ALPYHAGMEFEIRQK
2043.974	259-276	AQGVRALPYHAGMEFEIR
2235.110	228-248	AEHTNADGTTDAGVVYCLSRR

Tabla 10. Presecuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica*. La masa de los fragmentos corresponde con los de una DNA helicasa RecQ dependiente de ATP de *Burkholderia mallei* con una homología del 16%.

Masa mono isotrópica	Posición del aminoácido	Secuencia peptídica
1273.706	624-634	LSNMLIDLDIK
1287.724	218-228	FLSTLPDVIKR
1287.724	229-240	KPIIFLKGGMGK
1297.624	315-325	EGLNEIELPER
1608.780	328-341	HDLLSVMPEQSTPR
1704.903	23-38	VGNIILRNITSSFSGK
2233.065	460-477	NYIKDFEAMQLMEIYGIR
2540.170	101-123	ETDQHGAILEDQIMAIKESGIR

Tabla 11. Presecuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica*. La masa de los fragmentos corresponde con los de una Acil-CoA sintetasa de *Ferroplasma acidarmanus* con una homología del 16%.

6. DISCUSIÓN

E. histolytica es un protozooario que tiene gran impacto en la salud pública a nivel mundial ya que causa la amibiasis intestinal, principalmente en los países subdesarrollados como México. En *E. histolytica*, un organismo cuya virulencia depende de múltiples factores, uno de los principales es la liberación de cisteín proteasas para invadir el tejido del hospedero. Las cisteín proteasas extracelulares rompen las IgA, degradan la matriz extracelular y degradan las IgG limitando la respuesta inmune del hospedero (Que y Reed, 2000).

Resultados obtenidos en este trabajo apuntan que existen proteasas específicas que pueden estar involucradas en la virulencia del parásito, como es el caso de la cisteín proteasa de 70 kDa que se aisló de los extractos de *E. histolytica*, la cual tiene actividad de hemoglobinas. El peso molecular de esta proteasa se corroboró por dos técnicas diferentes como son filtración en gel y SDS-PAGE. Conviene recordar que esta proteasa se extrajo de la fracción soluble del extracto de *E. histolytica*. La proteasa de la fracción no soluble no fue caracterizada en su peso molecular, y aunque se observó por SDS-PAGE un peso molecular similar al de la proteína soluble, un estudio más detallado podría indicar ligeras diferencias en su masa molecular. De hecho, cabría esperarse la presencia de una región peptídica hidrofóbica extra que pudiese marcar la diferencia entre la proteína soluble y la no soluble. La proteasa de 70 kDa podría corresponder con la cisteín proteasa reportada por Serrano-Luna *et al* (1998), la cual presenta actividad en gelatina porcina y hemoglobina, además de presentar actividad proteolítica a pH neutro. La proteasa reportada en el trabajo de Serrano-Luna *et al*

(1998) tiene un peso molecular de aproximadamente 82 kDa, aunque no es claro si esa proteasa pertenece a la fracción soluble o la no soluble.

Serrano-Luna *et al* (1998), reportaron actividades proteolíticas de cisteín proteasas con pesos moleculares de 116, 82, 28 y 21 kDa, donde llama la atención la cisteín proteasa de 82 kDa por su alta actividad proteolítica. Cabe resaltar que los valores de peso molecular asignados a las proteasas de dicho trabajo, una vez que los analizamos, parecieran describir una migración lineal y no logarítmica como debería ser en SDS-PAGE al 12%. Se estimó el peso molecular de nuestra cisteín proteasa en una curva, donde se comparó la distancia (mm) que migraron los marcadores de referencia en SDS-PAGE 10% y el valor de su peso molecular (figura 6). El peso de la cisteín proteasa se calculó sustituyendo el valor de la migración (mm) de la proteína de *E. histolytica* en la ecuación de la curva, el valor que nos dio fue de 70 kDa. Así, se estimó que la proteasa de 82kDa que reportan Serrano-Luna *et al* (1998), en realidad tiene un peso molecular de 70 kDa y corresponde con la cisteín proteasa que aquí se identificó y aisló.

El protozooario *E. histolytica* tiene la habilidad de degradar la hemoglobina para extraer hierro, el cual es un factor importante en el metabolismo del parásito (Serrano-Luna *et al*, 1998). Basándose en estos datos es importante identificar este tipo de proteasas para su estudio ya que esta cisteín proteasa que reportamos de 70 kDa presenta actividad catalítica sobre hemoglobina.

El peso molecular de la cisteín proteasa de 70 kDa puede corresponder con el publicado por Franco *et al*, (1999) donde muestra un peso molecular de 68 kDa

tanto en SDS-PAGE como en zimogramas y que la actividad proteolítica es inhibida por el $ZnCl_2$.

El $ZnCl_2$ actúa como inhibidor reversible de cisteín proteasas, posee baja toxicidad en cantidades relativamente altas y es altamente soluble (Franco *et al*, 1999). El uso de este inhibidor nos dio excelentes resultados, puesto que la actividad catalítica de las proteasas se inhibía reversiblemente y cuando se requería se activaba con un amortiguador que contenía β -mercaptoetanol y EDTA el cual quela los iones zinc.

Para aislar esta cisteín proteasa de 70 kDa se utilizaron diferentes técnicas, una de ellas fue la columna de exclusión molecular en la que se eluyó por separado y en diferentes columnas la fase soluble y no soluble de los extractos de *E. histolytica*. Durante este proceso la muestra se inhibió con $ZnCl_2$ y posteriormente se activó con β -mercaptoetanol. En esta técnica se observaron proteínas activas con el peso molecular deseado, a pesar de que las muestras estaban muy diluidas. Basándose en una calibración con cuatro proteínas de peso molecular conocido (β -galactosidasa 116 kDa, albúmina sérica bovina 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa y anhidrasa carbónica 31 kDa) se supo en que fracción se esperaba encontrar la proteasa de 70 kDa. El uso del SDS para la fase no soluble presenta la desventaja técnica de que las proteínas presentes en la muestra pueden desnaturalizarse y perder su actividad. En los resultados se muestra que la presencia del $ZnCl_2$ inhibe en un 70% aproximadamente la actividad proteolítica de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica*.

Los resultados de la columna de intercambio iónico muestran que se separó proteína (tabla 11, fracción 2) de los extractos de *E. histolytica*. La fracción 2 se obtuvo con una concentración relativamente baja de sales (NaCl 200 mM) y cabe mencionar que la proteína aislada de esta columna posee una naturaleza aniónica. La concentración de proteína no era la suficiente para observarse en SDS-PAGE, la muestra estaba muy diluida y en los zimogramas la actividad proteolítica era muy difusa. Es posible que la misma naturaleza de la columna haya interferido con el Zn^{2+} , de tal manera que este ión divalente no pudo actuar como inhibidor y consecuentemente las cisteín proteasas haber tenido autoprosesamiento. Así, la razón de que se observe un barrido en la actividad proteolítica es probablemente debida a que las proteasas se degradaron o bien que la inhibición y/o activación de las proteasas no se desarrolló correctamente (figura 13, carriles 6 y 7).

El uso de un sistema de ultrafiltración con membranas Millipore con un límite de retención de 50 kDa facilitó el proceso de purificación de la cisteín proteasa, ya que concentraba la muestra, de tal modo que el peso molecular y la actividad proteolítica de la proteasa de 70 kDa era muy evidente en SDS-PAGE y zimogramas copolimerizados con gelatina y/o hemoglobina. Se pudo observar el corte de las proteasas mayores de 50 kDa que se retuvieron en la membrana (figura 16). La importancia de eliminar las proteasas menores de 50 kDa (y proteínas en general) radicó en disminuir la cantidad de proteína de bajo peso molecular y evitar que las proteasas pequeñas compitieran con la cisteín proteasa de 70 kDa en la columna de afinidad con el E-64. Durante este proceso la muestra

se inhibió con $ZnCl_2$ y posteriormente se activó el zimograma con β -mercaptoetanol y EDTA.

Se eluyó la fase soluble de la ultrafiltración en la columna de afinidad con E-64, recordando que el E-64 es un inhibidor que se unió irreversiblemente a la resina tiopropil sepharose 6B de modo que aún puede unirse al sitio catalítico de las cisteín proteasas de modo reversible, sin afectar su actividad (Govrin, 1999). Se colectaron cuatro fracciones donde la mayor cantidad de proteínas se encuentra en la fracción 2 (ver figura 17) y se liofilizó para concentrar la proteína. Posteriormente se cuantificó la proteína total por el método de micro Bradford (1976). Se corrió la fracción 2 en un zimograma y se identificaron tres bandas, donde se encontraba la banda con el peso molecular de 70 kDa. La importancia de utilizar esta técnica es eliminar proteasas que pueden interferir en la purificación de la cisteín proteasa de 70 kDa, ya que los sitios catalíticos de la cisteín proteasa son afines con el E-64 y la tiopropil sepharose 6B. Durante este proceso la proteasa se mantuvo inhibida con $ZnCl_2$. Los resultados muestran que $ZnCl_2$ 5 mM inhibe más del 70% la actividad proteolítica de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica*, por lo tanto es útil para su purificación.

Se cortó la banda de 70 kDa del gel de SDS-PAGE al 10% y se transfirió a una membrana de PVDF con un amortiguador especial (CAPS, pH 11), para posteriormente secuenciarla en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina. Se identificó que la región amino terminal estaba bloqueada y se obtuvieron las masas monoisotópicas de los fragmentos trípticos por espectrometría de masas. Estos resultados se analizaron en una base de datos y

Aislamiento y purificación de una cisteín proteasa activa de 70 kDa de *Entamoeba histolytica*

se encontró que tienen cierto grado de homología con enzimas de otros organismos, y se asignó la secuencia peptídica de la proteína homóloga. La masa de los fragmentos de la cisteín proteasa de 70 kDa de *E. histolytica* corresponde con la masa de los fragmentos de una secuencia de una DNA helicasa RecQ dependiente de ATP de *Burkholderia mallei* (tabla 10) y a una Acil-CoA sintetasa de *Ferroplasma acidarmanus* (tabla 11) ambas con una homología del 16%.

La cisteín proteasa de 70 kDa que aquí aislamos puede estar involucrada en el proceso de obtención de hierro a partir de la hemoglobina. Como recordaremos del trabajo de Serrano-Luna *et al* (1998), el hierro es fundamental para la supervivencia, crecimiento y reproducción de *E. histolytica*.

Un problema que se enfrentó en el transcurso de la purificación de esta cisteín proteasa de 70 kDa con actividad de hemoglobinasas, fue que espontáneamente y sin razón aparente, se perdía su actividad proteolítica en los cultivos que se mantenían en el laboratorio. Por esta razón, se trabajó con una cepa virulenta de *E. histolytica* cultivada en el CINVESTAV en la que el daño hepático causado a hámster era cercano al 40%. Dicha cepa se comparó con la cepa de *E. histolytica* que se mantenía en el laboratorio, en la cual se encontró que no tenía virulencia en hámster. Los extractos se observaron en un zimograma copolimerizado con hemoglobina con el objetivo de observar diferencias entre ambas cepas. Los resultados son de gran impacto, ya que la banda de 70 kDa aparecía en el cultivo virulento y prácticamente no aparecía en el cultivo sin virulencia que se mantuvo por un largo tiempo en el laboratorio. La importancia de este resultado es que esta cisteín proteasa de 70 kDa con actividad de

Aislamiento y purificación de una cisteín proteasa activa de 70 kDa de *Entamoeba histolytica*

hemoglobinas podría estar participando en la virulencia de *E. histolytica* lo que involucraría un próximo estudio a fondo acerca de esta proteasa y su posible participación en la virulencia del parásito.

La importancia de aislar cisteín proteasas involucradas en la virulencia del parásito *E. histolytica* constituye un reto para su estudio y determinación, por lo que es de gran relevancia conocer el papel que desempeñan estas proteasas en la invasión del parásito en el hospedero.

7. CONCLUSIONES

- ▣ Se logró aislar y purificar una cisteín proteasa de 70 kDa con actividad de hemoglobinasas de *E. histolytica* en la fase soluble del extracto.

- ▣ El $ZnCl_2$ inhibe reversiblemente la actividad proteolítica de las cisteín proteasas de *E. histolytica*.

- ▣ La mejor técnica para separar la proteasa de 70 kDa es con la ultrafiltración ya que concentra mejor la proteína.

- ▣ La cisteín proteasa de 70 kDa podría participar en la virulencia del parásito.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aucott J N, Ravdin J I. Amebiasis and "nonpathogenic" intestinal protozoa. Infect Dis Clin North Am. 1993; 7: 467-485.
- Barwick R S, Uzicanin A, Lareau S, Malakmadze N, Imnadze P, Iosava M, Ninashvili N, Wilson M, Hightower A W, Johnston S, Bishop H, Petri W A Jr, Juraneck D D. Outbreak of amebiasis in Tbilisi, Republic of Georgia, 1998. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67 : 623-631.
- Bernal R R. Entamoebosis-amibiiasis intestinal *Entamoeba histolytica*-*Entamoeba dispar*. Bol Med Hosp Infant Mex. 2001; 58 : 217-219
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro quantities of protein. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.
- Bruchhaus I, Loftus B J, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteineprotease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. Eucaryot Cell. 2003; 2 : 501-509.
- Conde-Bonfil MC, de la Mora-Zerpa C. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. Salud publica de México. 1992; 34: 335-41.
- Deutscher M P. Guide to protein purification-methods in enzymology. Academic Press. San Diego. 1990: 309-317.

- Franco E, Araujo S R, Meza I. Specific and reversible inhibition of *Entamoeba histolytica*. Cysteine-proteinase activities by Zn²⁺ implications for adhesion and cell damage. Arch Med Res. 1999; 30: 82-88.
- Garfin D. One-dimensional Gel Electrophoresis. Guide to protein purification-methods in enzymology. Academic Press. San Diego. 1990: 425-441
- Govrin E, Levine A. Purification of active cysteine proteases by affinity chromatography with attached E-64 inhibitor. Hebrew University of Jerusalem. Prot Exp Pur. 1999; 15: 274-250.
- Hunkapiller M W, Lujan E, Ostrader F, Hood L E. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Meth Enzimol. 1983; 91: 227-236.
- Luna R N, Mena R E, Serrano-Luna J J, Negrete A E. Proteasas microbianas y su identificación con el uso de zimogramas: una técnica sencilla y sensible para identificar y caracterizar proteasas. Métodos de Investigación en Ambiente y Salud. Universidad Autónoma de Puebla. México. 2001: 159-179.
- Martinez P A. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitology Today. 1987; 3: 111-118.
- Mckerrow J H, Sun E, Rosenthal P J, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. j Microbiol. 1993; 47: 21-853.
- Mora-Galindo J, Anaya V F, Ramírez R S, González R A. *Entamoeba histolytica*: correlation of assessment methods to measure erythrocyte digestion,

ans effect of cysteine proteinases inhibitors in HM-1:IMSS and HK-9:NIH strains. Exp Parasitol. 2004; 108: 89-100.

- Olivos-García A, González-Canto A, López-Vancell R, García de León M C, Tello E, Nequiz-Avendaño M, Monfort I, Pérez-Tamayo R.. Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. Parasitol Res. 2003; 90: 212-220.
- Que X, Redd S L. Cysteine proteinases and the patogénesis of amebiasis. Clin Microbiol. 2000; 13 : 196-206.
- Rondon G S E. La amibiasis como causa de disentería en la infancia. [http: www.drrondonpediatra.com](http://www.drrondonpediatra.com) (2005).
- Sargeaunt P G, Williams J E, Grene J D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72: 519-521.
- Serrano-Luna J J, Negrete A E, Reyes M, Garza M. *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: Hemoglobin-Degradating Neutral Cysteine Proteases. Exp Parasitol. 1998; 89: 71-77.
- Spinella S, Etienne L, Petek F, Rigotherier M C. Purification and biochemical characterization of a novel cysteine portease of *Entamoeba histolytica*. Eur. J. Biochem. 1999; 266: 170-180.
- Stanley, S L.. Pathophysiology of amoebiasis. TRENDS Parasitol. 2001; 17: 280-285.

- Wolfe M. Terapéutica de los trastornos digestivos. ED. Mc Graw Hill. México. D. F. 2001.

- www.chemistry.ohio-state.edu/ehs/handbook/gases/coldtrap.htm

- www.provlab.ab.ca

- www.umanitoba.ca

I. ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ACP: cisteín proteasas de amibas

BSA: albúmina de suero bovino

CAPS: 3-[ciclohexilamino]-1 ácido propane-sulfónico

E-64: L-trans-(epoxysuccinil)-L-leucine 4-guanidinobutilamide

EdCP: cisteín proteasas de *Entamoeba dispar*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EhCP: cisteín proteasas de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica: *Entamoeba histolytica*

Da: daltones

DEAE: Diethylaminoethyl

DTT: ditioneitol

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-Of- Flight

PHMBA: *p*-hydroxy-mercuribenzoic acid

PVDF: polivinil difluoruro

PMSF: fluoruro de fenil-metil sulfonilo

PSA: persulfato de amonio

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

I. ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ACP: cisteín proteasas de amibas

BSA: albúmina de suero bovino

CAPS: 3-[ciclohexilamino]-1 ácido propane-sulfónico

E-64: L-trans-(epoxysuccinil)-L-leucine 4-guanidinobutilamide

EdCP: cisteín proteasas de *Entamoeba dispar*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EhCP: cisteín proteasas de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica: *Entamoeba histolytica*

Da: daltones

DEAE: Diethylaminoethyl

DTT: ditioneitol

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-Of- Flight

PHMBA: *p*-hydroxy-mercuribenzoic acid

PVDF: polivinil difluoruro

PMSF: fluoruro de fenil-metil sulfonilo

PSA: persulfato de amonio

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS