

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *Entamoeba histolytica* QUE INTERACTÚAN CON ERITROCITOS HUMANOS.

**TESIS QUE PRESENTA EL
BIÓLOGO EDUARDO CARRILLO TAPIA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS GENÓMICAS**

**DIRIGIDA POR
DRA. MARIA ESTHER OROZCO OROZCO.
DR. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ.**

México, D.F., Agosto de 2006

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

TUTORES

Dra. María Esther Orozco Orozco

Profesor-Investigador Titular del Departamento de Patología Experimental,
CINVESTAV-IPN

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Profesor-Investigador Titular del Departamento de Patología Experimental,
CINVESTAV-IPN

ASESORES

Dra. Elisa Azuara Licéaga

Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mario Cesar López Camarillo

Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad
Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a la Dra. Esther Orozco y al Dr. Mario Alberto Rodríguez por la dirección de este trabajo, por el apoyo y la confianza depositada en mí, y sobre todo por sus enseñanzas y críticas.

A la Dra. Elisa Azuara Licéaga por sus críticas y asesoría a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Cesar López Camarillo por sus observaciones y asesoría en este trabajo.

A la Dra. Guillermina García Rivera, a la M. en C. Rosa María García Pérez, al Dr. Leobardo Mendoza Alcántara y al QBP Tomas Sánchez por su apoyo técnico en el laboratorio y el microscopio confocal.

A Alfredo Padilla Barberi por su soporte técnico en el diseño gráfico del material de apoyo, por compartir sus conocimientos en el manejo de las computadoras y por su amistad.

A la Sra. Alejandrina Reyes Vivar, por el apoyo técnico en el laboratorio y por su amistad.

A Roció Guerrero García (CINVESTAV), Fátima Catalina Sánchez Domínguez (UACM) y Lourdez Collazo (UACM) por su apoyo secretarial.

A mis compañeros de la maestría: Noemi Esquibel, Fernando Flores, Mayra Vázquez y Reotbebely Barrientos.

Mi más sincero agradecimiento a cada uno de mis compañeros de laboratorio No 2 del departamento de Patología Experimental del CINVESTAV: Guillermina García, Cecilia Bañuelos, Abigail Betanzos, Mavil López, Guadalupe De Dios, Israel López, Eduardo Flores, Mayra Meléndez, Eliza Azuara, Felipe Carrillo, Adriana Castillo, Andrés Casas, Esther Herrera, Tomas Sánchez, Cesar López., Rosa María García, Mónica Romero, Alberto García, Ramón Ocádiz, Karina Picazarri, Máximo Martínez, Mercedes Calixto, Jacobo Juárez, Alberto García.

Gracias a cada una de estas personas, por todos los conocimientos, comentarios, consejos de laboratorio, recomendaciones, asesorías científicas, críticas y sugerencias, y por todo aquello que me ha ayudado en algún momento de mi vida para poder entender aunque sea solo un poco esto que ustedes llaman ciencia.

ESTORPON

Quiero dedicar el presente trabajo a mi familia, por que considero que son parte fundamental de mi desarrollo personal y profesional.

Mis abuelos:

Luisa Carreras Egandio, † y Emilio Carrillo Egandio †
Luisa Chantegui Fuentes y Jorge Tapia Jimenez †

Por esa infancia que hoy considero especial y afortunada.

Mis padres:

Juana Tapia Chantegui y Elias Carrillo Carreras.

Por ese apoyo tan grande para mi, que aun mañana recibiré sin preguntar siquiera si lo merezco.

Mis otros padres:

Laura Adriana Egandio Anguiano y Enrique Herrera Carreras

Por apoyarme y tratarme como si fuera su propio hijo.

Mi esposa e hijos:

Claudia Esth. Herrera Egandio

Mauricio Boham Carrillo Herrera y Leonardo Hugo Carrillo Herrera

Por enseñarme lo que es el amor desprendido de cualquier interés que no sea el de estar juntos.

Mis hermanas:

Elias Carrillo Tapia, Carlos Carrillo Tapia.

Por todos esos momentos de la infancia y adolescencia que nos unen.

Mis tíos:

Reinaldo, Violeta y María Tapia Chantegui.

Por que cuando mi madre a fallado, siempre he encontrado el apoyo de alguna de ellas

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Amibiasis.....	1
1.2 Epidemiología.....	1
1.3 Clasificación taxonómica.....	3
1.4 Ciclo de vida.....	3
1.5 Características morfológicas del trofozoíto.....	4
1.6 Mecanismo agresor de <i>E. histolytica</i>	7
1.6.1 Adhesión.....	8
1.6.2 Efecto citolítico.....	10
1.6.3 Fagocitosis.....	11
1.7 Eritrofagocitosis.....	13
1.8 Fagocitosis en organismos superiores.....	15
1.9 La proteómica de la fagocitosis en <i>E. histolytica</i>	21
1.10 Antecedentes específicos.....	24
II. JUSTIFICACIÓN.....	28
III. HIPÓTESIS.....	28
IV. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general.....	29

4.2 Objetivos particulares.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Cultivo de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	30
5.2 Obtención y fijación de eritrocitos humanos.....	30
5.3 Eritrofagocitosis.....	31
5.4 Extracción de proteínas totales de <i>E. histolytica</i>	31
5.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	31
5.6 Tinción de geles de proteínas con nitrato de plata.....	32
5.7 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	33
5.8 Western Blot.....	34
5.9 Inmunolocalización de proteínas.....	34
VI. RESULTADOS.....	36
6.1 Aislamiento de proteínas amibianas que interactúan con eritrocitos.....	36
6.2.1 Inmunodetección del complejo EhCPADH en la eritrofagocitosis.....	42
6.2.2 Inmunodetección del receptor acoplado a proteínas G en la eritrofagocitosis.....	45
6.2.3 Inmunodetección de la subunidad B de la ATPasa vacuolar en la eritrofagocitosis.....	46
6.2.4 Inmunodetección de la piruvato:ferredoxin oxido reductasa (PFO) en la eritrofagocitosis.....	47
6.2.5 Inmunodetección de la enolasa de <i>E. histolytica</i> en la eritrofagocitosis.....	55
6.2.6 Inmunodetección de la actina durante la eritrofagocitosis.....	56
6.2.7 Inmunodetección de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) en la eritrofagocitosis.....	62
6.3 Localización de proteínas relacionadas con la eritrofagocitosis.....	63

6.3.1 Inmunolocalización del complejo EhCPADH durante la eritrofagocitosis.	63
6.3.2 Inmunolocalización de la ATPasa vacuolar de <i>E. histolytica</i> durante la eritrofagocitosis.....	64
6.3.3 Inmunolocalización del EhGPCR-1 de <i>E. histolytica</i> durante la eritrofagocitosis.....	68
VII. DISCUSIÓN.....	82
VIII. CONCLUSIONES.....	92
IX. PERSPECTIVAS.....	93
X.APENDICE.....	94
XI REFERENCIAS.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	5
Figura 2. Microscopia electrónica de transmisión de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> después de cinco minutos de eritrofagocitosis.....	17
Figura 3. El fagosoma virtual en macrófagos de ratón.....	23
Figura 4. El fagosoma virtual de <i>E. histolytica</i>	27
Figura 5. Aislamiento de proteínas que interactúan con eritrocitos humanos.....	39
Figura 6. Inmunodetección del complejo EHCPADH en la eritrofagocitosis.....	43
Figura 7. Inmunodetección del EhGPCR-1 en eritrofagocitosis.....	49
Figura 8. Inmunodetección de la ATPasa vacuolar en eritrofagocitosis.....	51
Figura 9. Inmunodetección de la piruvato: ferredoxín óxidoreductasa (PFO).....	53
Figura 10. Inmunodetección de la enolasa en la eritrofagocitosis.....	58
Figura 11. Inmunodetección de la actina en la eritrofagocitosis.....	60
Figura 12. Inmunodetección de la proteína EhTBP.....	65
Figura 13. Inmunolocalización del complejo EhCPADH.....	70
Figura 14. Inmunolocalización del complejo EhCPADH durante la eritrofagocitosis.....	72
Figura 15. Inmunolocalización intracelular de la subunidad B de la ATPasa vacuolar.....	74
Figura 16. Inmunolocalización de la subunidad B de la ATPasa vacuolar durante la eritrofagocitosis.....	76
Figura 17. Inmunolocalización del GPCR-1 de <i>E. histolytica</i>	78
Figura 18. Inmunolocalización del GPCR-1 de <i>E. histolytica</i> durante la eritrofagocitosis.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las bandas obtenidas en el trabajo de Rodríguez y col., (1989) y en este trabajo.....	41
Tabla 2. Proteínas amibianas que interaccionan con eritrocitos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

B-ATPasa	Subunidad B de la ATPasa vacuolar
Ehadh112	Gen que codifica para la adhesina EhADH112
Ehcp112	Gen que codifica para la cisteína proteinasa EhCP112
EhKO	Organelo de <i>E. histolytica</i> parecido al kinetoplasto
kDa	Kilodaltones
mAb	Anticuerpo monoclonal
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PFA	Paraformaldehido
PFO	Proteína piruvato: ferredoxín oxidoreductasa
PHMB	Para-hidroximercuribenzoato.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TYI-S-33	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero para cultivo axénico de <i>E. histolytica</i>
EhPFO	Proteína Piruvato: ferredoxin oxido reductasa de <i>E. histolytica</i>
EhGPCR-1	Receptor acoplado a proteínas G triméricas de <i>E. histolytica</i>
EhCPADH	Complejo proteico formado por una proteasa y una adhesina de <i>E. histolytica</i>

RESUMEN

Desde hace más de cien años, Lesh demostró que las amibas encontradas en las muestras de humanos con disentería contenían eritrocitos. Precisamente, la eritrofagocitosis ha sido tradicionalmente considerada uno de los criterios más importantes en la identificación de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en el laboratorio. Sin embargo, el mecanismo por el cual este protozoo interactúa con los eritrocitos aún es poco claro.

Por lo tanto, el interés de este trabajo fue identificar moléculas de los trofozoítos amibianos involucradas en la eritrofagocitosis a los 20 min de interacción célula-célula.

La estrategia que utilizamos fue realizar ensayos de ligando seguidos por Western blot y por último inmunolocalizamos a las proteínas por microscopía confocal. Primeramente, incubamos 10^6 trofozoítos con 1.6×10^8 eritrocitos humanos fijados con glutaraldehído durante 20 min a 37°C y posteriormente lisamos los trofozoítos con el detergente NP-40. Los eritrocitos fijados y por lo tanto intactos, se utilizaron como acarreadores de las proteínas amibianas unidas a ellos.

De los ensayos de aislamiento identificamos diez bandas correspondientes a proteínas de *E. histolytica* en los geles de poliacrilamida, con pesos similares a los obtenidos en trabajos anteriores.

Posteriormente, mediante anticuerpos específicos logramos inmunodetectar cuatro de estas proteínas, una correspondió al complejo EhCPADH, el cual además funcionó como control positivo de este trabajo. Las otras tres proteínas

fueron la subunidad B de la ATPasa vacuolar, un receptor acoplado a proteínas G (EhGPCR-1) y la piruvato: ferredoxín óxidoreductasa (PFO). En estos ensayos no se logró inmunodetectar a las proteínas enolasa y actina, los cuales habían sido detectados en otros trabajos.

Por ensayos de inmunofluorescencia, logramos inmunolocalizar el complejo EhCPADH, la B-ATPasa y el EhGPCR-1, alrededor o sobre los eritrocitos ingeridos por los trofozoítos, confirmando de esta manera la interacción de estas proteínas de *E. histolytica* con la célula blanco.

I INTRODUCCIÓN

1.1 AMIBIASIS

La amibiasis está definida como la presencia del parásito protozoario *Entamoeba histolytica* en el organismo humano, acompañada o no de manifestaciones clínicas (WHO, 1997). Ésta es considerada como una enfermedad infecciosa y resulta principalmente en dos distintas manifestaciones clínicas, una de ellas la disentería intestinal (Marion y Guillen, 2006). El período de incubación de la amibiasis intestinal puede variar desde pocos días hasta meses o años, pero generalmente es de 1-4 semanas (revisado en Tanyuksel y Petri, Jr., 2003). Si el parásito invade el epitelio intestinal puede causar una amplia variedad de alteraciones anatómicas, correspondientes a cuadros clínicos bien definidos que se conocen como colitis ulcerativa amibiana, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (revisado en (Tanyuksel y Petri, Jr., 2003). Bajo ciertas condiciones, el parásito puede llegar a otros órganos, provocando la amibiasis extraintestinal (Pérez-Tamayo, 1989). La amibiasis hepática es la segunda manifestación clínica más importante y se caracteriza por la presencia de abscesos (Marion y Guillen, 2006) en una o más áreas grandes de necrosis (Pérez-Tamayo, 1989).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La amiba es un parásito cosmopolita, con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales; su presencia se encuentra relacionada a condiciones sanitarias deficientes, a la pobreza e ignorancia y probablemente al estado general de salud y nutrición del individuo (Cook, 1990).

En el mundo, la amibiasis afecta directamente a más de 50 millones de personas causando debilidad física en ellas y hasta la muerte, con el subsiguiente daño económico (Ravdin, 2000). En países industrializados afecta principalmente a inmigrantes, a personas con inmunodeficiencias y a personas que visitaron zonas endémicas de la enfermedad (Tanyuksel y Petri, Jr., 2003). A nivel mundial se reconocen algunas áreas de alto riesgo, entre ellas se encuentra el sur de África y Asia, el medio Oriente, el sur y centro de América y México (Ravdin, 2000).

En México, la amibiasis es una enfermedad endémica y es considerado un grave problema de salud pública, puesto que se encuentra entre las primeras diez causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales (Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992) y (Caballero-Salcedo y col., 1994) encontraron que el 8.4% de la población mexicana es seropositiva para antígenos de *E. histolytica* y ésta se incrementa marcadamente en zonas rurales en donde no hay drenaje ni agua. La prevalencia es más alta en niños de edad escolar, probablemente debido a que el parásito se trasmite de niño a niño por falta de hábitos de higiene adecuados (Cinfuentes y col., 1994).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reporta en México a la amibiasis como la quinta causa de morbilidad. En el año 2005, se reportaron 762,937 casos en hombres y mujeres. Cuando se divide por grupos de edades se observó que los niños de entre 1-4 años y los adultos de entre 25-44 años de edad son los más afectados con 150,372 y 146,102 casos, respectivamente (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2005).

En una revisión de reportes de 1929 a 1997 se encontró que la amibiasis invasiva (disentería, absceso hepático, perforación colónica, peritonitis, apendicitis y ameboma) mostró una predisposición mayor en hombres que en

mujeres (la proporción hombre: mujer es de 3.2:1); sin embargo, la infección asintomática está igualmente distribuida entre ambos géneros (Acuña-Soto y col., 2000).

1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Debido a que se creyó que *E. histolytica* no poseía mitocondrias, se pensaba que había divergido de los eucariontes antes de la adquisición de éstas y otros organelos, sin embargo, los estudios filogenéticos basados en la comparación de las secuencias de la subunidad pequeña del DNA ribosomal (srDNA) han establecido que *E. histolytica* pertenece a un linaje relativamente cercano al de los eucariontes, sugiriendo que los antecesores de este parásito sufrieron la pérdida de estos organelos (Clark y Roger, 1995).

La clasificación taxonómica de *E. histolytica* presenta variaciones entre autores, sin embargo todos concuerdan en que pertenece al *phylum* de los *Rhizopodos*, cuya característica es la presencia de pseudópodos en algún estadio de su vida y a la familia de los *Entamoebidae*, cuyos miembros son todos parásitos. Sin embargo, para llevar a cabo la clasificación taxonómica más adecuada de cualquier organismo se deben de tomar criterios no solamente morfológicos, sino moleculares fisiológicos y genéticos (Kudo y col., 1985).

1.4 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *E. histolytica* presenta dos fases: el quiste y el trofozoíto (Ravdin, 2000). El ciclo de vida comienza cuando se ingieren los quistes maduros (Fig. 1). Las causas de infección por quistes son varias, entre ellas, la falta de limpieza en las manos y la presencia de materia fecal en agua y

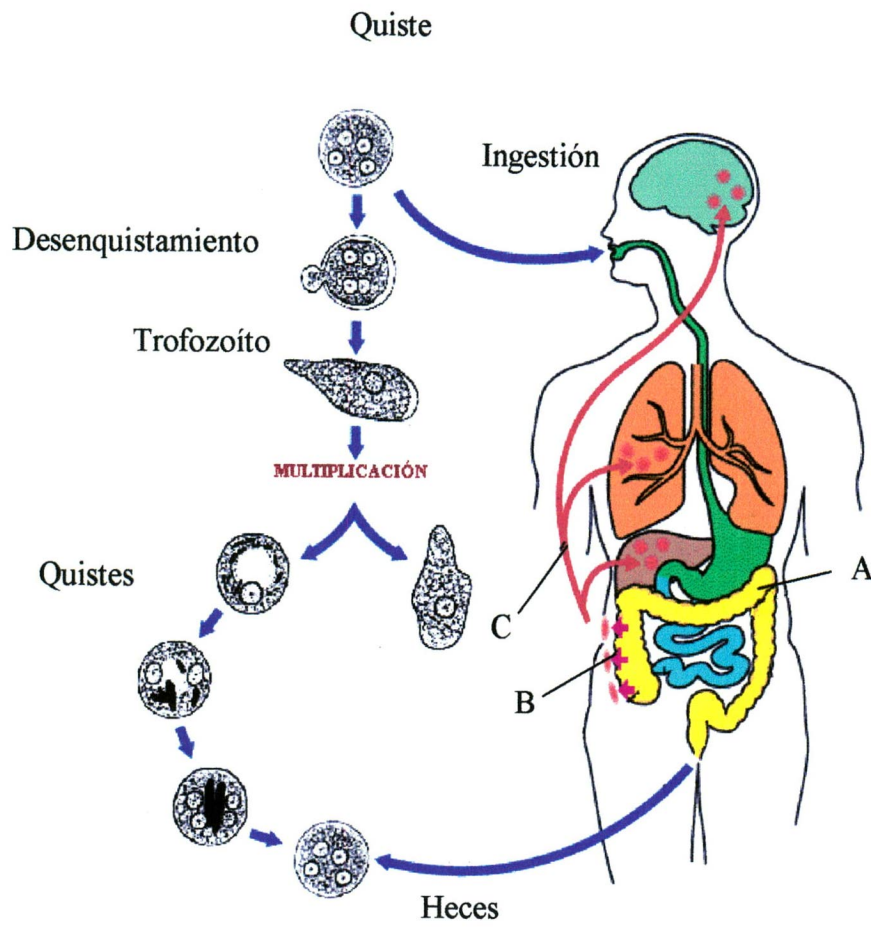
alimentos (www.dpd.cdc.gov, 2006). El quiste es ingerido y viaja a través del estómago y del intestino delgado. Los trofozoítos emergen en el íleon terminal (Ravdin, 2000). El enquistamiento ocurre en el intestino delgado donde los trofozoítos producen más quistes, los cuales salen con las heces (Fig. 1). Los quistes pueden sobrevivir por días o semanas fuera del huésped, debido a la protección que les confiere su pared quitinosa a las condiciones del ambiente, hasta comenzar una nueva infección por alguna de las causas mencionadas. Los trofozoítos pueden ser eliminados del huésped en casos de diarrea pero son rápidamente destruidos. En algunos casos los trofozoítos permanecen como comensales en el lumen intestinal y los individuos portadores pueden propagar los quistes. En otros casos los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal produciendo úlceras y colitis asintomática, o llegar a otros órganos como el cerebro o el hígado a través del torrente sanguíneo (Fig. 1) (www.dpd.cdc.gov, 2006).

1.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL TROFOZOÍTO

E. histolytica es un organismo eucarionte, por tanto a diferencia de los procariontes tiene núcleo y puede llegar a tener varios núcleos en una misma célula, también tiene un citoplasma con numerosas vacuolas (Ravdin, 2000) y posee un genoma complejo (Loftus y col., 2005).

La división nuclear se da sin que desaparezca la membrana nuclear. Su interior contiene al cariosoma o endosoma que es una masa esférica de aproximadamente 0.5 μm de diámetro compuesta de material fibrogranular y DNA condensado (Ravdin, 2000). El trofozoíto mide de 20-40 μm es pleomórfico y muy dinámico y se desplaza por medio de la formación de pseudópodos y filópodos,

Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. El humano se infecta al ingerir los quistes maduros en alimentos contaminados. En el intestino delgado pasa de quiste a trofozoíto y posteriormente, migra al intestino grueso. Los trofozoítos habitan el colon donde se dividen y producen quistes que salen con las heces. En la mayoría de los casos los trofozoítos permanecen en la luz intestinal como comensales (portador asintomático); sin embargo, en algunos individuos los trofozoítos pueden llegar a invadir la mucosa intestinal produciendo disentería amibiana (amibiasis intestinal) o entrar por torrente sanguíneo a otros órganos como el hígado hasta el cerebro (www.dpd.cdc.gov, 2006).



- A. Colonización no invasiva
- B. Enfermedad intestinal
- C. Enfermedad extraintestinal

además presenta un uroide en la parte posterior (Ravdin, 2000). El trofozoito carece de estructuras intracelulares fácilmente reconocibles en la mayoría de los eucariontes, por esto se considera un organismo simple. Sin embargo, contiene varias vacuolas citoplásmicas y se han detectado estructuras subcelulares que corresponden al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi, aunque difieren de los eucariontes superiores (Chavez-Munguia y col., 2000; Ghosh y col., 1999). Se ha reportado que estos organelos se encuentran en vesículas periféricas al núcleo y en el citoplasma. La localización del retículo endoplásmico en el trofozoito se determinó por la tinción con DiOC6 (yoduro de 3-3' dihexiloxacarbocianina) y la inmunolocalización de la proteína de choque térmico BiP, además, en extractos totales de amiba se ha detectado actividad de la enzima dolicol fosfato manosa sintetasa (DPMS) la cual en eucariontes participa en la N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico. El aparato de Golgi se localizó por su tinción con C6-NBD-ceramida y la inmunolocalización de la proteína ARF (Villagómez-Castro y col., 1998). El citoplasma es rico en glicógeno y tiene un núcleo esférico que mide de 4-7 μm de diámetro (Ravdin, 2000). En el laboratorio se trabaja casi exclusivamente con la fase trofozoítica, ya que no ha sido posible propagar los quistes en cultivo. Los trofozoitos se cultivan en el medio axénico (sin otros organismos asociados) TYI-S-33 (Diamond y col., 1978).

1.6 MECANISMO AGRESOR DE *E. histolytica*

Dentro de los eventos que se presentan en el proceso patogénico de *E. histolytica*, la adhesión del microorganismo a la célula blanco es un evento importante, ya que le permite a éste resistir la acción de fuerzas mecánicas. La

adhesión no es una propiedad exclusiva de los microorganismos patógenos y por lo tanto, no es un indicador de patogenicidad (Rodríguez, 1990). De hecho, la adhesión de algunos microorganismos no patógenos a las mucosas de los animales tiene un papel importante en el mantenimiento de la flora bacteriana “normal” (Savage y Blumershine, 1974).

La patogenicidad de *E. histolytica* es un fenómeno multifactorial, en el que participan varias moléculas (Orozco y col., 1983) y muchos otros factores que no están identificados aún. Sin embargo, tres factores que contribuyen a la patogenicidad de *E. histolytica* han sido muy estudiados y caracterizados a nivel molecular: i) La adhesión, en la cual están involucradas lectinas, adhesinas y otras proteínas. ii) La citólisis donde participan proteínas que forman poros en las membranas celulares del hospedero y diversas cisteín-proteasas. iii) La fagocitosis, en la cual participan adhesinas, proteínas de tráfico vesicular, proteínas del citoesqueleto y proteínas reguladoras de la organización del citoesqueleto, entre otras (Ravdin, 2000).

1.6.1 ADHESIÓN

Varias proteínas de la superficie celular de *E. histolytica* han sido involucradas en la unión de los trofozoítos con la célula blanco. Una de las moléculas más ampliamente caracterizadas es la lectina inhibible por galactosa y N-acetilgalactosamina, por lo que se conoce como la lectina Gal/Gal-NAc. Esta lectina se purificó originalmente por cromatografía de afinidad a carbohidratos y con anticuerpos monoclonales (mAb). La lectina Gal/GalNAc es un heterodímero de 260-kDa, compuesto por una subunidad grande de 170 kDa y otra de 35 kDa, unidas por puentes bisulfuro, las cuales co-purifican con una

subunidad intermedia de 150 kDa (Petri, Jr. y col., 1987). Los anticuerpos dirigidos contra la subunidad pesada inhiben la adhesión a células CHO, sugiriendo que esta subunidad es importante para la adhesión amibiana (Petri, Jr. y col., 1989).

Las familias de genes que codifican las subunidades de la lectina fueron caracterizadas por electroforesis en campos pulsados. La subunidad pesada de la lectina está codificada por cinco genes y la subunidad ligera también está codificada por una familia de al menos tres genes (Ramakrishnan y col., 1996). Se ha observado que la subunidad ligera está involucrada en la patogénesis del parásito, pues amibas transfectadas con plásmidos que codifican formas truncadas del gen *Igl1*, que codifican una subunidad ligera de 30-35 kDa muestran una disminución en su habilidad para adherirse a células de mamífero, así como para fagocitar eritrocitos (Katz y col., 2002).

Otra molécula caracterizada con propiedades de lectina es la proteína de 220 kDa, la cual fue aislada por electroelución a partir de geles de poliacrilamida, esta proteína es capaz de aglutinar eritrocitos (Rosales-Encina y col., 1987). Se ha sugerido que la lectina de 220 kDa tiene diferentes epítopes que generan distintos patrones de respuesta inmune, pues células de bazo de ratones inmunizados con la proteína completa fueron incapaces de proliferar, no así las células de ratones inmunizados con péptidos de la proteína (Talamás-Rohana y col., 1995).

Otra proteína involucrada en la adhesión de la amiba es la proteína conocida como SREHP o proteína rica en serinas (Stanley, Jr. y col., 1990). El DNA que codifica para esta proteína se ha utilizado como vacuna contra el absceso

hepático amibiano en roedores y se ha reportado que genera altos porcentajes de protección en los animales (Zhang y Stanley, Jr., 1999).

El complejo EhCPADH es otra proteína que puede interactuar con la célula blanco y en conjunto con las anteriores hacer más específico el contacto (García-Rivera y col., 1999). El complejo esta formada por dos subunidades: una con actividad de proteasa (EhCP112) y otra con un motivo de adhesión (EhADH112) (García-Rivera y col., 1999). El motivo de adhesión se ha localizado en los últimos 240 aminoácidos de la proteína EhADH112 (Martinez-Lopez y col., 2004). Este complejo se identificó empleando anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión y mutantes deficientes en adhesión (Arroyo y Orozco, 1987). A través de estudios de microscopía electrónica e inmunofluorescencia indirecta se observó que el complejo se localiza en forma uniforme en la superficie de los trofozoítos amibianos y en la membrana de algunas vacuolas (García-Rivera y col., 1999). Es muy inmunogénica, pues es una de las principales proteínas reconocidas en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo y Orozco, 1987). El complejo EhCPADH también puede participar en la invasión de los tejidos, puesto que la proteína purificada presenta una actividad proteolítica significativa (García-Rivera y col., 1999).

1.6.2 EFECTO CITOLÍTICO

La citólisis del tejido hospedero se inicia después de la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco (Ravdin, 2000). La secreción de cisteína proteasas es un factor importante para determinar el grado de agresividad de los trofozoítos (Keene y col., 1990).

Las proteasas de *E. histolytica* son inhibidas por bloqueadores específicos para las cisteína proteasas y no por los inhibidores de las serina proteasas por lo que son clasificadas como cisteína-tiol proteasas (Que y Reed, 2000).

Uno de los genes del complejo EhCPADH, codifica para una cisteína proteasa (*Ehcp112*), que es capaz de degradar colágena, fibronectina y hemoglobina, EhCP112 tiene un rango amplio de actividad en pH y temperatura (Ocádiz y col., 2005). El otro gen (*Ehadh112*) codifica para una proteína que contiene un dominio de adhesión entre los aminoácidos 422 y 687.

La citólisis de *E. histolytica* también puede estar mediada por proteínas que forman poros en las células blanco y que son llamadas amebaporos (Young y col., 1982). Estas proteínas establecen contacto con la célula blanco e inmediatamente inician eventos de lisis celular. Existen tres isoformas de amebaporos: A, B y C, las cuales están presentes en los trofozoítos en una proporción 35:10:1, respectivamente (Leippe y col., 1994). La inhibición de la expresión de los genes del amebaporo, disminuyen significativamente la patogenicidad de amibas de cepa HM-1:IMSS transfectadas con un plásmido que contenía el gen del amebaporo (isoforma A) en antisentido (Bracha y col., 1999).

1.6.3 FAGOCITOSIS

La fagocitosis también juega un papel importante en la patogenia de *E. histolytica*, pues mutantes deficientes en fagocitosis también son deficientes en la producción de abscesos hepáticos en modelos animales (Orozco y col., 1983; Rodríguez y Orozco, 1986). Un modelo propuesto para el mecanismo de fagocitosis en *E. histolytica* (Orozco y col., 1988) postula que los trofozoítos son

atraídos quimiotácticamente hasta las células blanco. Posteriormente, se realiza la unión de los trofozoítos amibianos a la superficie de la célula blanco, mecanismo en el que intervienen las adhesinas localizadas en la superficie de la amiba y receptores presentes en la superficie de las células blanco. Una vez adheridas, la célula blanco y las amibas sufren una redistribución de receptores y ligandos presentes en la superficie, lo que produce una señalización interna en el trofozoíto que permite la liberación de enzimas que lisan a las células blanco. Más tarde, el trofozoíto emite pseudópodos que envuelven a las células blanco y las internalizan en vacuolas fagocíticas, que se fusionan después con los lisosomas para formar los fagosomas, donde las enzimas digestivas actúan sobre el material fagocitado.

Se sabe que el complejo EhCPADH participa también en la fagocitosis, ya que se adhiere a la célula blanco y se introduce con ellas durante el proceso de ingestión, primero a través del canal fagocítico y después en las vacuolas fagocíticas (García-Rivera y col., 1999). Finalmente, al término de la digestión de la célula blanco, la adhesina vuelve a la membrana plasmática (García-Rivera y col., 1999). También se ha descrito que en la fagocitosis de *E. histolytica* participan moléculas del citoesqueleto (Bailey y col., 1992; Guillén, 1996), moléculas reguladoras de la organización del citoesqueleto (Guillén, 1996) y probablemente moléculas que regulan el tráfico vesicular, como EhRabB, la cual se ha sugerido participa en la regulación del proceso de endocitosis (Rodríguez y col., 2000), EhRab7, que codifica para una proteína de 24.5 kDa y que se ha propuesto esta unida a endosomas tempranos (Welter y col., 2002) y EhRab5, que fue relacionada en la fagocitosis de eritrocitos y en el empaquetamiento de hidrolasas lisosomales (Saito-Nakano y col., 2004).

Los trofozoítos de *E. histolytica* son fagocitos profesionales con una gran capacidad de internalizar variedad de materiales particulados e incluso células como bacterias, células epiteliales y glóbulos rojos (Rabinovitch, 1995).

1.7 ERITROFAGOCITOSIS

Desde hace más de cien años Löscher demostró que las amibas encontradas en las muestras de humanos con disentería contenían eritrocitos y precisamente la eritrofagocitosis ha sido tradicionalmente considerado como uno de los criterios más importantes en la identificación de trofozoítos de *E. histolytica* en el laboratorio (Voigt y Guillen, 1999). Estudios en donde se evaluó la capacidad de fagocitosis de diferentes cepas de *E. histolytica*, demostraron que todas son capaces fagocitar, sin embargo, las cepas virulentas tienen una velocidad mucho mayor de eritrofagocitosis, con respecto a las cepas no virulentas (Trissl y col., 1978).

El mecanismo por el cual este protozoario interactúa con los eritrocitos aún es poco claro, pero, al igual que sucede con otros tipos de células, requiere de la adhesión como un proceso activo, pues la fijación del eritrocito con glutaraldehído disminuye ligeramente el proceso en los trofozoítos (Lopez-Revilla y Cano-Mancera, 1982). La adhesión de los eritrocitos es más eficiente a 37°C, a pH 7.3 y en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} , y no es dependiente del grupo sanguíneo (Lopez-Revilla y Cano-Mancera, 1982).

En la eritrofagocitosis también se ha observado la participación de proteínas tipo cinasas. Pues, inhibidores de este tipo de proteínas como la estaurosporina, genisteína y la Wortmanina, disminuyen de un 90 a un 95% la eritrofagocitosis. Así, se ha sugerido estas proteínas son importantes en la

transducción de señales durante el proceso de eritrofagocitosis y por lo tanto, también en la virulencia de este parásito (Batista y de Souza, 2004).

E. histolytica modifica la superficie de los eritrocitos antes de la fagocitosis. Después que la amiba adhiere a los eritrocitos, los rodea con sus pseudópodos y los creta, debido a la distorsión de la superficie del eritrocito. Durante este fenómeno se encontró la exposición de una fosfatidilserina en la membrana de los eritrocitos (Boettner y col., 2005). Esta proteína se ha sugerido se encuentra relacionada con la fagocitosis, pues en macrófagos dispara la fagocitosis de células apoptóticas y de eritrocitos viejos. Para probar si existe un receptor de esta proteína en la amiba se hicieron ensayos en donde a los eritrocitos se les agregó 2.5 mM de calcio para que expusieran la fosfatidilserina en su membrana y posteriormente se les agregó D-galactosa. Entonces, se midió el índice de fagocitosis de esos eritrocitos y se observó que la fagocitosis era 23% más eficiente cuando los eritrocitos exponen la fosfatidil serina que cuando no lo hacen o cuando no tuvieron el tratamiento con calcio (Boettner y col., 2005). De esta manera, los autores sugieren que además de la lectina Gal/Gal-NAc, deben existir otros receptores utilizados para la adhesión y posterior fagocitosis, entre éstos el de la fosfatidilserina (Boettner y col., 2005).

Otro proceso poco entendido es la digestión de los eritrocitos por los trofozoíto. La medición de la actividad digestiva de este protozoario se ha observado por microcopia electrónica y por espectroscopía de rayos X (Mora-Galindo y col., 2000). La microscopía permitió observar diferentes estructuras de la amiba entre ellas el núcleo y numerosas vacuolas y vesículas, generalmente vacías cuando las amibas no tenían contacto con eritrocitos. Sin embargo, cuando estaban en contacto con ellos, se podían observar eritrocitos dentro de la

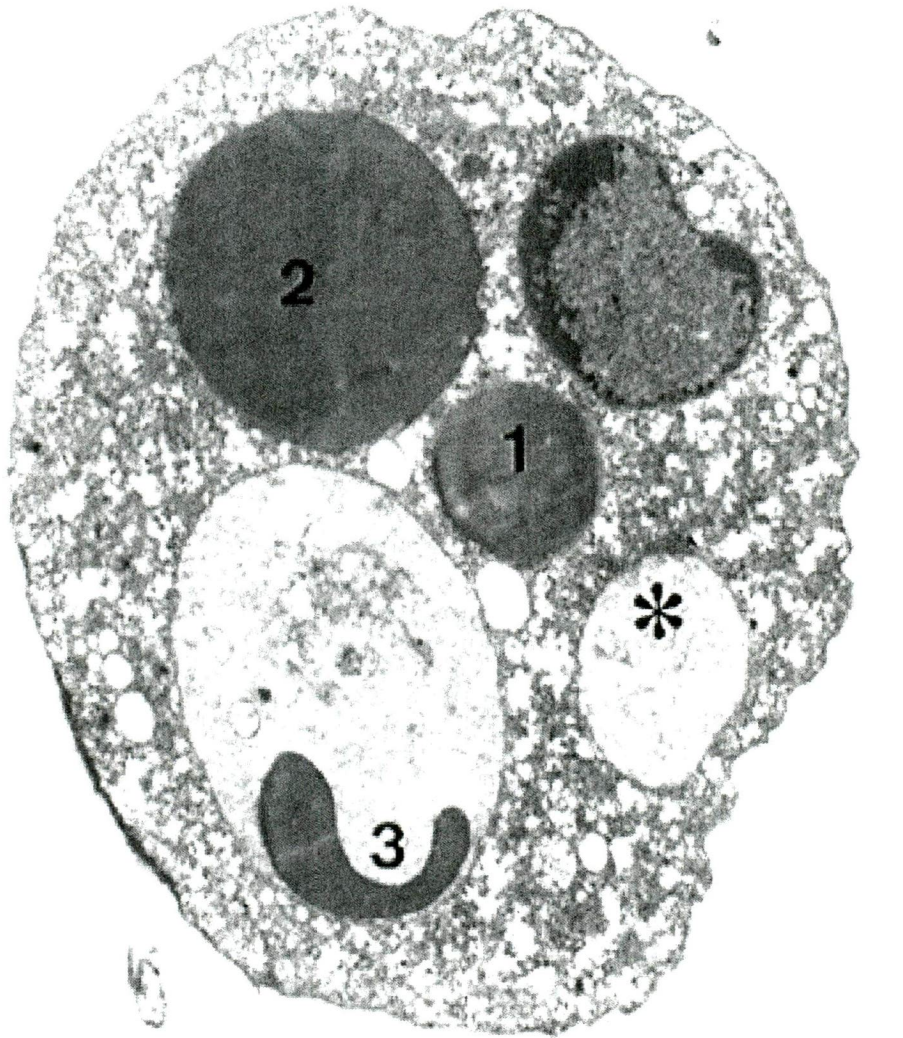
matriz citoplasmática y rodeados por membranas de vacuolas (Fig. 2), hasta las 1.5 h después del contacto inicial con los eritrocitos posterior a este tiempo sólo se observó una gran cantidad de material amorfo. Después de las tres horas sólo se observaron en la amiba algunas vacuolas con cantidades escasas de este material amorfo y vacuolas vacías. Esto sugiere que en este tiempo se da la principal actividad digestiva de los eritrocitos. Sin embargo, a tiempos posteriores como 6 y 12 horas todavía se encontraron algunas vacuolas que contenían restos de membranas de eritrocitos (Mora-Galindo y col., 2004).

1.8 FAGOCITOSIS EN ORGANISMOS SUPERIORES

La fagocitosis fue descrita por primera vez por Elías Metschnikoff hace más de 100 años como la habilidad de las células eucariotas de internalizar células o partículas de más de una micra de diámetro (Voigt y Guillen, 1999). Casi todas las células son capaces de ingerir material particulado o soluble desde el ambiente que lo rodea mediante la endocitosis o la fagocitosis (Brown, 1995). La fagocitosis puede ser distinguida de la endocitosis por su sensibilidad a la temperatura y el marcado requerimiento del citoesqueleto (Voigt y Guillen, 1999). La fagocitosis en organismos superiores funciona como un mecanismo de defensa contra algunos patógenos (Desjardins y col., 1994). En este proceso las células internalizan largas partículas que son degradadas por enzimas lisosomales (Desjardins y col., 1994). Para fagocitos profesionales como los macrófagos, este es un proceso iniciado por la unión de una partícula a receptores de la superficie celular, que disparan la reorganización de la membrana citoplasmática y diversos elementos del citoesqueleto, que termina

Figura 2. Microscopia electrónica de transmisión de trofozoítos de *E. histolytica* después de cinco minutos de eritrofagocitosis.

Se pueden observar vacuolas con diferentes contenidos dentro de la amiba. Las vacuolas más comunes son redondas, muy compactas y con un solo eritrocito (1). También se observan vacuolas más grandes con varios eritrocitos aglomerados (2). En otros casos se observan eritrocitos parcialmente unidos al interior de las vacuolas, con abundante material amorfo y membranas en vacuolas muy largas (3). En otras vacuolas, se observó abundante material amorfo y algunas membranas (*). Tomado de Mora Galindo y col., 2004.



5 μ m

en el engullimiento de la partícula y la formación de un fagosoma (Garin y col., 2001). Se han considerado dos mecanismos para la fagocitosis de las partículas, uno es el modelo del cierre y otro el del gatillo (Swanson y Baer, 1995). El modelo del cierre está soportado por estudios en macrófagos que fagocitaron eritrocitos y bacterias mediante el receptor Fc gamma y el receptor 3 del complemento (Swanson y Baer, 1995). De acuerdo con este modelo, la ingestión ocurre por el envolvimiento secuencial con la membrana del fagocito sobre la superficie de la partícula (Swanson y Baer, 1995). El modelo del gatillo propone que la unión localizada inicialmente es suficiente para la formación del pseudópodo y la toma de la partícula. El modelo del gatillo ha sido observado durante la fagocitosis de *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri* por macrófagos (Swanson y Baer, 1995). Por otro lado, en *Legionella pneumophila* se ha reportado otra forma de fagocitosis que se ha denominado fagocitosis por enrollamiento, este proceso consiste en una extensión celular unilateral que se enrolla sobre si misma y envuelve a la bacteria en múltiples capas (Horwitz, 1984). Existen reportes de otros patógenos que inducen este tipo de fagocitosis como son *Leshmania ssp.* y *Borrellia burgdorferi* (Rittig y col., 1998).

También se ha observado que los macrófagos de la línea celular L929sAhFas utilizan estos dos mecanismos para internalizar células necróticas y células apoptóticas, pues al utilizar marcadores de macropinocitosis, éstos se localizaron sólo con el material necrótico y no con las células apoptóticas, mientras que, cuando se utilizó un inhibidor del citoesqueleto (Wortmanina) se redujo sólo la captación de células apoptóticas, pero se mantuvo el engullimiento de células necróticas (Krysko y col., 2006). Los fagosomas son organelos clave para las funciones de los macrófagos, y las propiedades

funcionales de los fagosomas son adquiridas a través de la interacción con organelos endovacuolares (Garin y col., 2001). Los fagosomas son organelos derivados de la membrana plasmática por la internalización de material particulado (Desjardins y col., 1997). Aunque su composición es similar a la de la membrana plasmática, los fagosomas pierden y adquieren gradualmente proteínas llevando a la biogénesis de los fagolisosomas (Desjardins y col., 1997). De hecho, durante la biogénesis de los fagolisosomas, los fagosomas intersectan la vía biosintética y se fusionan secuencialmente con endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas (Pitt y col., 1992).

El proceso de fusión es regulado por GTPasas y otras proteínas que son también involucradas en el proceso de fusión en la vía endocítica (Tjelle y col., 2000). Durante estas interacciones, los fagosomas adquieren varias moléculas requeridas para actividades microbicidas. Estas incluyen ATPasas bombeadoras de protones involucradas en la acidificación del fagosoma (Mellman, 1992) y una variedad de hidrolasas responsables para la digestión del contenido en los fagosomas (Claus y col., 1998). Aunque las hidrolasas están presentes en varias poblaciones de organelos endocíticos la mayoría de estas moléculas son almacenadas con los endosomas tardíos y los lisosomas (Duclos y col., 2000). Así, la fusión de los fagosomas con estos organelos es fundamental para células fagocíticas como los macrófagos, para controlar la diseminación de infecciones (Duclos y col., 2000). Se creía primero que la biogénesis de los fagolisosomas se daba mediante la fusión completa de los fagosomas con los lisosomas (Rabinowitz y col., 1992). Sin embargo, recientemente se ha revelado que los fagosomas se encuentran regulados por una serie de eventos de fusión, primero con los endosomas tempranos y

tardíos, para su posterior fusión con los lisosomas (Desjardins y col., 1994; Desjardins y col., 1997). A pesar de esta actividad de fusión dinámica, los fagosomas y endosomas mantienen un tamaño estable a través del tiempo (Desjardins y col., 1994).

Una hipótesis de cómo se fusionan los fagosomas con los organelos endocíticos es que éstos tienen repetidos eventos de fusión transitorios y a este proceso se le ha denominado “kiss and run” (Desjardins, 1995).

Para entender las funciones de los fagosomas se han identificado de manera sistemática las proteínas que los forman. Estos estudios se comenzaron básicamente mediante el uso de perlas de látex que interactuaron con macrófagos de ratón (Garin y col., 2001). Los fagosomas formados se separaron mediante el uso de gradientes discontinuos de sacarosa y posteriormente las proteínas encontradas en estos fagosomas fueron analizadas por electroforesis en geles de doble dimensión, ensayos de inmunocitoquímica y ensayos bioquímicos con el fin de caracterizar las proteínas que recubren perlas magnéticas (Desjardins y col., 1994).

En estudios posteriores y con estrategias de proteómica, estas proteínas se han estudiado e identificado de manera sistemática con el uso de técnicas de identificación de proteínas mediante su huella peptídica o fragmentación de péptidos y la obtención de una secuencia parcial de los aminoácidos de estas proteínas (Garin y col., 2001). Con esta última estrategia se identificaron un gran número de proteínas (>140) asociadas con los fagosomas, productos de la internalización de las perlas de látex, de las cuales algunas ya habían sido previamente relacionadas con estos fagosomas como algunas subunidades de ATPasas bombeadoras de protones. Sin embargo, algunas otras proteínas no

habían sido previamente descritas como la GTPasa 14, la galectina 3 y la proteína Alix. Algunas otras proteínas no lograron ser comparadas con las proteínas contenidas en las bases de datos lo cual sugiere que estas proteínas aún no han sido descritas (Garin y col., 2001).

La caracterización sistemática de las proteínas que forman los fagosomas ha permitido aclarar sus funciones y conocer qué proteínas o grupos de proteínas están involucradas en la regulación de estas funciones (Fig. 3) y al mismo tiempo tener una visión mas clara del mecanismo molecular que gobierna la función de los fagosomas y la biogénesis de los fagolisosomas (Garin y col., 2001).

1.9 LA PROTEÓMICA DE LA FAGOCITOSIS EN *E. histolytica*

La fagocitosis de células humanas por *E. histolytica* es el sello característico de la amibiasis. La importancia de la fagocitosis en la amibiasis está subrayada por la presencia de eritrocitos en los trofozoítos, la cual es el mejor marcador de amibiasis invasiva en el intestino (Marion y col., 2005).

Mientras el mecanismo molecular de la fagocitosis en fagocitos profesionales como los macrófagos se ha estudiado extensivamente a nivel molecular, en *E. histolytica* se sabe muy poco (Okada y Nozaki, 2006). La reciente secuenciación del genoma de la amiba abrió el camino para estudiar la virulencia del parásito y los procesos involucrados en la fagocitosis de las células humanas (Marion y Guillen, 2006). Recientes estudios de proteómica de las proteínas de fagosomaless (Okada y col., 2005) o proteínas de unidas a la

Figura 3. El fagosoma virtual en macrófagos de ratón. Las principales proteínas identificadas en el trabajo de Garin, (2001) son mostradas como potenciales proteínas que interactúan con los fagosomas. Este amplio grupo de datos dio nuevas indicaciones dentro del mecanismo molecular que gobiernan las funciones de los fagosomas, sus funciones y la biogénesis de los fagolisosomas (Tomado y modificado de Garin y col., 2001).

lectina inhibible por N-acetilglucosamina (McCoy y Mann, 2005), descubrieron un número de proteínas involucradas en el proceso de biogénesis de los fagosomas (Figura 4), así como proteínas involucradas en los primeros pasos del proceso fagocitosis (Marion y col., 2005).

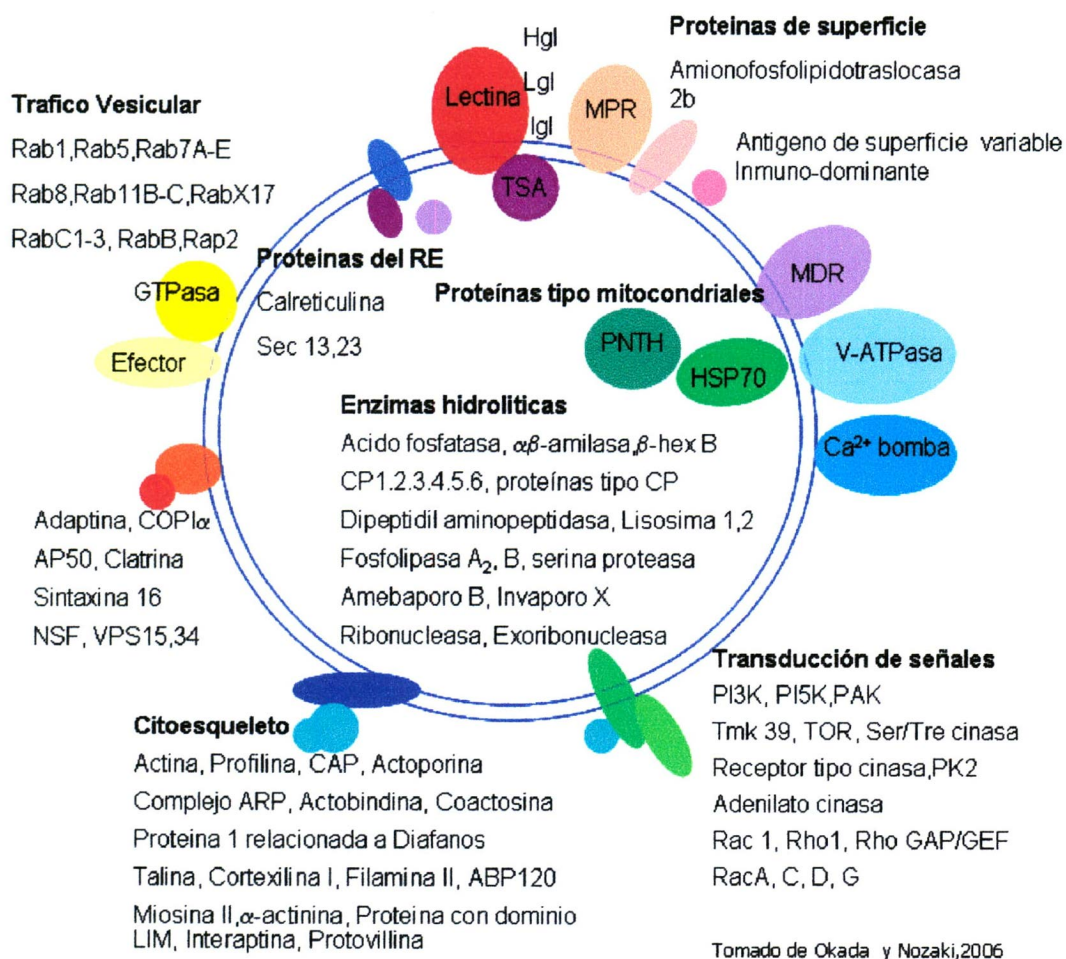
Aunque ya se conocen varias proteínas que están relacionadas con el proceso de la fagocitosis, se desconoce otro gran número de moléculas y sus cinéticas de asociación y disociación durante la biogénesis de los fagosomas (Okada y col., 2005). Para aclarar qué moléculas y mecanismos están involucrados en la fagocitosis de este parásito, e identificar a las proteínas asociadas con los fagosomas, se modificó el protocolo de aislamiento de fagosomas y la identificación de proteínas se efectuó mediante espectrometría de masas previamente utilizada en macrófagos de ratón (Garin y col., 2001).

1.10 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ENSAYOS DE LIGANDO

Rodríguez y col. en 1989, mediante ensayos de ligando analizaron las interacciones *E. histolytica*-eritrocitos, utilizando eritrocitos humanos como partículas acarreadoras de las proteínas de *E. histolytica* que interactúan con la célula. Para ubicar estas proteínas, se mezclaron 1×10^6 trofozoítos/ml en el medio de cultivo TYI-S-33 con 1×10^8 eritrocitos fijados con glutaraldehído por 20 minutos a temperatura ambiente en presencia de BSA para evitar interacciones inespecíficas. Después de la interacción, los trofozoítos se lisaron y los eritrocitos se lavaron con PBS para obtener únicamente las proteínas unidas específicamente a los eritrocitos. Los eritrocitos fijados y las proteínas amibianas adheridas a ellos se hirvieron por 3 minutos, para separarlas de la

superficie. Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes, que posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa y reveladas con un suero dirigido contra las proteínas totales de los trofozoítos. A partir de este ensayo se detectaron diferentes proteínas amibianas que se unen a la superficie de los eritrocitos con los siguientes pesos moleculares: 210, 160, 112, 90, 70, 50 y 24 kDa. Esto sugirió que estas proteínas pueden estar involucradas en la relación del parásito con el eritrocito. Sin embargo, sólo la naturaleza de la proteína de 112 kDa fue identificada mediante anticuerpos específicos, mientras que el resto de las proteínas fueron descritas como bandas en los geles. De esta manera, es importante conocer de qué proteínas se trata y cuáles son sus funciones, por lo que en esta tesis estudiamos algunas de estas proteínas.

Figura 4. El fagosoma virtual de *E. histolytica*. La figura muestra las principales proteínas identificadas en tres diferentes trabajos realizados por Okada 2005, McCoy y Mann 2005, y Marion 2005. En cada uno de estos trabajos, mediante estrategias de proteómica como espectrometría de masas en tandem, se identificaron diferentes tipos de proteínas que están involucradas en la actividad del citoesqueleto, transducción de señales, endocitosis, actividad lítica y proteínas presentes en la superficie del parásito. Tomado de Okada y col, 2006.



II. JUSTIFICACIÓN

Dado que el primer paso de *E. histolytica* en la invasión del hospedero es la adhesión a las células, es de suma importancia saber qué proteínas del parásito son las que permiten esta primer interacción, de aquí que el interés en este trabajo sea identificar las moléculas de *E. histolytica* que están involucradas en la unión e internalización de las células blanco. Un claro conocimiento de estas proteínas nos permitirá tener una mejor comprensión de la biología del parásito, del proceso de eritrofagocitosis y del mecanismo de acción contra el hospedero.

III. HIPÓTESIS

Si *E. histolytica* es un organismo descrito como un fagocito profesional que requiere primero unirse a su célula blanco para posteriormente fagocitarla, entonces este protozooario debe poseer varias moléculas involucradas en su adhesión a las células del hospedero y en el tráfico vesicular del material fagocitado.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar proteínas de *E. histolytica* que interactúan con eritrocitos humanos durante la eritrofagocitosis.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Aislar las proteínas de *E. histolytica* que interaccionan con eritrocitos humanos.
- 2.-Identificar algunas de esas proteínas mediante ensayos de Western Blot con anticuerpos específicos.
- 3.-Demostrar la interacción *in situ* de alguna de las proteínas identificadas, por inmunofluorescencia y microscopia confocal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*

Trofozoítos de la clona A (cepa HM1:IMSS) (Orozco E, 1981) se cultivaron axénicamente a 37°C en tubos de 16 x 25 mm en medio TYI-S-33 (Diamond y col., 1978) suplementado con suero bovino 16.6% (Biofluids, EUA), previamente inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos, mezcla de vitaminas de Diamond 3% (Special Diamond Vitamin Mixture, NortAmerican Biologicals), penicilina 0.25 µl/ml (Lakeside, México) y estreptomycin 35 µg/ml (Lakeside, México). Para realizar los experimentos, los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron en un baño de agua-hielo durante 10-15 min y se agitaron suavemente para despegar a los trofozoítos de las paredes del recipiente. Las células se cosecharon por centrifugación a 500 x g durante 5 min a 4°C.

5.2 Obtención y fijación de eritrocitos humanos

Eritrocitos humanos de cualquiera de los grupos sanguíneos A, B, O, se obtuvieron por punción venosa, en un volumen aproximado de 3 ml de sangre humana a los cuales se les agregaron 6 ml de solución Alsever (0.275 g ácido cítrico, 4 g citrato de sodio, 2.1 g cloruro de sodio, 10.25 g dextrosa pH 6.1) como anticoagulante. Las células se centrifugaron a 967 x g por 5 min, la pastilla se lavó tres veces con solución de Alsever.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los eritrocitos se utilizaron sin fijar,

mientras que para los ensayos de interacción con trofozoítos, los eritrocitos se fijaron al incubarlos por 1 h a 37° C con una solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS. Una vez fijados, los eritrocitos se lavaron tres veces y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Por último se almacenaron a 4°C, hasta su uso.

5.3 Eritrofagocitosis

La interacción de los parásitos con eritrocitos se hizo en una proporción 1:160, diluido volumen a volumen. A esta interacción se le agregó BSA (1 mg/ml). Entonces, se permitió la interacción por 20 minutos a 37°C, posteriormente se le agregaron 2/10 del volumen de solución de lisis (PBS, 1% de Nonidet P-40 (NP40), 100 mM de PHMB y 100 mM de Tris-HCl) más una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 0.5 mM, benzamidina 2 mM, aprotinina A 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, E-64 10 µg/ml) y se incubó 10 minutos a 37°C. Los eritrocitos se recuperaron al centrifugar a 967 x g por 5 minutos, los *debris* celulares se eliminaron con solución de lavado (PBS y 0.1% de NP40) en presencia de inhibidores de proteasas. Por último, los eritrocitos se resuspendieron en un volumen con solución amortiguadora para proteínas (Laemmli, 1970).

5.4 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*

Para obtener las proteínas totales de *E. histolytica*, los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron en un baño de agua-hielo durante 10-

15 min y se agitaron suavemente para despegarlos de las paredes de la caja de cultivo. Se cosecharon por centrifugación a 500 x *g* durante 5 min a 4° C. A la pastilla se le agregó 1 ml de PHMB (100 mM) por cada 1X10⁶ trofozoítos, la pastilla se resuspendió y se congeló en nitrógeno líquido, ésta se descongeló paulatinamente por ciclos de vórtex-hielo de 20 segundos. Por último, a la pastilla descongelada se le agregó un volumen de solución amortiguadora para proteínas (50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol y 10% glicerol) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó de la siguiente manera: el gel separador se preparó con acrilamida al 10, 15 ó 20 %, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS al 0.1%. El gel se polimerizó agregando 0.05% de persulfato de amonio y 0.003% de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 5%, Bis-acrilamida 0.36%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS al 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.005%. Para correr el gel se utilizó una solución amortiguadora de Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, 0.1 % de SDS pH 8.3 y se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 100 voltios durante 1.5 h.

5.6 Tinción de proteínas con nitrato de plata

Las proteínas separadas en la matriz de poliacrilamida se incubaron con dos soluciones para fijar las proteínas, la primera por un tiempo de 15 min (etanol;

ácido acético; agua; en una proporción 3:1:6, respectivamente) y la segunda por 30 min (glutaraldehído 0.5%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1%, etanol 30%, NaCH_3COO 0.4%). Posteriormente, la matriz se lavó con agua desionizada y se tiñó por 30 minutos (AgNO_3 0.1%, metanol 3% y formaldehído 25 μl). Nuevamente se lavó la matriz y se reveló por 15 minutos (Na_2CO_3 2.5% y 40 μl de formaldehído). La reacción de revelado se detuvo agregando una solución de ácido acético al 5%.

5.7 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Supported nitrocelulose-1, Gibco, BRL). Para esto, los geles, las membranas de nitrocelulosa y los papeles Whatman se incubaron por 5 minutos en solución de transferencia de proteínas (20% metanol, 10% Tris-Glicina). Posteriormente, se armó un dispositivo que permite a las proteínas migrar del polo negativo al positivo con la aplicación de voltaje, de esta manera pasan de la matriz hacia la membrana de nitrocelulosa. Para esto, primero se colocó una fibra, papel Whatman y la matriz de poliacrilamida, a continuación la membrana de nitrocelulosa, otro papel Whatman y por último otra fibra. Una vez armado el dispositivo se sumergió en solución de transferencia de proteínas y se corrió entre 300 y 400 mA a 4°C por 1.5 h. Por último, la presencia de las proteínas en la membrana se confirmó con tinción por 3 minutos con rojo Ponceau 100 mg rojo (Ponceau Sigma-Aldrich), ácido acético 1 ml y H_2O cbp 100 ml). Después las membranas se lavaron con agua bidestilada para retirar el colorante y posteriormente se realizaron los ensayos

de Western blot.

5.8 Western blot de proteínas

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, éstas se incubaron durante toda la noche con PBS y 2.5% de leche descremada. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario diluido en PBS y leche descremada al 2.5% por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación constante. Después las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se les agregó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-IgG de ratón o conejo según fuera el caso) diluido en PBS y leche descremada al 2.5 % por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación constante. Por último, las membranas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech, USA), incubando la membrana 5 minutos y para detectar la señal las membranas se expusieron a placas de autorradiografía.

5.9 Inmunolocalización de proteínas

La microscopía de inmunofluorescencia indirecta fue llevada a cabo de acuerdo a la técnica descrita previamente (Ausubel y col., 1994). Los trofozoítos se cosecharon por centrifugación a 500 x *g* durante 5 min a 4°C, se cuantificaron y se agregaron 1X10⁶ trofozoítos en placas de seis pozos (Corning). Los trofozoítos amibianos se colocaron sobre cubreobjetos estériles dentro de los

pozos y se incubaron por 2 horas a 37°C hasta que se adhirieron. Posteriormente, se hizo la interacción amiba-eritrocito en una relación 1:10 durante 20 minutos a 37°C. En seguida el medio se retiró y las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS pH 7.4 a 37°C, durante 45 minutos y se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% durante 45 minutos. Se lavó nuevamente con PBS. Para contrastar los eritrocitos, éstos fueron teñidos mediante la incubación con una solución de diaminobenzidina (1.5 ml de Tris 50 mM pH 9.5, 2.5 µl de H₂O₂ y 30 µl diaminobenzidina a 37 mg por cada 700 µl de propanodiol) por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con PBS. Enseguida, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las preparaciones se bloquearon con una solución de BSA al 1% a 37°C durante 40 minutos. Una vez bloqueadas, las células se incubaron con anticuerpos primarios los cuales fueron: anticuerpos monoclonales contra el complejo EhCPADH aplicados de manera directa; anticuerpos policlonales contra la subunidad B de la ATPasa vacuolar hechos en ratón, en una dilución 1:80; anticuerpos policlonales contra EhGPCR-1 hechos en ratón, en una dilución 1:500. Todos los anticuerpos primarios fueron incubados a 37°C por 1 hora o a 4°C durante toda la noche. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-ratón acoplados a fluoresceína (Zymed) en una dilución 1:100 (PBS y BSA 1%), éste se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de yoduro de propidio (10 µg/ml) por 5 minutos, se lavó nuevamente con PBS y por último con agua estéril. Después del último lavado se montaron los cubreobjetos con las células en un portaobjetos con vectashield al 50 %.

VI. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de proteínas amibianas que interactúan con eritrocitos.

Experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio por el Dr. Mario A. Rodríguez permitieron detectar por experimentos de ligando la presencia de varias proteínas de *E. histolytica* que interaccionan con los glóbulos rojos durante la eritrofagocitosis (Rodríguez y col., 1989). Sin embargo, en esos experimentos sólo se logró precisar la identidad de la proteína de 124 kDa que corresponde al complejo EhCPADH porque se tenían los anticuerpos contra este complejo. La mayoría de las bandas no fueron identificadas ya que no se contaba con las herramientas biológicas para hacerlo. Por lo tanto, el interés de este trabajo fue identificar otras moléculas de los trofozoítos amibianos involucradas en la unión e internalización de los eritrocitos. El conocimiento de estas proteínas nos permitirá comprender mejor el mecanismo de patogenicidad de la amiba.

La estrategia que utilizamos fue realizar ensayos de ligando seguidos por Western blot. Primeramente incubamos 10^6 trofozoítos con 1.6×10^8 eritrocitos fijados con glutaraldehído por 20 minutos a 37°C y posteriormente lisamos los trofozoítos con el detergente NP-40. Una vez hecha la lisis de los trofozoítos, los eritrocitos fijados y por lo tanto intactos, se utilizaron como acarreadores de las proteínas unidas a ellos. Las proteínas que se unieron a los eritrocitos se analizaron en geles de poliacrilamida que teñimos con plata y/o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para identificar las bandas con anticuerpos. Después de 20 minutos de incubación con los eritrocitos, los trofozoítos habían ingerido aproximadamente un promedio de 14 eritrocitos por amiba.

Para lograr separar la mayoría de las proteínas de la amiba unidas a los eritrocitos, se realizaron geles de diferente concentración de poliacrilamida (10%, 15% y 20%) (Fig. 5 panel: B, C y D). El patrón obtenido en estos ensayos se comparó con el obtenido a partir de extractos totales de trofozoítos (Fig.5, panel A). En todos los casos se determinó el peso molecular de las proteínas mediante regresión lineal. En estos ensayos se utilizaron como controles por un lado, trofozoítos de la clona A que no estuvieron en contacto con eritrocitos fijados y que por lo tanto, no tendrían un vehículo acarreador de las proteínas del parásito. A estas células se les dio el mismo tratamiento que a las que sí tenían vehículo acarreador (Fig. 5, paneles B, C y D, carril 2). Por otro lado, se utilizaron sólo eritrocitos fijados (Fig. 5, paneles B, C y D, carril 3). En los geles de poliacrilamida al 10 % visualizamos al menos seis bandas con masas moleculares de 217, 79, 54, 47, 40 y 35 kDa y una banda más con un peso menor de 35 kDa (Fig. 5, panel B, carril 1) que también estuvo presente en el control de eritrocitos por lo que se consideró como proteína contaminante (Fig. 5, panel B, carril 3). Con el objetivo de separar mejor las bandas menores a los 35 kDa se aumentó la concentración de la poliacrilamida en el gel al 15%. En este caso logramos visualizar seis bandas con masas moleculares de 211, 76, 52, 43, 24 y 22 kDa (Fig. 5, panel C, carril 1). Además de éstas se observaron dos bandas con pesos de 33 y 15 kDa que también se observaron en el control de eritrocitos, por lo que las consideramos como contaminantes de las proteínas del eritrocito (Fig. 5, panel B, C, carril 2). Al aumentar nuevamente la concentración de poliacrilamida al 20 % sólo logramos resolver otras dos bandas extra con pesos de 16 y 18 kDa (Fig. 5, panel D, carril1).

La ausencia de proteínas en el control de trofozoítos en los tres ensayos nos

dice que las proteínas aisladas en el carril número 1 son específicas de la interacción eritrocito-amiba (Fig. 5, paneles B, C y D, carril 2).

La comparación de las bandas obtenidas en geles con diferentes concentraciones de poliacrilamida permitió observar que algunas de las bandas cambian ligeramente de peso, por lo tanto, en la Tabla 1 el peso molecular propuesto para las bandas identificadas está dentro del rango de los pesos obtenidos en los tres ensayos. En total identificamos diez bandas en los geles de poliacrilamida (Tabla 1, columna izquierda). También comparamos los pesos de las proteínas obtenidas en este trabajo con los reportados por Rodríguez y col. (1989). En general, hay similitud entre ellos, aunque también hay algunas variaciones probablemente debidas a diferencias experimentales. Por ejemplo, la proteína de 24 kDa fue identificada por nosotros y por Rodríguez y col. 1989, pero las proteínas de 217 kDa y 211 kDa, podrían corresponder a la proteína que Rodríguez y col., 1989 reportaron con un peso molecular de 210 kDa. Las proteínas de 79 kDa y 76 kDa, podrían corresponder a la proteína de 70 kDa reportada por Rodríguez y col. (1989). Las proteínas de 160, 124 y 90 kDa no fueron detectadas en nuestros ensayos, a pesar que la tinción con nitrato de plata permite resolver cantidades del orden de un nanogramo de proteína como una banda sencilla (Sambrook y col., 1989). El otro caso de contraste entre este trabajo y el de Rodríguez y col. (1989) son las bandas de 18 y 22 kDa, que sólo fueron observadas en el presente trabajo. Esto se debe al uso de diferentes concentraciones de poliacrilamida, que nos permitió resolver de una manera más clara la zona donde se encuentran proteínas de menor tamaño.

Figura 5. Aislamiento de proteínas que interactúan con eritrocitos

humanos. Trofozoítos de la clona A se incubaron durante 20 minutos a 37°C con eritrocitos, previamente fijados con glutaraldehído al 2.5 %, . Los trofozoítos se lisaron con NP-40 al 1%, 100 mM de Tris HCl y 100 mM de PHMB. Los eritrocitos resuspendidos se lavaron varias veces y las proteínas aisladas se separaron por electroforesis. Se visualizaron por tinción con plata. De izquierda a derecha: geles de diferente concentración de poliacrilamida 10% (B),15% (C) y 20% (D), respectivamente. Del lado izquierdo de cada panel, los pesos calculados por regresión lineal para cada banda

Carril 1.-Proteínas aisladas después de la interacción de los trofozoítos con los eritrocitos.

Carril 2.-Proteínas de los trofozoítos (Control negativo).

Carril 3.-Proteínas de eritrocitos que no interaccionaron con los trofozoítos (Control negativo).

M.-Marcadores de peso molecular.

Panel A. Proteínas totales de trofozoítos de la clona A.

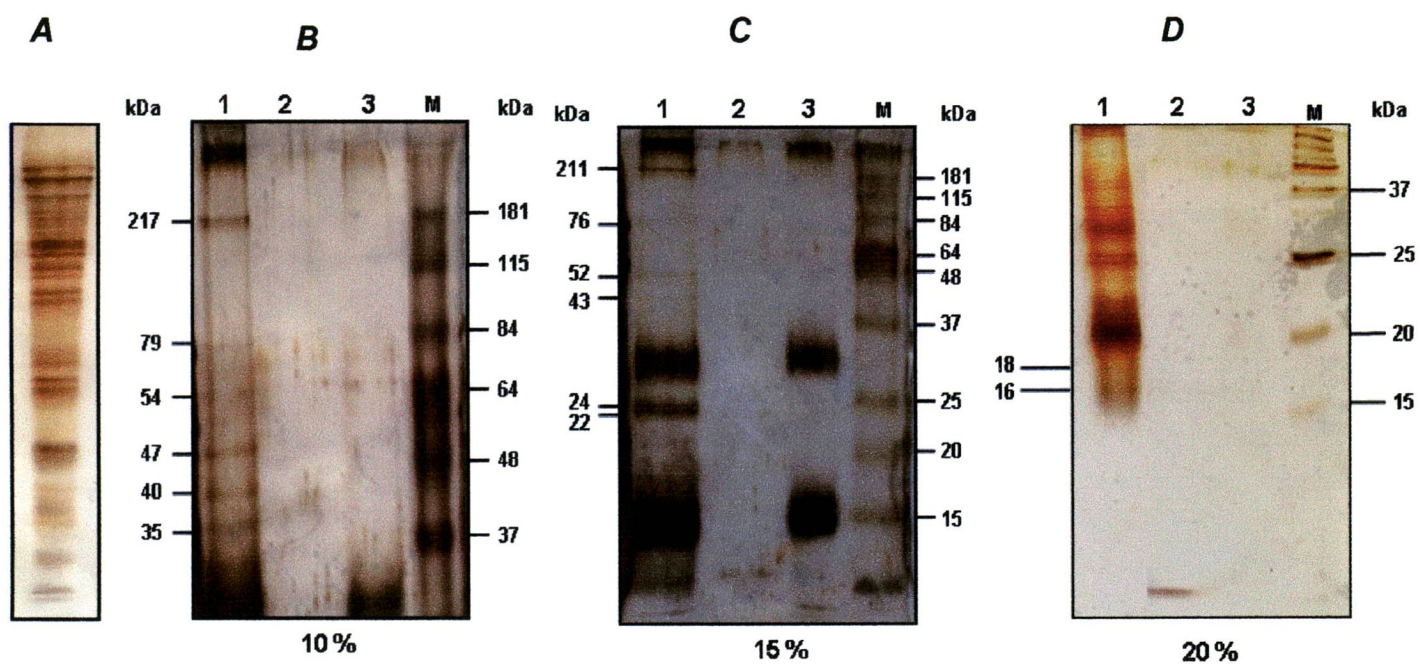


Tabla 1. Comparación de las bandas obtenidas en el trabajo de Rodríguez y col., (1989) y este trabajo.

Este trabajo	Rodríguez y col.,1989
217-211 kDa	210
----	160
----	112
----	90
79 - 76	70
54- 52	50
47	----
43-40	----
35	35
24	24
22	----
18	----
16	13

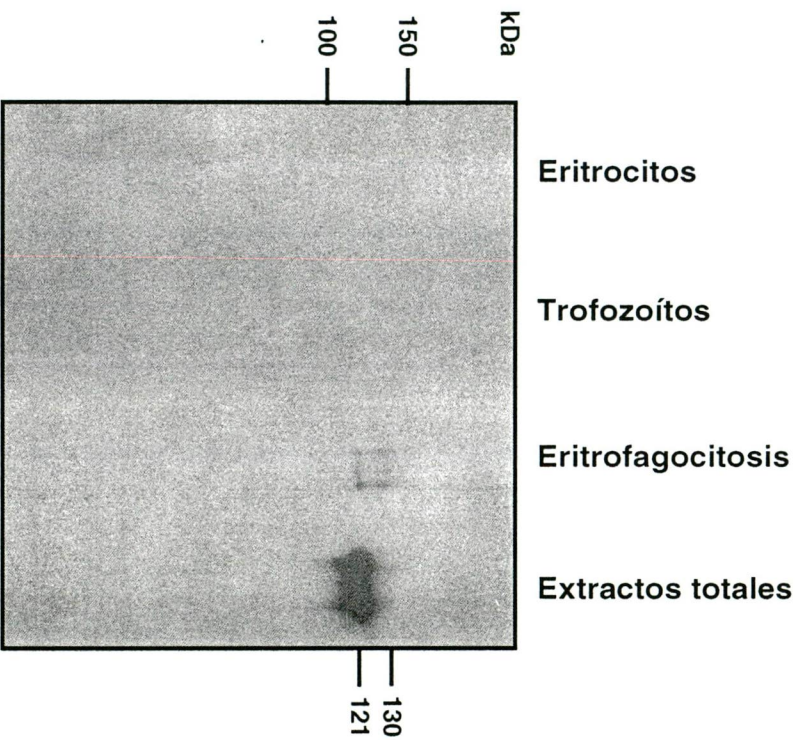
“----”. Ausencia de la banda con peso molecular similar al de la columna opuesta.

6.2.1 Inmunodetección del complejo EhCPADH

Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, la composición de aminoácidos, la co-migración con proteínas conocidas o la detección con anticuerpos específicos. La identificación de las proteínas aisladas fue el segundo objetivo de este trabajo y para esto nos valimos de una serie de anticuerpos específicos tanto policlonales como monoclonales que existen en nuestro laboratorio.

El complejo EhCPADH, es muy inmunogénico y es una de las principales proteínas reconocidas en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo y Orozco, 1987). Además, mediante técnicas como la microscopía electrónica y microscopía de fluorescencia se observó que durante la fagocitosis esta proteína es transportada desde la membrana plasmática hacia vacuolas fagocíticas (García-Rivera y col., 1999). En nuestros ensayos no identificamos en los geles teñidos con plata a la banda de 124 kDa que corresponde al complejo EhCPADH. Sin embargo, mediante el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra el complejo EhCPADH en ensayos de Western blot logramos detectar un doblete en las membranas de nitrocelulosa con las proteínas que se habían unido a los eritrocitos y separadas por electroforesis en geles de 10% de poliacrilamida (Fig. 6). La regresión lineal con los marcadores de peso molecular permitió determinar que este doblete tenía una banda con un peso molecular de 121 kDa y otra banda de 130 kDa. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito, ya que se ha sugerido que los carbohidratos pueden influenciar la migración del complejo EhCPADH en el gel (García-Rivera y col., 1999). En ambos controles negativos, los trofozoítos

Figura 6. Inmunodetección del complejo EhCPADH en la eritrofagocitosis. Los trofozoítos se incubaron con eritrocitos fijados (1:160) a 37°C por 20 minutos. Los trofozoítos se lisaron y las proteínas que quedaron adheridas a los eritrocitos después de lavados exhaustivos se separaron en geles de poliacrilamida al 10%. Después de aislar las proteínas de los trofozoítos que se adhirieron a los eritrocitos, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, éstas se probaron con anticuerpos específicos contra el complejo EhCPADH. A la izquierda se encuentran los marcadores de peso molecular.



solos y los eritrocitos solos, no se observó señal alguna. En el extracto total de amibas los anticuerpos detectaron una banda gruesa que comigra con la banda de 121 kDa y que corresponde al complejo EhCPADH (Fig. 6).

6.2.2 Inmunodetección del receptor acoplado a proteínas G durante la eritrofagocitosis

Recientemente se reportó la identificación de un posible receptor acoplado a proteínas G (EhGPCR-1) en *E. histolytica* (Picazarri y col., 2005). Este tipo de proteínas eucarióticas son el mayor grupo de proteínas receptoras integrales de membrana que regulan diversos tipos de proceso fisiológicos, incluyendo la fagocitosis (Freire-Garabal y col., 2003). EhGPCR-1 se identificó mediante ensayos de doble híbrido como una molécula que interactúa con la proteína EhRabB (Picazarri y col., 2005), la cual se ha reportado que está presente en las bocas fagocíticas cuando los trofozoítos se incuban con eritrocitos humanos (Rodríguez y col., 2000). Esto sugirió que el EhGPCR-1 pudiera estar participando en la eritrofagocitosis. Para saber si el EhGPCR-1 está dentro del grupo de proteínas aisladas en nuestros ensayos realizamos experimentos de Western blot usando un anticuerpo policlonal dirigido contra esta proteína (Picazarri, 2006). En estos ensayos, los anticuerpos reconocieron una banda con un peso de aproximadamente 59 kDa, lo cual varía un poco con respecto al peso teórico reportado para esta proteína, que es aproximadamente de 54 kDa. Los cambios en los pesos probablemente se deben a diferencias experimentales, como el tiempo de electroforesis y el uso de marcadores de proteínas diferentes. Como controles negativos de este ensayo se utilizaron amibas sin eritrocitos por un lado y eritrocitos sin amibas por otro. Ambos

controles se realizaron con el objeto de poder observar contaminación por fallas en el sistema de aislamiento y como se observa en la figura 7 en ambos casos no hay señal alguna. Como control positivo se utilizaron extractos totales de proteínas de amiba de la clona A. En la figura 7 podemos observar una banda clara que después de calcular el tamaño mediante regresión lineal tiene un peso de 55 kDa.

Al obtener una señal en las proteínas aisladas, nos dice que el EhGPCR-1 probablemente está participando en el proceso de eritrofagocitosis o cuando menos que se une específicamente a los eritrocitos.

6.2.3 Inmunodetección de la subunidad B de la ATPasa vacuolar en la eritrofagocitosis

Las ATPasas bombeadoras de protones son enzimas que acoplan el transporte de protones a través de las membranas con la síntesis o hidrólisis del ATP. Las ATPasas vacuolares o V-ATPasas son complejos multiméricos encargados de acidificar los compartimentos celulares como vacuolas, endosomas, lisosomas y vesículas secretorias (Kane y col., 1990).

En macrófagos se han identificado mediante espectrometría de masas varias subunidades de estos complejos, entre ellas, la subunidad α , β y ϵ (Garin y col., 2001). Entanto, en *E. histolytica* mediante espectrometría de masas sólo se ha identificado un péptido con 33 % de identidad con la subunidad α de la V-ATPasa de humano (Okada y col., 2005).

Debido a la función general de este tipo de proteínas, se consideró a la V-ATPasa como una proteína que pudiera estar participando en el proceso de fagocitosis. Para estos ensayos se usó el anticuerpo policlonal hecho en ratón

contra la subunidad β de la ATPasa vacuolar de *E. histolytica* (Meléndez, 2004). De esta manera y después de separar las proteínas y transferirlas a una membrana se incubaron con los anticuerpos, se obtuvo una señal clara en el carril de las proteínas aisladas a partir de eritrocitos que estuvieron en contacto con los trofozoítos durante la eritrofagocitosis. El tamaño calculado de esta banda fue de 57 kDa (Figura 8), el cual es ligeramente mayor que el reportado, que es de 55 kDa para la subunidad B de la ATPasa (Meléndez, 2004). En los controles negativos no se observó señal alguna, mientras que en las proteínas totales de trofozoítos usados como control positivo se observó una banda con un peso de 57 kDa, por lo que podemos sugerir que el cambio en el peso debe estar dado por la forma en que corrieron los marcadores de peso molecular.

Este resultado coincide con lo reportado a partir de ensayos de fagocitosis de los macrófagos de ratón en los que mediante espectrometría de masas se ha identificado a la subunidad B como una de las proteínas que participa en el proceso de fagocitosis (Garin y col., 2001). El reconocimiento de esta proteína en nuestros ensayos además indica que en *E. histolytica* existe una proteína que forma el parte del complejo de subunidades que constituyen a la ATPasa vacuolar.

6.2.4 Inmunodetección de la piruvato: ferredoxín óxidoreductasa (PFO) en la eritrofagocitosis

En microorganismos fermentativos, la piruvato ferredoxín óxidoreductasa (PFO) se encarga de descarboxilar al piruvato y convertirlo en acetil coenzima A (Kerscher y Oesterhelt, 1981). En *Trichomonas vaginalis* la PFO está

localizada en la membrana de los hidrogenosomas (Williams y col., 1987). Sin embargo, recientemente se identificó a una nueva adhesina de *T. vaginalis* con alta homología a la PFO, la cual se expresa sobre la superficie de este parásito cuando crece en altas concentraciones de hierro (Moreno-Brito y col., 2005).

En *E. histolytica*, mediante el uso de anticuerpos contra la proteína EhPFO recombinante y microscopía confocal se determinó que esta enzima se localiza en el organelo llamado EhkO y sobre la membrana plasmática de los trofozoítos (Rodríguez y col., 1996). Esto podría sugerir que EhPFO también podría participar en la interacción con eritrocitos. Al utilizar los anticuerpos anti-EhPFO en nuestros ensayos obtuvimos un par de bandas con pesos moleculares de 70 y 78 kDa (Fig 9), las cuales no corresponden con el peso teórico esperado de la EhPFO, que es de 130 kDa (Rodríguez y col., 1996). La presencia de estas bandas probablemente sea debida a la degradación de la proteína, pues como se puede observar en la figura 9, en los extractos totales de los trofozoítos además del reconocimiento de una banda con un peso de 129 kDa, también se observa el reconocimiento de una serie de bandas en forma de barrido por debajo de ésta, incluyendo dos bandas con pesos moleculares de 70 y 78 kDa. El reconocimiento específico está vigilado por los controles negativos, que como en los casos anteriores, no dio reconocimiento ni señal alguna (Figura 9). Entonces, podemos sugerir que muy probablemente la PFO amibiana también esté participando en el proceso de fagocitosis, aunque una función más clara de ella durante el proceso necesitará de otro tipo de ensayos.

Figura 7. Inmunodetección del EhGPCR-1 en eritrofagocitosis.

Después de aislar las proteínas de *E histolytica* que interactuaron con los eritrocitos, éstas fueron trasferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente identificadas con anticuerpos específicos contra la proteína EhGPCR-1. De izquierda a derecha, control negativo de eritrocitos, control negativo de amibas, proteínas aisladas de la interacción eritrocito-trofozoíto y extractos totales de amiba, como control interno.

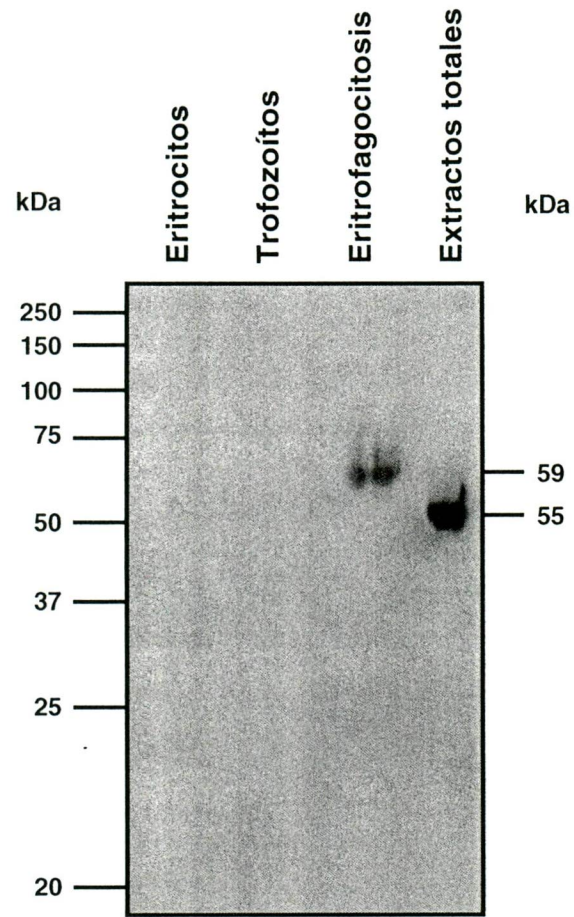


Figura 8. Inmunodetección de la ATPasa vacuolar en eritrofagocitosis.

Después de aislar las proteínas que interactuaron con los eritrocitos las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente identificadas con anticuerpos específicos contra la subunidad B de la ATPasa vacuolar de *E. histolytica*. De izquierda a derecha, control negativo de eritrocitos, control negativo de amibas, proteínas aisladas de la interacción eritrocito-trofozoito y extractos totales de amiba, como control interno.

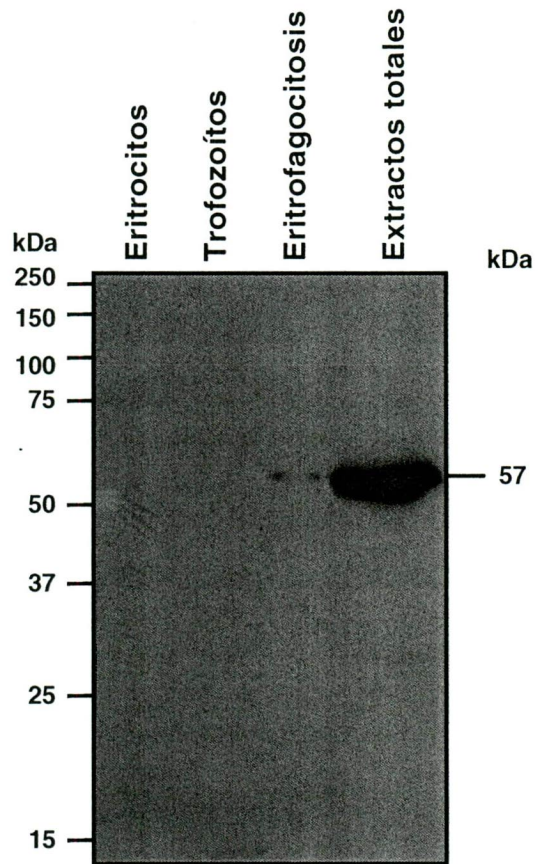
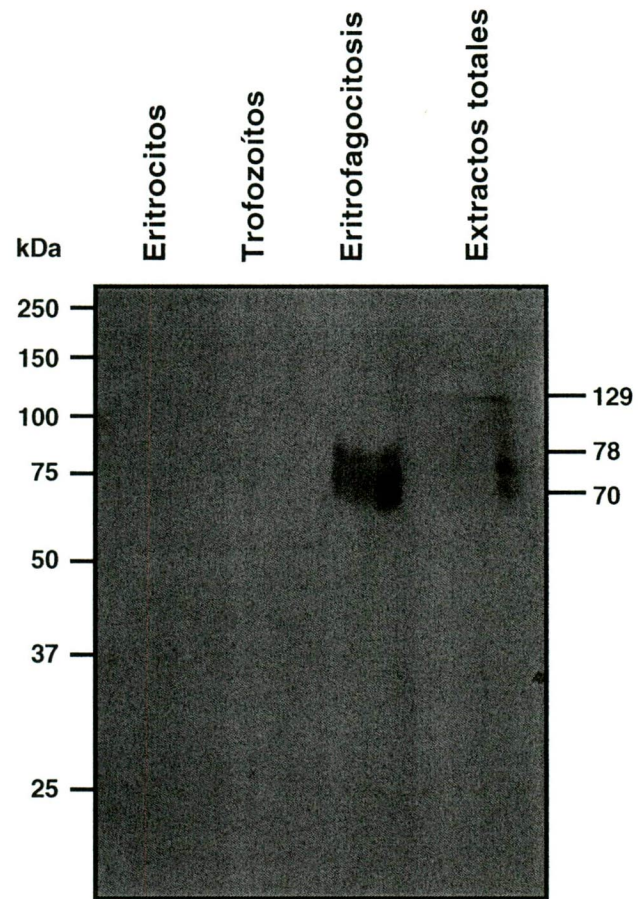


Figura 9. Inmunodetección de la piruvato: ferredoxín óxidoreductasa (PFO). Después de aislar las proteínas de *E. histolytica* que interactuaron con los eritrocitos, las proteínas fueron trasferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente identificadas con anticuerpos específicos contra la PFO amibiana. De izquierda a derecha, control negativo de eritrocitos, control negativo de amibas, proteínas aisladas de la interacción eritrocito-trofozoíto y extractos totales de amiba, como control interno.



6.2.5 Inmunodetección de la enolasa de *E. histolytica* en la eritrofagocitosis.

Como mencionamos en los antecedentes, existen trabajos previos donde se han aislado las proteínas que están interactuando con los eritrocitos humanos como célula blanco de los trofozoítos amibianos (Rodríguez y col., 1989); (Hidalgo, 1997). En uno de estos trabajos, donde se utilizaron condiciones distintas a las empleadas en este trabajo, se encontró una banda con un peso aproximado de 48 kDa, la cual posteriormente se identificó como la enzima glicolítica enolasa mediante la técnica de microsecuenciación (Hidalgo, 1997). Esta enzima cataliza la deshidratación reversible del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en las rutas de la glucólisis y gluconeogénesis, es decir, participa tanto en la degradación como en el almacenamiento de carbohidratos. Interesantemente, por medio de ensayos de proteómica usando macrófagos de ratón de la línea celular J774 que fagocitaron perlas de látex, también se identificaron a la enolasa como una de las proteínas presentes en los fagosomas (Garin y col., 2001).

Para determinar la presencia de la enolasa de *E. histolytica* en nuestros ensayos realizamos experimentos de Western blot, utilizando anticuerpos policlonales hechos en conejo dirigidos contra los primeros 300 aminoácidos del extremo amino terminal de la isoenzima α -enolasa humana (Santa Cruz Biotechnology). Estos anticuerpos no detectaron proteína alguna en las proteínas que interaccionaron con los eritrocitos (Fig. 10). Como control positivo de este ensayo se utilizaron extractos totales de amibas, en donde se observó una banda de 48 kDa, la cual corresponde al peso molecular de la enolasa. De esta manera aseguramos que los anticuerpos estaban

reconociendo a la enolasa de amiba (Hidalgo y col., 1997). Como controles negativos se utilizaron, por un lado, las proteínas de eritrocitos que no interactuaron con amibas y por otro, las proteínas de amibas que no interactuaron con eritrocitos. En ambos casos no se obtuvo señal alguna. Si bien nuestros resultados no coinciden con lo reportado en el trabajo de Hidalgo (Hidalgo, 1997), considerando que el proceso de la fagocitosis es un fenómeno muy dinámico, donde las proteínas que están interactuando con las células blanco tienen cinéticas que aún desconocemos, podríamos asumir que, las condiciones diferentes en el proceso de aislamiento que se utilizó en el trabajo de Hidalgo (1997) pueden ser las responsables de las diferencias encontradas.

6.2.6 Inmunodetección de la actina durante la eritrofagocitosis.

Es bien sabido que durante la extensión de los pseudópodos se presenta la polimerización de la actina debajo de la membrana plasmática (Mitchison y Cramer, 1996). En el caso de *E. histolytica*, se ha observado que después del contacto con los eritrocitos se presenta la emisión de pseudópodos y existe una rápida polimerización de la actina (Bailey y col., 1985). Sin embargo, cuando se usan perlas magnéticas desnudas, éstas no estimulan esta respuesta (Bailey y col., 1985), lo que sugiere que la interacción inicial de los trofozoítos con los eritrocitos es un proceso de reconocimiento muy específico (Bailey y col., 1990).

Recientemente, en estudios de proteómica de la fagocitosis de este parásito y mediante el uso de perlas magnéticas cubiertas con proteínas del suero humano, así como recubiertas con la proteína inhibible por galactosa y Nacetil galctosamina (Gal-Gal-Nac), la actina ha sido detectada alrededor de los

fagosomas generados por la ingestión de estas perlas magnéticas (McCoy y Mann, 2005); Así también se reportó que esta proteína parece ser más abundante sobre los fagosomas a los 15 minutos en comparación con los 30 minutos de fagocitosis en una cepa de amibas que sobreexpresaba la miosina IB, cuya principal característica es hacer el proceso de fagocitosis de una manera más lenta con respecto a la cepa silvestre (Marion y col., 2005).

Debido a que esta proteína está relacionada con el proceso de eritrofagocitosis y ha sido identificada mediante espectrometría de masas en los estudios de proteómica, nos pareció un excelente candidato para ser identificada dentro del grupo de proteínas aisladas en el presente trabajo. Sin embargo, en los ensayos hechos en este trabajo no se observó señal alguna al utilizar anticuerpos anti-actina (Fig. 11). Como control positivo de este ensayo se utilizaron anticuerpos anti-actina en extractos totales de proteínas de amiba de la clona A, revelandose una banda con un peso molecular de 44 kDa, lo cual coincide con el peso teórico de la actina (Fig.11). Como control negativo se utilizaron las proteínas de eritrocitos que no interactuaron con amibas y por otro lado, proteínas de amibas que no interactuaron con eritrocitos. En ambos casos no se obtuvo señal, por lo que podemos sugerir que no existía contaminación por proteínas de eritrocito. La ausencia de esta proteína en este ensayo, a pesar de que se ha demostrado su participación en la fagocitosis del parásito, se debe probablemente a que las condiciones usadas para el proceso de aislamiento promueven que esta proteína sea separada de los eritrocitos.

Figura 10. Inmunodetección de la enolasa en la eritrofagocitosis.

Después de aislar las proteínas de *E. histolytica* que interactuaron con los eritrocitos, éstas fueron trasferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente identificadas con anticuerpos específicos contra la α -enolasa de origen humano. De izquierda a derecha, control negativo de eritrocitos, control negativo de amibas, proteínas aisladas de la interacción eritrocito-trofozoíto y extractos totales de amibas como control interno.

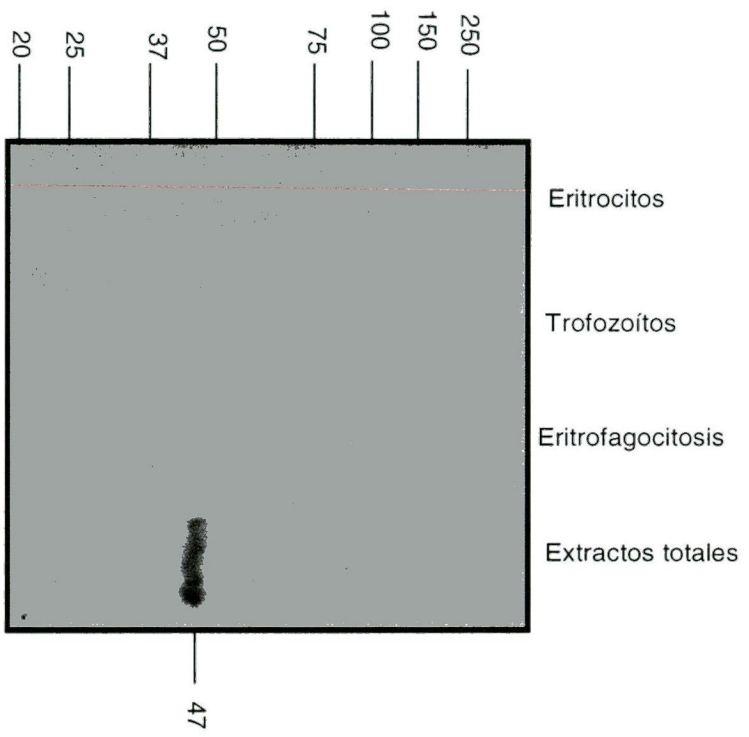
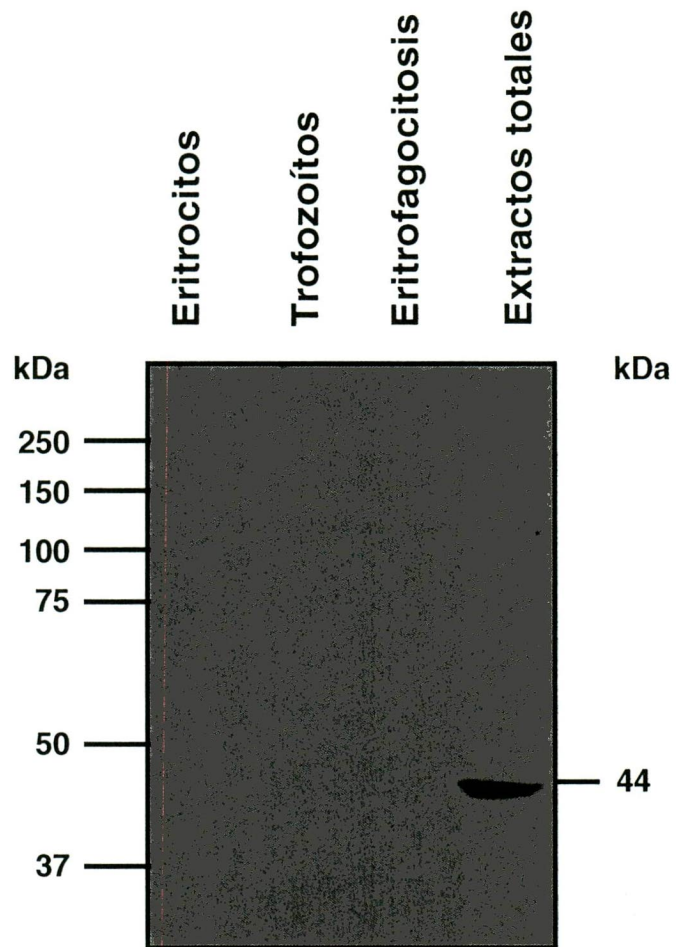


Figura 11. Inmunodetección de la actina en la eritrofagocitosis.

Después de aislar las proteínas de la amiba que interaccionaron con los eritrocitos, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente probadas con anticuerpos específicos contra la actina. De izquierda a derecha, control negativo de eritrocitos, control negativo de amibas, proteínas aisladas de la interacción eritrocito-trofozoíto y extractos totales de amiba, como control interno.



6.2.7 Inmunodetección de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) en la eritrofagocitosis.

Como control negativo de estos ensayos utilizamos una proteína nuclear de *E. histolytica*, la proteína de unión a la caja TATA (TBP), la cual es uno de los factores clave para realizar la transcripción eficiente de los genes de *E. histolytica* (de Dios-Bravo y col., 2005). Como esta proteína es nuclear y no ha sido relacionada con el proceso de la fagocitosis, consideramos que al no localizarla dentro del grupo de proteínas aisladas en nuestros ensayos de interacción nos evidenciaría que hemos detectado proteínas específicas del proceso de fagocitosis evitando por tanto, la presencia de proteínas contaminantes. Para valorar esta suposición, realizamos el ensayo de interacción y realizamos el aislamiento de las proteínas como se describió en la metodología. Una vez que las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa, utilizamos anticuerpos policlonales hechos en conejos dirigido contra la proteína TBP de *E. histolytica* (de Dios-Bravo y col., 2005). Los anticuerpos dieron una señal positiva sólo en el carril con extractos de proteínas nucleares (Fig. 12). En este caso usamos extractos de proteínas nucleares para inmunodetectar a la proteína, ya que se encuentra en una concentración muy baja en el citoplasma. Tanto en los controles negativos como en el ensayo de eritrofagocitosis no logramos observar alguna señal (Fig. 12), lo cual nos sugiere, que en nuestro ensayo no existe contaminación por proteínas que no estén participando en el proceso de eritrofagocitosis.

Hasta aquí pudimos observar que existe una serie de proteínas que se unen a eritrocitos durante la fagocitosis y que se lograron identificar mediante

anticuerpos específicos. En la Tabla 2, a manera de resumen, por columnas de izquierda a derecha se muestran: los pesos moleculares de las bandas observadas en los geles mediante tinción con plata, los pesos calculados mediante regresión lineal de las bandas obtenidas durante los ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos, los pesos teóricos de las proteínas que pensamos inmunodetectar y por último, los nombres de las proteínas. Como se observa en la tabla, de las siete proteínas probadas se inmunodetectaron cuatro. Una corresponde al complejo EhCPADH previamente relacionado con el proceso de eritrofagocitosis (García-Rivera y col., 1999). Sin embargo la PFO, el EhGPCR-1 y la B-ATPasa no habían sido relacionadas directamente con el proceso de eritrofagocitosis y se logró su inmunodetección con los anticuerpos específicos. En otros casos como la actina y la enolasa, aunque han sido reportadas dentro del grupo de proteínas aisladas mediante ensayos de ligando (Hidalgo y col., 1997), en este trabajo no fueron localizadas mediante anticuerpos.

6.3 Localización de proteínas relacionadas con la eritrofagocitosis.

El tercer objetivo de este trabajo fue demostrar la interacción *in situ* de las proteínas amibianas identificadas con los eritrocitos por ensayos de inmunofluorescencia, los cuales se realizaron como se describió en el apartado de materiales y métodos.

6.3.1 Inmunolocalización del complejo EhCPADH durante la eritrofagocitosis.

Previamente, mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía

electrónica, y utilizando anticuerpos monoclonales, se observó que durante la eritrofagocitosis, el complejo EhCPADH era traslocado desde la membrana plasmática hacia las vacuolas fagocíticas (García-Rivera y col., 1999). En el presente trabajo, aunque durante los ensayos de aislamiento y tinción con plata no se visualizó alguna banda con el peso aproximado de esta proteína, los anticuerpos anti-EhCPADH sí la detectaron en las proteínas transferidas. Para confirmar el resultado obtenido durante los ensayos de inmunodetección, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia. Para esto, los trofozoítos se fijaron y permeabilizaron. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-EhCPADH.

Como se puede observar en la figura 13 panel A, en trofozoítos sin fagocitar la proteína se localizó principalmente sobre la membrana plasmática de las células y alrededor de vacuolas dentro del citoplasma, lo cual coincide con lo ya reportado (García-Rivera y col., 1999). La señal fue específica ya que en el control negativo, donde sólo se usaron los anticuerpos secundarios, no se obtuvo ninguna señal. Cuando los trofozoítos estuvieron en contacto con eritrocitos por 20 minutos a 37°C previo a la inmunolocalización, la fluorescencia se observó también en la membrana plasmática, pero además se localizó alrededor de los eritrocitos (Fig. 14, paneles A, C y E).

6.3.2 Inmunolocalización de la ATPasa vacuolar de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis.

En un trabajo previo, mediante ensayos de inmunofluorescencia se concluyó que la ATPasa vacuolar se distribuye principalmente en el citoplasma de los trofozoítos amibianos, en pequeñas vesículas y en algunas regiones de la

Figura 12. Inmunodetección de la proteína EhTBP. Después de aislar las proteínas de la amiba que interaccionaron con los eritrocitos, éstas fueron trasferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente probadas con anticuerpos específicos contra la proteína TBP de *E. histolytica* (de Dios-Bravo y col., 2005). De izquierda a derecha, control negativo de eritrocitos, control negativo de amibas, proteínas aisladas de la interacción eritrocito-trofozoíto y extractos nucleares de amiba como control interno del ensayo de Western blot.

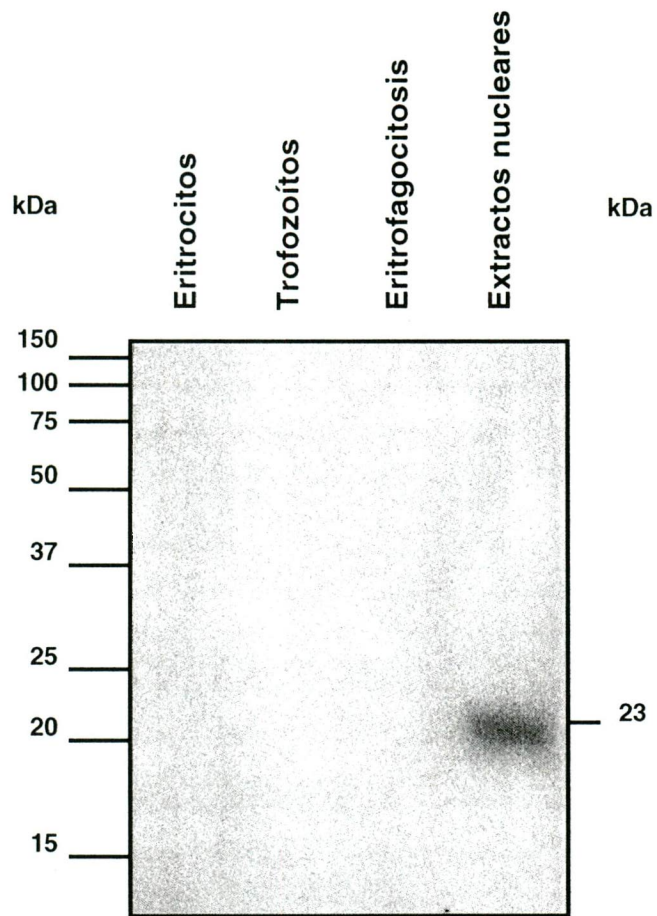


Tabla 2. Proteínas amibianas que interactúan con eritrocitos

Proteínas observadas por tinción con plata (kDa)	Proteínas inmunodetectadas (kDa)	Pesos teóricos de las proteínas inmunodetectadas (kDa)	Nombre de la proteína
211-217	-----	-----	----
-----	120	124	EhCPADH
76-79	70 y 78	130	PFO ?
52-54	59	54	EhGPCR-1
	55	57	B-ATPasa
47	-----	-----	-----
40-43	-----	-----	-----
24	-----	-----	-----
22	-----	-----	-----
18	-----	-----	-----
16	-----	-----	-----

membrana plasmática (Meléndez, 2004). En los ensayos del presente trabajo de aislamiento, se inmunodetectó la ATPasa vacuolar como una proteína de 55 kDa que interacciona durante el proceso de eritrofagocitosis (Fig. 9). Para confirmar los resultados anteriores se hicieron ensayos de inmunofluorescencia. Para esto, trofozoítos que estuvieron o no en contacto con eritrocitos por 20 minutos se fijaron y permeabilizaron. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-la subunidad B de la ATPasa vacuolar de *E. histolytica* (Meléndez, 2004). Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal. Durante estos ensayos observamos en los trofozoítos amibianos que no se incubaron con los eritrocitos que la distribución de la proteína es principalmente citoplasmática y en algunos casos forma pequeños agregados (Fig. 15). Cuando los eritrocitos estuvieron en contacto con las amibas, la proteína cambió su localización y ésta se encontró principalmente sobre los eritrocitos, pues la fluorescencia marca perfectamente a los eritrocitos dentro de los trofozoítos amibianos (Figuras 17 y 18 paneles A). Este último resultado nos indica que muy probablemente esta proteína si esté participando en el proceso de eritrofagocitosis como se ha observado en macrófagos (Garin y col., 2001).

6.3.3 Inmunolocalización del EhGPCR-1 de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis.

La identificación del EhGPCR-1 mediante el sistema de doble híbrido sugiere su participación en el proceso de eritrofagocitosis (Rodríguez y col., 2000). En este trabajo, mediante el uso de anticuerpos específicos, se identificó como una de las proteínas que estaba interactuando con los eritrocitos humanos (Fig.

8). Para confirmar los resultados anteriores se hicieron ensayos de inmunofluorescencia. Para esto, trofozoítos que estuvieron o no en contacto con eritrocitos por 20 minutos se fijaron y permeabilizaron. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos policlonales contra EhGPCR-1. Los anticuerpos localizaron a la proteína principalmente en el citoplasma cuando los trofozoítos no fagocitaron (Figura 17). El patrón cambió cuando ambas células estuvieron en contacto y el anticuerpo localizó a la proteína principalmente alrededor de los eritrocitos (Figura 18 paneles A, D y F).

Figura 13. Inmunolocalización del complejo EhCPADH.

Trofozoítos de la clona A se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100. Las amibas se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-EhCPADH y posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a fluorescéina. Posteriormente, las muestras se analizaron por microscopía confocal. El panel A muestra la distribución de la proteína sobre la membrana plasmática. El panel B muestra el contraste de fases de la misma imagen.

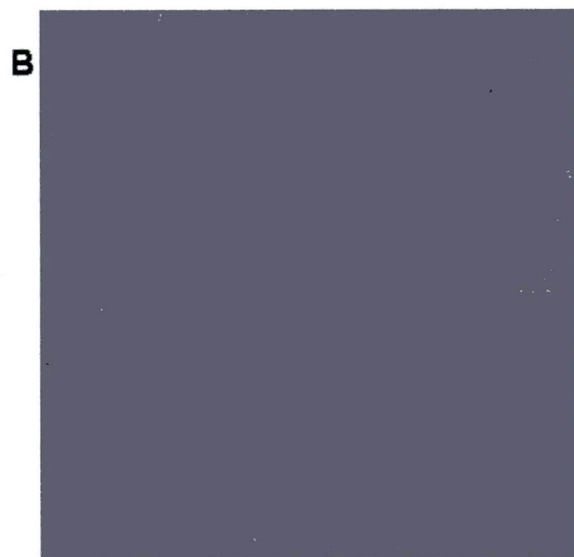
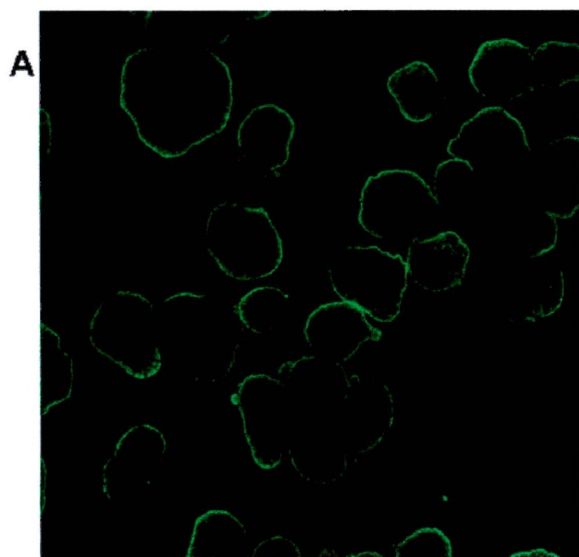


Figura 14. Inmunolocalización del complejo EhCPADH durante la eritrofagocitosis.

Trofozoítos de la clona A se incubaron con eritrocitos humanos por 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 4% y finalmente, se permeabilizaron con Tritón X-100. Las amibas se incubaron con anticuerpos anti-EhCPADH y con anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Finalmente, las muestras se analizaron por microscopía confocal. El panel A muestra la distribución de la proteína sobre la membrana plasmática y rodeando los eritrocitos, en color verde. El panel B muestra la tinción de los núcleos con yoduro de propidio, en color rojo. El panel C muestra la sobreposición de los paneles A y B. El panel D muestra el contraste de fases de la misma imagen. El panel E muestra un campo amplio de la misma imagen con la sobreposición de los canales rojo y verde. El panel F muestra el contraste de fases de la misma imagen del E.

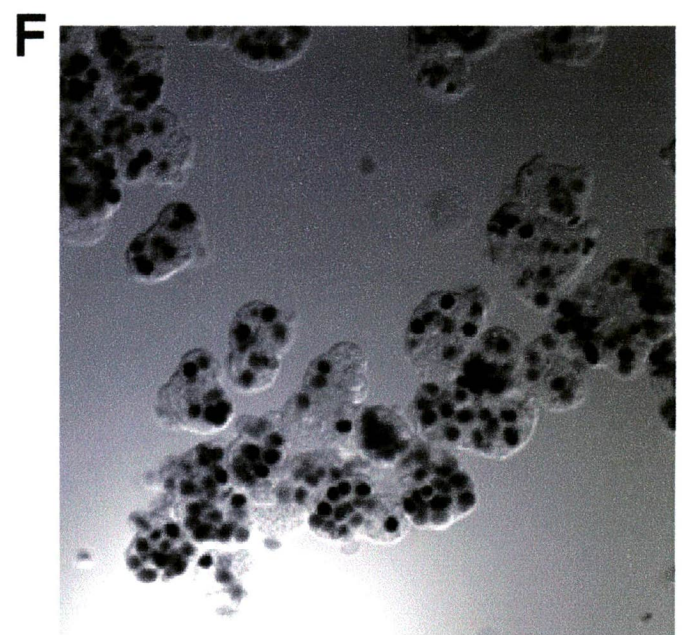
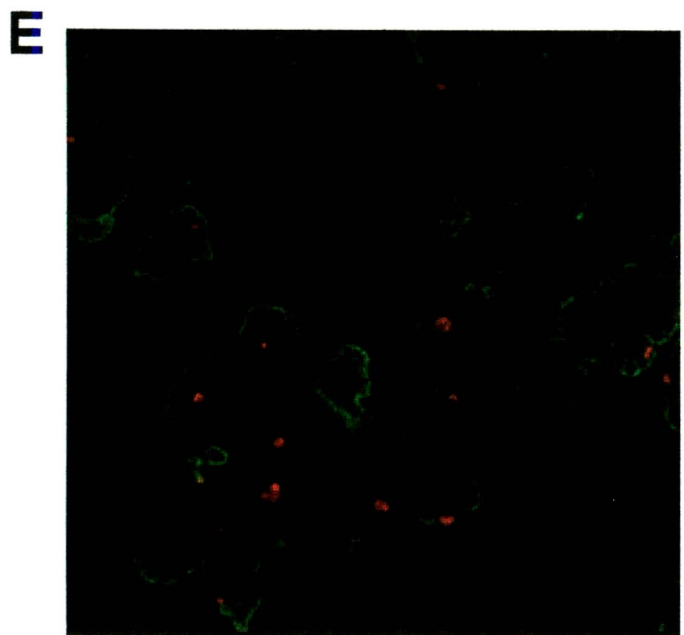
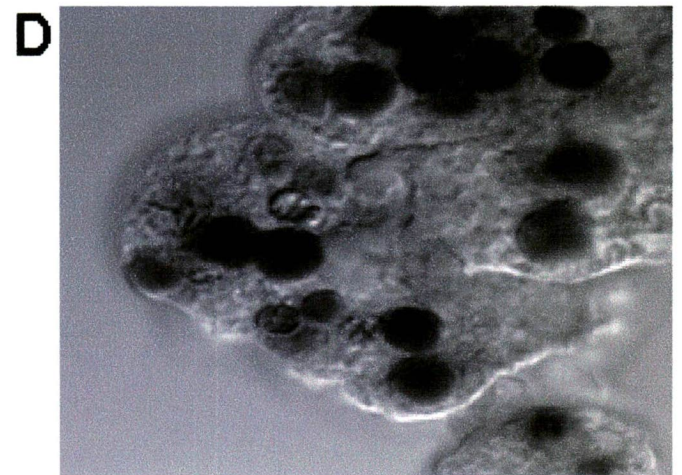
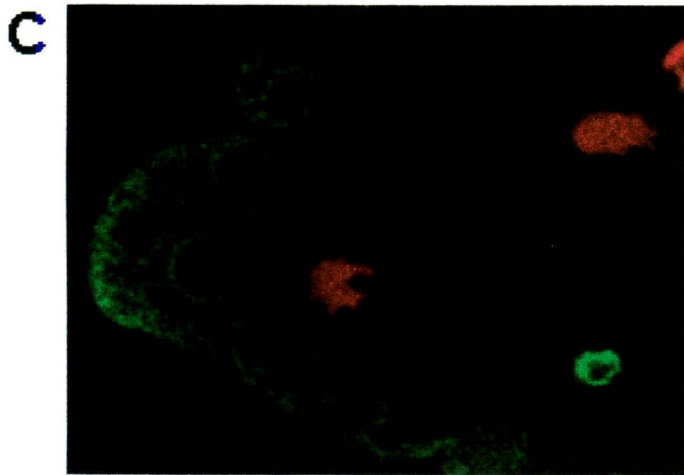
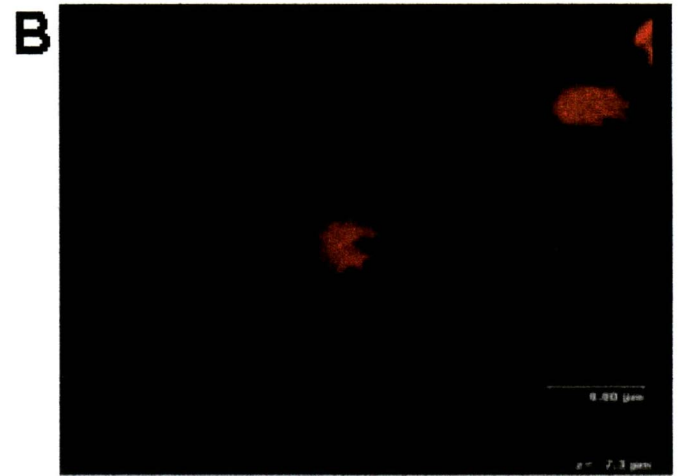
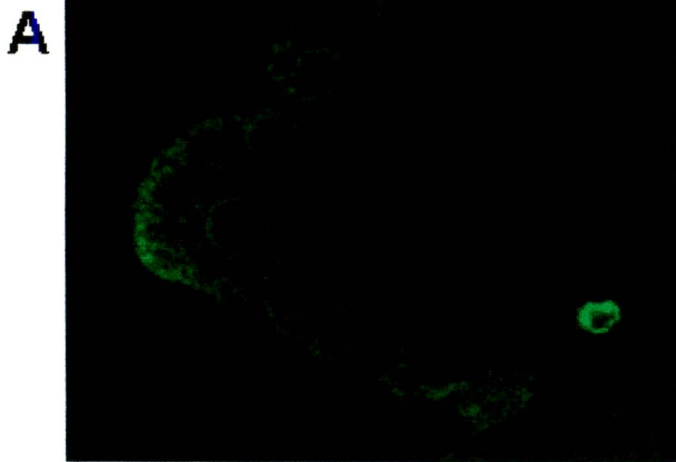


Figura 15. Inmunolocalización intracelular de la subunidad B de la ATPasa vacuolar.

Trofozoítos de la clona A se fijaron con paraformaldehído al 4%, y se permeabilizaron con Tritón X-100. Las amibas se incubaron con anticuerpos policlonales contra la subunidad B de la ATPasa vacuolar de *E. histolytica* y con anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Posteriormente, las muestras se analizaron por microscopía confocal. El panel A muestra la distribución de la proteína en el citoplasma de las células y en algunos casos formando agregados, en color verde. El panel B muestra la tinción de los núcleos teñidos con yoduro de propidio, en color rojo. El panel C muestra la sobreposición de los paneles A y B. El panel D muestra el contraste de fases de la misma imagen.

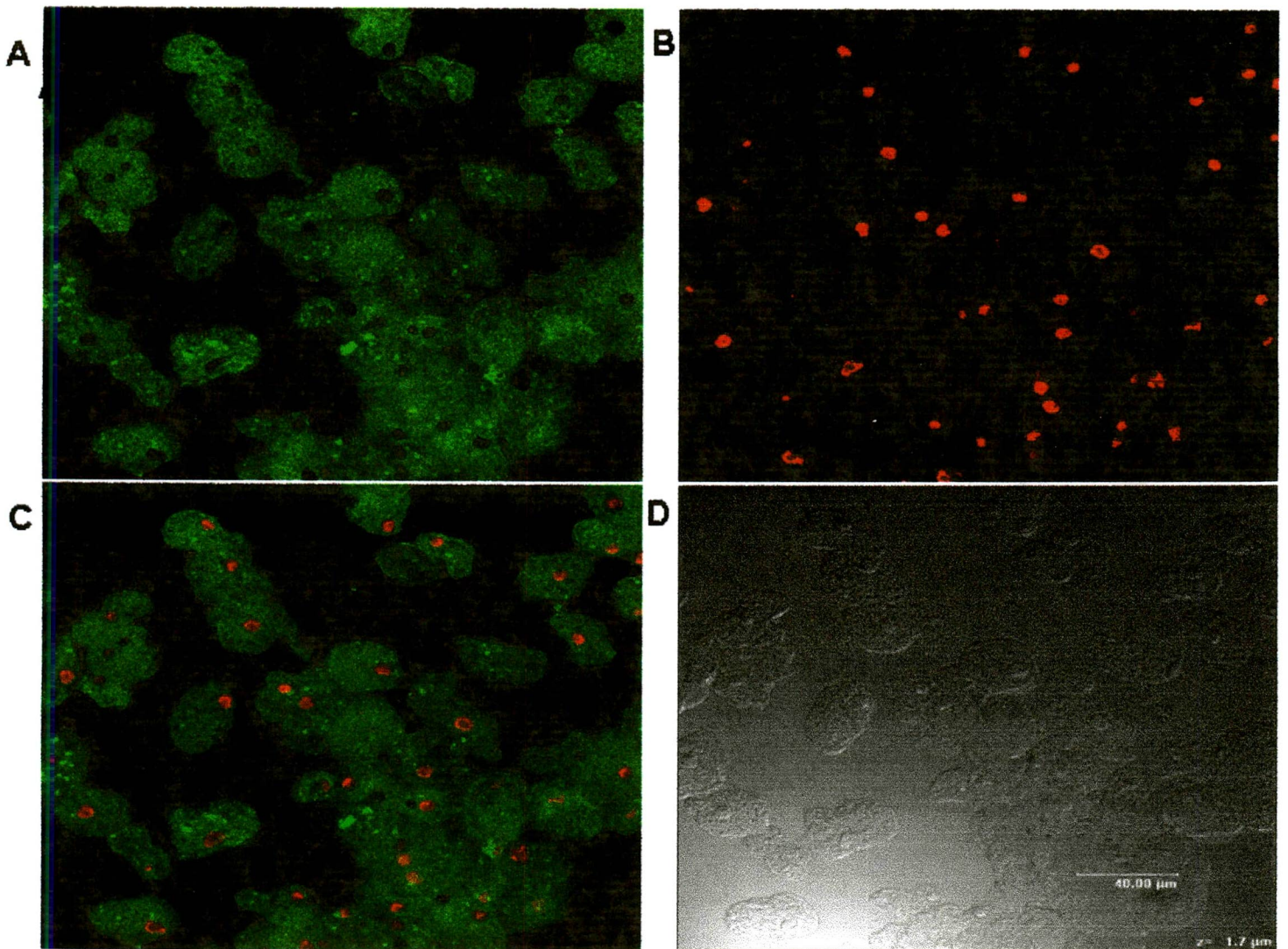


Figura 16. Inmunolocalización de la subunidad B de la ATPasa vacuolar durante la eritrofagocitosis.

Trofozoítos de la clona A se incubaron con eritrocitos humanos por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% y finalmente, se permeabilizaron con Tritón X-100. Las amibas se incubaron con anticuerpos policlonales contra la subunidad B de la ATPasa vacuolar de *E. histolytica* y con anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Posteriormente, las muestras se analizaron por microscopia confocal. El panel A muestra la distribución de la proteína rodeando los eritrocitos y en algunos casos rodeándolos completamente, en color verde. El panel B muestra la tinción de los núcleos con yoduro de propidio en color rojo. El panel C muestra la sobreposición de los paneles A y B. El panel D muestra el contraste de fases de la misma imagen. El panel E muestra la sobreposición de los canales verde y rojo de un campo amplio. El panel F muestra el contraste de fases de la imagen del panel E.

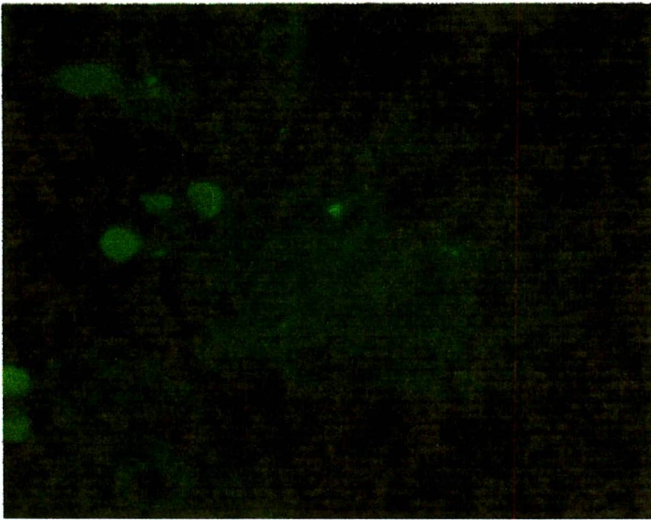
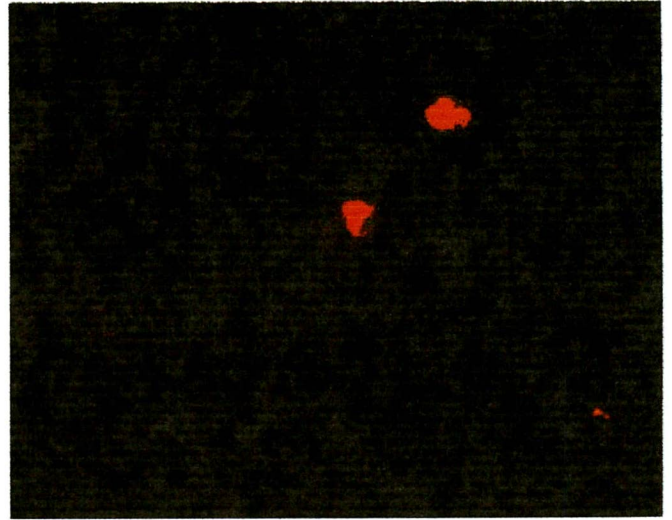
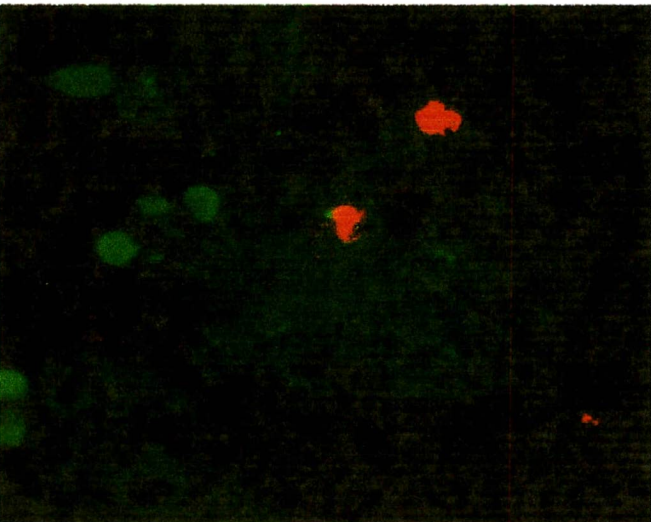
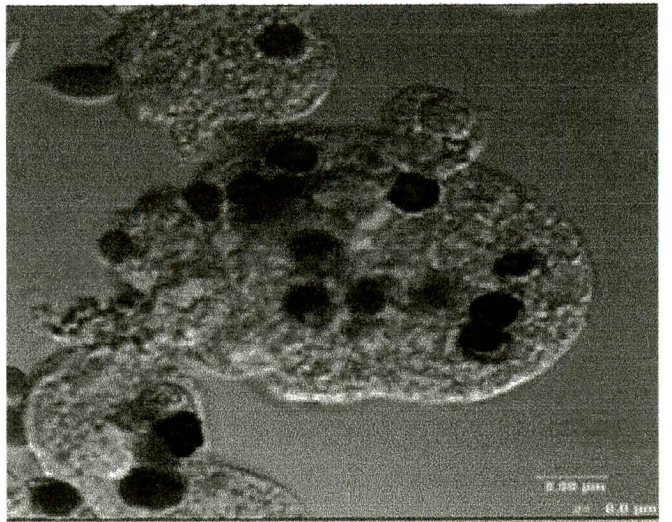
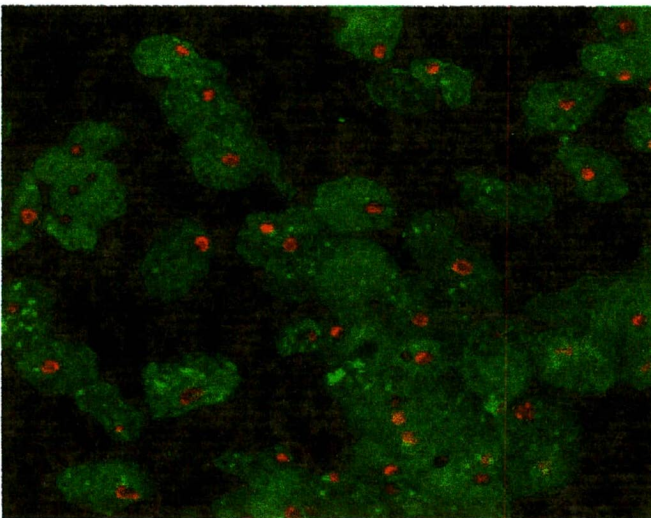
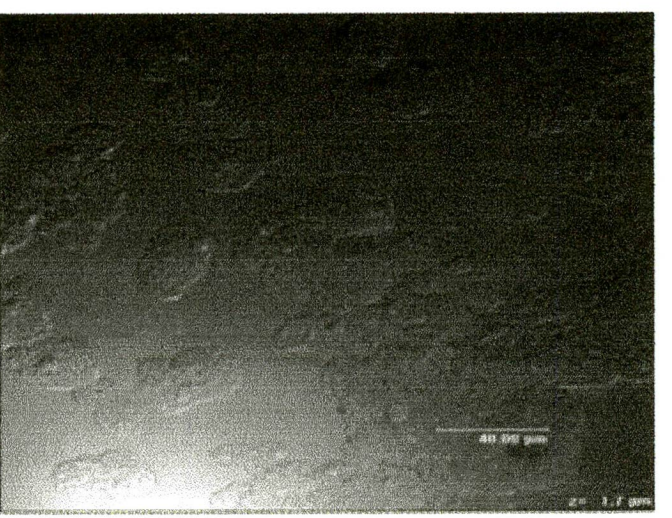
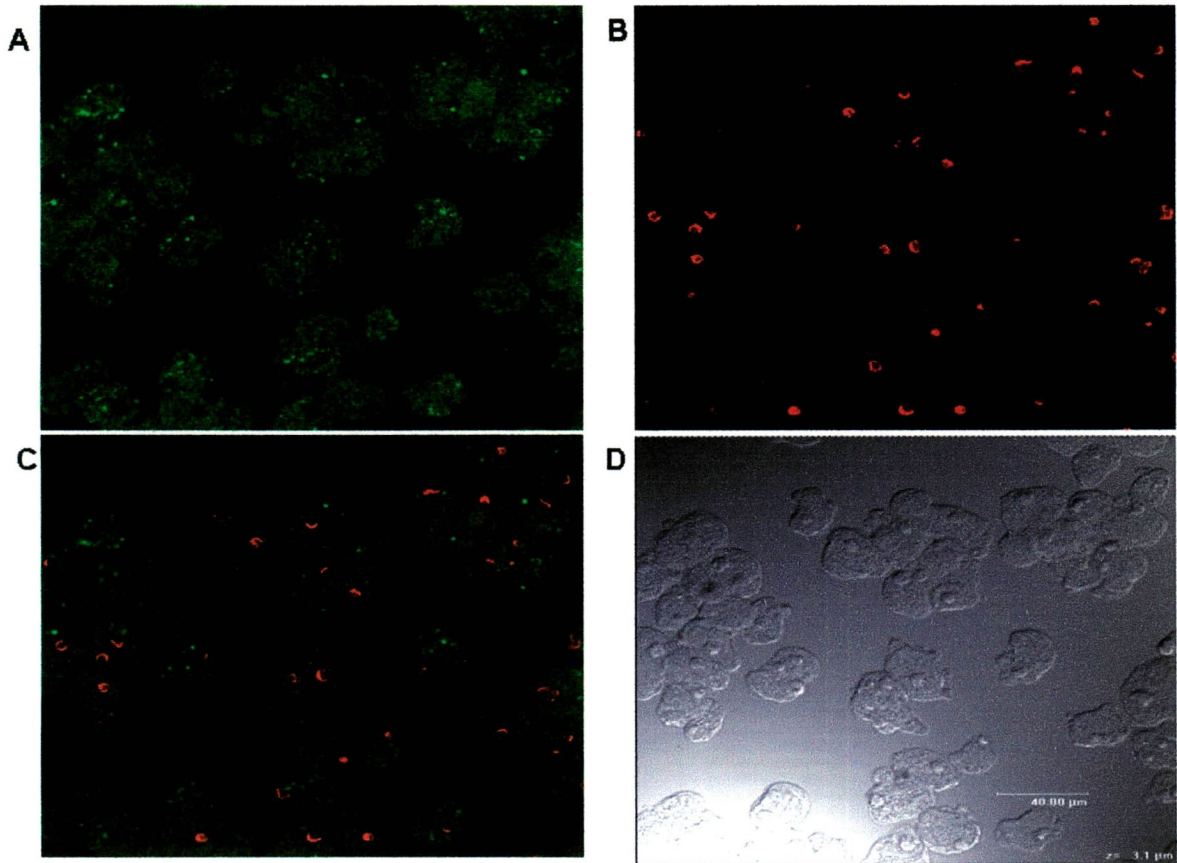
A**B****C****D****E****F**

Figura 17. Inmunolocalización del GPCR-1 de *E. histolytica*.

i

Trofozoítos de la clona A se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100. Las amibas se incubaron con anticuerpos anti-EhGPR-1 y con anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Posteriormente, se analizaron por microscopía confocal. El panel A muestra que la proteína se localiza en el citoplasma de las células. El panel B muestra la tinción de los núcleos con yoduro de propidio. El panel C muestra la sobreposición de los paneles A y B. El panel D muestra el contraste de fases de la misma imagen.

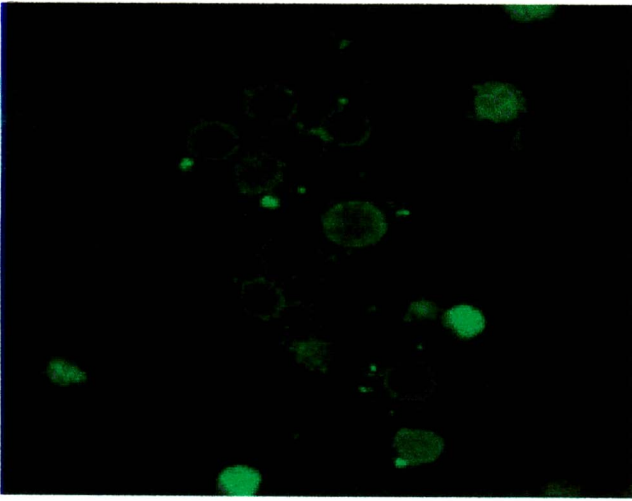


BIBLIOTECA UACM

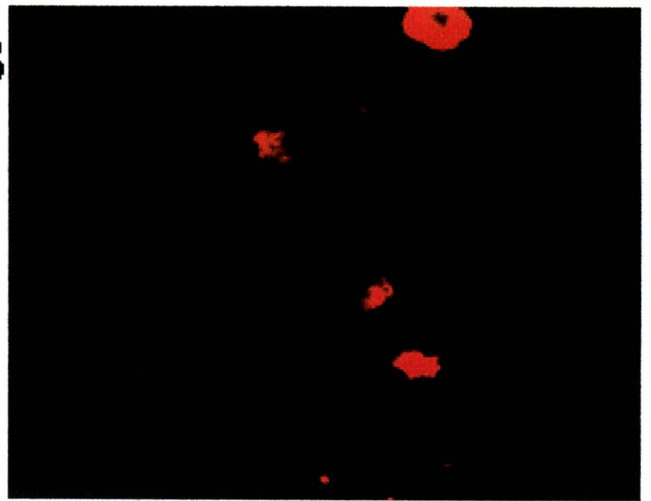
Figura 18. Inmunolocalización del GPCR-1 de *E. histolytica* durante la eritrofagocitosis.

Trofozoítos de la clona A se incubaron con eritrocitos humanos por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%, y finalmente se permeabilizaron con Tritón X-100. Las amibas se incubaron con anticuerpos anti-EhGPR-1 y con anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Como control negativo los trofozoítos fueron incubados sólo con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína. Finalmente, se analizaron por microscopía confocal. El panel A muestra que la proteína se localiza alrededor de los eritrocitos. El panel B muestra la tinción de los núcleos con yoduro de propidio. El panel C muestra el contraste de fases de la misma imagen. El panel D muestra la superposición de los paneles A y B. El panel E muestra el contraste de fases de un campo amplio. El panel F muestra la superposición de los canales rojo y verde de la misma imagen.

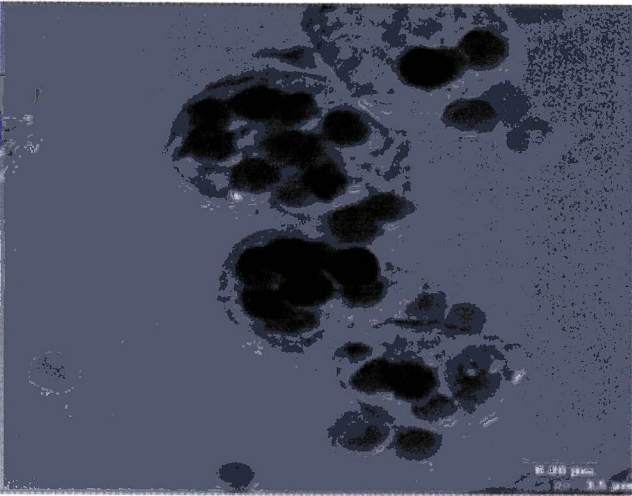
A



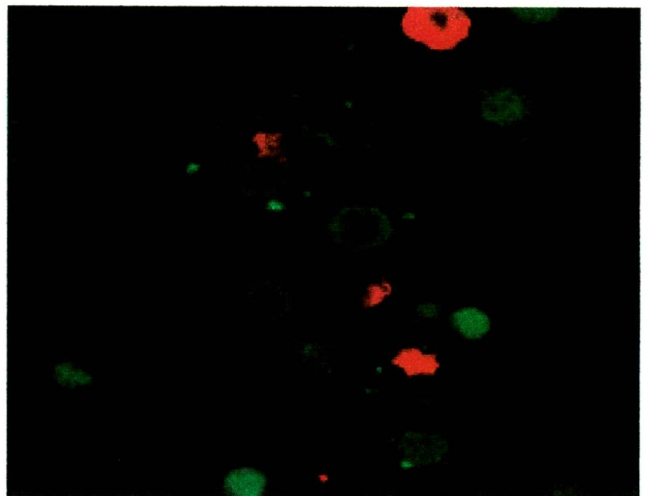
B



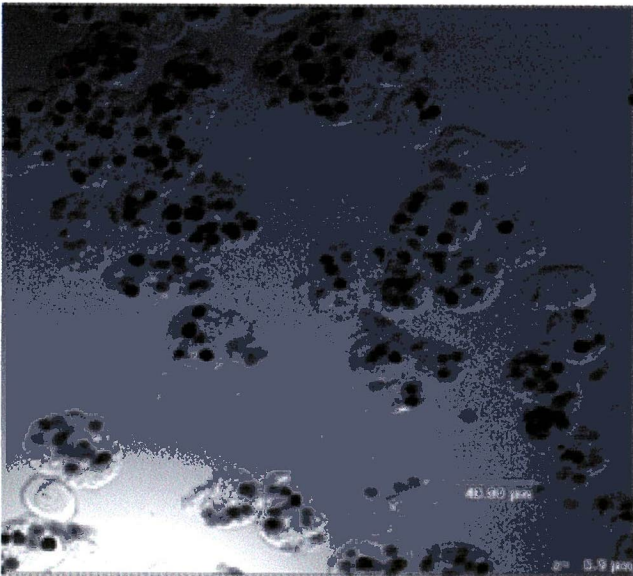
C



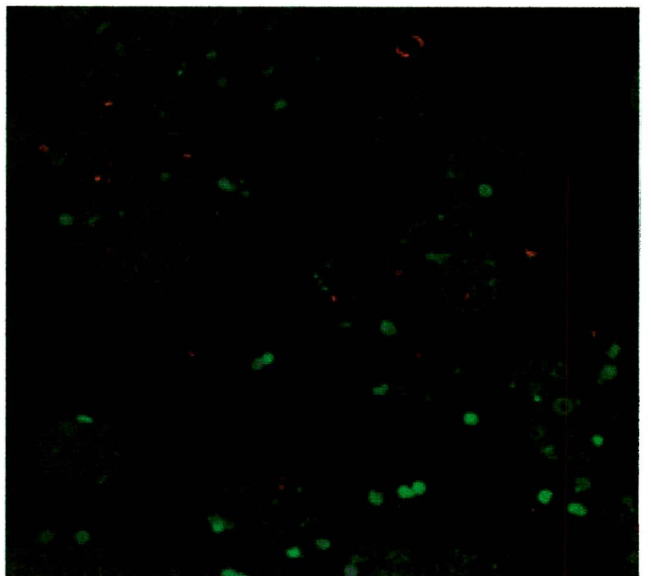
D



E



F



VII. DISCUSIÓN

Con la utilización de diferentes técnicas de aislamiento de proteínas y la secuenciación completa del genoma de *E. histolytica* ha sido posible estudiar a gran escala las moléculas que participan en los procesos biológicos relacionados con la virulencia de este parásito, como es el caso de la fagocitosis (Marion y col., 2005). Los estudios hechos en este campo se han fundamentado en las estrategias usadas para estudiar la biogénesis de los fagosomas en macrófagos de ratones (Desjardins y col., 1994).

Con la idea de reproducir *in vitro* el fenómeno de fagocitosis, bajo condiciones muy similares al proceso natural, en nuestro estudio utilizamos eritrocitos humanos en lugar de perlas de látex, ya que el eritrocito es la célula que este parásito fagocita comúnmente y de manera natural durante la amibiasis invasiva (Marion y col., 2005). La imitación de la fagocitosis usando perlas magnéticas desnudas, ha limitado la identificación de algunas proteínas que previamente se han relacionado con la eritrofagocitosis como la cisteína proteasa 3 (Okada y col., 2005). Además, se ha observado que las proteínas reclutadas en los fagosomas dependen de la proteína que esté recubriendo a la perla magnética. Por ejemplo, proteínas como la calreticulina o sec 13, involucradas en la formación de vesículas para el retículo endoplásmico, fueron identificadas únicamente cuando las perlas magnéticas se recubrieron con proteínas de suero humano y no cuando fueron recubiertas con mucina (Okada y col., 2005). Esto sugiere que el proceso de eritrofagocitosis es específico. Aunque actualmente se han descrito muchas proteínas implicadas en el proceso de eritrofagocitosis muchas más aún son desconocidas (Okada y col.,

2005). Considerando lo anterior, en esta tesis decidimos aislar e identificar proteínas de *E. histolytica* que interactúan con eritrocitos humanos durante el proceso de eritrofagocitosis. En experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio por Rodríguez y col. (1989) e Hidalgo, (1997) se estableció que existen varias proteínas de *E. histolytica* que participan en el evento de eritrofagocitosis. No obstante, sólo se identificaron tres de estas proteínas. Del primer trabajo, se identificó a la adhesina de 112 kDa, hoy denominada complejo EhCPADH (Rodríguez y col., 1989) y dos proteínas del segundo trabajo, las cuales correspondieron a la enolasa y a la actina de *E. histolytica* (Hidalgo, 1997). En los estudios citados, se había comenzado a buscar un conjunto de moléculas con participación en el proceso de eritrofagocitosis. De alguna manera estos trabajos establecen datos para el estudio global del fenómeno en la era de la proteómica. Si bien, la metodología empleada permitió el aislamiento de una diversidad de proteínas de tamaños diferentes participando en una misma función, la identidad de todas ellas aún no está establecida. Entonces, el interés de este trabajo fue identificar más proteínas potencialmente involucradas en la unión e internalización de las células blanco. Con ello avanzaríamos en un mejor conocimiento sobre el tipo de proteínas que participan en la eritrofagocitosis y cuál puede ser su mecanismo de acción y al mismo tiempo relacionar esta función con la patogenicidad del parásito.

Basados en la estrategia de Rodríguez y col. (1989), manejamos interacciones de trofozoítos y eritrocitos estos últimos previamente fijados con glutaraldehído. Después de 20 minutos de fagocitosis los trofozoítos fueron lisados. La hipótesis con que iniciamos nuestro trabajo señala que en esta interacción los

eritrocitos pueden funcionar como acarreadores de las proteínas unidas a ellos en su proceso natural.

Para observar todas las proteínas unidas a los eritrocitos, éstos se analizaron en geles a diferentes concentraciones de acrilamida. De este ensayo se obtuvieron un total de 14 bandas correspondientes a proteínas con pesos moleculares de 217, 211, 79, 76, 54, 52, 47, 43, 40, 35, 24, 22, 18 y 16 kDa (Fig. 5). La comparación de los pesos de las proteínas obtenidas en este trabajo con los reportados por Rodríguez y col. (1989) permitió detectar similitudes entre ellos (Tabla 1), aunque en algunos casos los pesos varían debido probablemente a la diferencia en la concentración de poliacrilamida de los geles y a los marcadores de peso utilizados. Por ejemplo, la proteína de 24 kDa se encuentra en ambos casos, mientras que las proteínas de 217 y 211 kDa, podrían corresponder a la proteína que se había reportado con peso de 210 kDa (Rodríguez y col., 1989). Otro caso es el de las proteínas de 79 kDa y 76 kDa, que podrían corresponder a la proteína de 70 kDa reportada por Rodríguez y col. (1989). Así como existen coincidencias en ambos trabajos, también existen algunas diferencias. Tal es el caso de las proteínas de 160, 112 y 90 kDa que no fueron detectadas en nuestros ensayos, probablemente debido a la menor sensibilidad de la técnica de tinción con nitrato de plata (Sambrook y col., 1989) en comparación al marcaje metabólico radioactivo (Rodríguez y col., 1989). El otro caso de contraste entre este trabajo y el de Rodríguez y col. (1989) son las bandas de 18 y 22 kDa, las cuales observamos usando geles a diferentes concentraciones de poliacrilamida, pues esto nos permitió una mayor resolución en la zona donde se encuentran las proteínas de menor tamaño.

Una diferencia con el trabajo de Hidalgo 1997, es con respecto a las proteínas que tenían un peso de aproximadamente a 45 y 48 kDa, correspondientes a la actina y a la enolasa (Hidalgo, 1997). En este caso durante el proceso de aislamiento se utilizaron dos detergentes en lugar de uno, como lo hicimos en nuestros ensayos. Los detergentes usados por Hidalgo fueron NP-40 (no iónico) y SDS (aniónico), en tanto que en este trabajo sólo usamos el primero para separar las proteínas unidas inespecíficamente a los eritrocitos. Además, el tiempo de interacción en los ensayos de Hidalgo y col., (1997) fue de 30 minutos, mientras que en los experimentos de esta tesis fue de 20 minutos. Esto probablemente permitió enriquecer dos proteínas, la actina y la enolasa. En nuestros experimentos sólo encontramos una banda con un peso aproximado de 47 kDa, que no fue reconocida por los anticuerpos específicos anti-actina o anti-enolasa.

Como podemos observar por la comparación de resultados, el método utilizado en nuestra estrategia de aislamiento de proteínas de amiba que participan en la eritrofagocitosis, está limitado por la cantidad final de proteína aislada. Esta es tan pequeña que en un gel de doble dimensión, probablemente sería difícil observar las manchas. Los geles de doble dimensión son capaces de separar una sola banda de los geles de una dimensión en varias manchas, donde cada mancha corresponde a una proteína con masa y punto isoelectrico diferentes. La concentración de las proteínas disminuirá y entonces será difícil su detección.

Para establecer la identidad de las proteínas aisladas y separadas por electroforesis realizamos ensayos de inmunodetección usando una serie de anticuerpos específicos. La hipótesis planteada para el estudio nos hizo pensar

en proteínas tanto de membrana plasmática como del citoplasma, pues en los trabajos sobre proteómica de fagosomas macrófagos y de trofozoítos de *E. histolytica* se han encontrado proteínas de tráfico vesicular, de superficie, de citoesqueleto así como proteínas metabólicas.

El complejo EhCPADH, previamente relacionado con la eritrofagocitosis por ensayos de inmunofluorescencia, se localiza en la membrana plasmática y en vacuolas fagocíticas (García-Rivera y col., 1999). Durante los ensayos de aislamiento nosotros no logramos observar por tinción con plata proteínas con pesos entre 80 y 200 kDa que, en los ensayos de ligando hechos por Rodríguez y col 1989 incluían a la adhesina de 124 kDa correspondiente al complejo. No obstante, al utilizar los mismos anticuerpos utilizados en el trabajo de García-Rivera y col 1999 observamos una señal en las proteínas provenientes de la eritrofagocitosis cuyo peso fue de 120 kDa y coincidió con el reportado para el complejo EhCPADH (García-Rivera y col., 1999). La detección de este complejo en nuestras preparaciones nos confirmó su participación en el proceso de eritrofagocitosis, a la vez que nos proporciona un marcador y un control para la metodología empleada. De manera complementaria, mediante microscopía confocal visualizamos a la proteína alrededor de algunos eritrocitos ingeridos, lo cual confirma la participación de la proteína durante el proceso de eritrofagocitosis y coincide con lo reportado por García-Rivera y col., (1999).

En los trabajos hechos en macrófagos de ratón de la línea celular J774 durante el proceso de eritrofagocitosis, se han identificado diferentes subunidades que pertenecen a las ATPasas bombeadoras de protones, por ejemplo, la subunidad α , β y ϵ (Garin y col., 2001). Mientras que en los estudios de

proteómica de los fagosomas de *E. histolytica* se ha identificado sólo a la subunidad α (Okada y col., 2005). Las ATPasas vacuolares son complejos multiméricos encargados de acidificar los compartimentos celulares como vacuolas, endosomas y lisosomas (Kane y col., 1990). En la tesis de la M. en C. Mayra Melendez (Meléndez, 2004) se reportó la identificación de la subunidad β de una ATPasa vacuolar de *E. histolytica*. En nuestro trabajo usamos los anticuerpos generados contra esta proteína. Con éstos logramos inmunodetectar a la ATPasa de entre las bandas correspondientes a las moléculas que aislamos en nuestros ensayos de interacción. El resultado apoya la idea de que la ATPasa participa durante el proceso de eritrofagocitosis. Además, en forma interesante los experimentos de microscopía confocal muestran a esta proteína rodeando los eritrocitos fagocitados, lo que sugiere fuertemente su participación durante el proceso de eritrofagocitosis. La presencia de esta molécula, como la del complejo EhCPADH parece responder a una dinámica de interacciones proteicas probablemente desde la formación de los endosomas tempranos hasta los tiempos de formación de fagosomas tardíos. A este respecto, podría ser interesante estudiar la biogénesis de los fagosomas y su intercambio proteico con respecto al tiempo de fagocitosis para establecer las funciones de las diferentes proteínas en el proceso de eritrofagocitosis. Esto se ha hecho en los estudios de proteínas de los fagosomas y su comparación en diferentes tiempos por análisis proteómico (Okada y col., 2006). En este trabajo se reportó que existen proteínas que se encuentran permanentemente localizadas sobre las perlas magnéticas a través del tiempo de fagocitosis, mientras que otras parecen tener ciclos de presencia y ausencia en los perfiles de las proteínas

durante la maduración de los fagosomas (Okada y col., 2006). En estos estudios se observó que la mayoría de las enzimas hidrolíticas identificadas fueron detectadas desde las primeras fases de la biogénesis de los fagosomas, y además estuvieron presentes en todos los puntos de la cinética de fagocitosis, lo que sugiere que las hidrolasas lisosomales fueron adquiridas rápidamente después de la formación de los fagosomas y continuamente asociadas con los fagosomas de *E. histolytica* (Okada y col., 2006).

Estos datos son similares a los observados en otros organismos incluyendo leucocitos de *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* y en *Dictyostelium discoideum*, donde la acidificación de los fagosomas y el reclutamiento de enzimas lisosomales ocurre en los primeros 15 minutos después de la ingestión (Okada y Nozaki, 2006).

La proteína EhRabB ha sido relacionada con el proceso de eritrofagocitosis por su presencia en fagosomas, visualizados mediante inmunolocalización (Rodríguez y col., 2000). Por otra parte, mediante el sistema de doble híbrido la proteína EhGPCR-1 fue relacionada con la proteína EhRabB, por lo que se sugirió que también pudiera estar participando en el proceso de eritrofagocitosis, probablemente regulando la actividad de la proteína EhRabB (Picazarri y col., 2005). Utilizando los anticuerpos generados contra EhGPCR-1 logramos inmunodetectar una banda con un peso molecular de 59 kDa en los ensayos de Western blot de las proteínas aisladas de los experimentos de eritrofagocitosis. La presencia de esta proteína en nuestros ensayos de eritrofagocitosis, apoya fuertemente la hipótesis de su participación en este proceso. En macrófagos se ha mostrado que los fagosomas se fusionan con los endosomas. Para ésto son necesarias las moléculas que regulan la

actividad de las proteínas del tráfico vesicular (Desjardins y col., 1997). En los trabajos de Desjardins y col. con macrófagos de ratón se ha identificado, por ejemplo, al factor sensible de N-etilmaleimida (NSF por sus siglas en inglés), que es una proteína de fusión vesicular. También se identificaron a las proteínas de unión a NSF soluble (SNAP- α y SNAP- γ , por sus siglas en inglés), requeridas para preparar a las membranas intracelulares para su fusión (Garin y col., 2001). Por otro lado, en los trabajos de proteómica de la fagocitosis de *E. histolytica* se han identificado diversas proteínas de tráfico vesicular del grupo de las Rab GTPasas, y algunas de sus proteínas reguladoras (Marion y Guillen, 2006). Sin embargo, no ha sido identificada la proteína EhGPCR-1. En nuestros ensayos el EhGPCR-1 sí fue detectado lo cual nos sugiere que probablemente sea específico de la eritrofagocitosis.

En los trabajos de fagocitosis de macrófagos de ratón se ha localizado a la isoenzima α de la enolasa como una de las proteínas contenidas dentro de los fagosomas (Garin y col., 2001). Sin embargo, en nuestros experimentos no encontramos a la enolasa, proteína metabólica que se encarga de catalizar la transformación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la vía de la glicólisis. A pesar de que la proteína fue co-purificada junto con la actina y parece unirse a eritrocitos humanos durante la eritrofagocitosis de acuerdo a Hidalgo (1997). En trabajos de proteómica de la fagocitosis de *E. histolytica* tampoco se ha identificado a la enolasa, aunque sí se han identificado otras proteínas metabólicas como la pirimidín nucleótido transhidrogenasa (Okada y col., 2005). Si bien en nuestros ensayos de aislamiento obtuvimos bandas con pesos aproximados al peso teórico de la enolasa, los anticuerpos específicos no lograron inmunodetectarlas como una de las proteínas transferidas a las

membranas de nitrocelulosa, probablemente porque en nuestros ensayos el uso de NP-40 pudo haber propiciado el rompimiento de la membrana de los fagosomas y con ello la separación de la enolasa.

El citoesqueleto de actina es requerido para la fagocitosis y esto ha sido señalado por la inhibición del proceso con drogas que afectan su movimiento (Bailey y col., 1985). La actina es una proteína que ha sido identificada en casi todos los trabajos de proteómica de *E. histolytica* (McCoy y Mann, 2005; Okada y col., 2005; Marion y col., 2005). En nuestros ensayos de aislamiento observamos una banda con un peso de 43 kDa, el peso aproximado al peso teórico de la actina. Sin embargo, no se logró inmunodetectar, probablemente porque como se sugirió para la enolasa, la proteína puede estar separando de los eritrocitos durante el proceso de lavado de los mismos. A este respecto nuestra estrategia de lisis celular, podría ser cambiada de una lisis química, a una lisis mecánica como se ha hecho en los trabajos de fagocitosis con perlas magnéticas en macrófagos y *Dictiostelium discoideum* y recuperar los fagosomas con sus membranas completas. De esta manera podríamos recuperar algunas de estas proteínas que se encuentran muy probablemente en el lumen de los fagosomas. Otra explicación de la ausencia de ambas proteínas puede deberse a lo observado en el trabajo de la cinética de fagocitosis analizada por proteómica donde se sugirió que algunas proteínas de tráfico vesicular como son Rab1, Rab5 y RabC1, tienen un modo de reclutamiento bifásico, es decir, que se encuentran en los estados tempranos y tardíos de la producción de estos fagosomas. Este mismo patrón de asociación y disociación fue observado para otras proteínas incluyendo algunas del citoesqueleto (Okada y Nozaki, 2006).

Con el objeto de emplear un control de nuestro ensayo utilizamos a la proteína TBP, ya que esta fue previamente localizada en el núcleo y en un organelo llamado EhKO (Luna-Arias y col., 1999). Además la TBP es una proteína que no ha sido relacionada previamente con el proceso de eritrofagocitosis. Nuestra hipótesis es que esta proteína no estuviera presente dentro de las proteínas que interactuaron con los eritrocitos y en nuestros experimentos, efectivamente, no fue detectada. Al utilizar extractos nucleares de trofozoítos de amiba, para aumentar las probabilidades de detección, sí logramos inmunodetectarla. Por esto consideramos que un mejor control sería aquel que estuviera mejor representado en cantidad en este protozoario.

En conclusión, en esta tesis encontramos que durante el proceso de eritrofagocitosis y específicamente a los 20 minutos del evento se visualizan diez bandas. De éstas, cuatro se lograron inmunodetectar mediante anticuerpos específicos y corresponden a la subunidad B de la ATPasa vacuolar, a un receptor acoplado a proteínas G, al complejo EhCPADH y la proteína metabólica piruvato ferredoxín óxidoreductasa. Por último, se logró inmunolocalizar a tres proteínas de la amiba que interactuaron con los eritrocitos humanos, entre ellas, la subunidad B de la ATPasa vacuolar, un receptor acoplado a proteínas G y el complejo EhCPADH.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) En nuestros ensayos de interacción a 20 minutos logramos aislar 10 bandas con pesos de 211, 76, 52, 47, 40, 35, 24, 22, 18 y 16 kDa.
- 2) Las proteínas que logramos identificar a los 20 minutos mediante Western blot fueron: EhCPADH, EhATPasa y EhGPCR-1.
- 3) Las proteínas que no logramos identificar a los 20 minutos mediante Western blot fueron: actina, enolasa y TBP.
- 4) Por ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal se confirmó que las proteínas EhCPADH, EhATPasa y EhGPCR-1 sí están en contacto con los eritrocitos a los 20 minutos de interacción.

IX. PERSPECTIVAS

Los datos experimentales obtenidos en esta tesis acerca de las proteínas amibianas que interactúan con eritrocitos humanos, pueden servir como base para posteriores estudios de proteómica de la eritrofagocitosis. Con la caracterización sistemática de las proteínas amibianas que se encuentran participando en el proceso de eritrofagocitosis, se podrá entender de una mejor manera la biología del parásito y de su mecanismo de acción contra el hospedero.

Para esto quedan en perspectiva las siguientes sugerencias:

1. A las proteínas obtenidas durante los ensayos de aislamiento realizar electroforesis de doble dimensión, para determinar el número exacto de proteínas involucradas a los 20 minutos.
2. Una vez obtenidas las manchas de la doble dimensión, hacer la microsecuenciación de cada una de las proteínas.
3. Realizar cinéticas de eritrofagocitosis.
4. Con las proteínas obtenidas en la cinética de eritrofagocitosis, determinar cambios en los patrones de participación de cada una de las proteínas.
5. Cambiar el proceso de lisis química por una lisis mecánica para no romper las membranas de los fagosomas y de esta manera obtener además las proteínas contenidas en los fagosomas.
6. Para confirmar la integridad de estos fagosomas se pueden realizar análisis por microscopía electrónica.

X. APÉNDICE

MEDIO TYI-S 33

Biosate	30.0 g
Glucosa	9.0 g
NaCl	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.63 g
L-cisteína	1.25 g
Ácido ascórbico	0.25 g

Aforar a 870 ml y ajustar el pH a 6.8. Completar el medio con 2% de suero bovino com y una mezcla de antibioticos (1.2 U/ml de penicilina y 1.4 µg/ml de estreptomocina)

PBS 10X

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	14.6 g
KCl	2.0 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a un litro, posteriormente filtrar y esterilizar en autoclave.

PBS-TWEEN

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.13g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 ml

Ajustar el pH 7.4 y aforar a un litro.

SOLUCIÓN DE ALSEVER

Ácido cítrico	0.275 g
Citrato de sodio	4.0 g
NaCl	2.1 g
Dextrosa	10.25 g
Agua (cbp)	500 ml

Ajustar el pH a 6.1, aforar y esterilizar en la autoclave.

INHIBIDORES DE PROTEASAS

PMSF	100 mM	5.0 µl
Aprotinina	100 mM	20 µl
Aprotinina	10 mg/ml	0.5 µl
Pepstatina A	1 mg/ml	5.0 µl
Leupetina	10 mg/ml	0.5 µl
E-64	1 mg/ml	<u>10 µl</u>
Vol. final		41.0 µl

XI. REFERENCIAS

1. Acuña-Soto,R., Maguire,J.H., y Wirth,D.F. (2000). Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *Am J Gastroenterol.* **95**, 1277-1283.
2. Arroyo,R. y Orozco,E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem. Parasitol* **23**, 151-158.
3. Ausubel,F.M., Brent,R., Moore.D.D, Kingston,R.E., Seidman,J.G., Smith,J.A., y Struhl,K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. (EUA).
4. Bailey,G.B., Day,D.B., y Gasque,J.W. (1985). Rapid polymerization of *Entamoeba histolytica* actin induced by interaction with target cells. *J. Exp. Med.* **162**, 546-558.
5. Bailey,G.B., Gilmour,J.R., y McCoomer,N.E. (1990). Roles of target cell membrane carbohydrate and lipid in *Entamoeba histolytica* interaction with mammalian cells. *Infect. Immun.* **58**, 2389-2391.
6. Bailey,G.B., Shen,P.S., Beanan,M.J., y McCoomer,N.E. (1992). Actin associated proteins of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **23**, 129-132.
7. Batista,E.d. y de Souza,W. (2004). Involvement of protein kinases on the process of erythrophagocytis by *Entamoeba histolytica*. *Cell Biology International* **28**, 243-248.
8. Boettner,D.R., Huston,C.D., Sullivan,J.A., y Petri,W.A., Jr. (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Utilize Externalized Phosphatidylserine for Recognition and Phagocytosis of Erythrocytes. *Infect. Immun.* **73**, 3422-3430.
9. Bracha,R., Nuchamowitz,Y., Leippe,M., y Mirelman,D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* **34**, 463-472.
10. Brown,E.J. (1995). Phagocytosis. *Bioessays* **17**, 109-117.
11. Caballero-Salcedo,A., Viveros-Rogel,M., Salvatierra,B., Tapia-Conyer,R., Sepulveda-Amor,J., Gutierrez,G., y Ortiz-Ortiz,L. (1994). Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* **50**, 412-419.
12. Chavez-Munguia,B., Espinosa-Cantellano,M., Castanon,G., y Martinez-Palomo,A. (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.* **31**, S165-S167.

13. Cinfuentes,E., Blumenthal,U., R  iz-Palacios,G., Bennett,S., y and Peassey,A. (1994). Ambiente epidemiológico del uso de aguas negras en agricultura: Valle del Mezquital. *Salud Pública* 3-9.
14. Clark,C.G. y Roger,A.J. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* **92**, 6518-6521.
15. Claus,V., Jahraus,A., Tjelle,T., Berg,T., Kirschke,H., Faulstich,H., y Griffiths,G. (1998). Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 9842-9851.
16. Conde-Bonfil,M.C. y Mora-Zerpa,C. (1992). [*Entamoeba histolytica*: a standing threat]. *Salud Publica Mex.* **34**, 335-341.
17. Cook,G.C. (1990). *Parasitic disease in clinical practice*. (London: London G.B.).
18. de Dios-Bravo,G., Luna-Arias,J.P., Riveron,A.M., Olivares-Trejo,J.J., Lopez-Camarillo,C., y Orozco,E. (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. *FEBS J.* **272**, 1354-1366.
19. Desjardins,M. (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**, 183-186.
20. Desjardins,M., Celis,J.E., van,M.G., Dieplinger,H., Jahraus,A., Griffiths,G., y Huber,L.A. (1994). Molecular characterization of phagosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 32194-32200.
21. Desjardins,M., Nzala,N.N., Corsini,R., y Rondeau,C. (1997). Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 18)**, 2303-2314.
22. Diamond,L.S., Harlow,D.R., y Cunnick,C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg.* **72**, 431-432.
23. Duclos,S., Diez,R., Garin,J., Papadopoulou,B., Descoteaux,A., Stenmark,H., y Desjardins,M. (2000). Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Sci.* **113 Pt 19**, 3531-3541.
24. Freire-Garabal,M., Nunez,M.J., Balboa,J., Lopez-Delgado,P., Gallego,R., Garcia-Caballero,T., Fernandez-Roel,M.D., Brenlla,J., y Rey-Mendez,M. (2003). Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. **139**, 457-463.
25. García-Rivera,G., Rodriguez,M.A., Ocadiz,R., Martinez-Lopez,M.C.,

- Arroyo,R., Gonzalez-Robles,A., y Orozco,E. (1999). Entamoeba histolytica : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. Mol Microbiol **33**, 556-568.
26. Garin,J., Diez,R., Kieffer,S., Dermine,J.F., Duclos,S., Gagnon,E., Sadoul,R., Rondeau,C., y Desjardins,M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. J. Cell Biol. **152**, 165-180.
 27. Ghosh,S.K., Field,J., Frisardi,M., Rosenthal,B., Mai,Z., Rogers,R., y Samuelson,J. (1999). Chitinase secretion by encysting Entamoeba invadens and transfected Entamoeba histolytica trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. Infect Immun. **67**, 3073-3081.
 28. Guillén,N. (1996). Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of Entamoeba histolytica. Trends Microbiol **4**, 191-197.
 29. Hidalgo,M.E., Sanchez,R., Perez,D.G., Rodríguez,M.A., Garcia,J., y Orozco,E. (1997). Molecular characterization of the Entamoeba histolytica enolase gene and modelling of the predicted protein. FEMS Microbiol. Lett. **148**, 123-129.
 30. Hidalgo, ME. Clonación, caracterización y expresión del gen que codifica para la enolasa en *E. histolytica*. 1997. Departamento de Patología Experimental. Centro de Investigación y de Estudios avanzados IPN. Ref Type: Thesis/Dissertation
 31. Horwitz,M.A. (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. Cell **36**, 27-33.
 32. Kane,P.M., Yamashiro,C.T., Wolczyk,D.F., Neff,N., Goebel,M., y Stevens,T.H. (1990). Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. Science **250**, 651-657.
 33. Katz,U., Ankri,S., Stolarsky,T., Nuchamowitz,Y., y Mirelman,D. (2002). Entamoeba histolytica expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gal-lectin are less virulent. Mol Biol Cell **13**, 4256-4265.
 34. Keene,W.E., Hidalgo,M.E., Orozco,E., y McKerrow,J.H. (1990). Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. Exp Parasitol **71**, 199-206.
 35. Kerscher,L. y Oesterhelt,D. (1981). The catalytic mechanism of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from Halobacterium halobium. One-electron transfer at two distinct steps of the catalytic cycle. Eur. J. Biochem. **116**, 595-600.
 36. Krysko,D.V., Denecker,G., Festjens,N., Gabriels,S., Parthoens,E., D'Herde,K., y Vandenabeele,P. (2006). Macrophages use different

internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death. Differ.*

37. Kudo,R., Levine,N., Corliss,J., Cox,F., Deroux,G., Grain,J., Honingberg,B., y Leedale,G. (1985). *Protozoología*. (México D.F.: Editorial Continental. S.A.).
38. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
39. Leippe,M., Andra,J., Nickel,R., Tannich,E., y Muller-Eberhard,H.J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* **14**, 895-904.
40. Loftus,B., Anderson,I., Davies,R., Alsmark,U.C., Samuelson,J., Amedeo,P., Roncaglia,P., Berriman,M., Hirt,R.P., Mann,B.J., Nozaki,T., Suh,B., Pop,M., Duchene,M., Ackers,J., Tannich,E., Leippe,M., Hofer,M., Bruchhaus,I., Willhoeft,U., Bhattacharya,A., Chillingworth,T., Churcher,C., Hance,Z., Harris,B., Harris,D., Jagels,K., Moule,S., Mungall,K., Ormond,D., Squares,R., Whitehead,S., Quail,M.A., Rabbinowitsch,E., Norbertczak,H., Price,C., Wang,Z., Guillen,N., Gilchrist,C., Stroup,S.E., Bhattacharya,S., Lohia,A., Foster,P.G., Sicheritz-Ponten,T., Weber,C., Singh,U., Mukherjee,C., El-Sayed,N.M., Petri,W.A., Jr., Clark,C.G., Embley,T.M., Barrell,B., Fraser,C.M., y Hall,N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**, 865-868.
41. Lopez-Revilla,R. y Cano-Mancera,R. (1982). Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. *Infect. Immun.* **37**, 281-285.
42. Luna-Arias,J.P., Hernandez-Rivas,R., de Dios-Bravo,G., Garcia,J., Mendoza,L., y Orozco,E. (1999). The TATA-box binding protein of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and location of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. *Microbiology* **145 (Pt 1)**, 33-40.
43. Marion,S. y Guillen,N. (2006). Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* **36**, 131-139.
44. Marion,S., Laurent,C., y Guillen,N. (2005). Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol.* **7**, 1504-1518.
45. Martinez-Lopez,C., Orozco,E., Sanchez,T., Garcia-Perez,R.M., Hernandez-Hernandez,F., y Rodriguez,M.A. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess

- formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology* **6**, 367-376.
46. McCoy, J.J. y Mann, B.J. (2005). Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* **110**, 220-225.
 47. Meléndez, H M. Clonación del gen de la subunidad B de la ATPasa vacuolar y localización de la proteína en *E. histolytica*. 2004. Departamento de Patología Experimental Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
Ref Type: Thesis/Dissertation
 48. Mellman, I. (1992). The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J. Exp. Biol.* **172**, 39-45.
 49. Mitchison, T.J. y Cramer, L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**, 371-379.
 50. Mora-Galindo, J., Gonzalez-Robles, A., Alvarez, D., Perea-Diaz, F.J., y Naya-Velazquez, F. (2000). Digestion of erythrocytes by *Entamoeba histolytica*. Correlative study with scanning electron microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis. *Arch. Med. Res.* **31**, S181-S182.
 51. Mora-Galindo, J., Naya-Velazquez, F., Ramirez-Romo, S., y Gonzalez-Robles, A. (2004). *Entamoeba histolytica*: correlation of assessment methods to measure erythrocyte digestion, and effect of cysteine proteinases inhibitors in HM-1:IMSS and HK-9:NIH strains. *Exp. Parasitol.* **108**, 89-100.
 52. Moreno-Brito, V., Yanez-Gomez, C., Meza-Cervantes, P., Vila-Gonzalez, L., Rodriguez, M.A., Ortega-Lopez, J., Gonzalez-Robles, A., y Arroyo, R. (2005). A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cellular Microbiology* **7**, 245-258.
 53. Ocadiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L.I., Ortega-Lopez, J., Garcia-Perez, R.M., Sanchez, T., Castillo-Juarez, B.A., Garcia-Rivera, G., y Rodriguez, M.A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* **7**, 221-232.
 54. Okada, M., Huston, C.D., Mann, B.J., Petri, W.A., Jr., Kita, K., y Nozaki, T. (2005). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* **4**, 827-831.
 55. Okada, M., Huston, C.D., Oue, M., Mann, B.J., Petri, W.A., Jr., Kita, K., y Nozaki, T. (2006). Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**, 171-183.
 56. Okada, M. y Nozaki, T. (2006). New insights into molecular mechanisms

- of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. Arch. Med. Res. **37**, 244-252.
57. Orozco E. Virulencia y propiedades de superficie de *Entamoeba histolytica*. 1981. Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
Ref Type: Thesis/Dissertation
 58. Orozco,E., Guarneros,G., Martinez-Palomo,A., y Sanchez,T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. J Exp Med **158**, 1511-1521.
 59. Orozco,E., Rodriguez,M.A., and, y De laCruz-Hernandez,F. (1988). The role of Phagocytosis in the pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. In Amibiasis. (U.S.A.: John Wiley and sons).
 60. Pérez-Tamayo,R. (1989). Patología de la amibiasis.
 61. Petri,W.A., Jr., Chapman,M.D., Snodgrass,T., Mann,B.J., Broman,J., y Ravdin,J.I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. **264**, 3007-3012.
 62. Petri,W.A., Jr., Smith,R.D., Schlesinger,P.H., Murphy,C.F., y Ravdin,J.I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. J Clin Invest **80**, 1238-1244.
 63. Picazarri, K. Identificación y caraterización de moléculas de *Entamoeba histolytica* que interaccionan con EhRabB. 2006. Departamento de Patología Experimental Centro de investigación y de estudios avanzados-IPN. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation
 64. Picazarri,K., Luna-Arias,J.P., Carrillo,E., Orozco,E., y Rodriguez,M.A. (2005). *Entamoeba histolytica*: identification of EhGPCR-1, a novel putative G protein-coupled receptor that binds to EhRabB. Exp. Parasitol. **110**, 253-258.
 65. Pitt,A., Mayorga,L.S., Schwartz,A.L., y Stahl,P.D. (1992). Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. J. Biol. Chem. **267**, 126-132.
 66. Que,X. y Reed,S.L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. **13**, 196-206.
 67. Rabinovitch,M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol **5**, 85-87.
 68. Rabinowitz,S., Horstmann,H., Gordon,S., y Griffiths,G. (1992). Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. J. Cell Biol. **116**, 95-112.

69. Ramakrishnan,G., Ragland,B.D., Purdy,J.E., y Mann,B.J. (1996). Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **19**, 91-100.
70. Ravdin,JI. (2000). Amebiasis. (Londres: Imperial College Press.).
71. Rittig,M.G., Burmester,G.R., y Krause,A. (1998). Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol.* **6**, 384-388.
72. Rodríguez, M. A. Proteínas y genes que participan en la interacción de *Entamoeba histolytica* con la célula blanco. 1990. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D.F. Ref Type: Thesis/Dissertation
73. Rodríguez,M.A., Garcia-Perez,R.M., Garcia-Rivera,G., Lopez-Reyes,I., Mendoza,L., Ortiz-Navarrete,V., y Orozco,E. (2000). An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem. Parasitol* **108**, 199-206.
74. Rodríguez,M.A., Hernandez,F., Santos,L., Valdez,A., y Orozco,E. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**, 87-99.
75. Rodríguez,M.A., Hidalgo,M.E., Sanchez,T., y Orozco,E. (1996). Cloning and characterization of the *Entamoeba histolytica* pyruvate: ferredoxin oxidoreductase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**, 273-277.
76. Rodríguez,M.A. y Orozco,E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **154**, 27-32.
77. Rosales-Encina,J.L., Meza,I.; Lopez-De-Leon,A., Talamas-Rohana,P., y Rojkind,M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* **156**, 790-797.
78. Saito-Nakano,Y., Yasuda,T., Nakada-Tsukui,K., Leippe,M., y Nozaki,T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* **279**, 49497-49507.
79. Sambrook ,J., Fritsch,E.F., y and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.
80. Savage,D.C. y Blumershine,R.V. (1974). Surface-surface associations in microbial communities populating epithelial habitats in the murine gastrointestinal ecosystem: scanning electron microscopy. *Infect Immun.* **10**, 240-250.
81. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2005.

Ref Type: Internet Communication

82. Stanley,S.L., Jr., Becker,A., Kunz-Jenkins,C., Foster,L., y Li,E. (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* **87**, 4976-4980.
83. Swanson,J.A. y Baer,S.C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* **5**, 89-93.
84. Talamas-Rohana,P., Schlie-Guzman,M.A., Hernandez-Ramirez,V.I., y Rosales-Encina,J.L. (1995). T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect Immun.* **63**, 3953-3958.
85. Tanyuksel,M. y Petri,W.A., Jr. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* **16**, 713-729.
86. Tjelle,T.E., Lovdal,T., y Berg,T. (2000). Phagosome dynamics and function. *Bioessays* **22**, 255-263.
87. Trissl,D., Martinez-Palomo,A., de la,T.M., de la,H.R., y Perez de,S.E. (1978). Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* **148**, 1137-1143.
88. Villagomez-Castro,J.C., Calvo-Mendez,C., Vargas-Rodriguez,L., Flores-Carreon,A., y Lopez-Romero,E. (1998). *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp. Parasitol.* **88**, 111-120.
89. Voigt,H. y Guillen,N. (1999). New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* **1**, 195-203.
90. Welter,B.H., Laughlin,R.C., y Temesvari,L.A. (2002). Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem. Parasitol* **121**, 254-264.
91. WHO (1997). WHO. *Weekly Epidemiol. Record* **72**, 97-100.
92. Williams,K., Lowe,P.N., y Leadlay,P.F. (1987). Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. J.* **246**, 529-536.
93. www.dpd.cdc.gov. Centers for Disease Control (CDC), Laboratory Identification of Parasites of Public Healt. 2006.
Ref Type: Internet Communication
94. Young,J.D., Young,T.M., Lu,L.P., Unkeless,J.C., y Cohn,Z.A. (1982).

Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **156**, 1677-1690.

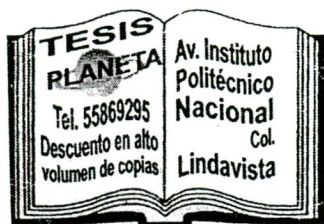
95. Zhang, T. y Stanley, S.L., Jr. (1999). DNA vaccination with the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevents amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine* **18**, 868-874.

Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno



CEL.0445515776025