



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Separación y caracterización bioquímica
parcial de proteasas de secreción de
Entamoeba histolytica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Ana Luz Hernández Neri



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Augusto J. González Canto

Ciudad de México, 2021



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.

*Daria todo lo que sé
por la mitad de lo que ignoro*

Rene Descartes

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a quienes me permitieron ser parte de este mundo, a mi padre Conrado Hernández a quién debo gran parte de mi ser, me gustaría darle las gracias por el apoyo incondicional, por la confianza y el respeto ante cualquiera de mis decisiones y más importante aún por mostrarme que el mejor regalo que puedes brindar a una persona, es el tiempo. A mi madre Rosario Neri por mostrarme que las palabras son la mejor arma con la que una persona se puede forjar pero sobre todo por enseñarme que sin importar el cansancio nunca se debe dejar de trabajar duro en esta vida. A mis compañeras de vida Aurora Hernández y Diana Neri gracias por todo su apoyo y por su amor incondicional, definitivamente sin ustedes mi vida no sería la misma.

Este camino llamado vida es largo y lo sería aún más sin aquellos cómplices llamados amigos y aunque la lista aquí debería ser más larga, me permitiré enlistar solo a quienes me acompañaron en la faceta de mi vida llamada licenciatura. Gracias Stephanie Escobar y German Pérez por nunca decirme lo que quería oír sino lo que necesitaba escuchar. Gracias Alejandra Ubaldo y Patsy Onofre por iluminar mi camino en mis momentos de mayor oscuridad y por nunca permitir que me rindiera. Pero sobre todo gracias a Angélica Viñas Marcial no solo por su invaluable amistad sino también por todo el apoyo brindado en la realización de experimentos como parte de su estancia en el laboratorio donde se construyó este trabajo.

La elaboración de un producto nunca es obra de una sola persona, por ello quiero agradecer al Biól. Mario Nequiz por la ayuda en el mantenimiento de la virulencia de la cepa HIM:IMSS de *E. histolytica* y a la Ing. Angélica Leticia Serrano Ahumada por su asistencia en la captura de muchas de las imágenes que ilustran este trabajo. De igual manera me gustaría expresar un profundo agradecimiento a la Dra. Haydee Torres Guerrero y al Dr. Luis Olgún por abrirme las puertas de sus laboratorios y por sus valiosos comentarios durante la realización de este trabajo.

Por supuesto, ninguna labor puede realizarse sin los consejos de un gran mentor, por ello quiero agradecer al Dr. Augusto González Canto por permitirme ser parte de su equipo y colmarme de atenciones y facilidades para desarrollar este proyecto. De igual manera quiero agradecer a la Dra. Alma Reyna Escalona Montaña por ser el faro que guio este trabajo en momentos de incertidumbre, por todas sus palabras de aliento y valiosos comentarios. Igualmente quiero agradecer al Dr. Jaime Zamora Chimal por el esmero e interés mostrado en la revisión del escrito, pero sobre todo por impregnarme de ánimo para ver concluido este trabajo.

Por lo anterior y por todo lo que no encontré lugar en esta lista, solo me queda decir:

Muchas gracias

Abreviaturas

AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride / 4- (2-aminoetil) - bencenosulfonyl fluoruro
ABS	Absorbancia
AHA	Absceso hepático amibiano
APS	Ammonium persulfate/ Persulfato de amonio
BSA	Bovine serum albumin/ Albumina sérica bovina
DTT	Dithiothreitol/ Ditiotreititol
E-64	N-(L-3-trans-carboxioxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-amido(4-guanidino) butane/ N-(L-3-trans-carboxioxiran-2-carbonil) -L-leucil] -amido (4-guanidino) butano
EDG	Electro dense granules/ Gránulos electro densos
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid / ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic Acid/ Ácido tetraacético de etilglicol
EhCP	<i>E. histolytica</i> cisteín-proteasas/ Proteasas de cisteína de <i>E. histolytica</i>
H	Horas
HPLC	High performance liquid chromatography/ Cromatografía líquida de alta resolución
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology/ Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
kDa	Kilodaltons/ kilo daltones
M	Molar
Min	Minutos
MUC2	Mucin 2/ Mucina 2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis/ Electroforesis en gel de poliacrilamida
PC	Proteasas de cisteína
SAC	Sobrenadante amibiano concentrado
SD	Superdex (fracciones)
SDS	Sodiumdodecyl sulfate/ Dodecilsulfatosodico

TEMED Tetramethylethylenediamine/ Tetrametiletilendiamina
Tris Tris(hidroximetil) aminometano/ 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TYI-S-33 Trip-casein yeast Iron serum/ Tripticaseina levadura hierro suero ensayo #33

Resumen

Entamoeba histolytica es una especie patógena para el hombre, causante de la enfermedad conocida como amibiasis, cuyo cuadro clínico incluye una variedad de lesiones intestinales y extraintestinales, y en ocasiones la generación de absceso hepático. Esta patogenicidad se ha atribuido, entre otras razones, a la expresión de proteasas, especialmente de proteasas de cisteína, enzimas que rompen enlaces peptídicos en un residuo de cisteína. En los últimos años, el estudio y la purificación de proteasas amibianas ha ido en aumento, sin embargo estos estudios suelen clonar los genes de las proteasas y expresarlos en células distintas a *E. histolytica* o recurrir a la lisis celular, dejando de lado el estudio de las proteasas secretadas por el parásito, las cuales corresponden a la forma *in vivo* en la que se presentan estas moléculas.

Con el objetivo de separar y caracterizar bioquímicamente las enzimas de secreción del parásito, se cultivaron trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS en medio TYI-S-33 sin suero, considerado como medio de secreción. Transcurridas 6 h de cultivo, el medio de secreción fue recuperado y utilizado para caracterizar el perfil proteínico y la actividad de las proteasas, mediante geles *SDS-PAGE* al 12% con gelatina al 0.05% respectivamente. Una vez determinado el perfil de proteasas, se realizó una cromatografía en la columna preparativa Superdex 200. Las 80 fracciones obtenidas por este método de separación se concentraron en tercias, y se seleccionó una fracción con base en la concentración de proteína, el peso molecular, el perfil proteínico y la actividad enzimática. La fracción seleccionada, se expuso a diferentes condiciones de pH, temperatura, iones, inhibidores de proteasas, agentes quelantes y agentes reductores.

Se demostró que la secreción de *E. histolytica* contiene proteínas que van de los 25-250 kDa, las cuales presentan actividad de proteasas entre los 37-75 kDa. Por otra parte, la fracción SD36-38 presentó proteasas de cisteína no dependientes de iones, con actividad óptima a pH 5 y temperatura de 40°C, condiciones similares a las que presentan las vesículas donde son secretadas y a la temperatura del hígado humano, respectivamente. De igual manera, se observó un aumento en la actividad de una proteasa de cisteína (<36 kDa) bajo condiciones de pH ácido, altas temperaturas y flujo de calcio. En conclusión, *E. histolytica* secreta proteasas que muestran actividad en condiciones similares a las presentes en la fisiopatología de la enfermedad.

Contenido

I. Introducción.....	1
I.1 <i>Entamoeba histolytica</i> : Taxonomía.....	1
I.2 Biología de la amiba.....	2
I.2 Ciclo de vida.....	2
I.2.1 Quiste	3
I.2.2 Trofozoíto	4
I.3 Amibiasis.....	6
I.3.1 Historia de la amibiasis.....	6
I.3.2 Epidemiología de la amibiasis.....	7
I.3.3 Patología de la amibiasis	9
I.3.3.1 Amibiasis intestinal.....	10
I.3.3.2 Absceso hepático amibiano.....	10
I.4 Factores de virulencia: Proteasas	11
I.4.1 Sistemas de clasificación de las proteasas	12
I.4.2 Importancia biológica de las proteasas	13
I.4.3 Proteasas de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
II. Hipótesis.....	19
III. Justificación	19
IV. Objetivos	19
V. Métodos.....	20
V.1 Cultivo de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	21
V.2 Obtención de las proteínas secretadas	21
V.3 Concentración de las proteínas secretadas.....	21
V.4 Cuantificación de proteínas.....	22
V.5 Determinación del perfil proteínico y la actividad de las proteasas	22
V.6 Cromatografía: Columna Superdex 200	22
V.7 Selección de las fracciones para caracterización.....	23
V.8 Caracterización bioquímica	23
V.8.1 Inhibidores.....	23
V.8.2 Iones	24

V.8.3 pH	24
V.8.4 Temperatura.....	24
V.8.5 Reductores	24
V.8.6 Quelantes	25
VI. Resultados.....	26
VI.1 Sobrenadante ambiental	26
VI.2 Columna Superdex 200.....	27
VI.3 Fracción SD36-38: caracterización bioquímica	31
VI.3.1 Inhibidores.....	32
VI.3.2 Iones	32
VI.3.3 pH	34
VI.3.4 Temperatura.....	34
VI.3.5 Reductores	35
VI.3.6 Quelantes	35
VII. Discusión	37
VIII. Conclusiones	39
IX. Literatura citada	40

I. Introducción

I.1 *Entamoeba histolytica*: Taxonomía

El término amiba o ameba es generalmente usado para protistas con capacidad de formar varios tipos de seudópodos¹. Dentro de estos nombres se incluye, *Entamoeba histolytica*. Tradicionalmente *E. histolytica* ha sido clasificada dentro del Phylum Sarcomastigophora, donde se incluyen protozoarios que se mueven por medio de flagelos, seudópodos o ambos. A su vez, este Phylum se divide en dos Subphyla: Mastigophora o flagelados y Sarcodina o amibas. Otra clasificación también usada es: Reino Protozoa, subreino Sarcomastigophora, Phylum Amebozoa². Las clasificaciones antes mencionadas se siguen usando hoy en día en el trabajo clínico. Sin embargo, se han ido desarrollando clasificaciones basadas en análisis bioquímicos y moleculares.

En la clasificación propuesta por Adl y colaboradores (Tabla 1), *E. histolytica* se incluye dentro de un súper grupo llamado Amoebozoa, el cual se conforma por organismos con capacidad de formar quistes y cuya locomoción se realiza principalmente por pseudópodos, y a su vez se incluye también dentro de la familia Entamoebidae, en la cual encontramos características como son: la ausencia de mitocondria, peroxisomas e hidrogenosomas³.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *E. histolytica* empleando el esquema de Adl, 2005.

Dominio:	Eukarya	Corlis, 1994
Reino:	Protista	Goldfuss, 1818
Súper grupo:	Amoebozoa	(Luhe, 1913) Cavalier-Smith, 1998
Clase:	Entamoebidae	Cavalier-Smith, 1993
Orden:	Endamoebida	Cavalier-Smith, 1993
Familia:	Entamoebidae	(Chatton, 1925) Cavalier-Smith, 1993
Género:	<i>Entamoeba</i>	Levine et al, 1980
Especie:	<i>Entamoeba histolytica</i>	(Schaudinn, 1903) Walker, 1911

En las clasificaciones descritas anteriormente, se incluye a *E. histolytica* dentro del género Entamoeba que además contiene varias especies de amibas parásitas de vertebrados con capacidad de infectar al hombre⁴, como son: *Entamoeba coli*, *Entamoeba gingivalis*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki* y *Entamoeba dispar*⁵.

I.2 Biología de la amiba

Se sabe que *E. histolytica* es un organismo fermentador obligado, tolerante a bajas concentraciones de oxígeno, que no presenta mitocondrias, proteínas del ciclo del Krebs ni de la cadena transportadora de electrones⁶. Esta carencia de respiración aeróbica responde a las bajas concentraciones de oxígeno que predominan en el intestino delgado, donde *E. histolytica* lleva a cabo parte de su ciclo de vida⁷. Otra característica del parásito es que durante la mitosis en *E. histolytica* no se ha observado una ruptura de la envoltura nuclear⁸ ni una condensación completa de cromosomas, en cambio sí se han registrado variaciones en el tamaño de los cromosomas, lo que ha dificultado determinar el número exacto de estos⁹.

La mayoría de los estudios celulares y moleculares de *E. histolytica* en el mundo, se han realizado con la cepa HM-1:IMSS, incluyendo su secuenciación genómica que dio como resultado el primer genoma amibiano secuenciado¹. A partir de esta secuenciación fue posible identificar 9 938 genes y algunos elementos genómicos móviles como son: trasposones y retrotrasposones, los cuales podrían estar participando en la generación de variantes patógenas de *E. histolytica*, aunque esto último no ha sido estudiado a fondo¹⁰.

En cuanto a la reproducción, *E. histolytica* se asocia habitualmente a un proceso asexual conocido como fisión binaria⁷, sin embargo, la secuenciación y el análisis del genoma de *E. histolytica* advierte que en sus cromosomas han ocurrido eventos celulares como la recombinación meiótica, lo cual sugiere la posible existencia de un mecanismo de reproducción sexual¹⁰.

I.2 Ciclo de vida

La infección por amiba comienza con la ingesta de quistes presentes en agua o comida contaminada con heces humanas. Los quistes sobreviven a las condiciones ácidas del estómago,

viajan a través del intestino delgado y dentro de la terminal íleon o colon⁷, cada quiste maduro origina una amiba con cuatro núcleos que después de dividirse, forma ocho trofozoítos con un solo núcleo¹¹. Los trofozoítos colonizan el lumen, la mucosa y las células epiteliales del intestino grueso¹², ingieren bacterias, eritrocitos y detritos celulares¹, se multiplican en la luz intestinal por fisión binaria y se enquistan, produciendo quistes con cuatro núcleos, que después de dos divisiones sucesivas forman un quiste con solo un núcleo¹¹. El ciclo biológico termina cuando se excretan los quistes infecciosos⁷ (Figura 1).

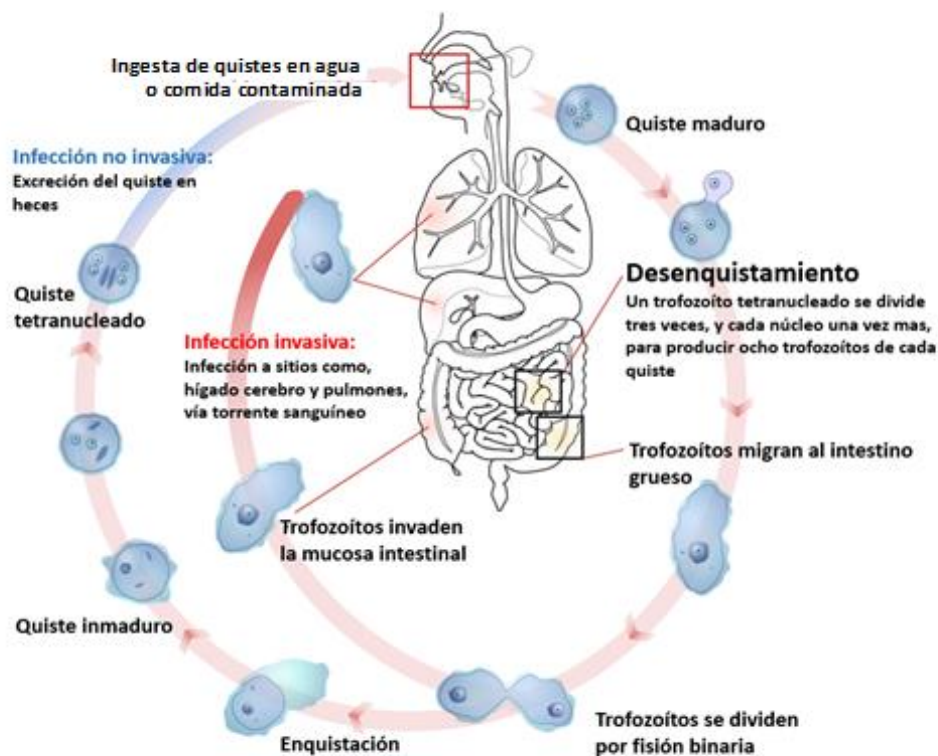


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. Modificado de Ruiz, 2008¹³.

I.2.1 Quiste

La morfología del quiste ha sido la base para identificar las diferentes especies del género *Entamoeba* durante muchas décadas de trabajo en los laboratorios¹¹, de los cuales se consideran tres caracteres morfológicos: su tamaño, el número de núcleos en los quistes maduros y la

morfología de los núcleos⁴. En particular los quistes de *E. histolytica* miden entre 10-15 μm de diámetro, presentan de uno a cuatro núcleos dependiendo del estado de madurez, además presentan también gránulos de glucógeno y ensamblajes ribosómicos llamados cuerpos cromatoides⁷. Estos cúmulos ribosómicos, muy poco frecuentes en otros eucariontes, pueden ser reflejo de periodos de actividad metabólica reducida, previa a la diferenciación de los trofozoítos a quistes¹¹.

A nivel genómico en *E. histolytica*, se han detectado dos genes que producen sintasas de quitina¹⁰, las cuales participan en la formación de la pared de quitina que rodea a los quistes⁷ (Figura 2). Por otro lado, una de las grandes incógnitas acerca del quiste es el proceso de su formación, Los únicos datos reportados han sido obtenidos en *Entamoeba invadens*, una ameba parásita de reptiles, en la cual se ha sugerido que la unión de una lectina de unión a galactosa en la superficie del parásito puede ser un desencadenante de la enquistación⁷. En *E. histolytica* ha sido difícil estudiar el proceso de enquistación, debido a que no se tiene un método de cultivo de quistes *in vitro* lo cual limita los estudios bioquímicos y moleculares⁸.

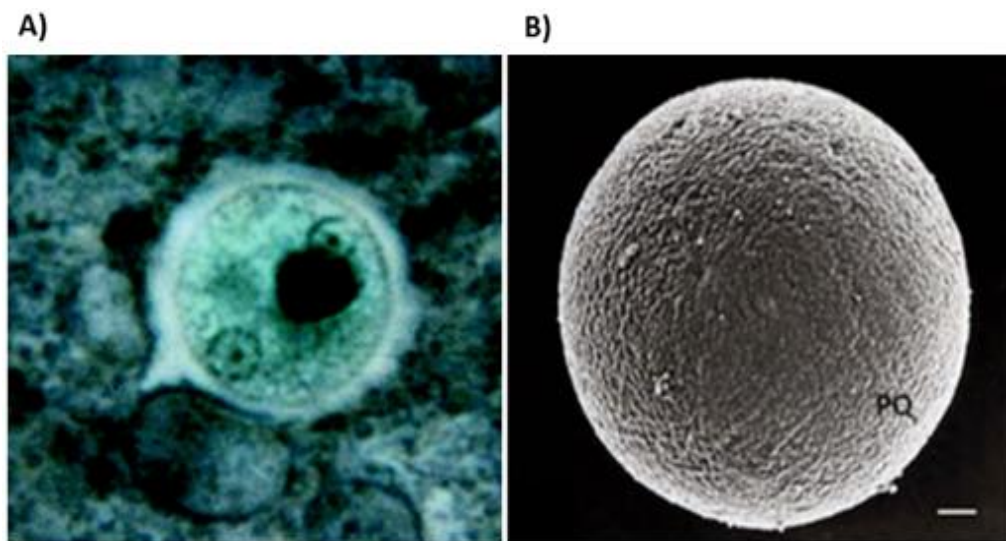


Figura 2. Quiste de *E. histolytica*. **A)** Teñido con negro de clorazol en heces, se observan dos de los cuatro núcleos característicos (aprox. 1600x)⁷ **B)** Microscopia de barrido, se observa la forma esférica y la superficie rugosa de la pared del quiste (PQ) (Barra= 100 nm)⁸.

1.2.2 Trofozoíto

El trofozoíto de *E. histolytica* es pleomórfico o ameboide, es decir, que cambia su forma continuamente debido a la fluidez del citoplasma y a la plasticidad de su membrana plasmática

(Figura 3). Estas características le permiten a la ameba desplazarse eficientemente sobre cualquier superficie formando proyecciones del citoplasma llamadas pseudópodos y son determinantes para su nutrición, ya que participan en la captura de alimento mediante mecanismos celulares como la pinocitosis, para ingerir líquidos, y la fagocitosis, para capturar sólidos⁸. Existen diferentes tipos de fagocitosis, en el caso de las amebas, este proceso ocurre por succión a través de canales estrechos¹¹ (Figura 4B).

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen un diámetro que varía de 10 a 50 μm ⁷, presentan una gran cantidad de vacuolas de diferente tamaño⁸ y anteriormente eran consideradas células sin citoesqueleto, lisosomas ni sistemas membranales equivalentes al complejo de Golgi y al retículo endoplásmico¹¹. Estos resultados eran sorprendentes, ya que los estudios de biología molecular habían identificado en las amebas algunas de las proteínas que participan en funciones características de las citadas estructuras⁸.

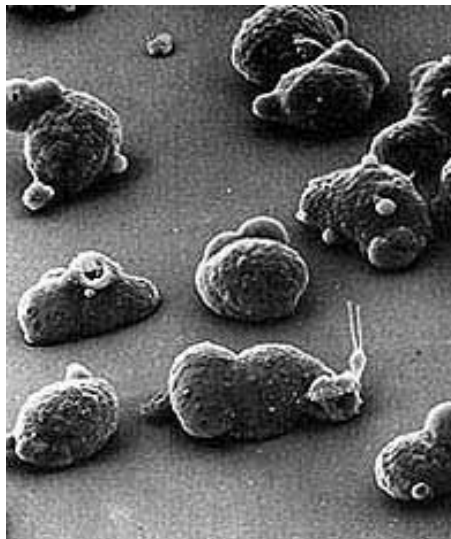


Figura 3. Fotomicrografía electrónica de barrido de *E. histolytica* en cultivo, se aprecia el pleomorfismo entre amebas de la misma especie¹².

Actualmente el desarrollo de nuevas técnicas de fijación y microscopía nos ha mostrado que, más que células carentes de organelos, los trofozoítos contienen probablemente organelos sensibles. Por ejemplo, respecto a las membranas, la congelación ultrarrápida ha permitido identificar un sistema de pequeños canalículos que podría corresponder a un retículo endoplásmico liso⁸ (Figura 4C).

En condiciones naturales el trofozoíto tiene sólo un núcleo, no obstante, en cultivos *in vitro* pueden observarse con frecuencia dos o más núcleos⁸. Contrario a los quistes, los trofozoítos son altamente móviles, el combustible para este movimiento proviene de la conversión anaeróbica de la glucosa y

piruvato a etanol. Un aspecto que resulta interesante es que muchas de las enzimas metabólicas parecen ser de origen procarionte, posiblemente adquiridos a partir de la transferencia lateral de genes de bacterias⁷.

Los trofozoítos tienen capacidad de invadir los tejidos del hospedero, pero no logran sobrevivir fuera de él, por lo que no tiene capacidad de invadir un nuevo ser humano¹¹.

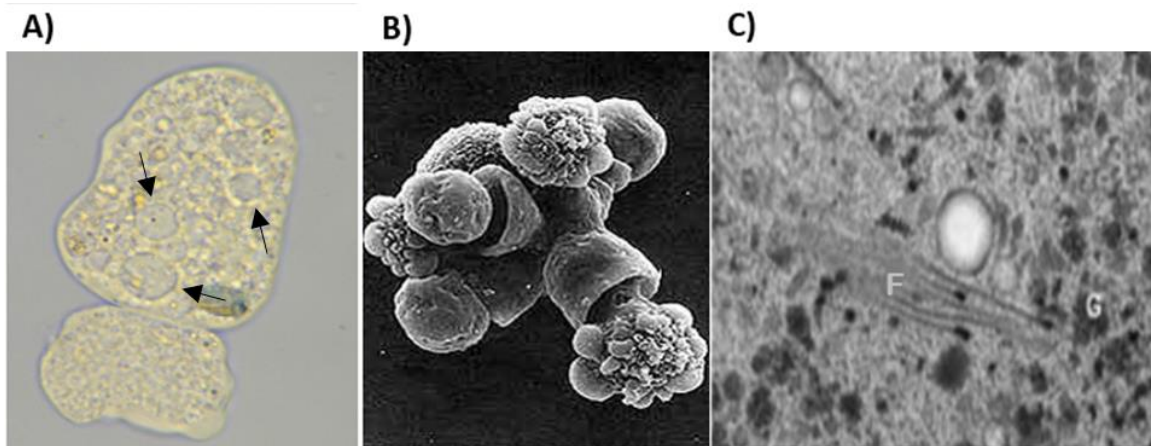


Figura 4. Trofozoíto de *E. histolytica*. **A)** Vacuolas, las flechas indican la presencia de vacuolas característica en esta forma del parásito **B)** Canales, la imagen muestra diversos canales que forma la membrana celular para realiza el proceso de fagocitosis ¹² **C)** Grupo de cisternas aplanadas similares al aparato de Golgi (F) y gránulos de glucógeno (G)⁸

I.3 Amibiasis

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la infección provocada por *E. histolytica*¹⁴. Si bien, el conocimiento de la amibiasis comenzó formalmente hace poco más de un siglo, los estragos que causa la amiba ya eran conocidos desde mucho tiempo atrás¹⁵ por lo cual es, probablemente, una de las enfermedades cuya historia está mejor documentada.

I.3.1 Historia de la amibiasis

Los casos de amibiasis se remontan hasta la Antigua Grecia (460 a 377 a.C.) cuando Hipócrates reportaba esta enfermedad como “flujo de vientre”¹⁶. Sin embargo, pasaron más de 2000 años hasta que en 1875 el físico Feder Losch asoció a *E. histolytica* con algunos de los síntomas de la amibiasis como son: la disentería y las ulceraciones intestinales⁷. Posteriormente en 1903 Fritz Schaudinn nombró al parásito encontrado veinte y ocho años antes como *E. histolytica* debido a su capacidad de causar lisis tisular⁵.

En 1925 el parasitólogo francés Emile Brumpt, basado en observaciones clínicas, epidemiológicas y estudios experimentales, propuso la existencia de *E. histolytica* como un complejo de dos especies morfológicamente indistinguibles a las que denominó *E. dysenteriae*

causante de la infección sintomática, y *E. dispar* encontrada solo en portadores asintomáticos¹⁶. Aunque este planteamiento fue rechazado inicialmente por la comunidad científica internacional de la época, a inicios de los años setenta se acumularon datos que apoyaban la hipótesis de Brumpt, los cuales llevaron a que en 1978 Sargeant y Williams, a través de electroforesis de isoenzimas, distinguieran por primera vez dos cepas de *E. histolytica*, confirmando así la existencia de una especie patógena y otra no patógena⁴. En 1993 Diamond y Clark concluyeron que existían pruebas suficientes para respaldar la existencia de dos especies con distinta patogenicidad, *E. histolytica* y *E. dispar*. Y así fue como en 1997, mediante un comité de expertos de la OMS reunidos en México, fue aceptada esta hipótesis¹⁷.

Para ese momento México era considerado como “La patria de la investigación en amibiasis” debido a los numerosos seminarios internacionales sobre este padecimiento organizados por el Doctor Sepúlveda durante el siglo XX¹⁵ los cuales eran seguimiento de la abundante investigación en amibiasis realizada durante el siglo XIX. Fue durante este último siglo cuando el absceso hepático, muy probablemente amibiano, hizo estragos en la población de la Ciudad de México lo que llevo a él Doctor Miguel Jiménez a proponer el drenado del absceso hepático como un tratamiento eficaz del padecimiento¹⁸.

I.3.2 Epidemiología de la amibiasis

La amibiasis tiene una distribución mundial con una alta prevalencia en países cercanos al trópico. A nivel mundial se estima que existen alrededor de 480 millones de personas infectadas, aproximadamente 12% de la población¹⁴. Estas cifras ubican a la amibiasis como la tercera parasitosis causada por protozoarios con mayor mortalidad¹¹, responsable de hasta 100 000 muertes por año según datos de la OMS¹⁹.

La susceptibilidad de los humanos a la amibiasis parece ser general¹¹, aunque frecuentemente los grupos con mayor riesgo de tener una evolución grave son los niños, ancianos, personas con desnutrición y los pacientes que reciben terapia con corticoides²⁰.

En el caso de México (Figura 5) se calcula que el 8% de la población es seropositiva para amibas²¹. Las tasas de mayor incidencia por rangos de edad se reportan en los individuos menores de 14 años y mayores de 50 años (Figura 6), lo cual coincide con lo mencionado anteriormente. Por otro lado, se ha demostrado en diferentes países, que la infección y la enfermedad son

relativamente frecuentes en pacientes VIH positivos. A pesar de eso, en dos estudios realizados en México ninguno de los pacientes VIH positivos infectados con *E. histolytica* presentaba síntomas atribuibles al parásito²². Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferentes grados de inmunosupresión de los pacientes o a la existencia de diferentes genotipos del parásito²⁰. Aunque también se ha demostrado que existen determinantes genéticos de susceptibilidad en el humano, entre los que se encuentran; el polimorfismo 223R, el cual aumenta hasta cuatro veces las probabilidades de adquirir la infección; o el alelo HQ DQB1*0601 del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II asociado a la protección contra la enfermedad¹².

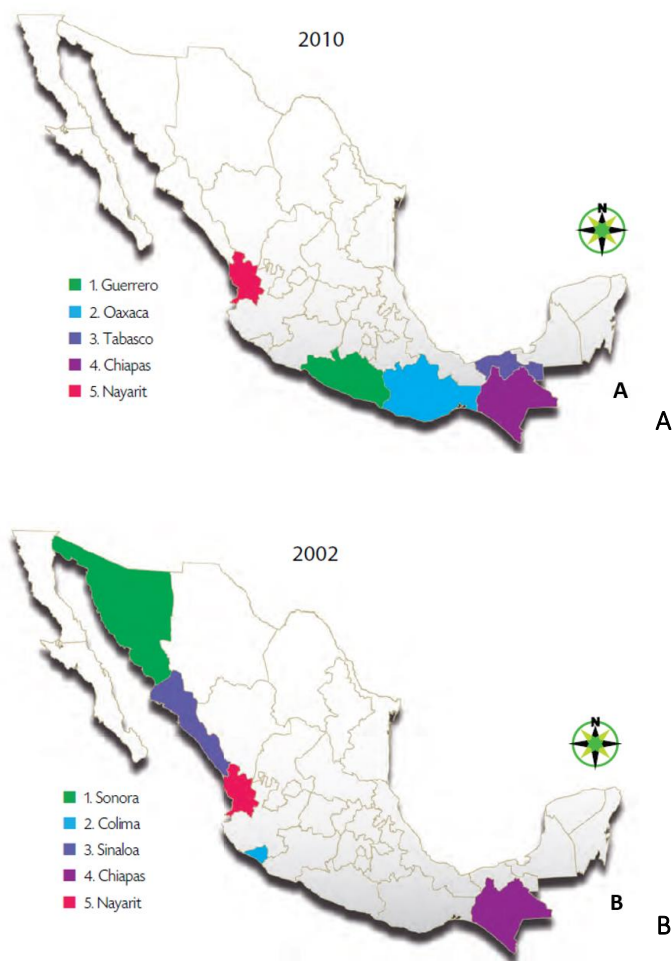


Figura 5. Estados de la República Mexicana con mayor incidencia de **A)** Amibiasis intestinal y **B)** Absceso hepático amibiano²³.

El diagnóstico, se basa en la observación microscópica, la cual no permite diferenciar entre *E. histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*, debido a que estas tres especies de amibas son morfológicamente indistinguibles²⁰. La coinfección con estas tres especies es común, por ejemplo, un reporte en Bangladesh informa que, de 109 muestras de heces de niños en edad preescolar, el 21% fue positivo para la infección por *E. moshkovskii*, y el 73% de éstas tuvo también *E. histolytica* o *E. dispar*. La realización de un diagnóstico específico es importante ya que en caso de infección con *E. dispar* y *E. moshkovskii* no hay necesidad de dar tratamiento¹¹.

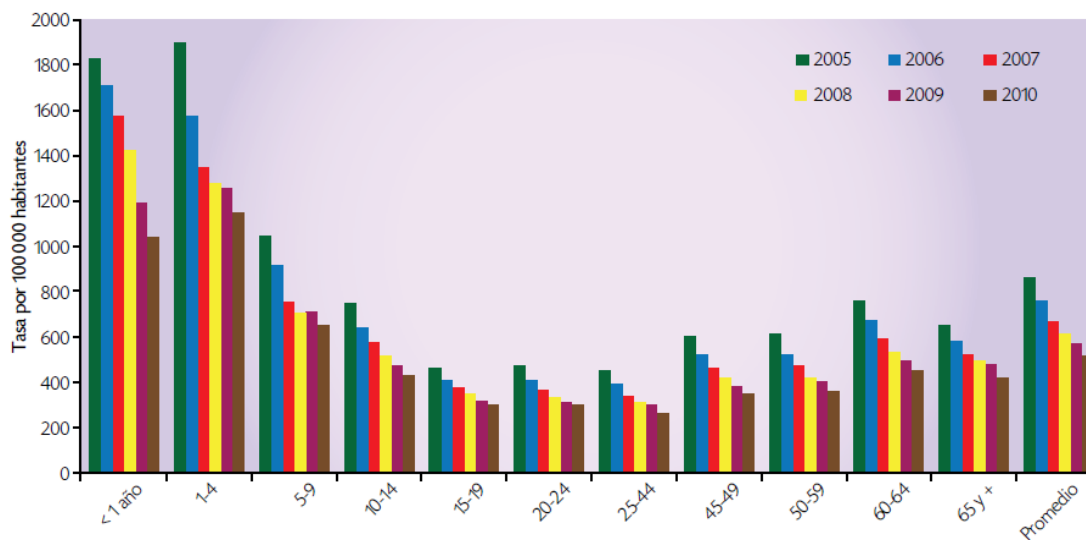


Figura 6. Incidencia de la amibiasis intestinal por años e intervalo de edad. Periodo 2005-2010²³.

Se han demostrado cambios en la virulencia de *E. histolytica* dependiendo de la presencia de bacterias co-cultivadas *in vitro*, lo cual plantea que el microbioma intestinal en un individuo dado, podría potencialmente influir en la infección por *E. histolytica*¹². Adicionalmente se ha descrito que la amibiasis también es el resultado de factores interrelacionados que comprenden aspectos sociales, económicos, culturales, históricos e incluso políticos²⁴ y que dichos factores no son determinantes para presentar un cuadro clínico grave de amibiasis.

I.3.3 Patología de la amibiasis

Las personas infectadas con *E. histolytica* se dividen en dos grupos de acuerdo a las manifestaciones clínicas: sintomáticos y asintomáticos, estos últimos también llamados portadores²⁵. Si bien es cierto que la infección con *E. histolytica* en el 80-90% de los casos es de tipo asintomática²⁶, estos individuos juegan un papel fundamental en la transmisión de la infección, ya que se calcula que un portador crónico es capaz de excretar hasta 15 millones de

quistes al día²⁷. La amibiasis sintomática por otro lado, es primariamente una enfermedad intestinal²⁸ que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del hospedero y la producción del absceso hepático amibiano¹.

I.3.3.1 Amibiasis intestinal

La enfermedad intestinal invasiva puede ocurrir días o años después de la infección inicial, cuando *E. histolytica* afecta la mucosa intestinal provocando necrosis y úlceras, lo cual puede generar síntomas como son: dolor abdominal y diarrea sanguinolenta²⁹. La tasa de mortalidad de la colitis intestinal alcanza el 3%, de estos individuos el 30% presenta también perforación intestinal¹⁹.

Entre las complicaciones de la amibiasis intestinal invasora se encuentran el ameboma del colon, que consiste en el desarrollo de un granuloma amibiano que puede obstruir el tránsito del intestino y que puede confundirse con cáncer de colon; la ruptura de alguna úlcera intestinal, con la consecuente diseminación de la infección a la cavidad peritoneal; la colitis fulminante y el colon tóxico, siendo estas últimas las complicaciones con la mortalidad más alta, pero afortunadamente las menos frecuentes actualmente²¹.

El tratamiento contra la amibiasis no es recomendado sin comprobar antes la existencia de amibiasis invasora, ya sea intestinal o extra-intestinal, y menos aun cuando el individuo es portador asintomático de la enfermedad²¹. Una vez que se lleva a cabo el diagnóstico pertinente, los tratamientos recomendados son derivados del nitroimidazol²⁶, particularmente el metronidazol, con el que aproximadamente el 90% de los pacientes con disentería leve o moderada presentan una respuesta favorable⁷.

En algunas ocasiones los trofozoitos de *E. histolytica* ingresan al torrente sanguíneo y se diseminan a otros sitios del cuerpo²⁹ tales como pulmones, cerebro o hígado²⁸. De estos, la manifestación clínica extraintestinal más frecuente²⁰, presente en menos del 1% de los pacientes infectados por amibiasis intestinal, es el absceso hepático amibiano²⁷.

I.3.3.2 Absceso hepático amibiano

Cuando las lesiones en el intestino causadas por *E. histolytica* son tan profundas que involucran los vasos sanguíneos, los trofozoítos viajan en la circulación del colon y de ahí alcanzan la circulación de la vena porta que llega al hígado²¹, debido a esta ruta de diseminación el absceso hepático es cuatro veces más frecuente en el lóbulo derecho del hígado²⁰. La mayoría de los pacientes (65% -75%) presentan un solo absceso, sin embargo, los abscesos múltiples también son posibles²⁹. Un hecho que resulta interesante mencionar, es el reporte de diferentes genotipos de *E. histolytica* en muestras derivadas de AHA y de heces de una misma persona¹². Esta variación genotípica se ha reportado también en pacientes con dos abscesos simultáneos e independientes que resultan de la infección con cepas de *E. histolytica* con genotipos diferentes³⁰.

Los síntomas más característicos de un paciente con AHA son dolor abdominal localizado en el cuadrante superior derecho y fiebre, así como posible presencia de disentería, pérdida de peso y malestar en general. La ictericia, coloración amarilla en los ojos, se puede presentar en pacientes con obstrucción de los conductos biliares provocada por el tamaño del o los abscesos hepáticos. Ante la posibilidad de ruptura del absceso debe plantearse al paciente la necesidad de realizar drenaje del material purulento²¹. En caso de no estar presente ese riesgo, el tratamiento recomendado es el mismo que para la amibiasis intestinal⁷.

I.4 Factores de virulencia: Proteasas

La gran capacidad que la amiba patógena tiene para efectuar lisis en los tejidos fue lo que justificó denominarla *histolytica*³¹. Esta capacidad citotóxica ha sido atribuida a diversos factores de virulencia determinados *in vitro*, entre los que encontramos moléculas como: los amiboporos que inducen la formación de poros en liposomas sintéticos²⁰, las fosfolipasas, el componente C3 del complemento, las anafilatoxinas, los gránulos electrodensos (EDG, por sus siglas en inglés) y las proteasas⁷ siendo estas últimas el tema principal a continuación.

El término proteasa apareció en la literatura alemana de química fisiológica en la última parte del siglo XIX como un término general para referirse a todas las hidrolasas que actúan sobre proteínas o en la degradación de fragmentos de las mismas³² es decir, enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos³³. Otros términos usados comúnmente son: enzimas proteolíticas, proteinasas y peptidasas y aunque históricamente, estos términos tenían significados ligeramente diferentes, en la actualidad las diferencias se han olvidado en gran

medida³² quedando como simples sinónimos. Debido a que, aun hoy en día suele existir confusión a la hora de nombrar y clasificar a las proteasas, y como introducción a algunos términos que serán usados posteriormente, resulta importante hacer una breve reseña sobre los sistemas de clasificación de proteasas más comunes.

1.4.1 Sistemas de clasificación de las proteasas

Una de las formas más sencillas y comunes para agrupar a las proteasas es clasificarlas en exoproteasas y endoproteasas, términos usados para referirse a las proteasas que cortan uno o algunos aminoácidos del extremo amino (N-) o carboxilo (C-) de la cadena polipeptídica y a las proteasas que escinden internamente, respectivamente. Siguiendo estas categorías resulta oportuno mencionar que la gran mayoría de proteasas son consideradas exoproteasas³².

Si bien el uso de las categorías antes mencionadas es extendido, el esquema de reconocimiento internacional para la clasificación y nomenclatura de todas las enzimas, incluidas las proteasas, en el sistema Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés), la cual propone agrupar a las proteasas de acuerdo con la naturaleza química del sitio catalítico. De esta forma se reconocieron inicialmente cuatro tipos de proteasas: de serina, cisteína, aspártico y metaloproteasas³², y posteriormente se agregaron, los grupos de proteasas de treonina y proteasas mixtas³⁴. Desafortunadamente el sistema de la IUBMB no ha sido del todo satisfactorio debido a que, en él, una enzima se define por el hecho de que cataliza una reacción única, lo que ocasiona que proteínas diferentes, pero que catalizan la misma reacción, se clasifiquen dentro de un mismo número y por el contrario, una sola proteína que cataliza varias funciones, sea registrada con más de un número de clasificación³². En este contexto surgió otro sistema de clasificación, nombrado MEROPS en honor a un género de aves. El sistema MEROPS es un recurso de información para enzimas proteolíticas, inhibidores y sustratos (se puede encontrar en <http://merops.sanger.ac.uk>). Este sistema intenta agrupar a las proteasas con base en la homología de las secuencias genéticas y reconoce tres categorías: tipo o especie, familia y clan³⁵.

El término tipo se usa para referirse a un conjunto de proteasas que se distinguen de acuerdo con los grupos químicos responsables de la catálisis, como en el tipo serina, cisteína, aspártico o metaloproteasa. El término familia se usa para describir un grupo de enzimas en el que cada

miembro muestra una relación evolutiva al menos entre sí, ya sea a lo largo de toda la secuencia o al menos en la parte de la secuencia responsable de la actividad catalítica. Por último, un clan comprende un grupo de familias para las cuales existen indicios de relación evolutiva, a pesar de la falta de similitudes estadísticamente significativas en la secuencia, considerando principalmente la estructura terciaria de la proteína³⁵.

El análisis de datos completos en más de cien genomas, ha demostrado que aproximadamente el 2% de todos los productos génicos son proteasas, lo que indica que éste es uno de los grupos funcionales más abundantes de las proteínas, presentes en todos los seres vivos desde virus hasta humanos³². El campo de estudio de estas enzimas está claramente en una etapa de rápida expansión³⁶, desde hace un par de décadas homólogos de proteasas se secuencian mucho más rápido de lo que se pueden caracterizar³⁵, lo cual reafirma la importancia de aumentar los trabajos de caracterización para equilibrar el conocimiento filogenético y el conocimiento que se tiene respecto a las funciones de dichas enzimas.

1.4.2 Importancia biológica de las proteasas

Las proteasas catalizan un amplio espectro de reacciones biológicas importantes³⁵ y aunque por muchos años los estudios se centraron en su papel como agresores contundentes, asociados con la demolición de proteínas²⁵, hoy en día sabemos que también son claves en procesos como son: el procesamiento de pro-hormonas, la coagulación de la sangre, la fibrinólisis, el metabolismo de las proteínas, las reacciones inmunitarias, la remodelación de tejidos³³ y la resistencia al estrés oxidativo en muchos organismos⁹. Es por esto que no es sorprendente que se haya encontrado que las proteasas tienen funciones críticas en la patogénesis de las enfermedades parasitarias³³, como es el caso de las infecciones con nematodos³⁷, kinetoplástidos³⁸ como por ejemplo *Leishmania*³⁴, y por su puesto *E. histolytica*⁷.

1.4.3 Proteasas de *Entamoeba histolytica*

Estudios genómicos en *E. histolytica* han identificado un total de 86 genes putativos para proteasas, de los cuales 4 corresponden a proteasas de aspártico, 10 a proteasas de serina, 22 a metaloproteasas y 50 a proteasas de cisteína³⁹. Estos datos, concuerdan con los múltiples

artículos que relacionan el desarrollo de la amibiasis con la actividad de proteasas, principalmente de cisteína⁴⁰, y con el reporte que menciona que más del 80% de los pacientes con amibiasis expresan anticuerpos contra proteasas de cisteína¹², esto último también reafirma que dichas moléculas son secretadas por *E. histolytica* dentro de su microambiente⁴¹.

Si bien la ubicación extracelular de las proteasas de cisteína es un hecho, se han reportado también endoproteasas localizadas en vesículas tipo lisosoma o en la superficie de la célula⁴². Al respecto se ha determinado que las proteasas de cisteína se sintetizan *in vivo* como precursores inactivos que contienen una pre-región N-terminal, la cual es necesaria eliminar para liberar la enzima madura, ya que es responsable de mantener la enzima en una conformación inactiva, mientras dirige estas proteínas a los compartimentos celulares antes mencionados⁴³. Probablemente a esto se deba que el tráfico de proteasas en vesículas se ha relacionado con la patogénesis de la amibiasis⁹. Sin embargo, el papel de las proteasas en el desarrollo de la enfermedad va mucho más allá. Estudios al respecto, han relacionado a las proteasas de cisteína con múltiples procesos, entre los que se encuentran: adquisición de nutrientes, citoadherencia, hemólisis⁴⁴, evasión de la respuesta inmune⁴⁰, citotoxicidad¹², degradación de componentes de la matriz extracelular¹ y diferenciación morfológica de los trofozoítos invasivos a la etapa de quiste infeccioso⁴⁵.

Mientras que la expresión específica de proteasas de cisteína en los quistes es atribuida a más de cinco proteasas⁴⁶, en el lisado del cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* aproximadamente 90% del total de la actividad de proteasas de cisteína está conformada por solo tres proteasas: EhCP1, EhCP2 y EhCP5⁴⁰. En consecuencia, la mayoría de los estudios sobre estas moléculas, así como todas las caracterizaciones bioquímicas de las enzimas se realizaron en estas tres proteasas⁴⁷ sobre las que hablaré a continuación y cuyo resumen se encuentra en la Tabla 2.

La EhCP1 es una proteasa presente en la superficie celular que inicialmente fue purificada como un monómero de aproximadamente 21-35 kDa⁴⁰, esto mediante dos etapas de cromatografía en gel, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y cromatografía de afinidad con sefarosa de organomercurio. Su actividad se presenta en un rango de pH de 3.5 a 8.5, con un máximo a pH 4.4, y uno de sus sustratos es la colágena tipo 1¹. Resulta interesante mencionar que la expresión de esta proteasa es más abundante en aislados patógenos que en aislados no patógenos⁴⁸; de hecho, no se han encontrado genes ortólogos en *E. dispar*, lo cual contrasta con la mayoría de las otras proteasas de cisteína⁴³.

La EhCP2 se encuentra en la superficie celular y en las membranas internas, presenta un peso molecular aparente de 26 kDa por SDS-PAGE y 29 kDa por cromatografía en gel⁴⁹. Se ha informado de un método de un solo paso para la purificación de esta proteasa por cromatografía de afinidad a un sustrato sintético a partir de un extracto de parásito soluble. En cuanto a su pH óptimo, varió ampliamente con sustratos sintéticos de 5.5 a 9.5. La EhCP2 no degrada la colágena tipo 1 o la elastina, pero es activa contra el proteoglicano del cartílago y la colágena glomerular de la membrana basal del riñón. EhCP2 también separa los trofozoítos de sus sustratos *in vitro* y podría desempeñar un papel en la invasión de tejidos¹.

Por su parte, la EhCP5 tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa y ha demostrado tener afinidad para una gran variedad de sustratos, entre los que se encuentran: mucina, fibrinógeno, colágena, hemoglobina, albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y gelatina¹. Es probablemente, la proteasa de cisteína más estudiada y la que posee considerablemente más regiones hidrófobas⁵⁰, a lo que probablemente debe su ubicación en la superficie de la amiba⁴³, donde interactúa directamente con las integrinas en la superficie de las células epiteliales del colon humano, lo que induce la secreción de citocinas proinflamatorias, incluidas el TNF- α y la conversión a una forma activa de la IL-1b. La inducción de las citocinas antes mencionadas, así como de la IL-6, IL-18 y el IFN- γ y la quimiocina IL-8 parecen ser el factor central del génesis de la enfermedad⁵¹.

Al igual que con la EhCP1, no se han encontrado genes ortólogos de la EhCP5 en *E. dispar*⁴³. El silenciamiento de la EhCP5 en trofozoítos de *E. histolytica* se ha relacionado con una disminución de hasta el 90%, en la formación del AHA, datos que deben tomarse con cautela debido a que dicho silenciamiento pudo también apagar otras proteasas con secuencias homólogas¹. Cabe mencionar que Freitas y colaboradores compararon los niveles de expresión de la EhCP5 en muestras de AHA y cepas cultivadas axénicamente y encontraron una mayor expresión del ARNm de EhCP5 en amibas derivadas directamente de los abscesos⁴⁶.

Si bien las proteasas mencionadas anteriormente son las más abundantes en los trofozoítos cultivados axénicamente, las proteasas EhCP3, EhCP4, EhCP6, EhCP7 y EhCP112 se expresan también, pero en niveles más bajos⁴⁵. Debido a esto, y con la única excepción de la EhCP7, también se han hecho estudios respecto a estas proteasas, de las cuales hablaré a continuación y resumiré en la tabla 2.

La EhCP3 se localiza principalmente en el citoplasma y en vesículas fagocíticas, es sensible al inhibidor de proteasas de cisteína E-64, presenta un peso molecular aproximado de 31 kDa y un

rango de actividad de pH de 4.5 a 8, con un máximo a pH neutro. Debido a que se ha encontrado un gen homólogo del EhCP3 en *E. dispar*, se piensa que la función de esta proteasa es la digestión de nutrientes y no la patogénesis de la enfermedad. Otra proteasa que se ha relacionado también con *E. dispar* es la EhCP4, para la cual se han encontrado genes análogos en dicho parásito no patógeno¹.

La EhCP4 se localiza en la región peri e intranuclear y en vesículas en el citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica*, por lo cual se sugiere una función en la diferenciación o ciclo celular¹. Sin embargo, cabe mencionar que la EhCP4 se ha relacionado también con la degradación del componente C3 del complemento, la pro-IL-18 y de las inmunoglobulinas IgA e IgG, lo cual sería importante para la evasión del sistema inmune⁵². Para esta proteasa se calcula un peso molecular de 23 kDa, pero se ha observado una migración a 26 kDa en geles SDS-PAGE. Presenta una actividad proteolítica óptima a pH neutro y una actividad autocatalítica a pH ácido. A pesar de que se cree que es secretada *in vivo*, es casi indetectable *in vitro*¹.

Por otro lado, la EhCP6 es una proteasa de cisteína sensible a E-64 y al estrés que se regula en respuesta al choque térmico y durante la invasión de patógenos del tejido del hospedero. Se ha demostrado que la proteína recombinante plegada produce autoproteólisis en presencia de DTT y SDS para dar lugar a una forma madura de 25 kDa⁴⁵.

Por último, la EhCP112 es una proteasa de 49 kDa que, junto con la adhesina EhADH112 forma el complejo EhCPADH que además de ser secretado se encuentra también en las vesículas citoplasmáticas y la membrana plasmática⁴⁴. El EhCPADH se transloca desde la membrana plasmática a las vacuolas fagocíticas durante la fagocitosis⁵³, esto implica una función en la adquisición de nutrientes. Sin embargo, el EhCPADH se ha asociado con virulencia de amibas. Los anticuerpos contra este complejo inhiben la adherencia, la fagocitosis y la destrucción de monocapas de células MDCK por los trofozoítos y extractos vivos⁴⁴. Se ha observado que la proteasa EhCP112 recombinante degrada el colágeno tipo 1 y la fibronectina¹ y se mantiene activa en un rango amplio de pH (3-10), con la mayor actividad a pH 7 para azocaseína y pH 6 para hemoglobina⁵⁴. La EhCP112 es enzimáticamente activa de 5 a 60° C con una actividad máxima para ambos sustratos a 37° C¹.

Debido a toda esta creciente evidencia sobre la relación de las proteasas de *E. histolytica* y el desarrollo de la amibiasis, en años recientes se han utilizado enfoques de diseño racional de fármacos para desarrollar inhibidores que bloqueen la actividad de las proteasas amibianas específicas *in vitro* y así reducir la patogenia de la enfermedad en modelos animales¹². Al

respecto, resulta importante resaltar que todos los estudios antes mencionados se realizaron en cultivos axénicos de trofozoítos de *E. histolytica*. Esto representa un entorno artificial que no es comparable a la situación encontrada durante la infección del humano⁵⁵. A pesar de esto, resulta tentador considerar estas enzimas como posibles objetivos para la intervención terapéutica.

Tabla 2. Proteasas de cisteína *E. histolytica*

Proteasa	Peso molecular	Localización celular	Observaciones	Referencias
EhCP1	21-35 kDa	Superficie celular	Mayor abundancia en aislamientos patógenos que en no patógenos. Actúa a pH 3.5-8.5 con un óptimo de 4.4.	(Serrano et al, 2012) ¹ (Trejos y Castaño, 2009) ⁴⁰ (Hellberg et al, 2002) ⁴³ (Tanich et al, 1991) ⁴⁸
EhCP2	26-29 kDa	Superficie celular y membranas internas	Purificada a partir de un extracto soluble. Actúa a pH 5.5-9.5.	(Serrano et al, 2012) ¹ (Luaces et al, 1988) ⁴⁹
EhCP3	31 kDa	Citoplasma y vesículas fagocíticas	Asociada a la digestión de nutrientes en la amiba, no a la patogenicidad. Actúa a pH 4.5-8 con un óptimo de 7.	(Serrano et al, 2012) ¹ (Que et al, 2002) ⁵⁶
EhCP4	23-26 kDa	Región perie intranuclear y vesículas citoplasmáticas	Relacionada con la evasión del sistema inmune. Se cree que es secretada <i>in vivo</i> pero es difícil detectarla <i>in vitro</i> . Su pH óptimo es 7.	(Serrano et al, 2012) ¹
EhCP5	30 kDa	Superficie celular	Induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Relacionada con la formación de AHA.	(Serrano et al, 2012) ¹ (Jacobs et al, 1998) ⁵⁰ (Hellberg et al, 2002) ⁴³ (Thibeaux et al, 2014) ⁵¹
EhCP6	25 kDa	No especificada	Participa en la invasión de tejidos.	(Serrano et al, 2012) ¹ (Ghosh y Raha, 2015) ⁴⁵
EhCP112	49 kDa	Secreción, superficie celular y vesículas citoplasmáticas	Al unirse con la adhesina EhADH112 forma el complejo EhCPADH112 el cual se ha asociado con la virulencia y fagocitosis. Actúa a pH 3-10 con un óptimo de 7.	(Ocadiz et al, 2005) ⁴⁴ (García et al, 1999) ⁵³ (Quintas et al, 2009) ⁵⁴ (Serrano et al, 2012) ¹

II. Hipótesis

E. histolytica en cultivo axénico secreta proteasas al medio de cultivo que se activan en condiciones similares a las que se presentan durante la infección

III. Justificación

Uno de los problemas de salud pública en México es la amibiasis, enfermedad causada por *E. histolytica*, entre los factores de virulencia asociados a este padecimiento se encuentran las proteasas secretadas por el parásito. Si bien existen estudios de proteasas de amibas, la mayoría se realizan a partir de proteínas recombinantes, o del lisado y extractos del parásito, lo cual no corresponde al proceso que está ocurriendo *in vivo* durante la infección, en cambio en este trabajo se realiza la obtención de proteasas de secreción de *E. histolytica* y la caracterización bioquímica parcial de dichas enzimas.

IV. Objetivos

Objetivo General:

Separar y caracterizar bioquímicamente proteasas de secreción de *Entamoeba histolytica*

Objetivos particulares:

- Estandarizar un sistema para la obtención de proteasas de trofozoítos de *E. histolytica* secretadas *in vitro* en un tiempo de incubación de 6 h.
- Analizar el perfil proteínico de las proteínas secretadas de *E. histolytica* en geles de SDS-PAGE.
- Determinar la actividad enzimática de las proteasas secretadas de *E. histolytica*.
- Separar mediante cromatografía las proteasas y realizar una caracterización bioquímica parcial de algunas de las enzimas separadas.

V. Métodos

En general, los métodos empleados en este trabajo se dividen en tres grandes fases; la primera incluyó el cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*, el proceso de obtención de las proteínas secretadas y la concentración de las mismas; la segunda fase correspondió a la separación de la muestra mediante cromatografía; y la tercera fase consistió en la caracterización bioquímica. En la figura 7 se encuentra resumida, la división antes mencionada.

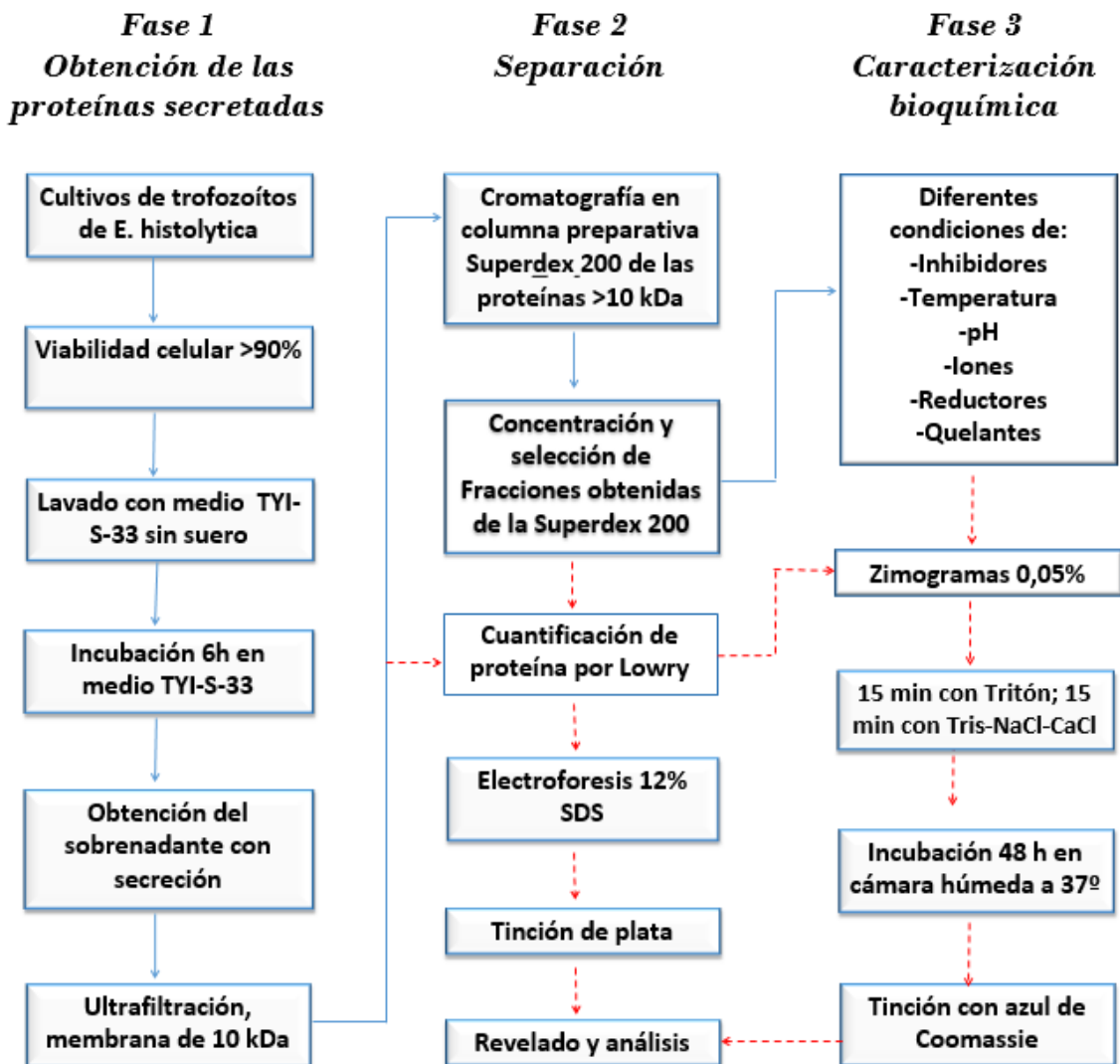


Figura 7. Diagrama de flujo de métodos. Se observan los diferentes pasos agrupados en tres fases, resaltando con líneas punteadas las técnicas comunes a cada una de ellas.

V.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Para el desarrollo de este proyecto, se emplearon trofozoítos de la cepa virulenta HM1:IMSS de *E. histolytica*, cultivados en condiciones axénicas en medio TYI-S-33⁵⁷ (Anexo 1) a 37° C. Para mantener una virulencia uniforme, los cultivos amibianos axénicos se inyectaron a través de la vía porta en hámsteres de 100 g dos veces al mes, siete días después de la inyección, se recuperaron los parásitos de los abscesos y se volvieron a cultivar axénicamente.

V.2 Obtención de las proteínas secretadas

Para la obtención de las proteínas secretadas se utilizaron trofozoítos provenientes de cultivos con 72 h de crecimiento (fase logarítmica), las cajas de cultivo de las amibas se colocaron en hielo durante cinco minutos. Transcurrido el tiempo, los cultivos se trasvasaron a tubos Falcon de 50 mL, donde se tomó una muestra de 1 mL para determinar a través de una tinción con azul de tripano que la viabilidad de los trofozoítos fuera $\geq 90\%$. Posteriormente, se centrifugaron a 161 g, durante cinco minutos. Al término el sobrenadante se eliminó y se realizaron dos lavados con medio TYI-S-33 sin suero. El botón obtenido se resuspendió en 35 mL del medio antes mencionado y se vertió nuevamente a una caja de cultivo, la cual se incubó a 37° C durante 6 h. Finalizado el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron nuevamente a 161 g durante 5 minutos, esta vez se recuperó el sobrenadante. Todo el proceso de obtención de las proteínas secretadas se realizó en condiciones de esterilidad.

V.3 Concentración de las proteínas secretadas

El sobrenadante del cultivo amibiano recuperado (5600 mL) se concentró aproximadamente 30 veces mediante ultrafiltración en el sistema Amicon, empleando una membrana de retención de 10 kDa, obteniendo un volumen final de 187 mL. Este proceso se realizó a una temperatura de 4° C.

V.4 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas del sobrenadante amibiano concentrado (SAC) se realizó mediante el método de Lowry⁵⁸ empleando una curva patrón de BSA de 0 a 100 µg, siguiendo un intervalo de 20 µg de proteína. Por su parte, la muestra SAC fue diluida 1:500 para su cuantificación, la concentración de proteína obtenida en esta solución fue de 48.13 mg/mL.

V.5 Determinación del perfil proteínico y la actividad de las proteasas

Para determinar el perfil proteínico de las muestras se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con un gel separador al 12% y un gel concentrador al 5% (Anexo 2). La electroforesis se corrió a 5 Watts, durante hora y media aproximadamente. En seguida se realizó una tinción de plata (Anexo 3). Una vez revelados, los geles fueron analizados en el negatoscopio.

La detección de la actividad enzimática se realizó por medio de zimogramas, empleando geles de poliacrilamida al 12% (separador) y 5% (concentrador) copolimerizados con gelatina al 0.05%, en condiciones desnaturalizantes. Al término de la electroforesis los geles se lavaron con Tritón al 0.02% durante 15 minutos y con amortiguador Tris-NaCl-CaCl₂ durante 15 minutos más. Después de los lavados los geles se colocaron en cámaras húmedas y se incubaron a 37° C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, fueron teñidos con 50 mL de azul de Coomassie durante 12 h aproximadamente, para después ser desteñidos con una solución de ácido acético-metanol y analizados en el negatoscopio, donde se observó la actividad catalítica de las proteasas.

Mientras que los perfiles proteínicos se realizaron empleando 100 µg de proteína, para el monitoreo de la actividad enzimática, la cantidad de proteína se tuvo que ajustar para cada fracción (Anexo 4), esto con la intención de observar con mejor definición la actividad enzimática.

V.6 Cromatografía: Columna Superdex 200

Una vez que se determinó la actividad enzimática de las proteasas, se realizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) en la columna preparativa Superdex 200,

en total se realizaron 30 corridas inyectando 5 mL de SAC (48.13 mg/mL) y empleando un amortiguador de Tris 10 mM pH 7.4. En cada corrida se colectaron 5 mL de elución por tubo, a un flujo de 1 mL/min, obteniendo al final 80 fracciones.

V.7 Selección de las fracciones para caracterización

Las fracciones obtenidas en la columna Superdex 200 se analizaron por espectrofotometría a 280 nm. Debido a la ausencia de proteína en las primeras 20 fracciones estas fueron desechadas, mientras que las fracciones 21-80 se concentraron de tres en tres para posteriormente analizar su perfil proteínico y la actividad de las proteasas. Con base en los resultados de espectrofotometría, cuantificación de proteínas por Lowry y electroforesis se seleccionó una fracción para su posterior caracterización bioquímica.

V.8 Caracterización bioquímica

Con la finalidad de analizar la actividad de proteasas en las proteínas secretadas, las fracciones se colocaron en presencia de inhibidores clásicos de proteasas de cisteína, serina, metaloproteasas y aspártico. Así mismo se analizaron diferentes condiciones de pH, temperatura, iones, agentes quelantes y reductores.

V.8.1 Inhibidores

Las fracciones seleccionadas se expusieron a E-64, 1-10 fenantrolina, 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro (AEBSFH) y pepstatina, sustancias inhibidoras de proteasas de cisteína, metaloproteasas, proteasas de serina y proteasas de aspártico, respectivamente. El tiempo de incubación fue de 15 min a temperatura ambiente y las concentraciones finales utilizadas se resumen en la Anexo 5. Una vez transcurrido el tiempo, se emplearon geles copolimerizados usando el método descrito anteriormente para registrar cualquier variación en la actividad enzimática.

V.8.2 Iones

Se determinó el efecto del cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂), cloruro de magnesio (MgCl₂), cloruro de manganeso (MnCl₂) y cloruro de zinc (ZnCl₂) en la actividad enzimática de las fracciones seleccionadas. Para esto se tomaron cinco alícuotas y se ajustaron a una concentración final de 0, 2, 10, 50 y 100 µM de cada uno de los iones. Posteriormente se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se corrieron en geles copolimerizados usando el método descrito anteriormente.

V.8.3 pH

De cada una de las fracciones seleccionadas se tomaron cinco alícuotas de 150 µL. La primera se utilizó como control y las siguientes cuatro fueron ajustadas a un pH 3, 5, 7 y 9 usando soluciones de Tris 1 M pH 1 y 2 M pH 11, respectivamente. Una vez ajustado el pH las muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se emplearon geles copolimerizados, mediante el método descrito anteriormente, y se registró el efecto del pH en la actividad enzimática de cada fracción.

V.8.4 Temperatura

Para determinar el efecto de la temperatura en la actividad enzimática del medio secretado por *E. histolytica* se tomaron cuatro alícuotas de 500 µL del SAC, las cuales se incubaron a temperatura ambiente (25 °C), 40, 60 y 80 °C durante 15 min. Transcurrido el tiempo, se emplearon geles copolimerizados, de acuerdo al método descrito anteriormente para registrar cualquier variación en la actividad enzimática.

V.8.5 Reductores

Las fracciones se expusieron a Ditioneitol (DTT) y β-mercaptoetanol, dos agentes reductores. Se tomaron cuatro alícuotas de cada 100 µL, las primeras dos se ajustaron a una concentración final de 0 y 50 mM de DTT. De las alícuotas restantes, la primera se utilizó como control mientras

que la segunda se ajustó a una concentración final de 10% de β -mercaptoetanol. Posteriormente se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se emplearon geles copolimerizados usando el método descrito anteriormente para registrar cualquier variación en la actividad enzimática.

V.8.6 Quelantes

Las fracciones se expusieron a los agentes quelantes ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Para ello, se tomaron cuatro alícuotas de 100 μ l de cada fracción y se ajustaron a una concentración final de 0 y 50 mM de EGTA y EDTA. Posteriormente se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se emplearon geles copolimerizados usando el método descrito anteriormente para registrar cualquier variación en la actividad enzimática.

VI. Resultados

VI.1 Sobrenadante amibiano

El perfil proteínico del SAC (Figura 8.A) muestra una mezcla de proteínas compleja y heterogénea, con pesos moleculares que van desde 25 a 250 kDa. Por su parte la actividad enzimática se observa en las cuatro bandas de color claro que van de los 37 a 50 kDa (Figura 8.B), las cuales debido a la degradación de la gelatina realizada por las proteasas no presentan retención del azul de Comassie.

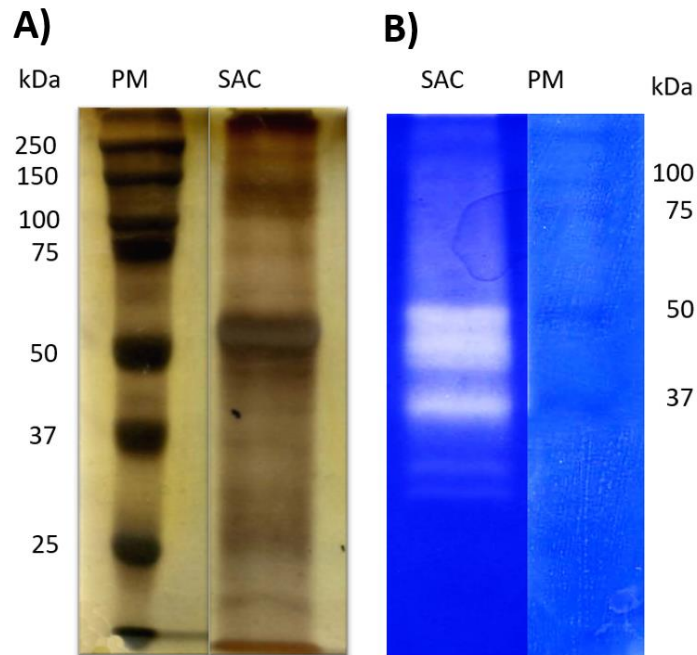


Figura 8. Perfil proteínico del SAC y actividad de proteasas A) Gel SDS-PAGE teñido con plata, de las proteínas secretadas del sobrenadante, B) Actividad enzimática de las proteasas obtenidas por secreción, ambos geles corresponden a muestras colectadas a las 6 h de cultivo y contienen 100 mg de proteína en cada carril.

VI.2 Columna Superdex 200

Las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200 se analizaron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 280 nm. Los resultados mostraron un perfil cromatográfico (Figura 9) que consiste en un pico principal que va de la fracción 59 a la fracción 67 (P-IV), el cual presenta dos alteraciones adyacentes que van de la fracción 45 a la 56 (P-III) y de la 68 a la 80 (P-V), respectivamente. Se observan también dos picos menos prominentes que van de las fracciones 23 a la 27 (P-I) y de la fracción 31 a la 38 (P-II). Las fracciones seleccionadas SD36-38 (Figura 9), corresponden a la zona donde concluye el segundo pico (P-II).

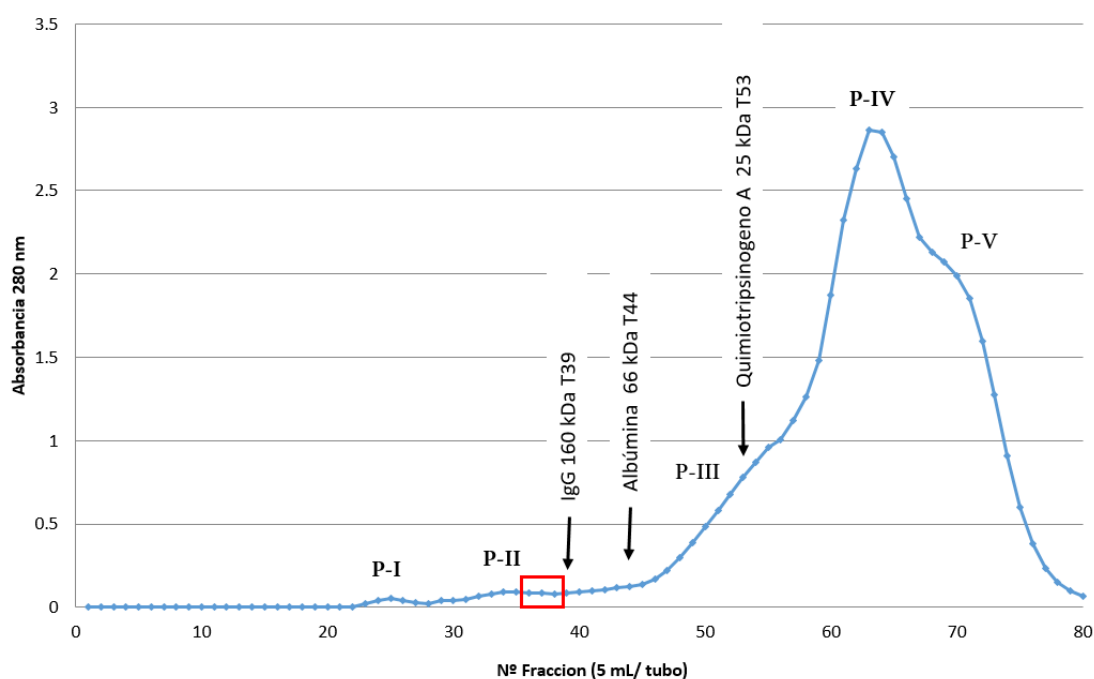


Figura 9. Cromatograma representativo de la columna superdex 200, los pesos moleculares de referencia se señalan con flechas. Las fracciones SD36-38 seleccionadas para la caracterización bioquímica se muestran dentro del recuadro rojo.

Por su parte al concentrar las fracciones en tercias y realizar la cuantificación de proteínas por el método de Lowry se observó una mayor concentración de proteínas en las fracciones 39-59 (Figura 10), fracciones que de acuerdo a los pesos de referencia mostrados en el cromatograma (Figura 9) corresponderían a pesos moleculares de aproximadamente <25-160 kDa, siendo la

fracción SD39-41 de aproximadamente 160 kDa la que presenta mayor concentración de proteínas (10.25 mg/mL). Por el contrario, las fracciones con menor concentración de proteínas se ubican en los extremos de la curva del cromatógrama y corresponden a pesos moleculares más bajos (<25 kDa) y altos (>160 kDa).

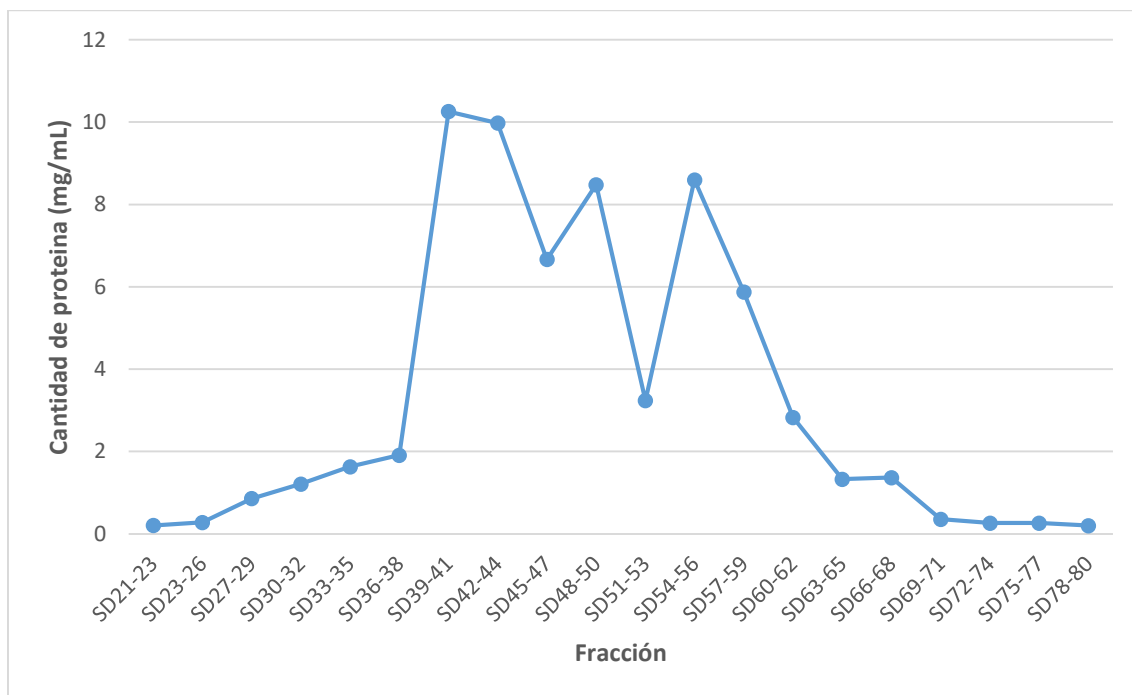


Figura 10. Concentración de proteína (mg/mL) en las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200, concentradas en tercias.

Respecto al perfil proteínico de las fracciones SD21-80 observado en los geles de poliacrilamida, se registró una abundancia de proteínas con pesos moleculares que van desde 37-150 kDa (Figura 11), con una banda de mayor grosor cercana a 75 kDa en las fracciones SD21-50 (Figura 11.A y 11.B), bandas más tenues alrededor de los 50 kDa en las fracciones SD21-47 (Figura 11.A y 10.B) y algunas bandas de bajo peso molecular (<25 kDa) observadas en la fracción SD51-66 (Figura 11.C).

De lo anterior resulta importante destacar la presencia constante de una banda de alto peso molecular (100-150 kDa) desde las primeras y hasta las últimas fracciones (Figura 11). Esto a pesar de que la columna Superdex 200 separa las mezclas de acuerdo a los pesos moleculares de las proteínas, obteniendo en las primeras fracciones proteínas de alto peso molecular y posteriormente proteínas de menor peso molecular. Considerando lo anterior y los pesos moleculares de referencia del cromatograma (Figura 9), la banda en cuestión debería encontrarse únicamente de las fracciones SD21-40.

En cuanto a la actividad de proteasas en geles de sustrato, la fracción con mayor actividad enzimática es la fracción SD21-23, la cual presenta dos zonas de intensa actividad en proteasas con pesos moleculares menores a 50 kDa y al menos cuatro zonas más en proteasas de alto peso molecular (75-250 kDa) (Figura 12.A).

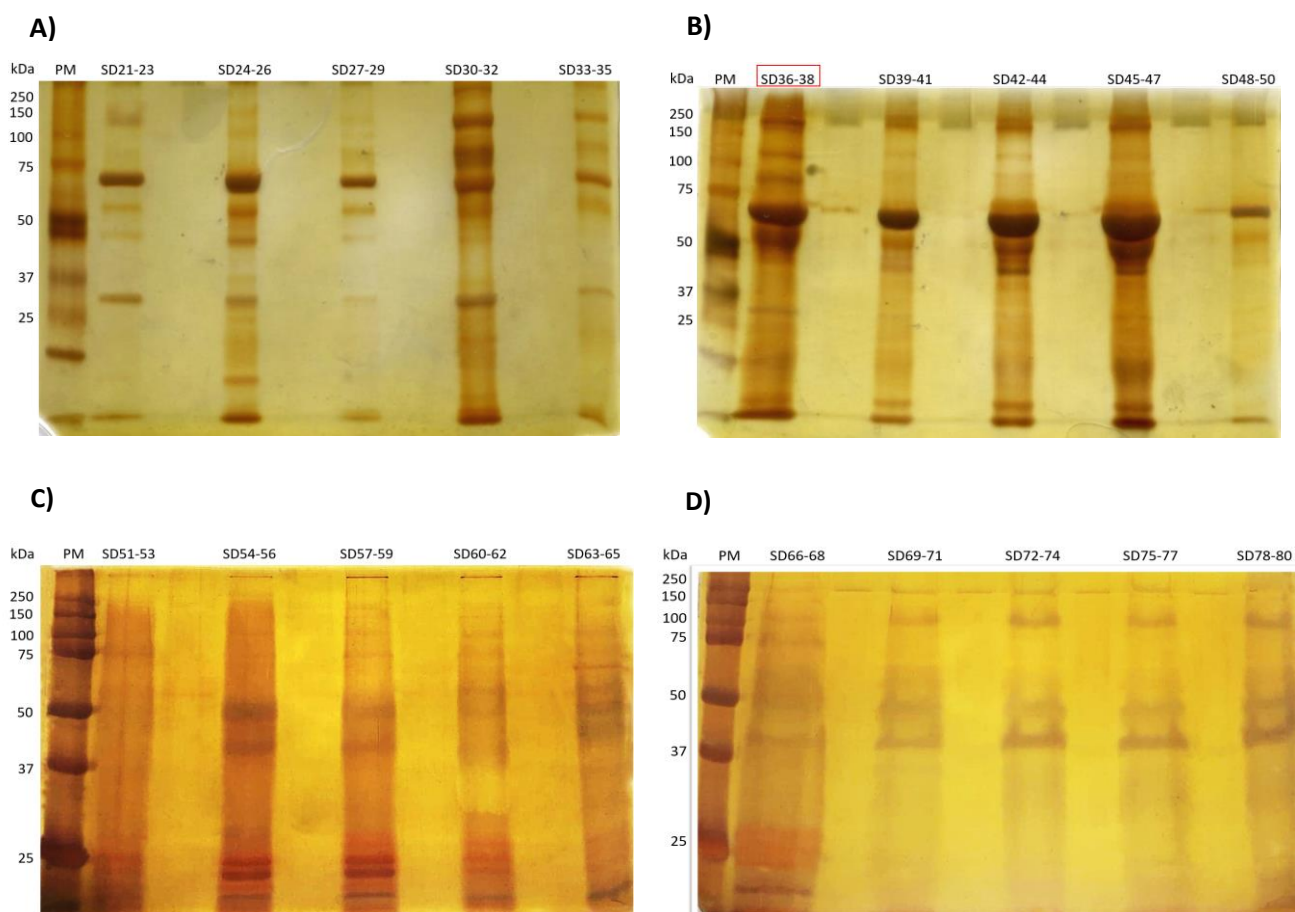


Figura 11. Perfil proteínico en geles SDS-PAGE teñidos con plata de las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200, *fracciones A) SD21-35, B) SD36-50, C) SD51-65, y D) SD66-80.* La fracción SD36-38 seleccionada para caracterización se muestra dentro del recuadro rojo.

Por otro lado, en las fracciones SD27-35 la actividad enzimática parece mantenerse débil pero estable, con dos zonas de intensidad entre los 36-50 kDa y los 75-100 kDa (Figura 12.B). Dentro de estas fracciones, cabe resaltar también la presencia de una banda difusa con peso molecular superior a los 150 kDa que va de la fracción SD30-47 (Figura 12.A y 12.B). En este intervalo, encontramos la fracción SD36-38, la cual además de presentar dos zonas de actividad enzimática (<50 kDa), muestra también un perfil proteínico bien definido y una concentración de proteína (1.911 mg/mL) mayor que la de la fracción SD21-23 (0.207 mg/mL) (Figura 10).

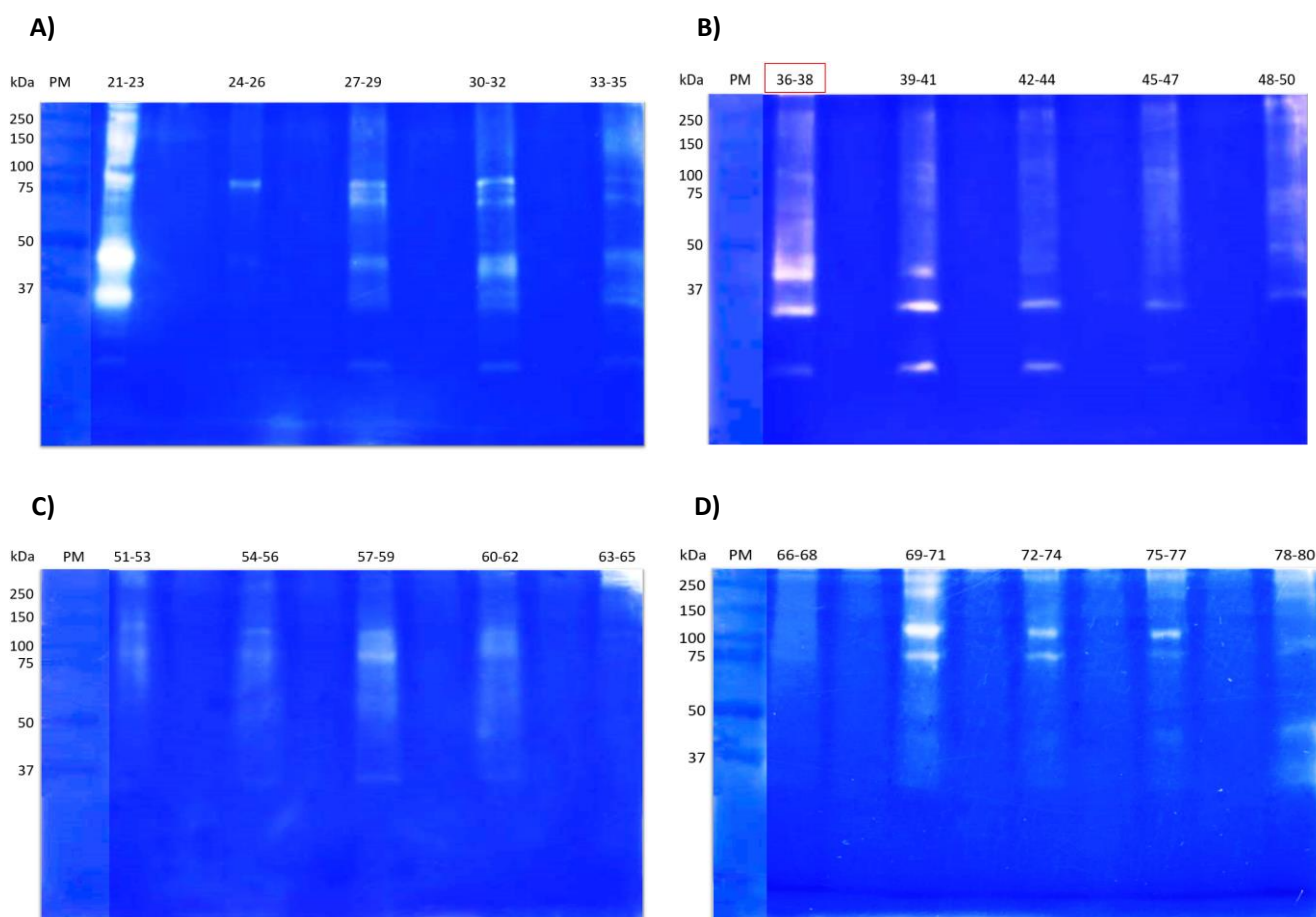


Figura 12. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas de la columna Superdex 200. Fracciones: **A)** SD21-35 **B)** SD36-50 **C)** SD51-65 y **D)** SD66-77. Con la intención de obtener una mejor resolución, se seleccionó una cantidad de proteína diferente para cada fracción (Anexo 4). La fracción SD36-38 seleccionada para caracterización se muestra dentro del recuadro rojo.

Las fracciones SD36-50, contrario a las fracciones anteriores, presentan una mayor intensidad en proteasas de bajo peso molecular (<50 kDa) siendo más evidente en las fracciones SD36-44 (Figura 12.B). De manera general, este comportamiento coincide con las características

esperadas de fracciones resultantes de la columna Superdex 200, sin embargo, esto cambia en las fracciones SD51-80 en las que nuevamente la mayor actividad enzimática la presentan dos proteasas de alto peso molecular, la primera de aproximadamente 75 kDa y la segunda de entre 100-150 kDa (Figura 12.C y 12.D).

De igual manera cabe resaltar un par de bandas de alto peso molecular (≥ 250 kDa), con actividad enzimática, presentes en la fracción SD63-65 (Figura 12.C) y SD69-80 (Figura 12.D), y dos zonas de actividad enzimática de bajo peso molecular (< 50 kDa) observadas en las fracciones SD78-80 (Figura 12.D).

VI.3 Fracción SD36-38: caracterización bioquímica

Las fracciones SD36-38 (Figura 13) muestran un perfil proteínico abundante y heterogéneo, que va desde los < 10 -250 kDa. Presenta dos bandas intensas entre los 50-70 kDa y una actividad enzimática principal en dos bandas ubicadas entre los 25-37 kDa y los 37-50 kDa respectivamente, seguida por al menos seis bandas más tenues entre los 50-250 kDa.

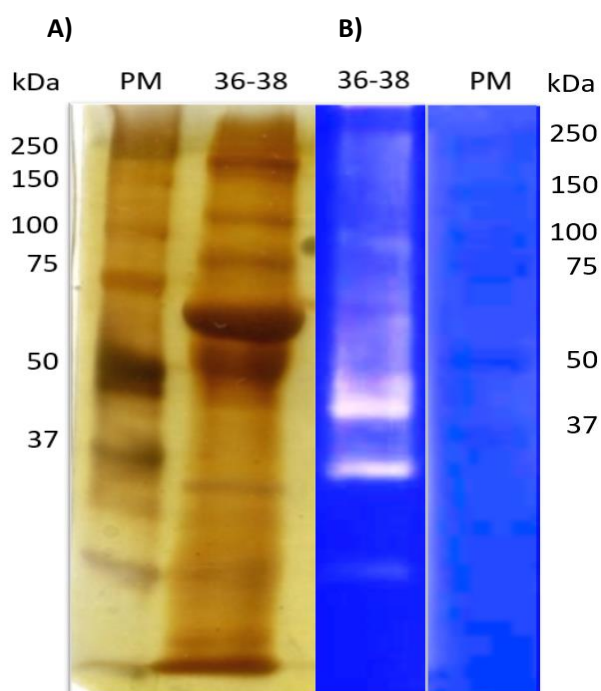


Figura 13. A) Gel SDS-PAGE de las proteínas presentes en la fracción SD36-38, teñido con plata **B)** Actividad enzimática de la fracción SD36-38.

VI.3.1 Inhibidores

Al exponer las fracciones SD36-38 a inhibidores de proteasas, la mayor inhibición se observó con el inhibidor de proteasas de cisteína E-64 a una concentración de 10 μ M (Figura 14.A). En dicha condición sólo se mantienen dos bandas de actividad, la primera entre 37-50 kDa y la segunda de 150 kDa. Sin embargo, al aumentar diez veces la concentración de este inhibidor la actividad se mantuvo sin cambios aparentes (Figura 14.B). Respecto a los inhibidores de metaloproteasas (1-10 fenantrolina), proteasas de serina (AEBSFH) y de aspártico (pepstatina), no se observó un efecto contundente en ninguna de las dos concentraciones probadas.

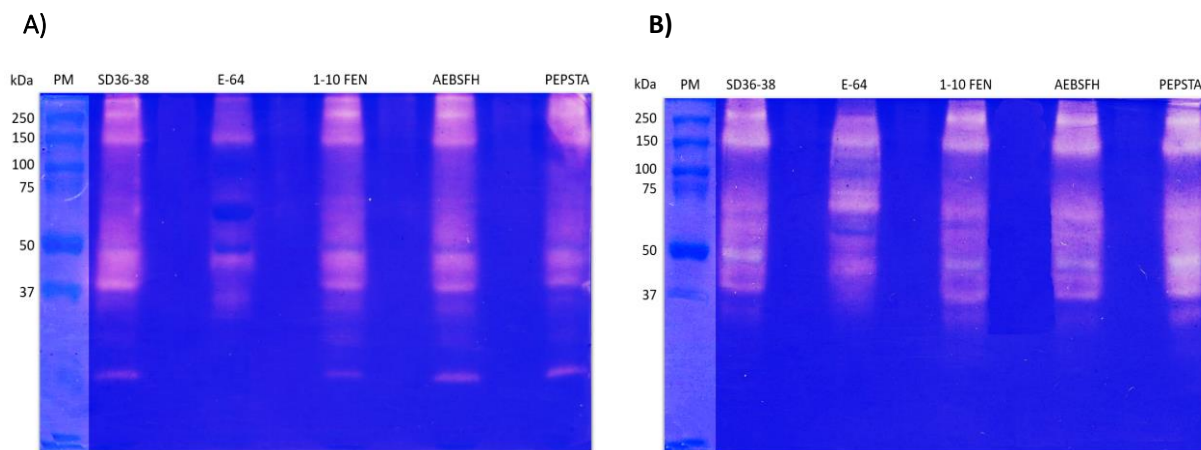


Figura 14. Efecto de los diferentes inhibidores de proteasas en la actividad catalítica de la fracción SD36-38. **A)** Concentración menor: 10 μ M de E-64, 1 mM de 1-10 Fenantrolina, 100 μ M de AEBSFH y 1 μ M de Pepstatina. **B)** Concentración mayor: 100 μ M de E-64, 10 mM de 1-10 Fenantrolina, 1 mM de AEBSFH, 10 μ M, de Pepstatina, inhibidores de proteasas de cisteína, metaloproteasas, serina y aspártico.

VI.3.2 Iones

La actividad enzimática de la fracción SD36-38 no presenta ninguna modificación evidente con la incubación con 2, 10, 50 y 100 μ M de NaCl, y MnCl₂ (Figura 15.A y 15.D). Mientras que con la incubación con MgCl₂, se observa un aumento de la actividad enzimática, dependiente del incremento de la concentración de dicho ion (Figura 15.C). Por su parte el CaCl₂ aumentó la

actividad en la proteasa de menor peso molecular (Figura 15.B), fenómeno que se observa en menor medida en comparación con la incubación con $ZnCl_2$ (Figura 15.E). A su vez, este último provoca un aumento en la actividad de proteasas de alto peso molecular (>75 kDa) a concentración de 50 y 100 μM (Figura 14.E).

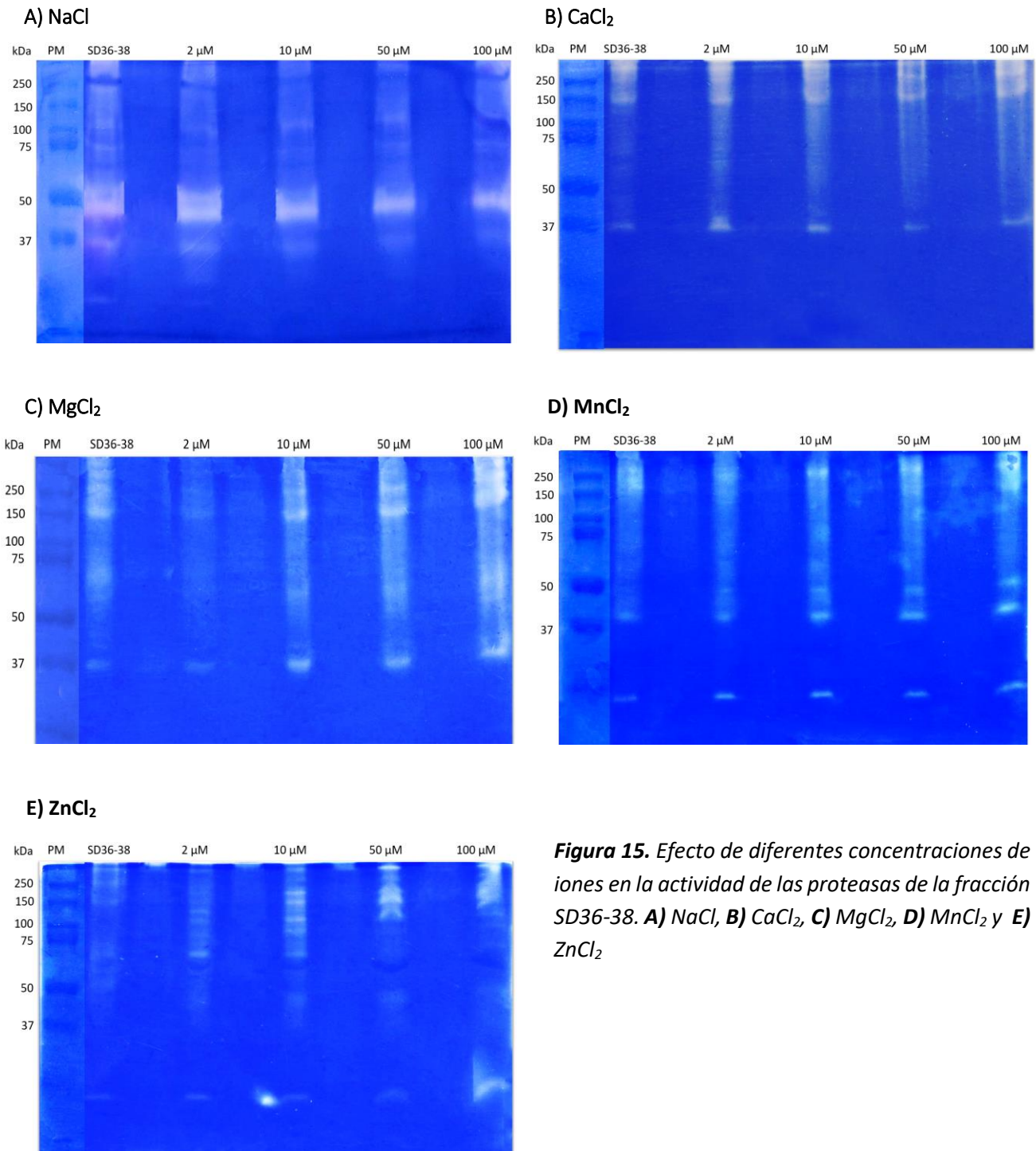


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de iones en la actividad de las proteasas de la fracción SD36-38. **A)** NaCl, **B)** CaCl₂, **C)** MgCl₂, **D)** MnCl₂ y **E)** ZnCl₂

VI.3.3 pH

La fracción SD36-38 presenta una actividad enzimática máxima a pH 5, mientras que dicha actividad se pierde a pH 3 y disminuye en condiciones más alcalinas como son, pH 7 y 9 (Figura 16).

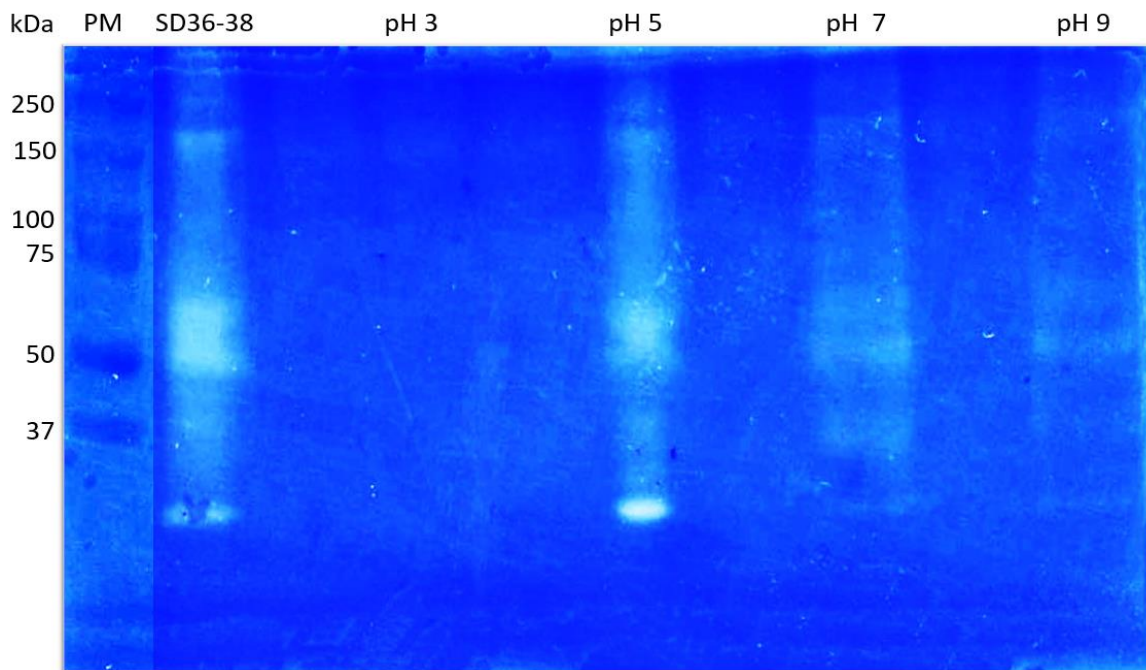


Figura 16. Efecto del pH en la actividad proteolítica de la fracción SD36-38

VI.3.4 Temperatura

En cuanto a la temperatura, las fracciones SD36-38 presentan un ligero aumento en la actividad enzimática a 40 °C, así como una estabilidad a 60 °C y una pérdida de actividad en proteasas de alto peso molecular a 80 °C, todo esto con respecto del control (25 °C). De igual manera, cabe resaltar la termoestabilidad de las dos proteasas de bajo peso molecular (<37 kDa), cuya actividad parece ser óptima, a 60 °C (Figura 17).

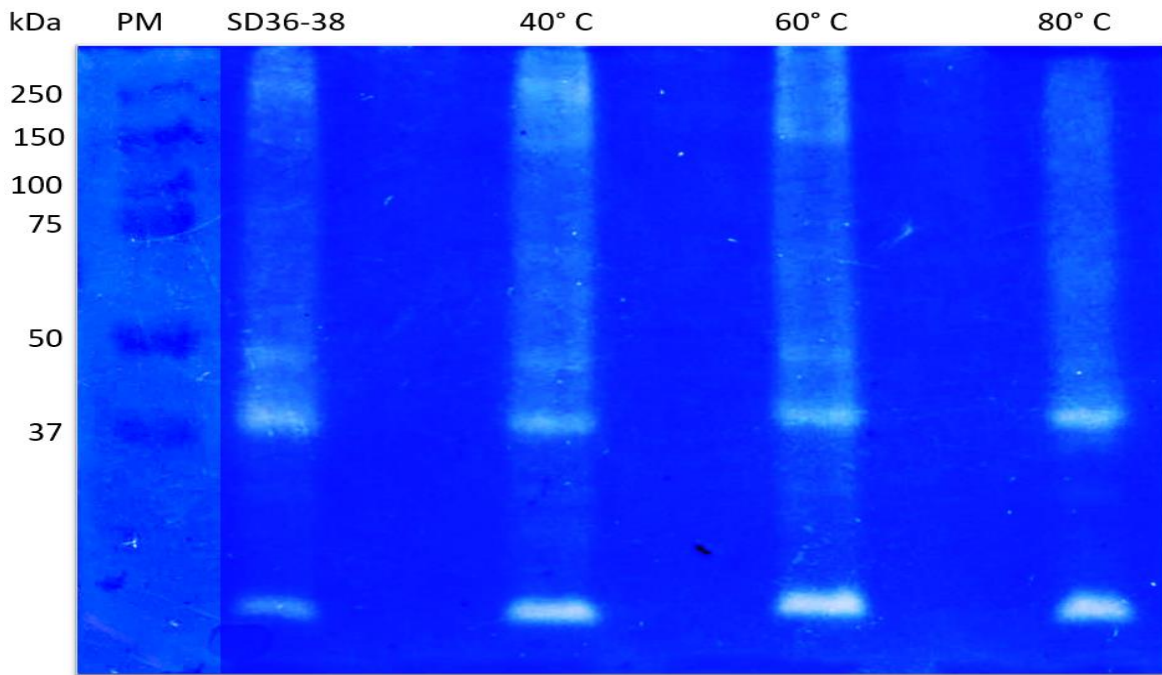


Figura 17. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica en la fracción SD36-38.

VI.3.5 Reductores

La fracción SD36-38 muestra tres zonas de actividad enzimática, la primera entre los 37-50 kDa, la segunda cercana a los 75 kDa y la tercera entre los 100-150 kDa, a la incubación con mercaptoetanol al 10% dichas zonas parecen migrar a pesos moleculares de menor tamaño, la primera se observa por debajo de los 37 kDa, la segunda cercana a los 50 kDa y la última cercana a los 100 kDa (Figura 18.A).

Por su parte, con la incubación con 50 mM de DTT la mayor actividad enzimática se concentra en la banda de menor peso molecular, con tres bandas adicionales de una actividad considerablemente menor, dos cercanas a los 50 kDa y una por debajo de los 50 kDa, lo cual difiere de lo observado en el control donde la actividad enzimática más intensa se encuentra cercana a los 50 kDa con dos de menor intensidad por debajo de los 37 kDa (Figura 18.B).

VI.3.6 Quelantes

Finalmente la actividad de la fracción SD36-38 no presentó ningún cambio evidente a la incubación con el agente quelante EDTA (Figura 19.A), mientras que a la incubación con EGTA se observa una ligera disminución en la actividad enzimática general (Figura 19.B).

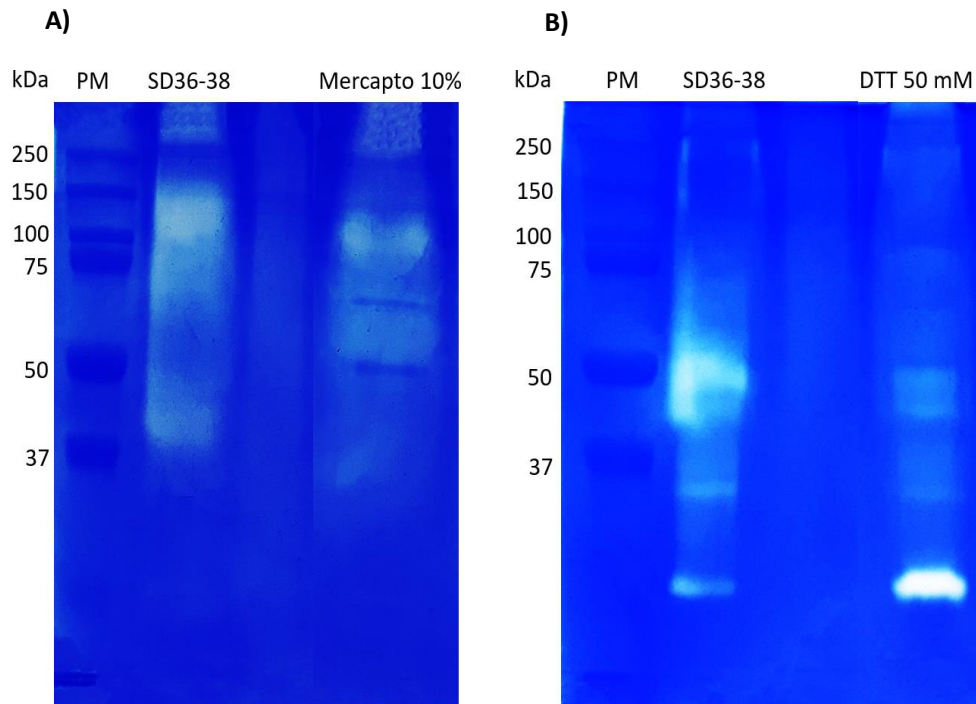


Figura 18. Efecto de los agentes reductores de la actividad catalítica de la fracción SD36-38 **A)** Mercaptoetanol y **B)** DTT.

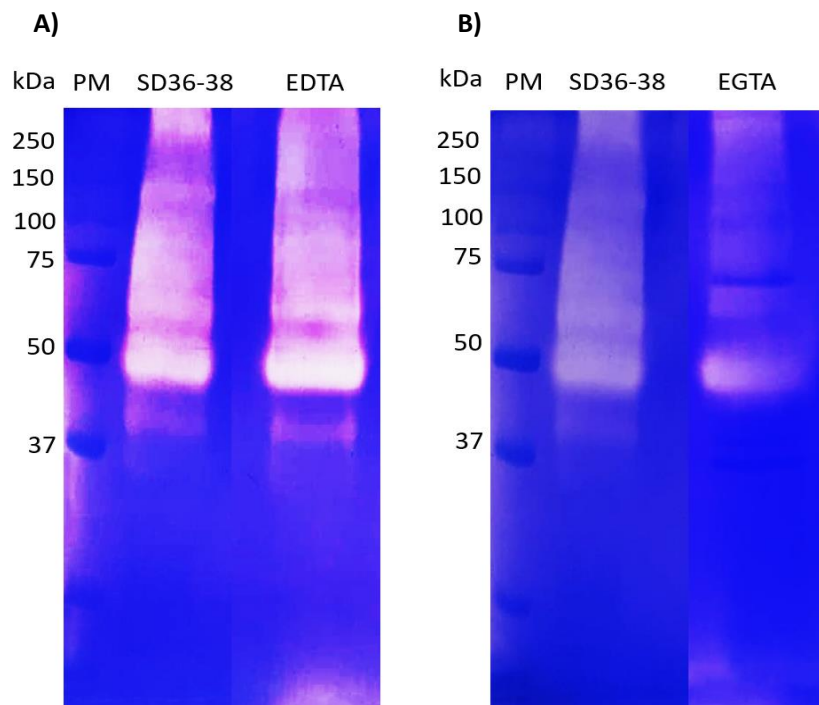


Figura 19. Efecto de los quelantes en la actividad catalítica de la fracción SD36-38 **A)** EDTA y **B)** EGTA

VII. Discusión

En el lisado y en sobrenadante de cultivo de *E. histolytica* se han reportado proteínas con pesos moleculares que van de los 16-200 kDa^{44,59}, algunas proteínas de peso molecular intermedio se han descrito con una actividad proteolítica⁶⁰. Estos datos concuerdan con lo observado en la actividad enzimática y perfil proteico del SAC, y en el cromatograma obtenido de la columna Superdex 200. Donde observamos que el sobrenadante de *E. histolytica* tenía proteínas que van de 25-250 kDa.

Por otro lado, al comparar el perfil proteínico de las fracciones SD21-80 con su respectiva actividad enzimática no se aprecia una relación entre las bandas de mayor grosor y las bandas con mayor actividad enzimática. Al contrario, pareciera que las bandas más tenues en el perfil proteínico son las que presentan mayor actividad, lo cual se observa claramente en las fracciones SD36-50. Esto indica que las proteasas no son las proteínas secretadas más abundantes, lo cual concuerda con el estudio de Ahn y colaboradores⁶¹ que señala que las proteínas secretadas más abundantes están relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y el citoesqueleto. A su vez, esta escasez de proteasas en la secreción de *E. histolytica* dificulta el trabajo con estas moléculas y explica por qué en los últimos años los trabajos han optado por el uso de proteasas recombinantes o lisados celulares.

Además de su escasez, otro factor que dificulta el análisis de proteasas en geles de sustrato es que las proteínas no migran de acuerdo con su peso molecular,⁴⁴ probablemente debido a la formación de multímeros, autoproteólisis o secreción de proenzimas de mayor masa molecular, lo cual puede deberse, a las diferencias en los protocolos de purificación⁵⁹ o bien a los múltiples intrones en el genoma de *E. histolytica*, los cuales tendrían la posibilidad de generar diferentes moléculas de ARN mensajero (ARNm) a partir del mismo gen, dando como resultado la síntesis de variantes o isoformas de una misma proteína, cada una con diferentes propiedades bioquímicas o funcionales¹⁰. La formación de multímeros e isoformas o la autoproteólisis podría explicar por qué fue frecuente observar variaciones en el patrón de actividad enzimática de la fracción SD36-38, a pesar de usar siempre la misma muestra, probablemente el mejor ejemplo sea comparar los controles observados en los geles resultantes de la exposición con DTT y mercaptoetanol, en los cuales el patrón de bandas de los controles utilizados en cada gel cambia considerablemente.

Respecto a la caracterización bioquímica, las proteasas de 50-150 kDa de la fracción SD36-38 disminuyeron su actividad con una concentración baja (1 mM) del inhibidor E-64, esto se debe a que la mayoría de los inhibidores irreversibles actúan mejor a concentraciones por debajo del punto de concentración⁶². Cabe resaltar también que E-64 es un inhibidor de proteasas de cisteína, lo cual concuerda con los reportes previos que mencionan la predominancia de este tipo de proteasas en *E. histolytica*³⁹.

Si bien el tráfico de proteasas en *E. histolytica* aún no se ha comprendido del todo, se cree que está relacionado con las numerosas vesículas ubicadas en su citoplasma⁵⁹ las cuales presentan pH 5.4¹². Si esto se confirma, explicaría por qué se observó una mayor actividad de las proteasas a pH 5, y no a pH's más neutros o alcalinos, como se ha reportado previamente⁴⁴⁻⁴⁵.

Por otro lado, la temperatura óptima para la mayoría de las enzimas humanas está comprendida entre 35-40 °C, con un proceso de desnaturalización por encima de 40 °C⁶³. Considerando que, probablemente las enzimas aquí estudiadas sean secretadas *in vivo* durante la infección, resulta lógico que presenten una respuesta similar ante la temperatura.

En general las proteasas analizadas fueron resistentes a las condiciones desnaturalizantes de los zimogramas, sin embargo, esto cambió a la incubación con agentes reductores. Los agentes reductores por definición, son aquellos capaces de reducir los enlaces disulfuro de las proteínas permitiendo separar las subunidades más pequeñas. Esto se ha observado en proteasas de cisteína amibianas, las cuales activan formas procesadas, de menor peso molecular con la incubación con DTT y mercaptoetanol.^{45,59} Este efecto también fue observado en este trabajo, a la incubación con mercaptoetanol y en mayor medida con la incubación con DTT, en la cual se registró una pérdida de actividad enzimática en lo que probablemente sean multímeros de proteasas y una marcada actividad enzimática en una única banda de bajo peso molecular (<36 kDa).

El aumento de actividad en la proteasa de menor peso molecular (>36 kDa) se observó también a la incubación a pH 5 y temperatura de 60 °C ambas condiciones desnaturalizantes, y con la incubación con CaCl₂, ion cuyo flujo aumenta durante el contacto y la destrucción de las células del hospedero¹². Estas observaciones sugieren que las condiciones antes mencionadas favorecen la degradación de dímeros o multímeros, permitiendo la expresión y migración de proteasas de acuerdo al verdadero peso molecular. Esto puede explicar por qué la actividad de proteasas suele ser de pesos moleculares intermedios a altos, a pesar de que es sabido que

todos los genes de *E. histolytica* codifican proteasas de cisteína maduras, con masas moleculares calculados entre 24 y 35 kDa⁵⁵.

Por último, no se observó un cambio significativo en la incubación con agentes quelantes, lo cual indica que dichas enzimas no presentaban iones metálicos en la estructura que las estuvieran activando o inactivando, esto a pesar de que se sabe que más del 25% de todas las enzimas contienen iones metálicos fuertemente enlazados o requieren de tales iones para su actividad⁶⁴.

VIII. Conclusiones

Si bien las proteasas de *E. histolytica* no son las proteínas secretadas más abundantes, en este trabajo se observó una gran diversidad de estas enzimas con pesos que van desde los <37-150 kDa. En el caso de la fracción SD36-38 se observaron proteasas de cisteína no dependientes de iones, que presentan una actividad óptima a pH 5 y temperatura de 40 °C, probablemente debido a su origen de vesículas ácidas de la amiba y a la temperatura del hígado humano, lo cual podría favorecer su papel en el daño observado en el absceso hepático amibiano.

Además de permitirnos relacionar los resultados aquí obtenidos con el proceso que ocurre *in vivo* durante la amibiasis, conocer las condiciones óptimas para la actividad enzimática de un grupo de enzimas como las de la fracción SD36-38, también es clave para implementar dichas condiciones en sistemas posteriores de separación, como pueden ser columnas de afinidad o de intercambio iónico, que permitan la purificación de cada una de las enzimas de dicha fracción. De igual manera, resulta importante recordar que en el presente trabajo solo se realizó la caracterización bioquímica de una tercia de las fracciones obtenidas por cromatografía lo cual deja la posibilidad de realizar la caracterización bioquímica con el resto de fracciones.

IX. Literatura citada

1. Serrano J., Piña C., Reyes M., Ortiz G. y De la Garza M. (2012) Proteases from *Entamoeba spp.* and pathogenic free-living Amoeba as virulence factors. *Journal of Tropical Medicine*.
2. Robert L. (2008) Sarcodinos o amibas de importancia médica. Amibiasis en el siglo XXI. *Sociedad Mexicana de parasitología*. IDISA. 16-28.
3. Adl S., Simpson A., Farmer M., Andersen R., Anderson R., Barta J., Bowser S., Brugerolle G., Fensome R., Fredericq S., James T., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C., Lewis L., Lodge J., Lynn D., Mann D., McCourt R., Mendoza L., Moestrup O., Mozley S., Nerad T., Shearer C., Smirnov A., Spiegel F. y Taylor M. (2005) The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal Eukariotic Microbiology*. 52(5):399-451.
4. Martínez R. y Ponce F. (2010) Taxonomía y filogenia del genero *Entamoeba*. Una revisión histórica. *Rev. Ibero-Latinoamericana. Parasitología*. 69:5-37.
5. Kaminsky R. (2011) *Parasitología clínica. Guía metodológica*. Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Departamento de Pediatría, Facultad de Ciencias Médicas.
6. Rosenthal B., Mai Z., Caplivski D., Ghosh S., De la Vega H., Graf T. y Samuelson J. (1997) Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of Bacteriology*. 179 (11): 3736-3745.
7. Stanley S. (2003) Amoebiasis. *Lancet*. 361:1025-1034.
8. Chávez B. y González A. (2013) *Entamoeba histolytica*: la estructura interna de un destructor por naturaleza. *Ciencia*. 64: 42-49.
9. Loftus B., Anderson I., Davies R., Samuelson J., Amedeo P., Roncaglia P., Berriman M., Hirt R.P., Mann B.J., Nozaki T., Suh B., Pop M., Duchene M., Ackers J., Tannich E., Leippe M., Hofer M., Bruchhaus I., Willhoeft U., Bhattacharya A., Chillingworth T., Churcher C., Hance Z., Harris B., Harris D., Jagels K., Moule S., Mungall K., Ormond D., Squares R., Whitehead S., Quail M.A., Rabinowitsch E., Norbertczak H., Price C., Wang Z., Guillén N., Gilchrist C., Stroup S.E., Bhattacharya S., Lohia A., Foster

- P.G., Sicheritz-Ponten T., Weber C., Singh U., Mukherjee C., El-Sayed N.M., Petri W.A. Jr, Clark C.G., Embley T.M., Barrell B., Fraser C.M. y Hall N. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*. 433:865-868.
10. Vargas M. (2013) La información genética de un organismo devastador. *Ciencia*. 64: 42-49.
 11. Martínez A. (1995) Las amibas, enemigas invisibles. Fondo de cultura económica. México. 47:46-68.
 12. Ralston K. y Petri W. (2011) Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology*. 27:253-262.
 13. Ruiz M. (2008) *Entamoeba histolytica* life cycle. *Parasitología clínica*.
 14. González M., Carabarin A., Baylon L. y Rosales J. (2012) De amibas y amebiasis. *Elementos*. 87:13-18.
 15. Martínez A. (2013) Antecedentes de la amibiasis en México. *Ciencia*. 64: 10-15
 16. Pinilla E., López C. y Viasus F. (2008) Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista Médica de Chile*. 136:118-124.
 17. Romero R. y García Y. (2008) Aspectos históricos. Amibiasis en el siglo XXI. Sociedad Mexicana de parasitología. IDISA. 11-15.
 18. Guarner V. (1994) Historia de la amibiasis. Amibiasis infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Trillas. 16-26.
 19. WHO. (1997) Amoebiasis. *Weekly epidemiological record*. 72 (14): 97-100.
 20. Chacín L. (2013) Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Revista Médica de Chile*. 141:609-615.
 21. Hernández M., Morán P. y Ximénez C. (2013) Amibiasis: la enfermedad, su diagnóstico y tratamiento. *Ciencia*. 64: 26-33.
 22. Morán P., Gómez A., Valadez A., García G., Ramos F., González E., Limón A., Riebeling C., Valenzuela O., Rojas L., Melendro E. y Ximénez C. (2009) Periodicity and patterns of

- Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in HIV⁺/ AIDS patients in Mexico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 103 (4):307-315.
23. Ximénez C., Morán P. y Ramiro M. (2013) ¿Es la amibiasis un problema de salud pública? *Ciencia*. 64: 16-25.
 24. Ruiz D. y Lozano R. (2008) Epidemiología de la amibiasis. *Amibiasis en el siglo XXI*. Sociedad Mexicana de parasitología. IDISA. 39-43.
 25. Lopez C. y Bond J. (2008) Proteases: Multifunctional enzymes in life disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (45): 30433-30437
 26. Raza A., Muhammad G., Ahmad M. y Hanif K. (2013) Amoebiasis as a major risk to human health. *International Journal of Molecular Medical Science*. 3 (3): 13-24.
 27. Fleeta J., Bueno O. y Bueno M. (2000) Amebiasis intestinal y absceso hepático amebiano. Elsevier. 36 (3): 96-101
 28. Shibayama M. y Tsutsumi V. (2013) Patología de la amibiasis: factores y causas. *Ciencia*. 64: 34-41.
 29. Pritt B. y Clark G. (2008) Amebiasis. *Clinic Proceedings*. 83(10):1154-1160.
 30. Valenzuela O., Moran P., Ramos F., Cardoza J., García G., Valadez A., Rojas L., Garibay A., González E. y Ximénez C. (2009) Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: a case report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 80, 51–54
 31. Perez R., Ingeborg B., Monfort I. y Pérez R. (1994) Patobiología de la amibiasis. *Amibiasis infección y enfermedad por Entamoeba histolytica*. Trillas. 155-187.
 32. Barret A., Woessner F. y Rawlings N. (2012) *Handbook of proteolytic enzymes*. Elsevier. 948.
 33. McKerrow J.H. (1989) Mini review Parasite proteases. *Experimental Parasitology* 68: 111-115.
 34. Mottram J., Coombs G. y Alexander J. (2004) Cysteine peptidases as virulence factor of *Leishmania*. Elsevier. 7: 375-381.

35. Rawlings N. y Barret A. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochemistry*. 290: 205-218.
36. Barret A. (1989) *Proteolytic enzymes: nomenclature and classification*. Proteolytic enzymes. Oxford University Press. Great Britain. 1-21.
37. Malagón D., Benítez R. y Kasný A. (2013) Peptidases in parasitic nematodes: a review. *Ecology, Diseases and Management*. Nova Science Publishers, Inc. 61-102. ISBN: 978-1-62257-692-0.
38. Caffrey C. y Steverding D. (2009) Review: Kinetoplastid papain-like Cystein peptidases. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 167:12-19.
39. Tillack M., Biller L., Irmer H., Freitas M., Gomes M., Tannich E. y Bruchhaus I. (2007) The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*.
40. Trejos J. y Castaño J. (2009) Factores de virulencia del parásito intestinal *Entamoeba histolytica*. Revisión de tema. *Infection*. 13 (2): 100-111.
41. Ah Lee Y., Hee N., Min A., Ah K., Nozaki T., Saito Y., Mirelman D. y Heon S. (2014) *Entamoeba histolytica*-secreted cysteine proteases induce IL-8 production in human mast cells via a PAR2-independent mechanism. *Parasite*.
42. Clark C., Alsmark U., Tazreiter M., Saito Y., Ali V., Marion S., Weber C., Mukherjee C., Bruchhaus I., Tannich E., Leippe M., Sicheritz T., Foster P., Samuelson J., Noel C., Hirt R., Embley T., Gilchrist C., Mann B., Singh U., Ackers J., Bhattacharya S., Bhattacharya A., Lohia A., Guillén N., Duchene M., Nozaki T. y Hall N. (2007) Chapter 2: Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in Parasitology*. 77-84.
43. Hellberg A., Nowak N., Leippe M., Tannich E. y Bruchhaus I. (2002) Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*. 24:131-137.
44. Ocadiz R., Orozco E., Carrillo E., Quintas L., Ortega J., García R., Sánchez T., Castillo B., García G. y Rodríguez M. (2005) EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine

- protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology*. 7(2): 221-232.
45. Ghosh A. y Raha S. (2015) Molecular and functional characterisation of a stress responsive cysteine protease, EhCP6 from *Entamoeba histolytica*. Elsevier. 109: 55–61
 46. Matthiesen J., Bartels A., Marien D., Ofori S., Biller L., Tannich E., Lotter H. y Bruchhaus I. (2013) Overexpression of specific cysteine peptidases confers pathogenicity. *mBio*.
 47. Irmer H., Tillack M., Biller L., Handal G., Leippe M., Roeder T., Tannich E. y Bruchhaus I. (2009) Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity. *Molecular Microbiology*. 72 (3): 658-667.
 48. Tannich E., Scholze H., Nickel R. y Horstmann R. (1991) Homologous cysteine proteinases of pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*: differences in structure and expression. *Journal of Biological Chemistry*. 266(8):4798–4803.
 49. Luaces A.L. y Barrett A.J. (1988) Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochemical Journal*. 250(3):903–909.
 50. Jacobs T., Bruchhaus I., Dandekar T., Tannich E. y Leippe M. (1998) Isolation and molecular characterization of a surface bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology*. 27 (2): 269-276.
 51. Thibeaux R., Avé P., Bernier M., Morcelet M., Frileux G. y Labruyere E. (2014) The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metallo proteinases to invade colonic tissue. *Nature Communications*.
 52. He C., Nora G. y Schneider E. (2010) A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase EhCP4 is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *Journal of Biological Chemistry*. 285(24): 18516–18527.
 53. García G., Rodríguez M., Ocadiz R., Martínez M., Arroyo R., González A. y Orozco E. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology*. 33 (3):556-568

54. Quintas L., Orozco E., Briebe L., Arroyo R. y Ortega J. (2009) Protein, refolding and autoactivation of the recombinant cysteine proteinase EhCP112 from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*. 63:26-32.
55. Bruchhaus I., Loftus B., Hall N. y Tannich E. (2003) The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell*. 2(3):501-509.
56. Que X., Brinen L., Perkins P., Herdman S., Hirata K., Torian B., Rubin H., McKerrow J.H. y Reed S.L. (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 119:1. 23–32.
57. Diamond L., Harlow D. y Cunnick C. (1978) A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72 (4): 431-432.
58. Lowry O., Rosebrough N., Farr L. y Randall R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
59. Que X. y Reed S. (2000) Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 13 (2):196-206.
60. Keene W., Petit M. y Allen S. (1986) The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Journal of Experimental Medicine*. 163:536-549.
61. Ahn C.S., Kim J.G., Shin M.H., Lee Y.A. y Kong Y. (2018) Comparison of secretoma profile of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proteomics*. 18:1700341.
62. Salvesen G. y Nagase H. (2001) Inhibition of proteolytic enzymes. *Proteolytic Enzymes* 2nd edition. Oxford University Press. 105-130.
63. Ferrier D. (2014) Enzimas. *Bioquímica* 6th edition. Lippincott's Illustrated Reviews. 53-67.
64. Murray R. (2001) Enzimas: mecanismos de acción. *Bioquímica de Harper*. Manual Moderno. México. 119-126.

X. Anexos

Anexo 1. Composición del medioTYI-S-33

Componente	Gramos/litro
Fosfato dipotásico	1.0
Fosfato monopotásico	0.6
Cloruro de sodio	2.0
Cisteína	1.0
Ácido ascórbico	0.2
Citrato de amonio	0.022
Dextrosa	10
Pectona	30
Suero bovino adulto	10%
Vitaminas	3%

Anexo 2. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%

Componente	Gel inferior 12% 10 (mL)	Gel separador 5% 5 (mL)
H2O	3.3	3.4
Acrilamida 30% Bis 0.8%	4.0	0.83
Tris 1.5 M	2.5 (pH 8.8)	0.63 (pH 6.3)
SDS 10%	0.1	0.05
APS 10%	0.1	0.05
TEMED	0.006	0.007

Anexo 3. Protocolo tinción de plata

Solución	Tiempo	Repeticiones
Etanol 30% Ácido acético 10%	>3 h	1
Etanol 30%	30 min	2
Agua mili-Q	10 min	2
Plata 0.5%	>1 h	1
Agua mili-Q	30 seg	2
Carbonato de sodio 2.5%	>20 min	1
Ácido acético 1 N	>1 h	1

Anexo 4. Cantidad de proteína utilizada (μg) para los geles de actividad enzimática de las fracciones obtenidas de la columna superdex (SD).

Fracción	μg
SD21-23	20
SD23-26	50
SD27-29	50
SD30-32	50
SD33-35	50
SD36-38	20
SD39-41	40
SD42-44	40
SD45-47	40
SD48-50	50
SD51-53	40
SD54-56	60
SD57-59	90
SD60-62	90
SD63-65	100
SD66-68	130
SD69-71	100
SD72-74	100
SD75-77	100
SD78-80	120

Anexo 5. Inhibidores empleados para la caracterización bioquímica

Inhibidor	Proteasas inhibidas	Concentración menor	Concentración mayor
E-64	Cisteína	10 μM	100 μM
1-10 fenantrolina	Metaloproteasas	1 mM	10 mM
AEBSFH	Serina	0.1 mM	1 mM
Pepstatina	Aspártico	1 μM	10 μM