



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PARTICIPACION DE LA PROTEASA DE CISTEINA DE *Entamoeba histolytica* EN EL DESARROLLO DEL ABSCESO HEPATICO AMIBIANO EXPERIMENTAL

TESIS



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

ALFONSO OLIVOS GARCIA

MEXICO , D. F.

OCTUBRE DEL 2001

225719

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM BAJO LA DIRECCIÓN DEL Dr. RUY PÉREZ TAMAYO Y LA Dra. IRMGARD MONTFORT HAPPEL CON LA ASESORÍA DE LA Dra. Ma. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ Y EL Dr. ALEJANDRO ALAGÓN CANO.

DEDICATORIA

A mis padres de quienes he recibido todo el amor, la comprensión, el cariño y el buen ejemplo.

A Cynthia por su amor, comprensión, apoyo y todos los momentos de felicidad.

A mis hermanos Ino, Tere, Ofelia, Fermín y Manuel con todo cariño.

A mis queridos y adorados sobrinos.

A mis tíos y primos especialmente Alicia y Mary.

A mis amigos: Carlos, Gloria, Julio César, Bety, Damián, Augusto, Alexis, Marco Antonio, Ricardo, Patricia, Gloria, Rodolfo, Malena, Gabriel, Mario, Fernando, Laila, Vicente, Sergio, Daniel, Paco, Porfirio, Arturo, Pedro, Marcela, César, Jorge, Noemí, Javier, Elizabeth, Alfonso, Carmen, Berta, Norma, Lolita, Bernardo, Rocío, Jesús y demás.

AGRADECIMIENTOS

A los admirables doctores, Irmgard Montfort, Ingeborg Becker y Ruy Pérez-Tamayo por su amistad, apoyo e impulso a mi desarrollo personal y profesional.

A los miembros del jurado por su amabilidad y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A los técnicos académicos Eusebio Tello, Augusto González y al Sr. Pedro Balderas por todo el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

Al encargado del bioterio Sr. Ricardo Vargas por haberme proporcionado animales de excelente calidad.

A mis compañeras del laboratorio Rosario y María del Carmen por su amistad y consejos.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, según el No. de registro 309-0.

Agradezco al CONACYT el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 142313.

CONTENIDO

ANTECEDENTES	1
Generalidades	1
Factores de virulencia en <i>Entamoeba histolytica</i>	2
Mecanismos de invasión y evasión de <i>Entamoeba histolytica</i>	5
Proteasas de cisteína en la amibiasis experimental.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
La proteasa de cisteína amibiana en la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero.....	9
La proteasa de cisteína amibiana en los mecanismos de sobrevivencia de la amiba.....	10
La proteasa de cisteína amibiana en los mecanismos de daño.....	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Cultivo axénico de <i>Entamoeba histolytica</i>	13
Cultivo de trofozoítos.....	13
Absceso hepático amibiano experimental en hamster.....	13
Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína.....	14
Cultivo masivo de amibas.....	14

Purificación de proteasas de <i>Entamoeba histolytica</i>	14
Extracción con éter.....	14
Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 2.5M.....	15
Zimograma en gel de gelatina.....	16
Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 0.5M.....	17
Secuenciación de la proteasa purificada.....	18
Obtención de anticuerpos anti-proteasa	18
Immunización a conejos.....	18
Determinación de la inmunoreactividad de los sueros de conejos inmunes.....	19
Purificación de inmunoglobulinas del suero de conejos.....	19
Determinación de la especificidad de los anticuerpos anti-proteasa.....	20
Efecto de los anticuerpos anti-proteasa en la actividad proteolítica de la enzima purificada.....	21
Efecto de los anticuerpos anti-proteasa en la actividad proteolítica de <i>E. histolytica</i>	21
Inmunodetección de proteasas amibianas en el absceso hepático amibiano experimental en hamster	21
Partículas inertes de liberación en hígado de hamster	23
Microesferas de gelatina.....	23
Microesferas de superdex 75.....	23
Incorporación de la proteasa amibiana purificada en microesferas de superdex 75.....	23
Inmunolocalización de la proteasa en las microesferas de superdex 75 con proteasa en el hígado de hamster.....	24
ORIGEN DE LOS REACTIVOS	24

RESULTADOS	26
Absceso hepático amibiano experimental en hamster.....	26
Cultivo masivo de amibas.....	26
Extracción de amibas con éter.....	26
Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 2.5M.....	27
Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 0.5M.....	31
Secuenciación de la proteasa purificada.....	37
Obtención de anticuerpos anti-proteasa.....	37
Efecto de los anticuerpos anti-proteasa en la actividad proteolítica de <i>E. histolytica</i>	40
Efecto de las microesferas de gelatina en el hígado de hamster.....	44
Efecto de las microesferas de superdex 75 con y sin proteasa en el hígado de hamster.....	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN	51
BIBLIOGRAFÍA	52

ANTECEDENTES

Generalidades

La amibiasis es la infección humana causada por el parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. Este padecimiento es responsable de aproximadamente 100000 muertes por año en el mundo, con alta tasa de incidencia en países subdesarrollados.⁷⁵ La infección se inicia al ingerir alimentos o agua contaminados con quistes, algunos de los cuales al llegar al intestino adoptan la forma de trofozoíto, proliferan y pueden cambiar nuevamente a la forma de quistes que al salir pueden reiniciar el ciclo biológico (figura 1). Durante esta colonización la amiba actúa algunas veces como comensal y en otras daña la mucosa intestinal, que en ocasiones perfora y a través de la circulación puede llegar a invadir casi cualquier órgano (figura 2). La variedad de cuadros clínicos que presenta esta infección ha sido atribuida a; 1) la existencia de cepas patógenas y no patógenas, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* respectivamente, diferenciadas por su patrón isoenzimático⁶³ y en algunas secuencias del ADN;⁸ 2) al diferente grado de virulencia de las cepas patógenas;^{23,72} y 3) factores propios del hospedero aun no conocidos. La amibiasis es casi exclusiva del ser humano y a la fecha no se conoce ningún modelo experimental en el que se reproduzca el ciclo biológico completo, sin embargo el modelo del absceso hepático amibiano experimental en hamsters, gerbos y ratones SCID es el más estudiado de este tipo de lesiones.

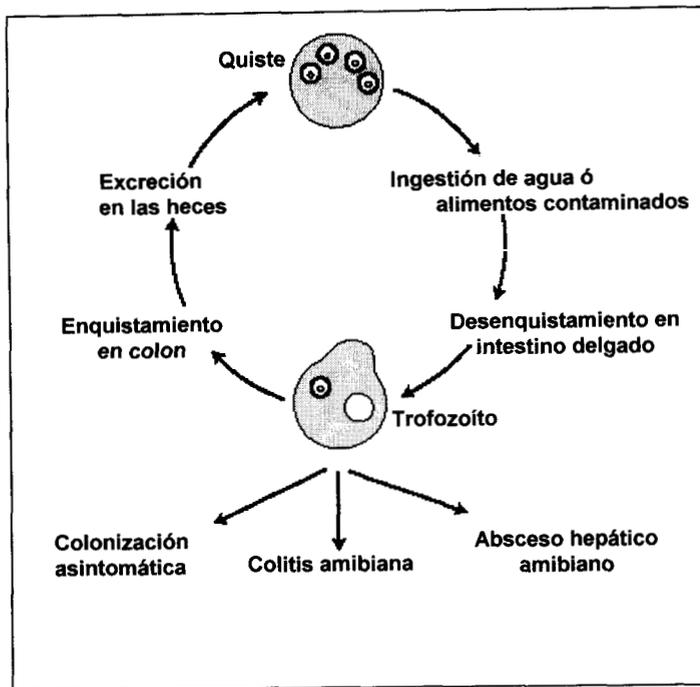


Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica* y las manifestaciones clínicas de la infección en humanos.³¹

Factores de virulencia en *Entamoeba histolytica*

Las moléculas de *E. histolytica* que se han asociado con la virulencia son:

1. Lectinas de superficie: moléculas bien caracterizadas que reconocen carbohidratos y son esenciales para la adherencia a células blanco. En la amiba se ha encontrado una adhesina específica para galactosa⁵⁸ que tiene epítopos semejantes a CD59.²² Esta molécula presente en la superficie de eritrocitos, linfocitos y otras células, previene la unión del complejo de ataque del complemento, además se sugiere su participación en la citotoxicidad y en la inactivación de macrófagos durante el desarrollo del absceso hepático amibiano.^{11,64} Por otra parte se ha demostrado que al ser utilizada como inmunógeno en animales de experimentación, confiere alta protección contra el absceso hepático amibiano experimental.⁷⁷

2. Fosfolipasas: enzimas del grupo de las acil hidrolasas que se clasifican de acuerdo al enlace que rompen dentro de la estructura de un fosfolípido. En *E. histolytica* se han descrito dos, una dependiente de calcio asociada a la fracción membranal con pH óptimo alcalino, y otra independiente de calcio asociada a la fracción citosólica con pH óptimo ácido.^{41,73} La inhibición de éstas en las amibas resulta en la disminución del efecto citolítico sobre líneas celulares *in vitro*.⁵⁹

3. Superóxido dismutasa y grupos tiol de proteínas de membrana: debido a su poder reductor pueden contrarrestar la oxidación generada por procesos tanto fisiológicos (respiración) como patológicos (inflamación).^{9,21,35}

4. Amiboporo: son péptidos con alta homología al componente C9 del complemento, presentan similitud estructural con el veneno de abejas y el polipéptido NK-lisina de linfocitos T citotóxicos y células NK. Se han clonado y caracterizado bioquímicamente tres isoformas A, B y C que se presentan con proporción de 35:10:1 respectivamente. Estas moléculas son capaces de formar poros y despolarizan la membrana en células blanco por contacto íntimo amiba-celula blanco.^{4,6,37}

5. Proteasas de cisteína: son enzimas con capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos y con cisteína en el sitio activo. En *E. histolytica* se han descrito diversas de estas proteasas con pesos moleculares que oscilan en un rango entre 16 y 96 kDa.^{3,34,43,44,46,50} Se han identificado por lo menos 6 diferentes genes que codifican para éstas,⁸ de los que sólo CP5 se encuentra truncado en *E. dispar*.⁵⁴ Estas proteasas son capaces de degradar proteínas de matriz extracelular como colágena, laminina y fibronectina;^{23,72} además, activan complemento fragmentando C3⁶¹ y degradan las anafilatoxinas C3a y C5a.⁶⁰

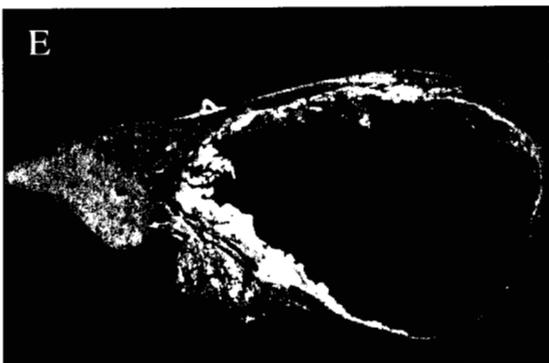


Figura 2. Amibiasis invasiva en diferentes tejidos del ser humano. **A,** Amibiasis cerebral. **B,** Pericarditis amibiana. **C,** Amibiasis cutánea inguinal y escrotal. **D,** Amibiasis cutánea en cara anterior del abdomen. **E,** Absceso hepático amibiano. **F,** Colitis amibiana fulminante. Cortesía del Dr. Ruy Pérez-Tamayo.

Mecanismos de invasión y evasión de *E. histolytica* propuestos a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo*

La especulación acerca de los siguientes mecanismos de invasión y evasión amibianos deriva principalmente de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

En el intestino del ser humano pueden encontrarse dos tipos de amibas *E. histolytica* y *E. dispar*, patógena y no patógena respectivamente. Para que *E. histolytica* pueda invadir, es necesaria la digestión de la capa de moco que cubre a las células de la mucosa intestinal. La adhesión a la mucosa intestinal, se logra mediante la adhesina específica de galactosa (principalmente) y la locomoción.^{13,52,58,71} Se cree que las células epiteliales adyacentes a la amiba son muertas por contacto, principalmente por el amiboporo y fosfolipasas, posteriormente estas células son desintegradas por las proteasas amibianas. Las células epiteliales destruidas liberan al medio entre otras cosas proIL-1 que las proteasas amibianas convierten a IL-1 funcional.⁸⁰ Esto, junto con la activación de complemento y la formación de péptidos quimiotácticos contribuye a la formación de una reacción inflamatoria mediada principalmente por leucocitos polimorfonucleares, cuyos productos oxidativos son contrarrestados por la superóxido dismutasa y grupos tiol de proteínas de membrana de la amiba.^{9,21,35} Por otra parte, *E. histolytica* es capaz de inactivar la función amebicida de macrófagos por un mecanismo no conocido; es probable que sea través de la inhibición en la producción de algunas citocinas como TNF α y NO.^{16,17} Igualmente, la amiba puede sobrevivir al ataque de complemento, activándolo en el espacio extracelular a través de la proteasa de 56 kDa y por la adhesina específica de galactosa, lo que previene la formación del complejo de ataque.^{5,10,22,61} En este punto, la respuesta inmune humoral, tanto sérica como secretora representadas por IgG e IgA respectivamente, puede ser contrarrestada por la degradación de dichos anticuerpos, o por la polarización y desprendimiento de éstos de la superficie amibiana, mecanismo conocido como

“capping”.²⁰ En ocasiones la amiba pasa al torrente circulatorio y llega al hígado en donde primeramente es rodeada por leucocitos polimorfonucleares. Esta inflamación aguda se acompaña de un fenómeno isquémico,⁵⁷ que puede favorecer a la amiba que es anaerobia, al disminuir el riego sanguíneo y como consecuencia el acceso del complemento y anticuerpos.¹² En el hígado la evasión de la respuesta inmune celular parece ser similar a aquella del intestino. El infiltrado celular es sustituido paulatinamente por macrófagos y linfocitos principalmente, que en etapas tardías están casi ausentes probablemente por la liberación de un péptido amibiano inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM) y por la degradación de las anafilatoxinas C3a y C5a.⁶⁰ Este panorama se asocia con una destrucción casi total del tejido hepático por proteasas amibianas o por moléculas del hospedero que culmina con la muerte de éste.

Un panorama más certero acerca de estos mecanismos, derivaría de algunos experimentos más detallados como: bloqueo específico de los genes de cada uno de los factores de virulencia, descubrimiento de nuevos factores relacionados con la virulencia, diseño de metodologías que nos permitan obtener gran cantidad de estas moléculas en estado nativo e inhibición específica de la actividad biológica de cada uno de estos factores durante el desarrollo de la amibiasis.

Proteasas de cisteína en la amibiasis experimental

La amibiasis se caracteriza por la gran destrucción de tejidos en el hospedero y hasta la fecha no se conoce cual (es) molécula(s) es la responsable de tal daño. Durante muchos años se ha especulado que las proteasas de cisteína amibianas pueden ser las responsables de este efecto, debido a que las amibas contienen y secretan gran cantidad de estas enzimas *in vitro*.^{23,25,38,61} Esta idea fue reforzada al encontrarse que el contenido y actividad de éstas es mucho menor en la cepa no patógena *E. dispar*. Así, el gen responsable del 90% de la actividad proteolítica en *E. histolytica* está truncado en *E. Dispar*⁷⁶ e interesantemente, la única proteasa de superficie de *E. histolytica* encontrada hasta la fecha es producto de este gen.³²

En un modelo de amibiasis experimental que consiste en el implante de un fragmento de intestino humano en ratones inmunodeficientes, demuestran que la proteasa es capaz de convertir proIL-1 inactiva liberada por células intestinales dañadas a la forma activa, contribuyendo de esta manera con la inflamación intestinal.⁸⁰ En otro modelo de amibiasis hepática en ratones inmunodeficientes se demostró la liberación de la proteasa por las amibas en el seno del hígado; por desgracia las lesiones en este modelo son limitadas y no se demuestra participación activa de la proteasa.⁷⁰ Recientemente, Mirelman y cols. han implementado una metodología con ARN antisentido con el que inhiben en 90% la expresión de la proteasa de cisteína más abundante en *E. histolytica* (CP5);¹ además observan que cuando estas amibas se inyectan en hígados de hamster los abscesos disminuyen.² El efecto citopático, determinado por la capacidad de las amibas de desprender monocapas celulares en cultivo y por su resistencia al complemento son fenómenos que se consideran estar directamente relacionados con la virulencia.^{10,23,51} Sin embargo en las amibas bloqueadas en expresión de CP5, tales capacidades no se encuentran alteradas; aunque la eritrofagocitosis amibiana cuya participación en la virulencia ha sido controversial,^{48,72} se encuentra disminuída en estos trofozoítos. De este experimento queda la duda si el 10% de la actividad proteolítica residual de la amiba, es la responsable de la disminución de los abscesos observados.

La adición al cultivo amibiano del inhibidor específico de proteasas de cisteína E-64, resulta en el bloqueo total de la actividad proteolítica, sin alterar el crecimiento y viabilidad. Stanley y cols. encontraron que la inyección intrahepática de amibas tratadas con E-64 en ratones SCID, resulta en la disminución de los abscesos hepáticos.⁷⁰

Autor	Referencia	Sistema	Prueba	Resultado
Lushbaugh W.B.	Exp Parasitol 1985; 59 :328-336	<i>in vitro</i>	Efecto citopático de la proteasa de cisteína purificada sobre monocapa de células H ₂ L ₉	Desprendimiento de la monocapa No explora muerte
Keene W.E.	J Exp Med 1986; 163 :536-549	<i>in vitro</i>	Efecto citopático de la proteasa de cisteína purificada sobre monocapa de células BHK	Desprendimiento de la monocapa sin daño celular
Luaces L.A.	Biochem J 1988; 250 :903-909	<i>in vitro</i>	Efecto citopático de la proteasa de cisteína purificada sobre monocapa de fibroblastos humanos	Desprendimiento de la monocapa No hay muerte (por azul de tripan)
Montfort I.	J parasitol 1993; 79 (1):98-105	<i>in vitro</i>	Efecto citotóxico y citolítico de amibas sobre hepatocitos de hamster y rata	Muerte celular con desintegración, inhibible con E-64
Li E.	Infect Immun 1994; 62 (11):5112-5119	<i>in vitro</i>	Resistencia eléctrica transepitelial (RET) en células Caco-2	Lisados amibianos no modifican la RET E-64+amibas no modifican la RET
Stanley S.L.	Infect Immun 1995; 63 (4):1587-1590	<i>in vivo</i>	Amibas crecidas en E-64 inyectadas en hígados de ratones SCID	Disminución de abscesos
Li E.	Infect Immun 1995; 63 (10):4150-4153	<i>in vivo</i>	Amibas incubadas con laminina e inyectadas en hígados de ratones SCID	Disminución de abscesos
Navarro-García F.	Exp Parasitol 1995; 80 :361-372	<i>in vitro</i>	RET en ciegos de gerbos	Lisados de amibas virulentas disminuyen la RET y este efecto se inhibe con E-64
Ankri S.	Mol Microbiol 1998; 28 (4):777-785	<i>in vitro</i>	Amibas HM-1 con ARN antisentido CP-5	La fagocitosis disminuye pero el efecto citopático Y la actividad hemolítica no se modifican
Ankri S.	Infect Immun 1999; 67 (1):421-422	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Amibas HM-1 con ARN antisentido CP5 Inyectadas en hígados de hamster	Disminución de abscesos y fagocitosis Susceptibilidad a complemento no alterada
Hellberg A.	Cell Microbiol 2001; 3 :13-20	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	E. histolytica y E. Dispar transfectadas con plásmidos CP-2 e inyectadas en hígados de gerbos	El efecto citopático se incrementa en ambas especies E. dispar transfectada no produce lesiones en hígado
Zhang Z.	Mol Microbiol 2000; 37 (3):542-548	<i>in vivo</i>	Amibas con ARN antisentido CP-5, en intestino humano transplantado en ratones SCID	No se altera la permeabilidad intestinal, disminuye la inflamación, baja la producción de IL-2 e IL-8 e incapacidad de las amibas de convertir proIL-1 a IL-1

Tabla 1. Proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica* en la amibiasis experimental.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los experimentos mencionados son los primeros en los que se demuestra la importancia de la expresión y actividad de la proteasa de cisteína de *E. histolytica in vivo*. Por lo que resulta de suma importancia el estudio detallado de los mecanismos moleculares de defensa, sobrevivencia y daño amibianos en los que participa esta proteasa. De los datos experimentales que se conocen hasta la fecha, se podría pensar que el papel que puede desempeñar la proteasa de cisteína amibiana es múltiple y no solo la destrucción de tejidos. Lo anterior se puede fundamentar con la siguiente información:

a) La proteasa de cisteína amibiana en la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero

Se sabe que las proteasas de cisteína amibianas no son capaces de matar líneas celulares *in vitro* (tabla 1). Además se ha encontrado que las proteasas de cisteína liberadas por metacéctodos de *T. solium* disminuyen la expresión del marcador CD4 de linfocitos T.⁴⁷ Por otra parte, una proteasa de cisteína de la papaya (papaína) es capaz de degradar receptores de macrófagos. Por lo anterior, una posible función de la proteasa amibiana en el tejido hepático sería la de eliminar receptores en células inflamatorias, principalmente de macrófagos, inactivando así su actividad amebicida. La propuesta anterior se complementa con el hecho de que los macrófagos aislados de hígados con abscesos amibianos de hamster no están activados, ni son activables por LPS y tienen disminuida su capacidad amebicida (TNF α y ON), mientras que macrófagos circulantes del mismo animal si son activables con LPS;¹⁷ lo que sugiere que molécula(s) amibianas liberadas en la vecindad de macrófagos en el hígado de hamster (probablemente la proteasa de cisteína amibiana mediante la eliminación de receptores) puede ser la responsable de este efecto. En el experimento de Mirelman y cols.² que consistió en la inyección de amibas que expresan ARN antisentido de CP5 en hígado de hamster,

probablemente las amibas al disminuir la síntesis de proteasas no pueden inactivar leucocitos, principalmente macrófagos, permitiéndole a éstos ejercer su actividad amebicida. De esta manera el efecto citopático y resistencia a complemento que no están alterados en estas amibas resultarían irrelevantes. Otra posibilidad es que las amibas en estas condiciones sobrevivan sin causar daño.

b) La proteasa de cisteína amibiana en los mecanismos de sobrevida de la amiba

En algunos estudios se han adicionado diversos inhibidores de proteasas de cisteína a los cultivos amibianos; todos ellos presentan diferente grado de interferencia en el crecimiento y viabilidad de las amibas,¹⁵ con la excepción del E-64.⁷⁰ Este inhibidor específico de proteasas de cisteína, se une de forma irreversible debido a que el oxígeno del epóxido del inhibidor y el azufre de la cisteína del sitio activo de la enzima forman un enlace covalente.^{33,54} Las proteasas de cisteína están conservadas en todos los protozoarios;⁵⁴ en experimentos *in vitro*, el bloqueo de la actividad proteolítica en algunos de ellos interfiere con el ciclo de vida, tráfico de proteínas y a otros los incapacita para procesar los nutrientes ocasionando su muerte.¹⁹

c) La proteasa de cisteína amibiana en los mecanismos de daño

Como se ha mencionado el considerar a las proteasas de cisteína amibianas como las únicas responsables de la destrucción de tejidos del hospedero ha derivado de experimentos *in vitro* e *in vivo*. El cuestionamiento acerca de esta sugerencia se basa en las siguientes observaciones: En el modelo de amibiasis hepática experimental en ratones SCID, se ha demostrado la presencia de proteasas en sitios cercanos a la amiba, sin embargo se desconoce si estas proteasas son liberadas por amibas viables o forman parte de restos amibianos ya que las lesiones en este modelo son limitadas; además la participación activa de las proteasas no se explora.⁷⁰ Por otra parte en caso de que *in vivo* la amiba liberara proteasas, el hospedero posee inhibidores naturales de éstas, como α 2macroglobulina en circulación⁵⁰ y laminina en tejidos⁴⁰ que podrían impedir su acción. Finalmente la participación

del hospedero en el daño tisular, durante el desarrollo de ésta enfermedad ha sido controversial.^{56,66,67,74}

Con fundamento en lo arriba mencionado, se describe una nueva metodología para la obtención de proteasas amibianas con alto grado de pureza en estado nativo, sin detergentes y con alto rendimiento. Además se obtienen y analiza el efecto de anticuerpos policlonales de alta especificidad anti-proteasa sobre la actividad proteolítica de la enzima purificada y sobre *E. histolytica*, así como la inmunodetección de las proteasas en el absceso hepático amibiano experimental en hamster. Finalmente, mediante el empleo de un vehículo que *per se* no despierta reacción inflamatoria, se analiza el efecto directo de la proteasa de cisteína de *E. histolytica* en el hígado de hamster.

HIPÓTESIS

La proteasa de cisteína de *Entamoeba histolytica* *per se* es capaz de destruir el tejido hepático *in vivo*.

OBJETIVOS

- Purificar y caracterizar bioquímicamente la proteasa de cisteína de ~30 kDa de *E. histolytica* HM-1:IMSS en estado nativo, sin detergentes, con alto grado de pureza y con buen rendimiento.
- Obtener anticuerpos policlonales anti-proteasa de alta especificidad y determinar si modifican la actividad proteolítica, tanto de la enzima purificada como de *E. histolytica* viable.
- Explorar si *E. histolytica* libera proteasas de cisteína durante el absceso hepático amibiano experimental en hamsters.
- Determinar si la proteasa de cisteína amibiana purificada es capaz de producir daño en hígado de hamster *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVO AXÉNICO DE *Entamoeba histolytica*

Cultivo de trofozoítos

Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM-1 IMSS (7×10^5) se cultivaron por 72 h en 50 ml de medio TYI-S-33.¹⁸ Al término los trofozoítos se lavaron dos veces en amortiguador de fosfato de sodio 15 mM pH 7.2, NaCl 0.15M (PBS) centrifugándolos a 2000 r.p.m. durante 5 min. Finalmente, se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripan, contándolas con un hematocitómetro. Estas amibas con viabilidad mayor de 95% se utilizaron para inducir absceso hepático amibiano en hamster.

Absceso hepático amibiano experimental en hamster

Dos hamsters de ambos sexos con ~100 gr de peso, se anestesiaron inyectando pentobarbital sódico (6.3 mg/100gr) por vía intraperitoneal, se realizó laparotomía y por la vena porta se inyectaron 2.5×10^5 trofozoítos de amibas resuspendidas en 0.2 ml de PBS; para evitar la hemorragia se puso un fragmento de gelfoam en el sitio de la inyección. La herida fue suturada en dos planos con hilo de seda 4-0 y el hamster se dejó por 7 días con agua y alimento *ad libitum*. El hígado con abscesos fue extirpado asépticamente y depositado en una caja de Petri estéril, cortado en pequeños fragmentos y éstos depositados en tubos estériles de 8 ml, a los que se adicionó 6ml de medio TYI-S-33 y 3 gotas de una mezcla de antibióticos (estreptomomicina, kanamicina y penicilina). A los tubos se les cambió diariamente el medio de cultivo con antibióticos durante cuatro días. Después se dejaron sin antibióticos por tres días y de estos tubos se hizo la expansión de amibas para la purificación de proteasas.

Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína

El sustrato se preparó haciendo una solución de azocaseína 2.5 mg/ml en amortiguador TRIS-HCl 10mM pH 7.4, NaCl 0.15M, EDTA 5mM, Mercaptoetanol 1mM. La muestra a analizar se resuspendió en 0.2 ml del mismo amortiguador en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se le adicionaron 0.4 ml de la solución de sustrato y se incubaron por 3 h a 37 °C; al término la reacción se detuvo adicionando 0.6 ml de ácido tricloroacético al 20%. Los tubos se sumergieron en hielo por 30 minutos y se centrifugaron a 10000 r.p.m. por 5 min y el sobrenadante se leyó en espectrofotómetro a 366 nm. Las absorbancias se compararon con una curva patrón de absorbancia de azocaseína y se determinó la cantidad de sustrato digerido.

Cultivo masivo de amibas virulentas

Se usaron 15 tubos de vidrio de 54 cm de largo por 6 cm de diámetro y con tapa de rosca en un extremo lateral. En cada uno de estos tubos se preparó un litro de medio TYI-S-33, se inocularon 3×10^7 trofozoítos y se cultivaron por 72 h a 36.5 °C. Las amibas se cosecharon centrifugando a 2000 r.p.m. por 5 min, se lavaron 2 veces con PBS, se contaron en un hematocitómetro y la pastilla obtenida se almacenó a -70 °C.

PURIFICACIÓN DE PROTEASAS DE *Entamoeba histolytica*

Extracción con éter

Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* congelados (3×10^9), se resuspendieron en 100 ml de amortiguador TRIS-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5 M, HgCl₂ 5mM y se adicionaron a un embudo de separación de 500 ml, enseguida se adicionaron 250 ml de éter etílico frío, se tapó y agitó suavemente

varias veces durante 8 hrs. Se dejó reposar por 24 h en frío y la fase acuosa se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 minutos en tubos de polipropileno cónicos de 50 ml con la tapa perforada con aguja. La fase acuosa clarificada se obtuvo puncionando la base del tubo y dejando caer el líquido a una caja Petri de vidrio de 14x2 cm. A la fase orgánica se le adicionaron 100 ml del mismo amortiguador y la fase acuosa se extrajo nuevamente. El primer y segundo extracto se mezclaron y se dejaron dentro de una campana de extracción de vapores por 12 h; al término la muestra se centrifugó a 18000 r.p.m. y el sobrenadante se almacenó a 5°C (**extracto éter amibiano NaCl 0.5M**).

A la fase orgánica del extracto anterior se le adicionaron 100 ml del mismo amortiguador pero aumentando la fuerza iónica a NaCl 2.5M y obteniendo de la misma forma el **extracto éter amibiano NaCl 2.5M**.

Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 2.5M

Fracciones de 5 ml del extracto éter NaCl 2.5M se pasaron por columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54, con dimensiones de 150 x 2.2 cm equilibrada con TRIS-HCl 20mM pH 7.4, NaCl 0.5M, HgCl₂ 1mM con flujo de 0.4 ml/min. Se colectaron fracciones de 5.5 ml, la proteína se detectó espectrofotométricamente determinando la absorbancia a 280 nm y la actividad proteolítica por el método colorimétrico que utiliza azocaseína como sustrato.

Las fracciones con actividad proteolítica de las diferentes corridas se mezclaron y concentraron a 3ml en un equipo de ultrafiltración "amicon", utilizando membrana YM-3 que retiene proteínas de peso molecular mayor a 3000 Da. La muestra obtenida se dializó con membrana de 8000 Da de corte, en amortiguador TRIS-HCl 10 mM pH 7.4, HgCl₂ 1mM. 2.7 ml de la muestra dializada se mezclaron con 2.3 ml de amortiguador de muestra no desnaturizante y se inyectó en el sistema de electroelución 491 Prep Cell de BIORAD.

Condiciones de corrida:

Volumen de muestra total: 5ml

Proteína inyectada: 2.6mg

Tubo de gel: 37.0 mm

Gel separador: 7.2 %

Gel concentrador: 4% (8 ml)

Corriente: 12 Watts constante

Volumen de las fracciones colectadas: 6 ml

Flujo de elusión: 0.75 ml/min

Tiempo de corrida: 28 hrs

Diferentes fracciones electroeluidas (una de cada 10) se sometieron a electroforesis-SDS (desnaturalizante) y no desnaturalizante al 12 %³⁶ y ambos geles se tiñeron con nitrato de plata.²⁹

Zimograma en gel de gelatina

Duplicados de los geles anteriores corridos de la misma forma, se superpusieron sobre geles de acrilamida al 10% conteniendo gelatina al 2%, se incubaron por 12 hrs, se tiñeron con azul de Coomassie al 0.1% en solución de fijación de geles y se destiñeron con la misma solución sin colorante.

Las fracciones con actividad proteolítica (una de cada 2) se monitorearon de la misma forma y se decidió fraccionar en dos partes “fracción I” y “fracción II”. La fracción I se concentró en “amicon” con membrana YM-3 a 2 ml, la fracción II a 3.2 ml y se analizaron en electroforesis-SDS³⁶ y SDS-urea⁶⁸, con su respectivo zimograma en gel de gelatina.

Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 0.5M

Una fracción de 5 ml del extracto éter amibiano NaCl 0.5M se pasó por columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54, en las mismas condiciones que el extracto éter amibiano NaCl 2.5M. Posteriormente, el extracto éter amibiano NaCl 0.5M (150 ml) se concentró en “amicon” con membrana YM-3 a 50 ml, se transfirió a un matraz de 100 ml y se le adicionaron 2 ml de una solución de $ZnCl_2$ 2.5 M en H_2O , se mezcló suavemente y se incubó 1 h a $37^\circ C$, se centrifugó a 20000 r.p.m. por 15 minutos y el sobrenadante se concentró en “amicon” con membrana YM-3 a 12 ml. La muestra obtenida se dividió en tres partes y se paso por la columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54, utilizada en la purificación del extracto éter amibiano NaCl 0.5M en las mismas condiciones. Las fracciones con actividad proteolítica se mezclaron y concentraron por “amicon” con membrana YM-3 a 4.4 ml. Esta muestra se dializó con membrana de 8 kDa de corte, en amortiguador de TRIS-HCl 10 mM pH 7.4. Finalmente 2.2 ml de la muestra dializada se mezclaron con 1.6 ml de amortiguador de muestra no desnaturizante y se inyectó en el sistema de electroelución 491 Prep Cell.

Condiciones de corrida:

Volumen de muestra total: 3.8ml

Proteína inyectada: 7.7mg

Tubo de gel: 37.0 mm

Gel separador: 7.2 %

Gel concentrador: 4% (8 ml)

Corriente: 12 Watts constante

Volumen de las fracciones colectadas: 6 ml

Flujo de elusión: 0.75 ml/min

Tiempo de corrida: 28 hrs

Diferentes fracciones electroeluidas (una de cada 10) se sometieron a electroforesis en gel no desnaturizante y los geles se tiñeron con nitrato de plata.²⁹

Zimograma: otros geles corridos de la misma forma se sobrepusieron sobre geles de acrilamida al 10% conteniendo gelatina al 2%, se incubaron por 12 h, se tiñeron con azul de Coomassie al 0.1% en solución de fijación de geles y se destiñeron con la misma solución sin colorante.

Las fracciones con actividad proteolítica (una de cada 2) se monitorearon de la misma forma y se decidió fraccionar en dos partes “fracción I y fracción II”. La fracción I se concentró en “amicon” con membrana YM-3 a 2.0 ml, la fracción II a 2.2 ml y se analizaron en electroforesis no desnaturizante con su correspondiente zimograma en gel de gelatina

Secuenciación de la proteasa de cisteína purificada

Se mandó a secuenciar 13 aminoácidos a partir del amino terminal de la fracción II con actividad proteolítica de Prep Cell al “The HHMI Biopolymer/W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory at Yale University”

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEASA

Inmunización a conejos

Proteasa purificada (200 µg) en 1ml de PBS se hirvió por 10 minutos y se mezcló con 1 ml de adyuvante completo de Freund. Esta mezcla se inyectó por vía intramuscular y subcutánea en un conejo macho Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso. A los 30 días se inyectaron de la misma forma 100

μg de proteasa y 7 días después se administraron 100 μg de proteasa hervida por vía intraperitoneal (**conejo 1**).

Otro conejo con las mismas características fué inyectado siguiendo el esquema de inmunización anterior, utilizando ahora a la proteasa inhibida con E-64 10 μM (**conejo 2**).

Determinación de la la inmunoreactividad de los sueros de conejos inmunes

Sangrado de conejos: después de la penúltima inmunización se obtuvieron 10 ml de sangre de la oreja de cada conejo, se dejó a 4°C por 24 h, se centrifugó a 2000 r.p.m. y el suero se almacenó a 4°C.

Inmunodifusión en agar: 50 ml de agar al 2% en amortiguador de barbital se solubilizó sumergiendo el matraz en agua hirviendo por 10 minutos, 12 ml de agar fundido se adicionaron en cajas Petri de 6.0x1.5 cm, sobre una mesa previamente nivelada. Una vez gelificado el agar se le hizo un orificio en el centro y seis más equidistantes alrededor de éste con un sacabocado.

El pozo central de una placa de agar se llenó con 100 μl de un lisado amibiano inhibido con E-64 10 μM y dos pozos adyacentes con 100 μl de suero de conejo 1 y 2 respectivamente, la placa de agar se tapó y se dejó difundir a temperatura ambiente por 24 hrs.

Purificación de inmunoglobulinas del suero de conejos 1, 2 y no inmune

Los conejos 1, 2 y otro no inmune se anestesiaron con éter y se sangraron por punción cardiaca, la sangre obtenida se almacenó en tubos cónicos de polipropileno a 4°C por 24 h y se centrifugó a 2000 r.p.m.x 30 min y el suero se almacenó a 4°C. El suero de cada conejo (~100 ml.) en agitación constante, se precipitó adicionando lentamente y en frío un volumen igual de sulfato de amonio saturado en amortiguador de fosfatos 15 mM pH 7.2. La suspensión resultante se almacenó a 4°C por 24 h y se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 30 min. El precipitado se resuspendió en 35 ml de amortiguador TRIS 10 mM pH 7.4 y se dializó con membrana de 8000 Da. de corte en el mismo

amortiguador (8 L) por 24 h y dos cambios más en TRIS 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M. La muestra dializada se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 30 minutos y el sobrenadante se fraccionó en tubos de polipropileno con 2 ml y se almacenó a 4°C (fracción gamaglobulinas). Cada fracción de gamaglobulinas se pasó por una columna de afinidad de sepharosa-proteína-A equilibrada con amortiguador TRIS 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15M, se dejaron pasar \cong 50ml de amortiguador (absorbancia 280 nm \cong 0). La proteína unida que corresponde a las IgGs se eluyó con 2 ml de glicina-HCl 0.1 M pH 2.2 y se neutralizó inmediatamente con unas gotas de TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8, la proteína eluída de todas las corridas se mezcló, se concentró en “amicon” con membrana YM-10 a 15 ml y se dializó con amortiguador TRIS 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M. Finalmente a cada muestra se determinó la concentración proteína por el método de Bradford⁷ y se almacenó a -10°C.

Determinación de la especificidad de los anticuerpos anti-proteasa

10 mg de IgGs del conejo 2, purificadas en la columna de afinidad sepharosa-proteína A, se dializaron con membrana de diálisis de 8000 Da de corte en amortiguador de acople (NaHCO₃ 0.1 M pH 8.3, NaCl 0.5M). Por otra parte, 1 gr de “sepharosa” activada con bromuro de cianógeno se lavó con 200 ml de HCl 1 mM y un lavado final con 5 ml de amortiguador de acople, inmediatamente se mezcló con las IgGs dializadas y se dejó en balancín a 4°C por 24 h. Con el fin de bloquear los grupos reactivos libres la suspensión se centrifugó, el sobrenadante se retiró y se adicionaron 5 ml de glicina 0.2M pH 8.0. Finalmente para lavar el exceso de proteína, la columna se lavó con 10 ml de amortiguador de acople seguido con 10 ml de amortiguador de acetatos 0.1M pH 4.0, NaCl 0.5M, seguido de 10 ml de amortiguador de acople.

La columna se equilibró con amortiguador de TRIS-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15M y se pasaron 3 ml del extracto éter amibiano 0.5M NaCl , se lavó con 100 ml de amortiguador y la proteína unida se eluyó con 2 ml de glicina-HCl 0.1M pH 2.0. La proteína recuperada se neutralizó inmediatamente con

unas gotas de TRIS-HCl 1.5M pH 8.8 y se concentró en “amicon” con membrana YM-3 a 2ml; la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford⁷ y la actividad proteolítica sobre azocaseína. Finalmente las proteínas purificadas se analizaron mediante electroforesis no desnaturizante al 12% con su respectivo zimograma en gel de gelatina.

225719

Efecto de los anticuerpos anti-proteasa en la actividad proteolítica de la enzima purificada

Se determinó la actividad proteolítica sobre azocaseína de 19.56 µg de la proteasa purificada por la columna de afinidad IgG anti-proteasa, en presencia de EDTA 5 mM y con de cantidades equimolares crecientes de IgGs (1,5,10,20) de conejos 1, 2 y normal (se realizaron tres experimentos independientes). Por otra parte otros tubos que contenían proteasa-IgGs en las mismas concentraciones se almacenaron a 4°C por 24 h y los inmunoprecipitados se centrifugaron a 10000 r.p.m., se lavaron en amortiguador TRIS-HCl 10mM pH 7.4, NaCl 0.15M y se analizaron mediante electroforesis SDS al 12%.³⁶

Efecto de los anticuerpos anti-proteasa en la actividad proteolítica de *E. histolytica*

Se crecieron 7×10^5 amibas en cajas de cultivo con 60 ml de medio TYI-S-33 por 72 h, se lavaron con TRIS-HCL 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15M, después 2.5×10^5 amibas se incubaron por 1.5 h con 1 mg de IgGs de conejo 1, 2 y normal. Inmediatamente se determinó la actividad proteolítica sobre azocaseína y la viabilidad de las amibas con azul de tripan.

Inmunodetección de proteasas amibianas en el absceso hepático amibiano experimental en hamster

Un hamster con absceso hepático amibiano de 24 hrs de evolución se sacrificó con sobredosis de éter, el hígado fue extirpado, cortado en pequeños fragmentos y sumergido en un frasco conteniendo 20 ml de formaldehído al 10% vol/vol en PBS. El frasco se almacenó por 48 h y los fragmentos se

procesaron mediante técnicas histológicas. Seis laminillas con cortes seriados de 4-6 μM de espesor desparafinados se trataron como sigue:

- En una caja de Coplin se prepararon 50 ml de una solución de H_2O_2 al 1% en metanol y las laminillas se introdujeron por 30 min.
- Se desechó la solución de metanol- H_2O_2 , se adicionaron 50 ml de TRIS-HCl 10 mM pH 7.4 NaCl 0.15M y se dejaron por 5 minutos; el paso anterior se repitió 2 veces.
- El anticuerpo primario diluido a 0.2 mg/ml en amortiguador TRIS-HCl 10 mM pH 7.4 NaCl 0.15M, se mezcló con 10 mg de polvo cetónico de hígado de hamster, se dejó en balancín por 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 r.p.m. y se colectó el sobrenadante (anticuerpos absorbidos). Las laminillas previamente lavadas se colocaron sobre una rejilla, se cubrieron con 200 μl de anticuerpos absorbidos y se dejaron dentro de una cámara húmeda por 2 h.
- Las laminillas incubadas con el anticuerpo primario se lavaron 3 veces por 5 min con 50 ml de amortiguador TRIS-HCl 10 mM pH 7.4 NaCl 0.15M.
- Las laminillas se cubrieron con 100 μl de anticuerpo anti-IgG de conejo, diluido 50 veces con TRIS-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15M (absorbido con polvo cetónico como el anticuerpo primario) y se dejaron dentro de la cámara húmeda por 1 h a temperatura ambiente.
- Las laminillas incubadas con el anticuerpo secundario se lavaron 3 veces por 5 minutos con 50 ml de amortiguador TRIS-HCl 10 mM pH 7.4 NaCl 0.15M y finalmente un lavado con TRIS-HCl 0.1M pH 7.4.
- El revelado se hizo cubriendo el área del tejido con una solución de 3 mg de diaminobenzidina disuelta en 5 ml de TRIS-HCl 0.1M pH 7.4, H_2O_2 0.3%. Las laminillas se observaron al microscopio con aumento 20X y cuando aparecieron manchas de color café en las laminillas incubadas con IgGs del conejo 1, 2 y estuvieron ausentes en las que corresponden a IgGs normales, se paró la reacción sumergiéndolas en agua corriente. Las laminillas se contrastaron tiñéndolas

levemente con hematoxilina. Finalmente se tomaron fotografías con un microscopio NIKON microphot FXA con objetivo 20X.

PARTÍCULAS INERTES DE LIBERACIÓN EN HÍGADO DE HAMSTER

Microesferas de Gelatina

Se prepararon microesferas de gelatina \cong a $40 \mu\text{M}^{78}$ y 5×10^4 de éstas se inyectaron por vía portal en hamsters. Los animales se sacrificaron a las 24 h con una sobredosis de éter, los hígados se extirparon, se fijaron con formol al 10% en PBS, se procesaron mediante técnicas histológicas y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se tomaron fotografías de las microesferas en el tejido con un microscopio NIKON microphot FXA con aumento 40X.

Microesferas de superdex 75

Microesferas de resina superdex 75 (pharmacia) utilizada en cromatografía de filtración molecular, con diámetro de 24-44 μm se lavaron dentro de una punta de pipeta de 200 μl con filtro, pasando un volumen de 1 ml de PBS, esto se logró centrifugando la punta con el eluyente, dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml a 500 r.p.m. por un min. 5×10^4 microesferas lavadas y resuspendidas en 0.2 ml de PBS se inyectaron por vía intraportal en 6 hamsters, que se sacrificaron a 3h, 24 h y 4 días. Los hígados extirpados se fijaron con formol al 10% en PBS, se procesaron mediante técnicas histológicas y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se tomaron fotografías de las microesferas en el tejido con un microscopio NIKON microphot FXA con aumento 40X.

Incorporación de la proteasa amibiana purificada en microesferas de superdex 75

A 3.5×10^5 microesferas de superdex 75 lavadas como se describió arriba se les recirculó 5 veces $60 \mu\text{l}$ de proteasa purificada activa (5 mg/ml) en PBS. Las microesferas se fraccionaron en 7 tubos, equivalente a 5×10^4 microesferas por tubo. Seis hamsters se inyectaron por vía intraportal con el contenido de cada uno de estos tubos, resuspendiéndolos justo antes de inyectarlos con 0.2 ml de PBS. Se sacrificaron 2 hamsters a las 3h, 24h y 4 días, los hígados se fijaron con formol al 10% en PBS, se procesaron mediante técnicas histológicas y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El tubo restante con microesferas y proteasa fue teñido con azul de Coomassie. Las áreas con microesferas en los cortes histológicos representativas de cada tiempo y las microesferas teñidas con azul de Coomassie se fotografiaron con un microscopio NIKON microphot FXA con aumento 40X y 20X respectivamente.

Inmunolocalización de la proteasa en las microesferas de superdex con proteasa en el hígado de hamster

Los bloques de parafina de cada uno de los hígados con microesferas conteniendo proteasa se desparafinaron, cortaron y se les hizo inmunohistoquímica con IgGs del conejo 2 como se menciona arriba, sólo que se reveló con un anticuerpo fluoresceinado anti-IgG de conejo, diluido 30 veces en TRIS-HCl 10 mM pH 7.4 NaCl 0.15 M. En este experimento se utilizó como control positivo un corte de absceso hepático amibiano de hamster de 5 días de evolución. Las preparaciones se montaron en resina especial para fluorescencia (VECTASHIELD) y se fotografiaron con microscopio de fluorescencia NIKON microphot FXA con aumento 20X.

ORIGEN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo y sus orígenes fueron los siguientes:

Amersham pharmacia biotech; resina de filtración molecular superdex-75

BIO-RAD; sistema de electroelución Prep cell, agarosa-proteína A, glicina

BIOSEBRA (France); resina de filtración molecular ultrogel ACA-54

BRISTOL-MYERS SQUIBB de México S de R.l de C.V; kanamicina 1 gr

CYNAMID de México S.A de C.V; hilo de seda tratado con silicón

DAKO Corporation; anticuerpo anti-IgG de conejo acoplados a isotiocianato de fluoresceína

GIBCO BRL; adyuvante completo de Freund

J.T.Baker; cloruro de sodio, sulfato de amonio, fosfato de sodio monobásico y dibásico, ácido clorhídrico, carbonato y bicarbonato de sodio, ácido acético glacial

Laboratorios PiSA S.A de C.V; estreptomicina 1 gr

Laboratorios Vector; resina vectashield para fluorescencia

Lakeside de México S.A de C.V; penicilina 1000000 U

Mallinckrodt; cloruro de mercurio

MERK; mercaptoetanol, ácido tricloroacético, éter etílico, cloruro de zinc, gelatina, acetato de sodio, formaldehído 37%, peróxido de hidrógeno, metanol

MILLIPORE; equipo de ultrafiltración amicon con membranas YM-3

PFIZER S.A de C.V; pentobarbital sódico

SIGMA-ALDRICH; azocaseína, EDTA, TRIZMA-BASE, E-64, agarosa tipo VII, amortiguador de barbital, sepharosa-bromuro cianógeno, 3,3'-diaminobenzidina, azul de Coomassie

Spectrum Laboratories; membrana de dialisis 6-8000 Da de corte

ZIMED Laboratories INC. anticuerpo anti-IgG de conejo acoplados a peroxidasa

RESULTADOS

Absceso hepático amibiano experimental en hamster

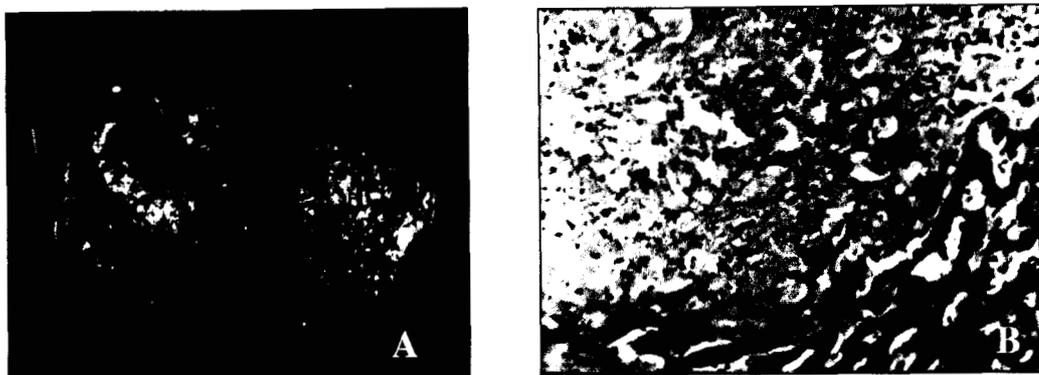


Figura 3. Absceso hepático amibiano experimental en hamster. A, Aspecto macroscópico y B, microscópico.

Cultivo masivo de amibas

El diseño de los tubos de vidrio para el cultivo masivo de amibas tiene la ventaja de reutilizarse disminuyendo así los gastos en material desechable; además en quince días se obtienen 3×10^9 amibas con viabilidad de 97%.

Extracción de amibas con éter

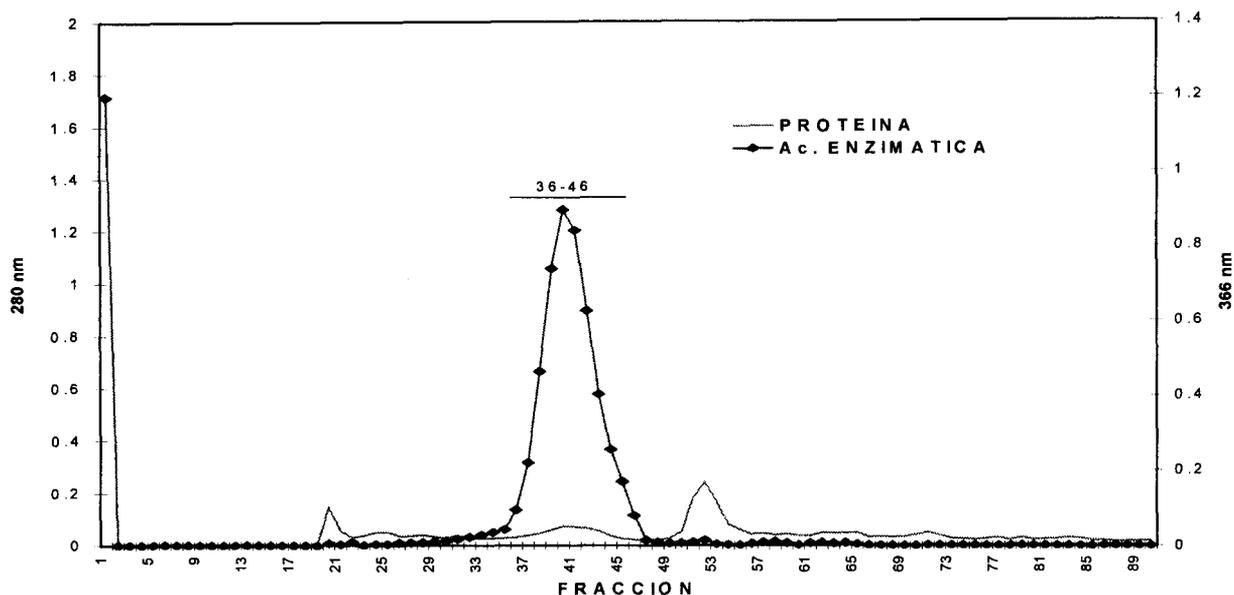
La extracción de amibas con éter y amortiguador TRIS 10 mM pH 7.4, NaCl 0.5M resultó en la obtención de un extracto claro con alta actividad proteolítica. Sin embargo, la fase orgánica sobrante que se volvió a extraer con el mismo amortiguador con NaCl 2.5M, resultó tener mayor actividad proteolítica /proteína que la inicial (tabla 2), por lo que decidimos iniciar la purificación de proteasas a partir de esta muestra. La adición de HgCl_2 a las soluciones de extracción fue con el propósito de inhibir a las proteasas de cisteína de forma reversible evitando así posible autoproteólisis.

	EXTRACTO ÉTER 0.5M NaCl	EXTRACTO ÉTER 2.5M NaCl	EXTRACTO ÉTER 4M NaCl
PROTEÍNA (mg)	664.50	29.19	7.10
ACTIVIDAD TOTAL (D.O. 366 nm)	6209.00	1608.00	177.30
ACTIVIDAD/PROTEÍNA	9.34	55.08	24.97

Tabla 2. Resumen de la extracción con éter de trofozoítos amibianos con diferentes concentraciones de NaCl.

Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 2.5M

Cuando el extracto éter amibiano NaCl 2.5M se pasó por la columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54, la actividad proteolítica se encontró en una zona de pesos moleculares intermedios de ~30 kDa (gráfica 1). Las fracciones con actividad proteolítica concentradas se analizaron por electroforesis en gel no desnaturizante al 8% y 10% con su respectivo zimograma en gel de gelatina; las proteínas con actividad proteolítica se definen mejor en el gel al 10% (figura 4), lo que a su vez sirvió para determinar la concentración de acrilamida ideal para la electroelución en el sistema 491 Prep Cell en condiciones no desnaturizantes. Las fracciones de la electroelución con actividad proteolítica (figura 5) se dividieron en dos partes, debido a las diferencias en el patrón proteico observado en las electroforesis-SDS; además, las fracciones con actividad proteolítica de la electroelución se agregan durante la electroforesis-SDS (figura 6-A y 6-C). Este fenómeno se evitó hirviéndolas previamente en presencia de EDTA y iodoacetamida (figura 6-B). La cantidad de proteasa purificada fue de 1.17 mg, con rendimiento del 19% (tabla 3). La pureza se muestra en electroforesis-SDS al 12% en presencia de EDTA y iodoacetamida, y EDTA, iodoacetamida y urea (figura 7). Esta proteasa es de cisteína ya que su actividad se inhibió completamente con E-64 que es un inhibidor específico de este tipo de proteasas.



Gráfica 1. Extracto éter amibiano NaCl 2.5M pasado por columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54. La proteína se detectó por D.O. a 280 nm y la actividad proteolítica a 366 nm. Las fracciones 36-46 presentan la mayor actividad proteolítica.

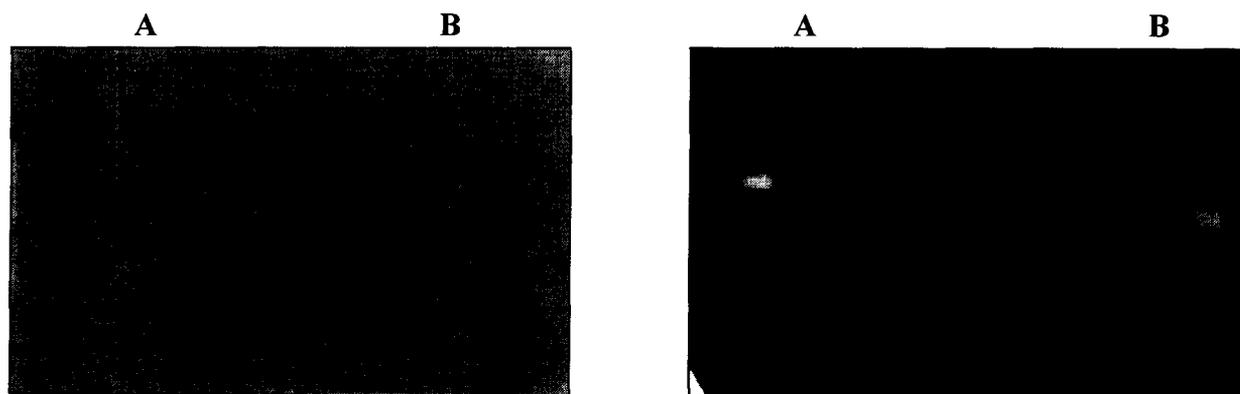


Figura 4. A y B, Electroforesis no desnaturalizante al 10% y 8% respectivamente del pico de actividad proteolítica de la cromatografía en filtración molecular Ultrogel ACA-54, con su respectivo zimograma en gel de gelatina.

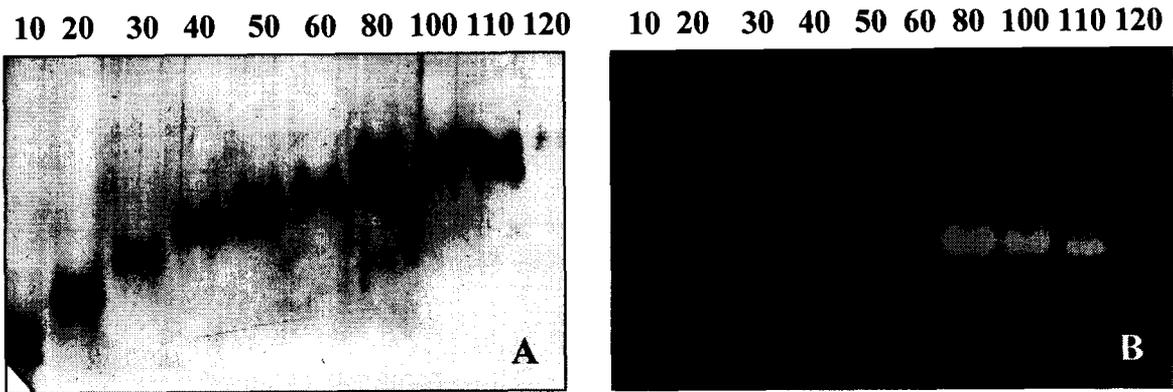


Figura 5. A, Electroforesis no desnaturizante al 12% de diferentes fracciones electroeluidas en Prep Cell. **B,** Zimograma en gel de gelatina.

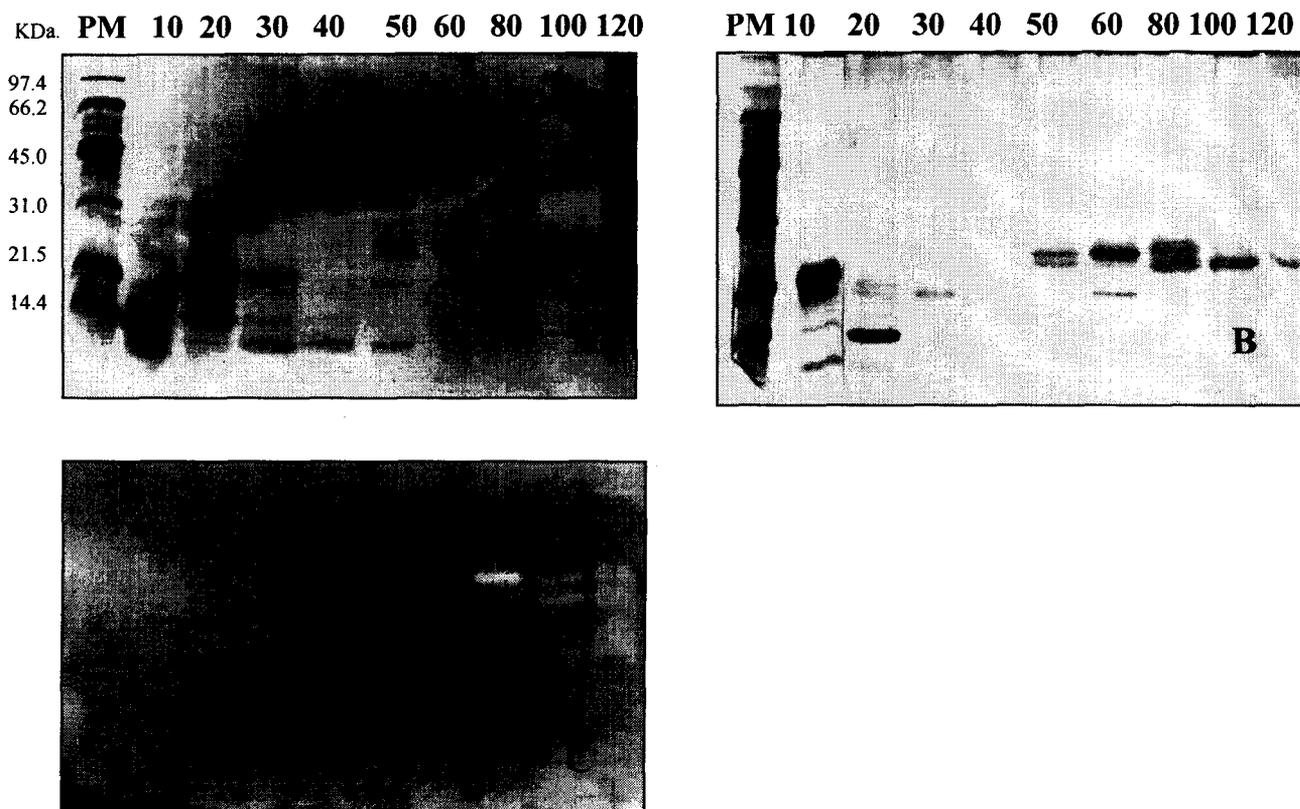


Figura 6. A, Electroforesis SDS al 12% de diferentes fracciones electroeluidas en Prep Cell. **B,** Fracciones con iodoacetamida y hervidas. **C,** Zimograma en gel de gelatina de A.

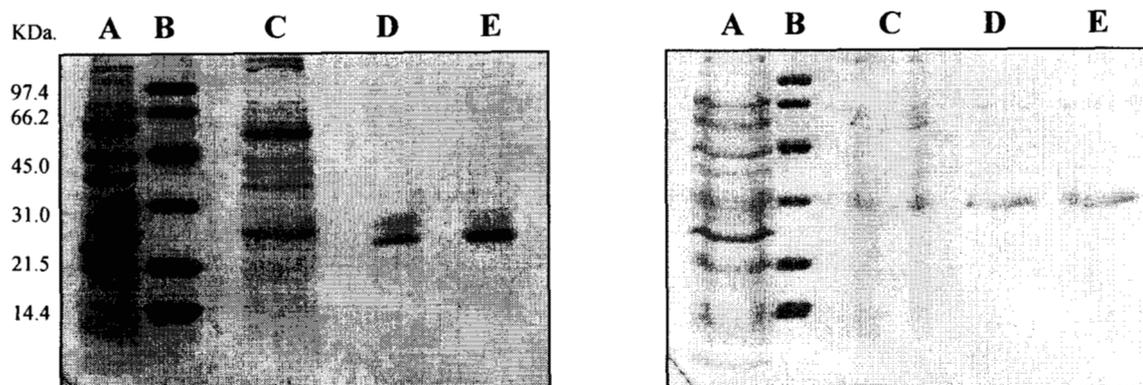
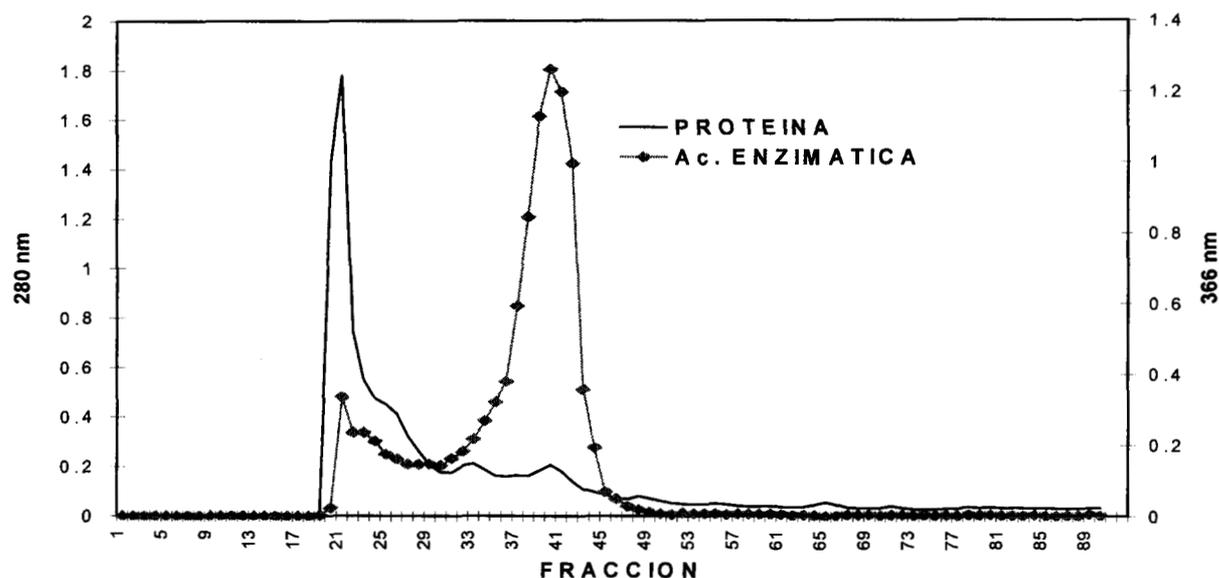


Figura 7. Electroforesis SDS al 12%. **A**, Extracto éter amibiano NaCl 0.5M. **B**, Pesos moleculares. **C**, Extracto éter amibiano 2.5 M NaCl. **D**, Fracción proteolítica I de Prep Cell. **E**, Fracción proteolítica II de Prep Cell. Gel 1: muestras hervidas con iodoacetamida y mercaptoetanol Gel 2: muestras hervidas con iodoacetamida, mercaptoetanol y urea.

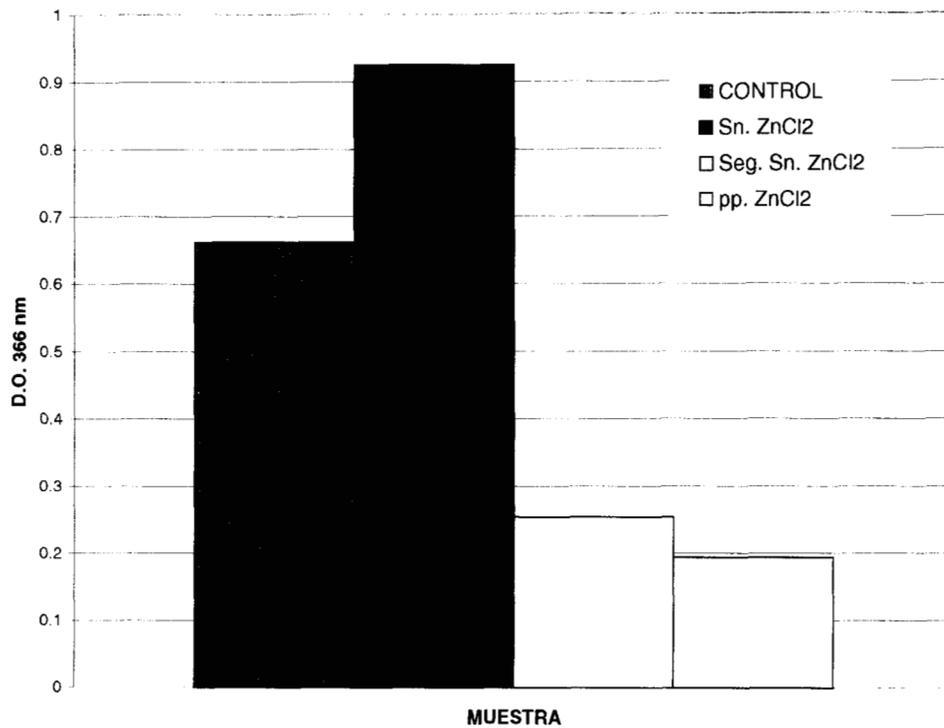
Purificación de proteasas a partir del extracto éter amibiano NaCl 0.5M

La gráfica 2 muestra la cromatografía de filtración molecular Ultrogel ACA-54 del extracto éter amibiano NaCl 0.5M. Durante la determinación de la capacidad inhibitoria de algunos inhibidores reversibles de proteasas de cisteína sobre extractos amibianos, se observó que la adición de $ZnCl_2$ 50 mM produce un precipitado; al analizar el precipitado y sobrenadante se encontró que en este último no solo se mantiene la actividad proteolítica sino que se incrementa (gráfica 3), además mostró menor cantidad de bandas proteicas que el extracto original (figura 8). Por lo anterior se trató de esta manera todo el extracto éter amibiano NaCl 0.5M. El sobrenadante obtenido después de la precipitación con $ZnCl_2$ se concentró y se pasó por una columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54 (gráfica 4) y las fracciones con actividad proteolítica se concentraron y se analizaron en electroforesis no desnaturalizante con su respectivo zimograma en gel de gelatina (figura 9). Esta muestra se aplicó en el sistema de electroelución 491 Prep Cell y al igual que en el extracto éter amibiano NaCl 2.5M, se monitorearon las fracciones mediante electroforesis-SDS y electroforesis no desnaturalizante con su respectivo zimograma en gel de gelatina. Las fracciones con actividad proteolítica se dividieron en fracción I y fracción II, se concentraron y se analizaron por electroforesis no desnaturalizante con su correspondiente zimograma en gel de gelatina. El análisis de estas fracciones 30 días después, nuevamente en electroforesis no desnaturalizante demostró que algunas proteasas se agregan, ya que se observó actividad proteolítica en zonas más arriba de las que originalmente se electroeluyeron (figura 10). Al igual que las proteasas purificadas a partir del extracto éter amibiano NaCl 2.5 M, éstas son proteasas de cisteína ya que su actividad proteolítica es bloqueada por E-64. Posteriormente la fracción II se analizó por electroforesis con SDS (figura 11). En la tabla 3 se presenta el resumen de la purificación de proteasas de cisteína de *E. histolytica* a partir de los extractos éter amibiano NaCl 2.5M y

NaCl 0.5M. Finalmente la secuenciación de los 13 aminoácidos del extremo amino terminal de la fracción II electroeluída en el sistema 491 Prep Cell, reveló que ésta es una mezcla de dos proteínas; una que corresponde a la proteasa de cisteína 2 y la otra a ubiquitina(s), ambas de *E. histolytica*.



Gráfica 2. Extracto éter amibiano NaCl 0.5M pasado por columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54. La proteína se detectó por D.O. a 280 nm y la actividad proteolítica a 366 nm. Se observan dos picos de actividad proteolítica, correspondiendo el de mayor actividad específica a las fracciones 35-45.



Gráfica 3. Actividad proteolítica del extracto éter amibiano NaCl 0.5M precipitado con ZnCl₂ 0.05M. Control, extracto sin precipitar. Sn. ZnCl₂, sobrenadante del extracto éter amibiano precipitado con ZnCl₂. Seg. Sn ZnCl₂, sobrenadante del precipitado lavado con amortiguador. pp. ZnCl₂, precipitado lavado con amortiguador.

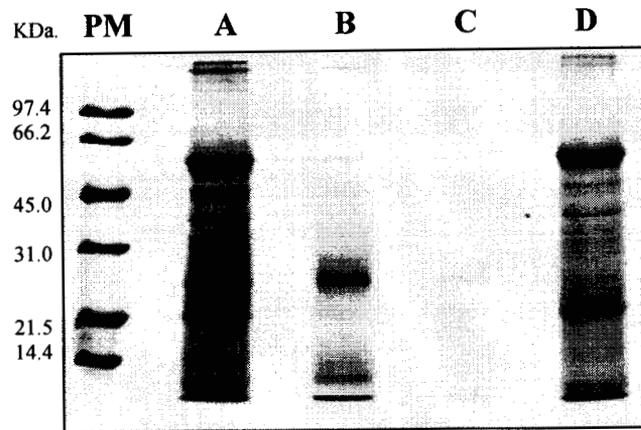
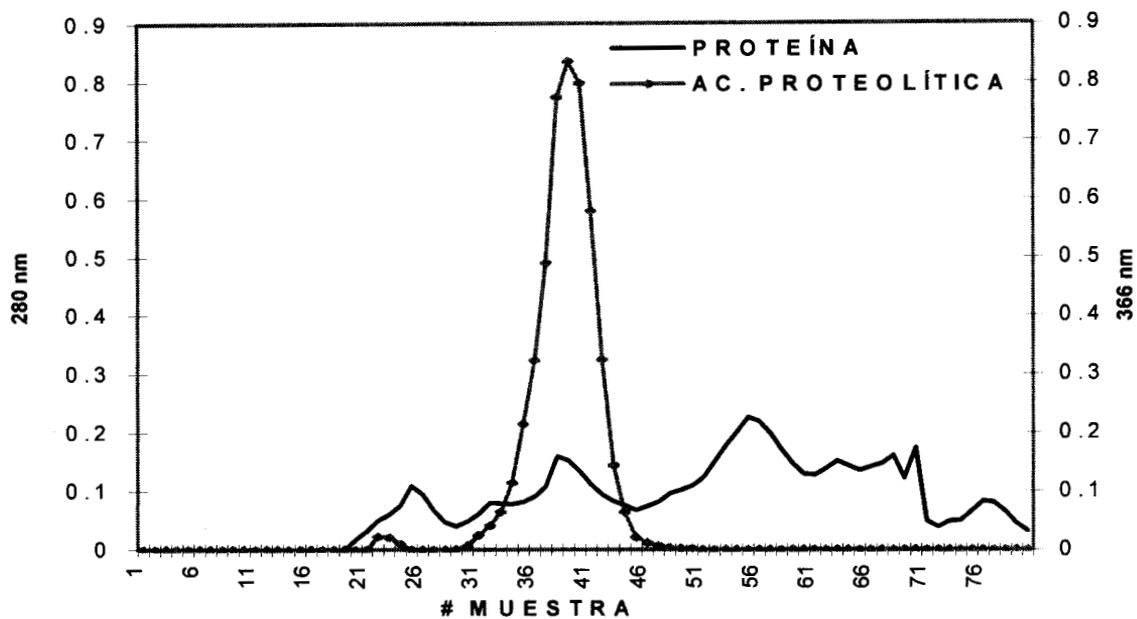


Figura 8. Electroforesis SDS al 12%. **A**, Extracto éter amibiano NaCl 0.5M. **B**, Sobrenadante de la muestra **A** precipitada con $ZnCl_2$ 0.05M. **C**, Precipitado $ZnCl_2$ lavado. **D**, Precipitado de la muestra **A** tratada con $ZnCl_2$ 0.05M.



Gráfica 4. Extracto éter amibiano NaCl 0.5M precipitado con $ZnCl_2$ 0.05M (sobrenadante) pasado por columna de filtración molecular Ultrogel ACA-54 . La proteína se detectó por D.O. a 280 nm y la actividad proteolítica a 366 nm. Se observa un pico de actividad proteolítica que corresponde a las fracciones 35-45.

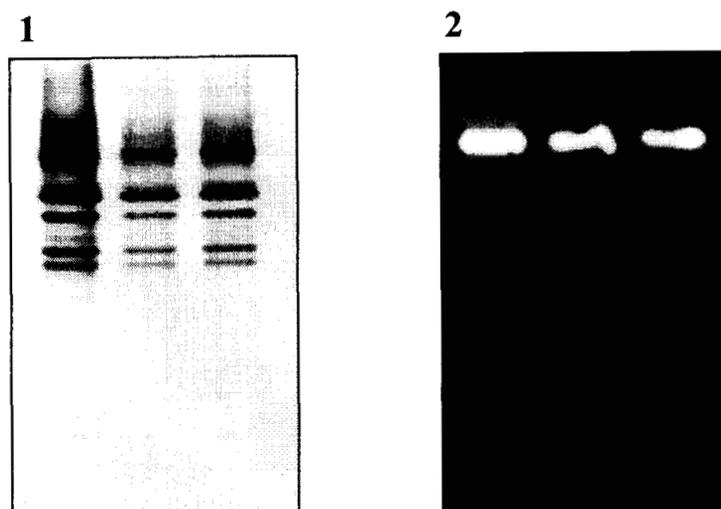


Figura 9. Electroforesis no desnaturizante al 12%. 1, Diferentes concentraciones de la fracción proteolítica de filtración molecular ultrogel ACA-54, del extracto éter amibiano NaCl 0.5M precipitado con $ZnCl_2$ (sobrenadante). 2, Zimograma en gel de gelatina.

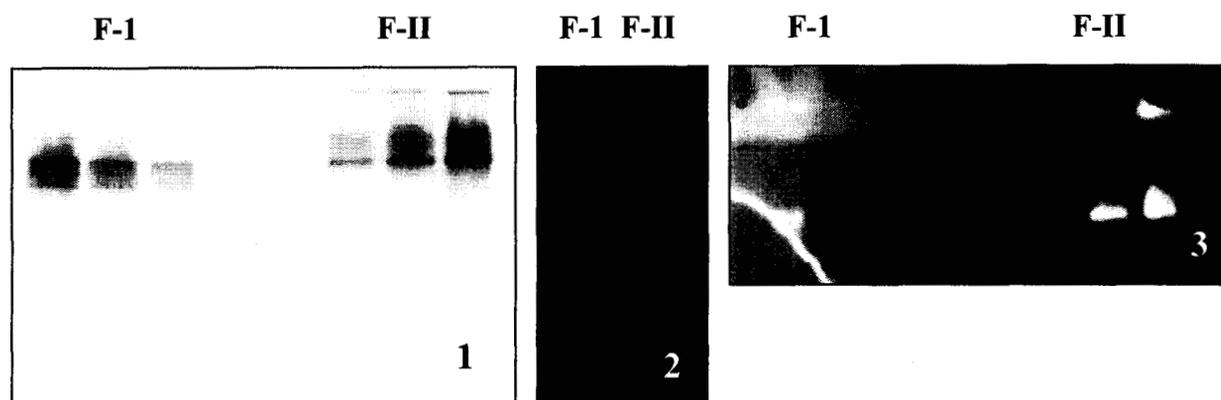


Figura 10. Electroforesis no desnaturizante al 12% de las proteasas de cisteína de *E. histolytica* electroeluidas en Prep Cell. 1, Diferentes concentraciones de fracción I (F-I) y fracción II (F-II). 2, Zimograma en gel de gelatina de fracción I y II. 3, Zimograma en gel de gelatina de fracción I y II almacenadas 30 días a 5 °C.

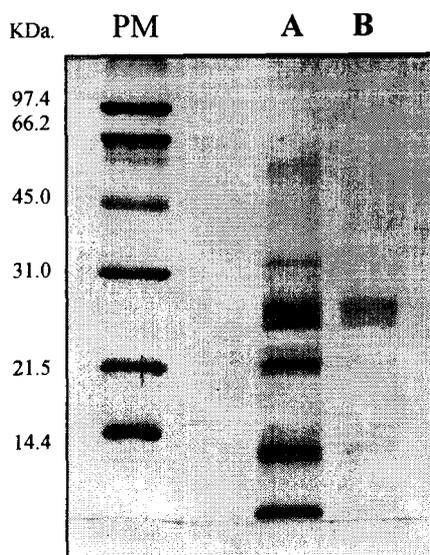


Figura 11. Electroforesis SDS al 12%. **A**, Fracción proteolítica de filtración molecular Ultrogel ACA-54 del extracto éter amibiano NaCl 0.5M precipitado con ZnCl₂ (sobrenadante). **B**, Proteasas de cisteína de *E. histolytica* electroeluidas en Prep Cell (fracción II).

	Extracto NaCl 2.5M	Electroelución		Extracto NaCl 0.5M	Electroelución	
		I	II		I	II
Proteína (mg)	29.10	0.347	0.827	664.50	1.625	3.834
Actividad total (D.O. 366 nm)	1608	91	216	6209	268	716
Rendimiento %	100	5.65	13.43	100	4.31	11.53

Tabla 3. Resumen de la purificación de proteasas de *E. histolytica* a partir de los extractos éter amibiano NaCl 2.5M y éter amibiano NaCl 0.5M.

electroforesis no desnaturizante las proteínas unidas a la columna, se observaron por lo menos cuatro bandas de diferente intensidad y muy cercanas entre si; el zimograma en gel de gelatina mostró actividad proteolítica asociada a la región proteica (figura 12-2). Este resultado muestra que los anticuerpos obtenidos tienen alta especificidad por proteasas amibianas.

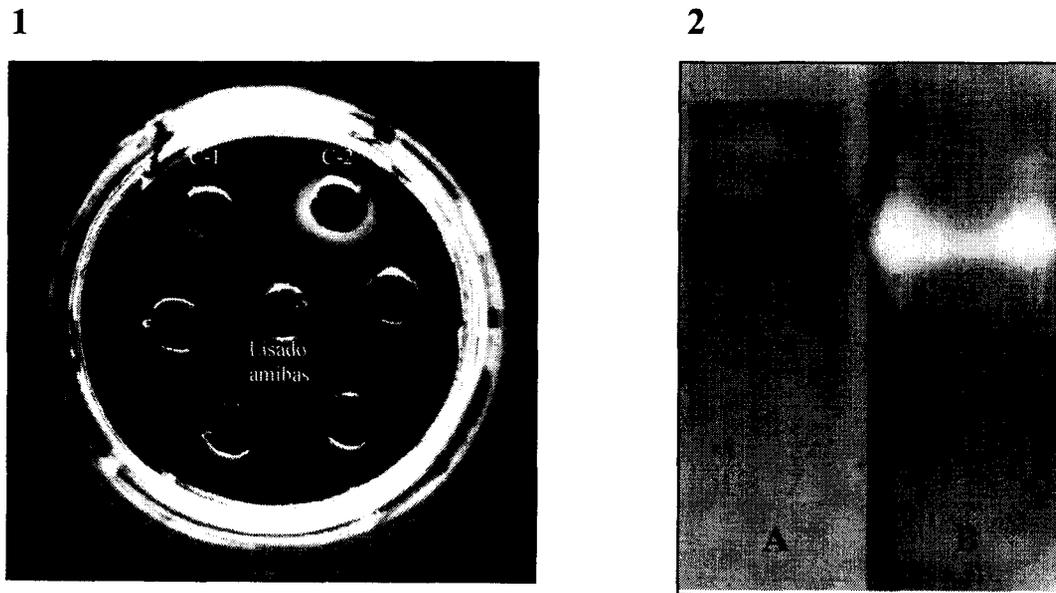


Figura 12. 1, Inmunodifusión en agar de los sueros del conejo 1 (C-1) y conejo 2 (C-2). **2-A,** Electroforesis no desnaturizante al 12% de las proteínas eluídas de la columna de afinidad anti-proteasa y **2-B,** zimograma en gel de gelatina.

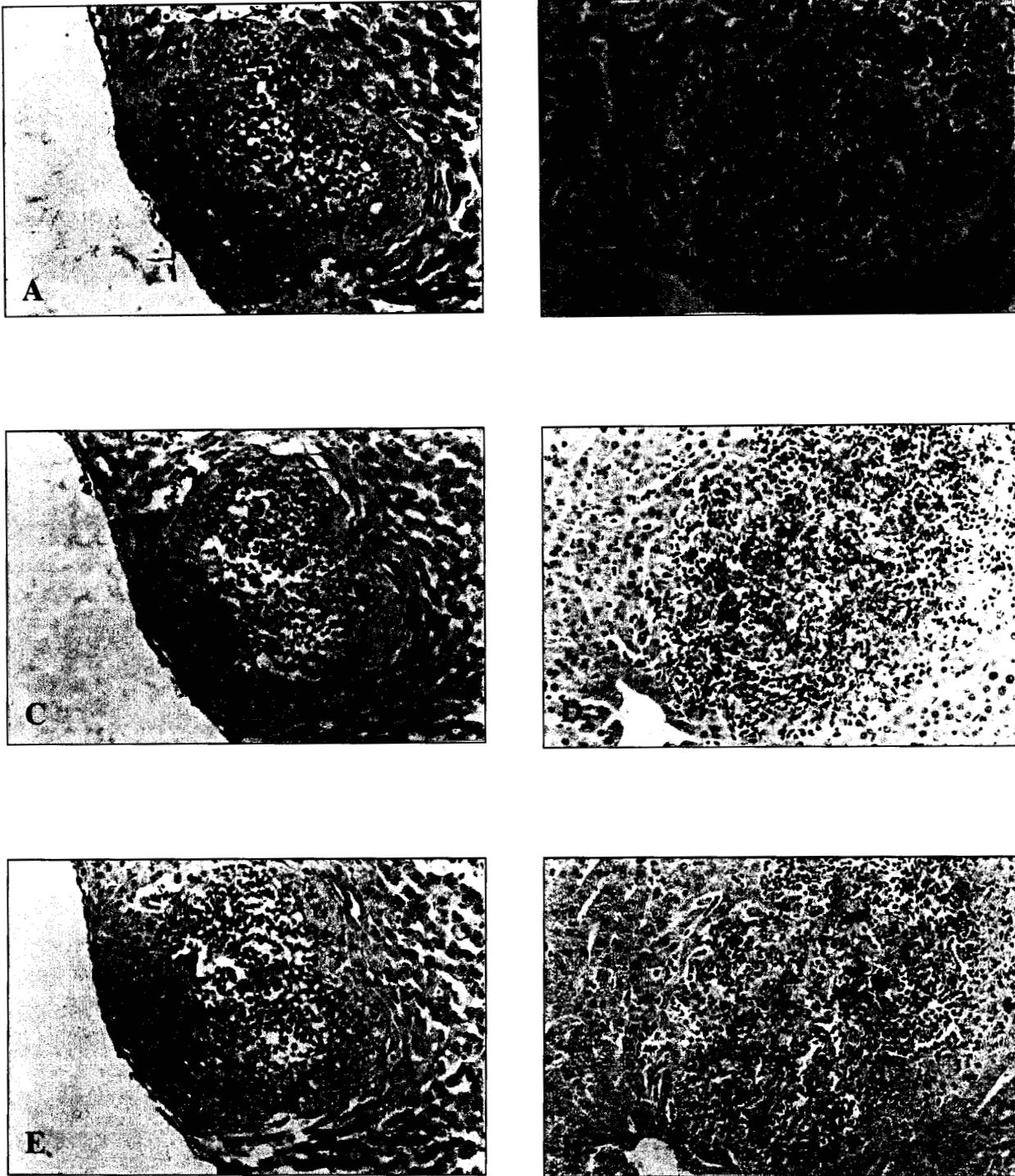


Figura 13. Cortes histológicos seriados de hígados de hamster con absceso hepático amibiano de 24 h de evolución, teñidos con anticuerpos anti-proteasa y revelados con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplados a peroxidasa. A y B, IgG conejo normal. C y D, IgG conejo 1. E y F, IgG conejo 2. Las amibas se aprecian claramente en color café marrón.

Efecto de los anticuerpos anti-proteasa en la actividad proteolítica de *E. histolytica*

La proteasa purificada por afinidad se incubó con concentraciones crecientes de IgGs purificadas de los conejos 1, 2 y normal, a partir de la relación equimolar y después se determinó su actividad proteolítica sobre azocaseína. En la gráfica 5 puede observarse que en el caso de las IgGs del conejo normal hubo una disminución gradual de la actividad proteolítica conforme aumentó la concentración de IgGs, esto seguramente se debió a una inhibición competitiva, ya que se sabe que esta proteasa degrada IgGs. La proteasa en presencia de IgGs del conejo 1 mostró un fenómeno similar al de las IgGs normales pero con actividad ligeramente mayor. Por el contrario, las IgGs del conejo 2 no inhibieron la actividad de la proteasa, sino que mostraron un efecto estabilizante sobre ésta, incrementando la actividad 3.2 veces con respecto a las IgGs del conejo normal. Se sabe que la reacción antígeno-anticuerpo precipita cuando se encuentra en la zona de equivalencia molar, por lo que se analizaron los inmunoprecipitados de las muestras anteriormente descritas. En la figura 14, en las muestras que corresponden a las IgGs de los conejos 1 y 2 se observaron proteínas con peso molecular semejante al de las proteasas purificadas, mientras que en las muestras con IgGs normales estas estuvieron ausentes. Para examinar si el efecto estabilizante de la actividad proteolítica por los anticuerpos se observaba en amibas vivas, se preincubaron amibas-IgGs y se determinó su actividad proteolítica sobre azocaseína. El resultado fue una disminución de 44 % de la actividad en presencia de IgGs del conejo normal, mientras que para las IgGs del conejo 1 la actividad permaneció casi igual y con IgGs del conejo 2 la actividad aumentó 23 %; finalmente, la viabilidad de las amibas no se modificó al final de la incubación con azocaseína (gráfica 6).

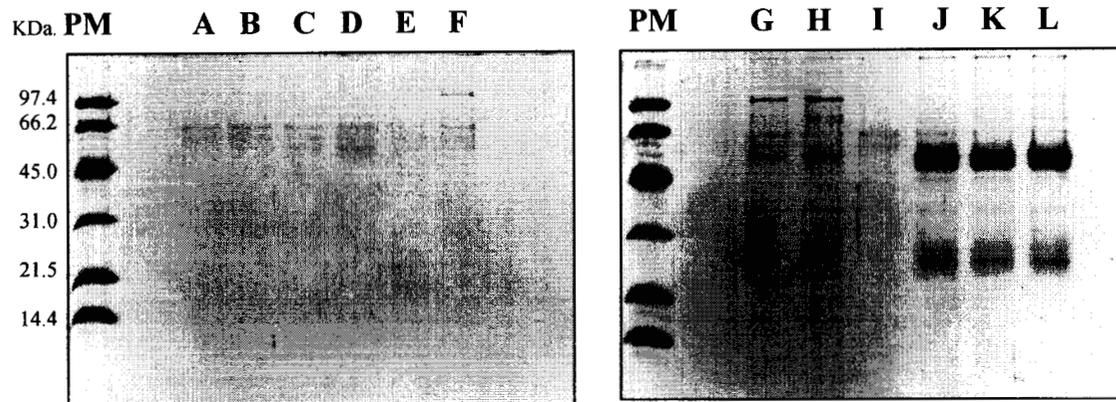
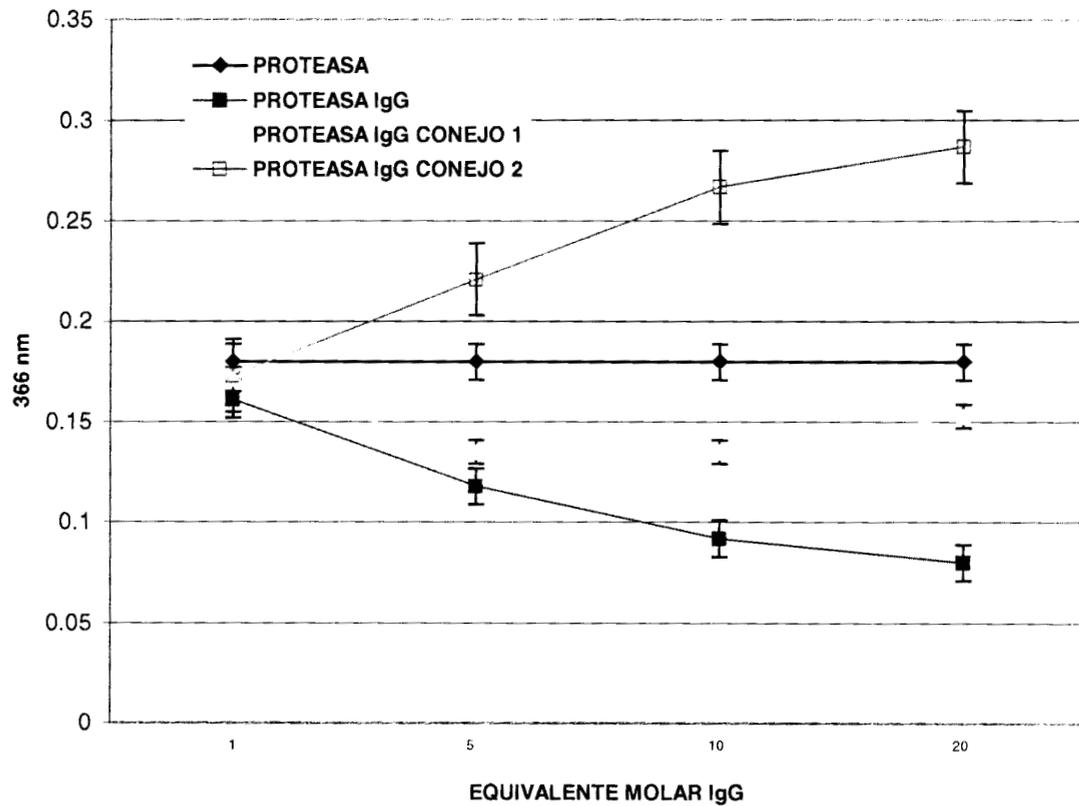
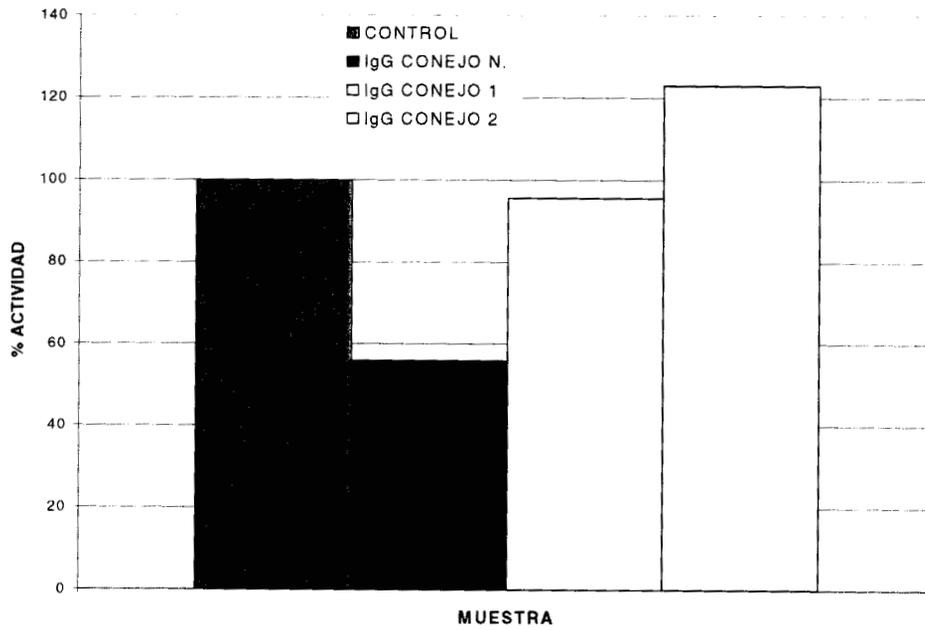


Figura 14. Electroforesis SDS al 12% de los inmunoprecipitados de la interacción IgG-proteasa purificada. 1 mol de proteasa se incubó con 1,5,10 y 20 moles de IgG. **A,B,C y D,** conejo normal. **E,F,G y H,** conejo 1 e **I,J,K y L,** conejo 2.



Gráfica 5. Efecto de anticuerpos policlonales anti-proteasa sobre la actividad proteolítica de la proteasa de cisteína de *Entamoeba histolytica* purificada en columna de afinidad IgG-anti-proteasa. Se aprecia un aumento de la actividad proteolítica en presencia de anticuerpos anti-proteasa.



Gráfica 6. Actividad proteolítica sobre azocaseína de *Entamoeba histolytica* en presencia de anticuerpos anti-proteasa.

Efecto de las microesferas de gelatina en el hígado de hamster

En la búsqueda de un vehículo que permitiera la liberación de proteasas en el hígado de hamster, se encontró en la literatura un trabajo que describía la metodología para la fabricación de microesferas de gelatina como vehículo de liberación de biomoléculas *in vivo*. Como se ilustra en la figura 15 estas microesferas no fueron de utilidad ya que despiertan una reacción inflamatoria intensa cuando se inyectan por vía portal en hamsters.

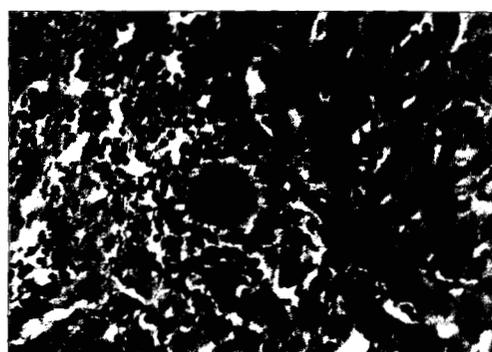


Figura 14. Microesferas de gelatina en hígado de hamster 24 h Se observa reacción inflamatoria aguda. Tinción hematoxilina y eosina.

Efecto de las microesferas de superdex 75 con y sin proteasa en el hígado de hamster

Como la resina superdex 75 (utilizada en cromatografía de filtración molecular) tiene tamaño semejante al de la amiba, incorpora proteínas de tamaño molecular semejante al de la proteasa con escasas o casi nulas interacciones con ésta y además en suspensión con agitación moderada liberan la proteína incorporada, se usaron como vehículo de la proteasa. En la figura 16 se observa que microesferas de superdex 75 en hígado de hamster presentan poca ó nula reacción inflamatoria a diferentes tiempos. En la figura 17-A se muestra la incorporación de proteína en superdex 75 mediante tinción con azul de Coomassie, se puede apreciar que la incorporación es heterogénea. En la figura 17-B se observa mediante inmunohistoquímica a la proteasa amibiana en las esferas de superdex 75 inyectadas en los hígados de los hamsters. Existe heterogeneidad en la intensidad de tinción de las microesferas, lo que esta de acuerdo con lo observado en las teñidas con azul de Coomassie. En la figura 17-C mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-proteasa, en cortes de un absceso hepático amibiano de 5 días de evolución, se localizó a la proteasa en las amibas pero no fuera de ésta. Finalmente, cuando se inyectaron las microesferas de superdex 75 con la proteasa incorporada, se observó que en 3 h ésta es capaz de inducir una respuesta inflamatoria aguda en el seno del hígado de hamster (figura 18-A), en el modelo usado esta inflamación disminuye en cuatro días, probablemente debido a que no se libera más proteasa (figura 18-C), además en 24 h se observaron lesiones escasas en la periferia de algunas microesferas (figura 18-B).

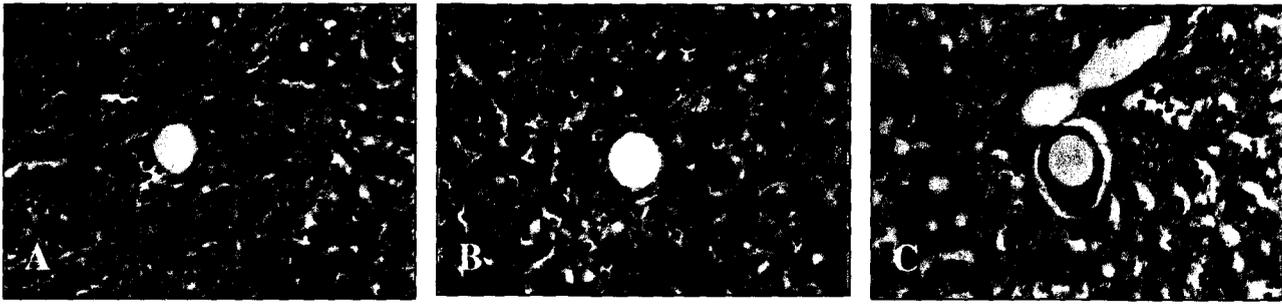


Figura 16. Microesferas de superdex en hígado de hamster. **A**, 3 horas. **B**, 24 horas. **C**, 4 días.



Figura 17. **A**, Microesferas de superdex con proteasa teñidas con azul de cooumassie. **B**, Inmunolocalización de microesferas de superdex con proteasa en hígado de hamster. **C**, Amibas en hígado de hamster (5 días) teñidas con anticuerpos anti-proteasa.

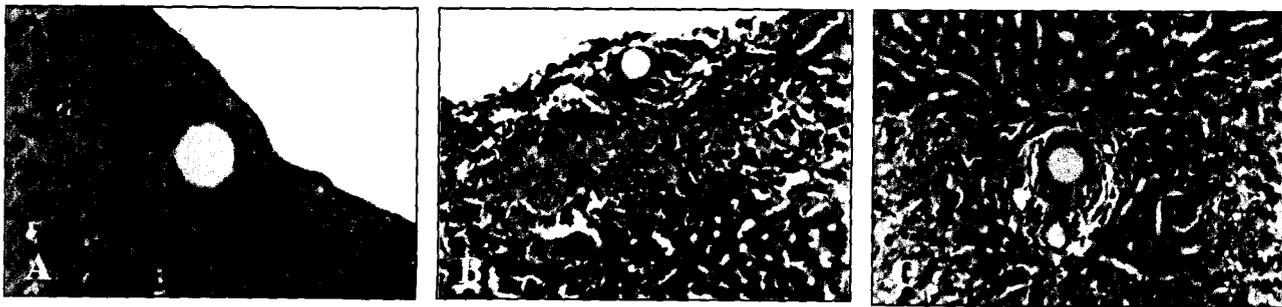


Figura 18. Microesferas con proteasa en hígado de hamster. **A**, Intensa reacción inflamatoria aguda 3 horas. **B**, Necrosis con reacción inflamatoria 24 horas. **C**, Lesión residual rodeando a la microesfera 4 días.

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos centrales del presente trabajo fue determinar si las proteasas de cisteína amibianas purificadas son capaces de destruir el tejido hepático *in vivo*.

El desarrollo del absceso hepático amibiano se caracteriza por la destrucción progresiva del tejido, que culmina con la muerte del hospedero. Para que este fenómeno ocurra el trofozoíto debe de estar viable, replicar y evadir los mecanismos amebicidas del sistema inmune, ya que a pesar de que exista necrosis en buena parte del hígado, la muerte de las amibas por metronidazol u otro fármaco resulta en la regeneración del tejido destruido sin cicatrización. La búsqueda de moléculas amibianas responsables de la destrucción del tejido se ha centrado en las proteasas de cisteína del parásito ya que estas moléculas aisladas *in vitro* son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular como colágena, laminina, fibronectina, y otras proteínas séricas;^{23,72} sin embargo, hasta la fecha no se ha comunicado algún efecto citotóxico directo sobre células aisladas y de cultivo (tabla 1). La importancia de las proteasas de cisteína en la amibiasis hepática experimental ha sido demostrada mediante ARN antisentido (EhCP5)¹ y por inhibición de la actividad proteolítica con E-64, que es específico de proteasas de cisteína.⁷⁰ Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares en los que esta participa. Es posible que pueda actuar de cuatro maneras: 1) en la destrucción directa de tejidos 2) en la evasión del sistema inmune 3) en el procesamiento de nutrientes y 4) una combinación de las anteriores. Para poder explorar el punto numero 1 fue necesario purificar proteasas de cisteína amibianas en estado nativo, sin detergentes y con alto grado de pureza.

En la mayoría de los protocolos de purificación de proteasas amibianas se emplean detergentes, tanto desnaturizantes como no desnaturizantes; se sabe que estos detergentes se unen a las proteínas en

diferente proporción y son difíciles de eliminar,^{30,53,55} por lo que para solubilizar las proteínas se utilizó éter etílico como sustituto de detergentes. Con el empleo de este solvente se obtuvo un extracto proteico soluble con alta actividad proteolítica. En la purificación de proteasas amibianas se ha recomendado el uso del inhibidor de proteasas de cisteína reversible PHMB;⁴² sin embargo se encontró que el HgCl₂ inhibe de manera semejante y es más económico por lo que se decidió emplearlo. La adición de ZnCl₂ a un extracto amibiano produjo un precipitado proteico, permaneciendo casi toda la actividad proteolítica en la fase soluble; esta actividad se asoció con proteínas de ~ 30 kDa (calculado por cromatografía de filtración molecular) y su correspondiente zimograma en gel de gelatina en condiciones no desnaturizantes reveló una banda de actividad proteolítica que concuerda con lo informado en la literatura ya que todos los genes de proteasas de *E. histolytica* clonados hasta la fecha codifican para proteínas de ~ 30 kDa.⁸ Contrario a esto, en *E. histolytica* se han identificado diversas proteasas de cisteína que oscilan entre 16 y 96 kDa.^{3,34,43,44,46,50} López-Revilla y cols.⁴² han propuesto que durante la electroforesis en SDS las proteasas de cisteína amibianas de menor tamaño se originan a partir de un precursor mediante autoproteólisis. Por otra parte Hellberg y cols.²⁷ cortaron las bandas de actividad proteolítica de electroforesis SDS, de peso molecular 35 y 48 kDa y las secuenciaron; resultando corresponder a EhCP2 y EhCP1, cuyos productos génicos corresponden a proteínas de 30 kDa., lo que sugiere fenómenos de oligomerización/agregación. Estos resultados parecen ser contradictorios, sin embargo los resultados de este trabajo apoyan la última propuesta, ya que al analizar en electroforesis SDS a las proteasas electroeluidas en el sistema Prep Cell, provenientes inicialmente de zonas de ~30 kDa de cromatografía de filtración molecular, así como de una sola banda proteica analizada en electroforesis no desnaturizante, se encontraron proteínas con diferente tamaño molecular y con actividad proteolítica. El fenómeno se revirtió a una banda proteica cuando estas muestras se hirvieron en

presencia de EDTA y Iodoacetamida, mientras que en presencia de mercaptoetanol y sin inhibidores la intensidad de las bandas proteicas disminuye, hay actividad en ~ 60 kDa y aparecen fragmentos proteicos en el frente del gel. La explicación a este fenómeno es desconocida, pero sugerimos que puede ser que la unión del SDS a la proteína cambie la conformación nativa de la proteasa, exponiendo sitios hidrofóbicos y generando algunos sitios accesibles a la hidrólisis, de esta manera en este microambiente tendríamos asociaciones proteasa-proteasa y proteasa- péptido(s) con diferente peso molecular. Además, la adición de mercaptoetanol favorecería la autoproteólisis ya que es activador de estas enzimas.

Se ha estudiado el efecto protector a la amibiasis experimental que presentan diversas moléculas amibianas cuando se les emplea como inmunógeno.^{14,45,79} Sin embargo, a pesar de que las proteasas amibianas son consideradas uno de los principales factores de virulencia, solo hay un estudio en el que fracciones semipurificadas con actividad proteolítica se emplean como inmunógeno y se observa que no hay correlación entre el título de anticuerpos y protección.²⁶ En humanos se ha encontrado que 83% de pacientes con amibiasis invasiva presentan anticuerpos anti-proteasa, mientras que en pacientes con amibiasis no invasiva estos estuvieron ausentes.⁶² Por otra parte, se ha sugerido que anticuerpos IgA anti-proteasa pueden desempeñar un papel protector en la amibiasis intestinal ya que *in vitro* estos inhiben eficientemente la actividad proteolítica.²⁴ En el presente trabajo se obtuvieron anticuerpos IgGs policlonales anti-proteasa con alta especificidad y se encontró que estos presentan un efecto estabilizante de la proteasa ya que la actividad proteolítica en presencia de éstos aumentó considerablemente; además el mismo fenómeno se observó en amibas viables. Sería interesante explorar si cuando esta proteasa se emplea como inmunógeno en animales de experimentación se obtienen anticuerpos con actividad estabilizante y si en estas condiciones se modifica el daño tisular.

Además se ha informado que individuos con amibiasis invasiva presentan episodios recurrentes,⁶⁹ por lo que es necesario explorar si existe una correlación entre la recurrencia a esta enfermedad y la presencia de anticuerpos estabilizantes de la actividad proteolítica amibiana.

La correlación entre el contenido de actividad proteolítica en *E. histolytica* y la virulencia a sido controversial,^{2,23,28,48} sin embargo experimentos *in vitro* han demostrado que la amiba libera proteasas al medio^{38,65} y se ha sugerido que *in vivo* estas proteasas son las responsables de la destrucción de tejidos que caracteriza a esta enfermedad. Contrario a esta propuesta, en nuestros resultados mediante inmunohistoquímica con peroxidasa o fluorescencia no se observaron proteasas fuera de la amiba en el absceso hepático amibiano experimental en hamster de 1 y 5 días de evolución, mientras que las amibas presentaron diferente intensidad de tinción, lo cual ha sido observado en amibas en cultivo. Es probable que la proteasa liberada por la amiba sea tan poca que se necesite un método de detección más sensible. Si este fuese el caso sería sorprendente que cantidades mínimas de proteasa amibiana sean responsables de las grandes áreas de destrucción, más aun si se tiene en cuenta que en este medio existen $\alpha 2$ macroglobulina⁵⁰ y laminina⁴⁰ que son capaces de inhibir su acción. No es posible, por lo tanto descartar la participación del hospedero en tal destrucción.

La incorporación de proteasas en un vehículo de liberación e inyección en hígados de hamster, permitió demostrar que las proteasas de cisteína amibianas son capaces de despertar una respuesta inflamatoria aguda en 3 h, acompañada de una pequeña área de necrosis en 24 h, que revierte en 4 días. Continúa la búsqueda de un vehículo que permita la liberación de gran cantidad de proteasa, para determinar si con esto la magnitud de la lesión aumenta. A pesar de que las microesferas de gelatina como vehículo de liberación de proteasas no fueron de utilidad, principalmente porque éstas son

degradadas antes de inyectarlas, pueden ser un excelente vehículo para la liberación prolongada de otros factores de virulencia amibianos *in vivo*.

225719

CONCLUSIÓN

Mediante un nuevo método de purificación se obtuvieron 6.6 mg de proteasas de cisteína de *Entamoeba histolytica* en estado nativo y con alto grado de pureza. Se purificaron anticuerpos policlonales anti-proteasa de alta especificidad con actividad estabilizante. Además por los métodos de inmunodetección empleados, no se localizaron proteasas fuera de la amiba en el absceso hepático amibiano experimental en hamster. Finalmente, la proteasa de cisteína amibiana purificada, *per se*, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria aguda en el seno del hígado de hamster, en el modelo usado esta inflamación disminuye en cuatro días, probablemente debido a que no se libera mas proteasa, además se observaron lesiones escasas en la periferia de algunas microesferas con proteasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun* 1999;**67**(1):421-422
2. Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* 1998;**28**(4):777-785
3. Avila E, Calderón J. *Entamoeba histolytica* Trophozoites: A surface-associated cysteine protease. *Exp Parasitol* 1993;**76**:232-241
4. Berninghausen O, Leippe M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1997;**65**(9):3615-3621
5. Braga L, Ninomiya H, McCoy J, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims P, Petri W. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 1992;**90**:1131-1137
6. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* 1999;**34**(3):463-472
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-254
8. Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* 1996;**22**(2):255-263

9. Bruchhaus I, Tannich E. Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. Mol and Biochem Parasitol 1994;**67**:281-288
10. Calderón J, Tovar R. Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* by treatment with human serum. Immunol 1986;**58**:467-471
11. Campbell D, Chadee K. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: Modulation of cell-mediated immune responses. Parasitol T 1997;**13**(5):184-188
12. Campos Rodríguez R, Jarillo-Luna A, Ventura-Juárez J, Shibayama M, Pacheco-Yépez J, Serrano-Luna J, Tsutsumi V. Interaction of antibodies with *Entamoeba histolytica* trophozoites from experimental amebic liver abscess: a immunocytochemical study. Parasitol Res 200;**86**:603-607.
13. Chadee K, Meerovitch, *Entamoeba histolytica*: Lymphoreticular changes in gerbils (*Meriones unguiculatus*) with experimentally induced cecal amebiasis. J Parasitol 1985;**71**(5):566-575
14. Cheng X, Tachibana H, Kaneda Y. Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by a monoclonal antibody to a 150-kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 1999;**85**:78-80
15. De Meester F, Shaw E, Scholze H, Stolarsky T, Mirelman D. Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Infect Immun 1990;**58**(5):1396-1401
16. Denis M, Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect Immun. 1989;**57**(6):1750-1756
17. Denis M, Chadee K. *In vitro* and *In vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. Infect Immun 1988;**56**(12):3126-3131

18. Diamond LS, Harlow DR, Cunniff CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;**72**:431-432
19. Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors alter golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell S* 1998;**111**:597-606
20. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*; Mechanism of surface receptor capping. *Exp Parasitol* 1994;**79**:424-435
21. Flores M, Batzer M, Stein M, Petersen C, Diedrich D, Torian B. Structural analysis and demonstration of the 29 kDa antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica* as the major accessible free thiol-containing surface protein. *Mol Microbiol* 1993;**7**(5):755-763
22. Flores-Romo L, Tsusumi V, Estrada-García T, Shibayama M, Aubry J, Bacon K, Martínez-Palomo A. CD59 (protectin) molecule, resistance to complement and virulence of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; **88**:116-117
23. Gadasi H, Koblitz D. *Entamoeba histolytica*: Correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp Parasitol* 1983;**55**:105-110
24. Guerrero-Manríquez G, Sánchez-Ibarra F, Avila E. Inhibition of *Entamoeba histolytica* proteolytic activity by human salivary IgA antibodies. *APMIS* 1998;**106**:1088-1094
25. Gupta S, Ghosh P, Naik S, Naik SR. Proteinase activity & virulence of *Entamoeba histolytica* on passage through hamster liver. *J Med Res.* 1998;**107**:173-177
26. Gupta S, Naik S, Naik SR. Vaccine potential of 56-66 kDa protease secreted by *Entamoeba histolytica*. *Ind J Med Res* 1999;**109**:141-146
27. Hellberg A, Leippe M, Bruchhaus I. Two major higher molecular mass proteinases of

- Entamoeba histolytica* are identified as cysteine proteinases 1 and 2. Mol Biochem Parasitol 2000;**105**:305-309
28. Hellberg A, Nickel R, Lotter H, Tannich E, Bruchhaus I. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction *in vitro* but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. Cell Microbiol 2001;**3**:13-20
29. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 1985;**6**:103-112
30. Hjelmeland LM. Removal of detergents from membrane proteins. Meth Enzymol 1990;**82**:277-282
31. Huston CD, Haque R, Petri WA. Expert reviews in molecular medicine: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
32. Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E, Leippe M. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol 1998;**27** (2): 269-76
33. Katunuma N, Kominami E. Structure, properties, mechanism. And assays of cysteine protease inhibitors: Cystatins and E-64 derivatives. Meth Enzymol 1995;**251**:382-397
34. Keene WE, Pettitt MG, Allen S, McKerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med. 1986; **163**: 536-549.
35. Kumar S, Tripathi L and Sagar P. Oxido-reductive functions of *Entamoeba histolytica* in relation to virulence. Annals of Trop Med and Parasitol 1992;**86**(3);239-248
36. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nat 1970;**227**:680-685

37. Leippe M, Andrä J, Nickel R, Tannich E, Müller-Eberhard. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* 1994;**14**(5):895-904
38. Leippe M, Sievertsen J, Tannich E, Hortsman D. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitol* 1995;**111**:569-574
39. Li E, Stenson WF, Kunz-Jenkins C, Swanson PE, Duncan R, Stanley SL. *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect Immun* 1994;**62**(11):5112-5119
40. Li E, Yang WG, Zhang T, Stanley SL. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect Immun* 1995;**63**(10): 4150-4153
41. Long-Krug S, Fischer K, Hysimith R and Ravdin J. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: Description and subcellular localization. *J Infect Dis* 1985;**152**(3):536-541
42. López-Revilla R, Canto-Ortiz L, Jiménez-Delgadillo B, Chávez-Dueñas L. Proteinases resistant to sodium dodecyl sulfate-induced autoproteolysis of *Entamoeba histolytica* HK-9 trophozoites. *Parasitol Res* 1993;**79**:168-171
43. Luaces AL, Barrett AJ. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Biochem* 1988; **250**: 903-909
44. Lushbaugh WB, Hofbauer F, and Pittman FE. *Entamoeba histolytica*: Purification of Cathepsin B. *Exp Parasitol* 1985;**59**:328-336
45. Marinets A, Zhang T, Guillén N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiendermann Stanley SL, Duchene M. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody

- directed against a lipophosphoglycan antigen localized on a surface of *Entamoeba histolytica*.
J Exp Med 1997;**186**(9):1557-1565
46. McLaughlin J, Faubert G. Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. Can J Microbiol 1976;**23**:420-425
47. Molinari JL, Mejia H, White AC, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P. *Taenia solium*: A cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 Lymphocytes *in vitro*. Exp Parasitol 2000; **94**: 133-142
48. Montfort I, Olivos A, Pérez-Tamayo R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 1992;**23**(2):177-179
49. Montfort I, Pérez-Tamayo R, González CA, García de León MC, Olivos A, Tello E. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the citopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes *in vitro*. J Parasitol 1993;**79**(1):98-105
50. Montfort I, Pérez-tamayo R, Pérez-Montfort R, González A, Olivos A. Purification and immunologic characterization of a 30-kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 1994;**80**:607-613
51. Navarro-García F, Chávez-Dueñas L, Tsutsumi V, Posadas del Rio F, López-Revilla R. *Entamoeba histolytica*: Increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. Exp Parasitol 1995;**80**: 361-372
52. Navarro-García, López-Revilla R, Tsutsumi V. Dose-and time-dependent functional and structural damage to the colon mucosa by *Entamoeba histolytica* trophozoite lysates. Parasitol Res 1993;**79**:517-522
53. Nelson CA. The binding of detergents to proteins. J Biol Chem 1971;**246**(12):3895-3901

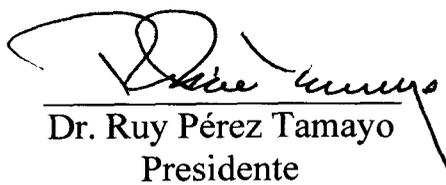
54. North MJ, Mottramand JC, Coombs GH. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 1990;**6**(8):270-275
55. Nosaki Y, Reynolds J, Tanford C. The interaction of cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins. *J Biol Chem* 1974;**249**(14):4452-4459
56. Pacheco-Yépez J, Campos-Rodríguez R, Shibayama M, Ventura-Juárez J, Serrano-Luna J, Tsutsumi V. *Entamoeba histolytica* : production of nitric oxide and in situ activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitol Res* 2001;**87**:49-56
57. Pérez-Tamayo R, Montfort I, Tello E, Olivos A. Ischemia in experimental acute amebic liver abscess in hamsters. *Int J parasitol* 1992;**22**(1):125-129
58. Petri WA Jr, Chapman MD, Snodgrass T, Broman J and Ravdin JI. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable as adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 1989;**264**:3007-3012
59. Ravdin J, Croft BY,Guerrant RL, Cytophagogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1980;**152**:377-390
60. Reed SL, Ember J, Herdman S, DisCipio R, Hugli T, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphilatoxins C3a and C5a. *J Immunol* 1995;**155**:266-274
61. Reed SL, Gigli I. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J Clin Invest* 1990;**86**:1815-1822
62. Reed SL, Keene W, Mckerrow J. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989;**27**(12):2772-2777

63. Sargeant P and Williams. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg* 1979;**73**(2):225-227
64. Séguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infec Immun* 1997;**65** (7):2522-2527
65. Serrano JJ, De la Garza M, Reyes M, León G, Tovar R, Muñoz ML. *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitol Res* 1996;**82**:200-205
66. Seydel KB, Li E, Zhang Z, Stanley SL. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. *Gastroenterol* 1998;**115**:1446-1453
67. Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infec Immun* 2000;**68**(1):400-402
68. Soulié S, Vuust MJ, Falson P, le Maire M. Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1996;**236**:363-364
69. Stanley SL. Protective immunity to amebiasis: new insights and new challenges. *J Infec Dis* 2001;**184**:504-506
70. Stanley SL, Shang T, Rubin D, LI E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infec Immun* 1995;

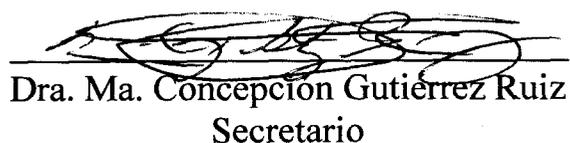
71. Tse SK, Chadee K. The interaction between intestinal mucus glycoproteins and enteric infections. *Parasitol T* 1991;**7** (7):163-171
72. Tsusumi V, Ramirez-Rosales A, Lans-Mendoza H, Shibayama M, Chávez B, Rangel-López E, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; **86**:170-172
73. Vargas-Villareal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas B, González-Garza T, Fernández-Said S. Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lisophospholipase L₁ activities. *Parasitol Res* 1995;**81**:320-323
74. Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-García J, Tsusumi V, Calderón J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *P Immunol* 1998;**20**:255-262
75. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of the morbidity and mortality. *Rev Inf Dis* 1986;**8**:228-238
76. Willhoeft U, Hamann L, Tannich E. ADNA Sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* Is presente and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infec Immun* 1999;**67**(11):5925-5929
77. Xun-Jia Ch, Tachibana H. Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunization with the 150- and 170-kDa surface antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 2001;**87**:126-130
78. Yoshioka T, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: nano-and microspherical carriers of gelatin. *Int J Pharm* 1981;**81**:131-141

79. Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 1994;**62**(4):1166-1170
80. Zhang Z, Yan L, Wang L, Seydel KB, Li E, Ankri S, Mirelman D, Stanley SL. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* 2000;**37**(3);542-548

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 5 de Octubre del 2001.



Dr. Ruy Pérez Tamayo
Presidente



Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz
Secretario



Dra. Irmgard Montfort Happel
Vocal



Dr. Alejandro Alagón Cano
Vocal



Dr. Julio César Carrero Sánchez
Vocal
