

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA PROTEÍNA EhCP112
Y SU PARTICIPACIÓN EN LA VIRULENCIA DE *Entamoeba histolytica*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD

DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA

M. EN C. JESÚS RAMÓN OCÁDIZ QUINTANAR

México, D.F.

2005

<u>ÍNDICE</u>	IV
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
AGRADECIMIENTOS	XII
DEDICATORIAS	XIV
<u>RESUMEN</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	2
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1. EPIDEMIOLOGÍA	4
2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	5
3. CICLO DE VIDA	5
4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL TROFOZOÍTO	6
4.1. Membrana plasmática.	7
4.2. Citoplasma.	8
4.3. Núcleo.	10
4.4. Genoma y variabilidad genética en <i>E. histolytica</i>.	10
5. DIFERENCIACIÓN DE LA ESPECIE.	12
6. FACTORES QUE AFECTAN LA VIRULENCIA DE <i>E. histolytica</i>	14
6.1. Factores del huésped.	14
6.2. Factores del microambiente.	14
6.3. Factores propios del parásito.	16
7. BASES BIOLÓGICAS DEL MECANISMO AGRESOR DE <i>E. histolytica</i>	16
7.1. Adhesión.	17
7.2. Citólisis dependiente de contacto.	18
7.3. Fagocitosis.	19
8. PROTEASAS.	21
8.1. Serina proteasas.	22
8.1.1. Serina proteasas en protozoarios parásitos.	23
i) La PfSUB-1 y la PfSUB-2 de <i>Plasmodium falciparum</i>	23
ii) La P76/P68 en <i>Plasmodium</i>	24
iii) Oligopeptidasa B (OPB) en <i>Trypanosoma</i>	24

8.2. Aspártico proteasas. -----	25
8.2.1. Aspártico proteasas en protozoarios parásitos. -----	26
i) Plasmepsina I (PM I) y Plasmepsina II (PMII) de <i>P. falciparum</i> -----	26
8.3. Metalo proteasas. -----	29
8.3.1. Metalo proteasas en protozoarios parásitos. -----	30
8.4. Cisteína proteasas. -----	32
8.4.1. Cisteína proteasas eucariotas -----	35
8.4.2. Cisteína proteasas en protozoarios parásitos. -----	35
i) Cruzaína en <i>T. cruzi</i> . -----	36
ii) CAP5.5 de <i>T. brucei</i> -----	38
iii) Las cisteína proteasa como factores de virulencia en <i>Leishmania</i> . -	39
iv) Cisteína proteasa 2 (CP2) en <i>Giardia lamblia</i> . -----	41
v) CP30 en <i>Trychomonas vaginalis</i> . -----	41
vi) CP65 de <i>T. vaginalis</i> . -----	41
9. CLASIFICACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LAS CISTEÍNA PROTEASAS. -----	42
9.1. Familia tipo legumaina. -----	43
9.1.1. Asparaginil endopeptidasas. -----	45
9.1.2. GPI: transamidadasas. -----	46
9.2. Proteasas tipo papaína. -----	46
10. PAPEL QUE JUEGAN LAS CISTEÍNA PROTEASAS EN LA RELACIÓN	
HUÉSPED PARÁSITO. -----	48
10.1. Nutrición y desarrollo. -----	48
10.2. Invasión del hospedero. -----	49
10.2.1. Invasión celular y de tejidos. -----	50
10.3. Enquistamiento, desenquistamiento, muda y eclosión. -----	51
10.4. Procesamiento de proteínas y activación. -----	52
10.5. Serodiagnósticos, alergias y vacunas. -----	52
10.6. Las cisteína proteasas en la evasión del sistema inmune. -----	53
10.6.1. Degradación de la IgA humana. -----	53
10.6.2. Rompimiento de IgG inmune. -----	55
10.7. Resistencia a la lisis mediada por complemento. -----	55
10.8. Degradación de las anaflatoxinas C3a y C5a. -----	56

10.9. Especificidad de substrato. -----	57
10.10. pH dependientes. -----	57
10.11. Inhibidores de cisteína proteasas como quimioterapia	
antiparasitaria. -----	58
10.11.1. E-64 e inhibidores de péptidos sintéticos -----	60
10.11.2. Efecto de la inhibición por RNA antisentido de cisteína	
proteasas. -----	61
11. CISTEÍNA PROTEASAS COMO FACTORES DE VIRULENCIA EN	
<i>E. histolytica</i> .-----	61
12. LOCALIZACION Y TRÁFICO DE CISTEÍNA PROTEASAS AMIBIANAS -----	62
13. IDENTIFICACIÓN DE CISTEÍNA PROTEASAS EN <i>E. histolytica</i> . -----	63
13.1. Subfamilia EhCP-A. -----	65
13.2. Subfamilia EhCP-B. -----	66
13.3. Subclases: cisteína proteasas tipo Catepsinas L y tipo Catepsinas	
B. -----	66
i). La EhCP1 (<i>acp3</i>), designada como amebapaína	
(Schulte y Scholze, 1989). -----	70
ii) La EhCP2 denominada histolysina (Luaces y Barret, 1988; Tannich	
y col., 1992). -----	70
iii) La EhCP3 (ACP1); (Tannich y col., 1991). -----	71
iv) La enzima EhCP5 fue descrita por Bruchhaus y col., (1996). -----	72
v) Los genes de las EhCP4 y EhCP6, (Bruchhaus y col., 1996). -----	73
vi) Los transcritos de los genes Ehcp7, Ehcp10, Ehcp11, Ehcp12, Ehcp13,	
Ehcp14, Ehcp15, Ehcp18 y Ehcp19 (Bruchhaus y col., 2003). -----	74
<u>ANTECEDENTES DIRECTOS.</u> -----	75
LA ADHESINA DE 112 kDa DE <i>E. histolytica</i>. -----	75
<u>JUSTIFICACIÓN.</u> -----	80
<u>OBJETIVO GENERAL.</u> -----	81
OBJETIVOS ESPECÍFICOS. -----	81
<u>MATERIAL Y MÉTODOS.</u> -----	82
1.- CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE <i>Entamoeba histolytica</i> . -----	82
2.- CULTIVO DE CÉLULAS DE LA LÍNEA MDCK. -----	82

3.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS. -----	82
4.- DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (PRIMERS). -----	83
5.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. -----	83
6.- ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA. -----	84
7.- PURIFICACIÓN DE DNA SEPARADO EN GELES DE AGAROSA. -----	84
8.- RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE DNA. -----	86
9.- CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN EhCP112 EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pRSET A y pTrchis2. -----	86
10.- PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES PARA TRANSFORMACIÓN. -----	87
10.1. Genotipos de cepas de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . -----	87
11.- AISLAMIENTO DEL DNA DEL PLÁSMIDO POR CALOR (MINIPREPARACIÓN). -----	88
12.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE. -----	89
12.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> . -----	89
12.2. Inducción de la expresión de la proteína recombinante. -----	89
12.3. Extracción de proteína. -----	89
12.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. -----	90
12.5. Tinción de geles de poliacrilamida. -----	90
12.6. Purificación de la proteína rEhCp112 por cromatografía de afinidad, condiciones desnaturalizantes. -----	90
12.7. Purificación de la proteína rEhCP112 por electroelución. -----	91
13.- INMUNIZACIÓN Y ELISA. -----	92
14.- INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT). -----	93
15.- MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA Y CONFOCAL. -----	94
16.- PROCESAMIENTO Y ACTIVACIÓN DE LA PRE-PROENZIMA EhCP112. -----	95
17.-ELECTROFORESIS EN GELES DE SUSTRATO, POLIACRILAMIDA–SDS CON GELATINA. -----	95
18.- EFECTO CITOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS AMIBIANOS. -----	96
19. -UNIÓN DE rEhCP112 A ERITROCITOS (ENSAYOS DE LIGANDO). -----	97

<u>RESULTADOS.</u> -----	98
AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>Ehcp112</i>. -----	98
CLONACIÓN EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pRSET A y pTrcHis2. -----	100
INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. coli</i>. -----	105
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE (rEhCP112). -----	108
1. EhCP112 FORMA PARTE DE LA ADHESINA DE 112kDa DE <i>E. histolytica</i>. -	110
1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE. -----	110
1.2. PAGE – INMUNOTRANSFERENCIA (Western Blot). -----	112
1.3. LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EhCP112 (rEhCP112) ES RECONOCIDA POR SUEROS DE PACIENTES CON AMIBIASIS. -----	112
1.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE EhCP112. -----	114
1.5. COLOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EhCP112 Y EhADH112. -----	117
2. LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EhCP112 PRESENTA ACTIVIDAD DE PROTEASA. -----	117
2.1. rEhCP112 ES ACTIVA EN UN AMPLIO RANGO DE pH Y TEMPERATURA. -----	122
2.2. rEhCP112 DEGRADA COLÁGENO TIPO I, FIBRONECTINA Y DESTRUYE MONOCAPAS DE CELULAS MDCK. -----	122
3. rEhCP112 SE UNE A LA CÉLULA BLANCO. -----	124
3.1. rEhCP112 SE UNE A ERITROCITOS Y DIGIERE HEMOGLOBINA HUMANA. -----	124
<u>DISCUSIÓN</u> -----	128
<u>CONCLUSIONES</u> -----	135
<u>PERSPECTIVAS</u> -----	136
<u>REFERENCIAS</u> -----	137
<u>ANEXOS</u> -----	165
ANEXO 1 -----	167
ANEXO 2 -----	181

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Diagrama que representa la interacción del sustrato con el sitio activo de una cisteína proteasa.
- Fig. 2.** Diagrama esquemático de la superfamilia de cisteína proteasas.
- Fig. 3.** Genes de la adhesina de 112 kDa de *E. histolytica*.
- Fig. 4.** Alineamiento de la secuencia de EhCP112 con otras cisteína proteasas.
- Fig. 5.** Construcción de los plásmidos pTrcHis2/*Ehcp112*.
- Fig. 6.** Amplificación de tres fragmentos del gen *Ehcp112* por medio de PCR.
- Fig. 7.** Clonación de fragmentos del gen *Ehcp112* en vectores de expresión pRSET y pTrcHis2.
- Fig. 8a.** Secuencias alrededor del sitio de clonación en las construcciones II (pRSET- proenzima) y III (pRSET-enzima) en el vector pRSET.
- Fig. 8b.** Secuencias del sitio de clonación en las construcciones II his (pTrcHis2- proenzima) y III his (pTrcHis2-enzima).
- Fig. 9.** Cinética de expresión y purificación de la preproenzíma.
- Fig. 10.** Inducción y Expresión de la proenzima.
- Fig. 11.** Purificación de la proteína EhCP112.
- Fig. 12.** Título y especificidad del anticuerpo policlonal AbEhCP112, por ELISA.
- Fig. 13.** Reconocimiento de las proteínas recombinantes de EhCP112 por el Mab 5.
- Fig. 14 .** Inmunogenicidad de EhCP112.
- Fig. 15 .** Inmunolocalización de la proteína EhCP112 en trofozoítos de *E. histolytica*.
- Fig. 16.** Colocalización de las proteínas EhCP112 y EhADH112 mediante microscopía confocal.
- Fig. 17.** Actividad proteolítica de la proteína recombinante EhCP112 tratada con pepsina.
- Fig. 18.** Actividad proteolítica de la proteína rEhCP112.
- Fig. 19.** rEhCP112 tiene actividad a diferentes pHs y temperaturas.
- Fig. 20.** rEhCP112 tiene actividad en colágeno tipo I, fibronectina y monocapas de células MDCK.
- Fig. 21.** rEhCP112 se adhiere a eritrocitos y digiere hemoglobina.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGNP	Amplificación génica no programada
CTE	Extensión C-terminal
DFP	Diisopropil fluorofosfato
DKO	Knockout dobles
DTT	Ditiotreitol
E64	L–trans–epoxisuccini–leucil– mido (4-guanidino–butano)
EhADH112	Adhesina del complejo EhCPADH de <i>E. histolytica</i> .
<i>Ehcp112</i>	Gen que codifica para la proteasa EhCP112
EhCP112	Cisteína proteasa del complejo EhCPADH de <i>E. histolytica</i> .
EhCPADH	Complejo formado por EhCP112 y EhADH112
ER	Retículo endoplásmico
ERFNIN	Motivo Glu, X ₃ Arg, X ₂ , (Ile/Val), Phe, X ₂ , Asn, X ₃ , Ile, X ₃ , Asn
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
MDCK	Madin Darby Cell Kidney, línea celular aislada del riñón de perro
MET	Microscopia electrónica de transmisión
NEM	N-etilmaleimida
OPB	Oligopeptidasa B
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHMB	p-hidroximercuribenzoato
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
pRSETA	Vector de expresión de 2.9 Kb (plásmido)
pTrcHis2C	Vector de expresión de 4.4 Kb (plásmido)
TLCK	n-p-tosil-L-lisin clorometilcetona

Este trabajo se realizó en el Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Esther Orozco Orozco y del Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma muy especial a la Dra. Esther Orozco Orozco por la dirección de este trabajo, por el apoyo y la confianza depositada en mi para alcanzar esta meta.

Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez por la dirección de esta tesis, por su apoyo incondicional, su disponibilidad en todo momento y su confianza.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por su apoyo, confianza, sugerencias, disposición y participación en todas mis tesis (Licenciatura, Maestría y Doctorado).

A la Dra. Rossana Arroyo Verástegui por su apoyo, participación, observaciones y sugerencias que enriquecieron a todas mis tesis (Licenciatura, Maestría y Doctorado).

Al Dr. Juan Pedro Luna Arias, por su participación, observaciones y sugerencias muy valiosas.

Al Dr. Guillermo Pérez Ishiwara por su amistad, apoyo, participación, observaciones y sugerencias que me permitieron completar esta tesis.

A la Dra Consuelo Gómez García por su participación, observaciones, sugerencias y constantes aportaciones.

A la Química Rosa María García por su colaboración, participación, confianza, apoyo y tiempo que permitieron completar este proyecto.

Al Sr. Alfredo Padilla Barberi por su amistad, apoyo, disponibilidad y participación en el trabajo técnico realizado en este trabajo.

Al Biólogo Eduardo Carrillo por su amistad, colaboración, disponibilidad, apoyo y participación en este trabajo.

Al Sr. Alberto García y Alejandrina Reyes por su apoyo técnico.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos que han formado parte del equipo de la Doctora Esther Orozco Orozco de los Departamentos de Genética y Biología Molecular, y Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. A ellos, de los que aprendí y compartí parte de mi vida:

A Fidel de la Cruz Hernández, Mario Alberto Rodríguez, Rossana Arroyo, Arturo Chavoya, Miguel Angel Vargas, Rosaura Hernández, Jesús Valdés, Francisco Solis, Ma. Eugenia Hidalgo, Margarita Leyva, Patricia Ayala, Eduardo Flores, Leobardo Mendoza, Claudia Montiel, Dulce Ma. Delgadillo, Guadalupe de Dios, Consuelo Gómez, Guillermo Pérez, Guzmán Sanchez, Xochitl Madríz, Israel López, Carolina Martínez, Juan Pedro Luna, Esther Herrera, Cecilia Bañuelos, Laurence Marchat, César López, Rima Gharaibeh, Beatriz Adriana Castillo, Tomás Sánchez, Alejandrina Reyes, Alberto García, Alfredo Padilla, Eduardo Carrillo, David Ricardo Orozco, Rosa María García, Mónica Romero y a todos aquellos que haya omitido. Gracias por su amistad.

A mis compañeros del C.I.C.A.T.A., esperando que continuen y triunfen.

A mis compañeros de la Facultad de Estudios Superiores Campus Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al C.I.C.A.T.A. y a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional.

Dedico esta tesis a lo que más quiero en la vida

A mis hijos

Iris Gabriela, Oscar Saíd y Jesús Ramón

Por ser mi inspiración y mi razón de ser,

gracias por su paciencia, amor y comprensión

A mi esposa

Bertha Lilia Ruiz Domínguez

*Por su amor, paciencia y constantes palabras de aliento
que siempre me han impulsado a continuar.*

A mis Padres

Bertha Quintanar Pérez (†)

Por tu Amor infinito y Dedicación

Te extraño mucho

Jesús Ocadíz Guerrero

Por tu Dedicación, Amor y Ejemplo

Gracias por todo

A mis hermanos

Silvia, María Isabel, Miguel Ángel y Juan Pablo

Por compartir origen y vida

Gracias, siempre están en mi corazón

RESUMEN

En este trabajo el gen *Ehcp112* de *Entamoeba histolytica*, el cual codifica una proteína con homología a cisteína proteasas, se subclonó, se expresó en bacterias y se caracterizó la actividad enzimática. Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tres fragmentos del gen *Ehcp112*: a) el gen completo de 1338 pb (preproenzima); b) un fragmento de 1281 pb que no codifica al péptido señal (proenzima); y c) un fragmento de 984 pb que codifica sólo la secuencia de la proteasa madura. Posteriormente, los fragmentos amplificados se clonaron en los vectores de expresión pRSETA y pTrcHis2C. Con las construcciones obtenidas se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21 (DE3) pLys E. Las construcciones que codifican la preproenzima y la proenzima expresaron las proteínas recombinantes del peso molecular esperado en bacterias inducidas con IPTG. El anticuerpo monoclonal 5 (Mab5) que está dirigido contra el complejo EhCPADH, reconoció a la proteína EhCP112, mediante ensayos de "Western blot". La proteína recombinante de la proenzima mostró actividad proteolítica sobre diferentes sustratos biológicos como gelatina, fibronectina, colágeno y hemoglobina en amplios rangos de temperatura que van desde 4 hasta 65 °C y de pH desde 3 hasta 9, sugiriendo que pudiera participar en la citopatogenicidad de *E. histolytica*. La rEhCP112 se purificó mediante columnas de afinidad a Ni²⁺ y se inmunizó en conejos para obtener anticuerpos policlonales (AbEhCP112), los cuales mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal localizaron a la proteína EhCP112 uniformemente distribuida en la membrana plasmática así como también en algunas vacuolas. Además, al utilizar anticuerpos policlonales AbEhADH112 se pudo observar una colocalización de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en la membrana de los trofozoítos amibianos, confirmando así que la adhesina de 112 kDa es un complejo ahora denominado EhCPADH, formado por estas dos proteínas.

ABSTRACT

In this work the *Entamoeba histolytica* *Ehcp112* gene, which codify a protein with homology to cysteine proteases, was subcloned, expressed and characterized. The primers were designed to amplify by means of the polymerase chain reaction (PCR), three fragments of the gene *Ehcp112*: a) the whole gene of 1338 pb (preproenzyme); b) a fragment of 1281pb that not codify to the signal peptide (proenzyme); and c) a fragment of 984 pb that codifies only the mature protease sequence. Later, the amplified fragments were cloned in the pRSETA and pTrcHis2C expression vectors. With the obtained constructions we transform bacteria *Escherichia coli* of strain BL21 (DE3) pLys E. The constructions that codify the preproenzima and the proenzyme expressed recombinant proteins with the expected molecular weight in IPTG induced bacteria. Monoclonal antibody 5 (Mab5) that was directed against the EhCPADH complex, recognized the EhCP112 protein by Western blot. The recombinant protein of the proenzyme (rEhCP112) showed proteolytic activity on different biological substrates as gelatin, fibronectin, collagen and hemoglobin in wide temperature ranges from 4 to 65 °C and pH from 3 to 9, suggesting that EhCP112 participate in the citopatogenicity of *E. histolytica*. rEhCP112 was purified by means of Ni²⁺-affinity columns and it was immunized in rabbits to obtain policlonal antibodies (AbEhCP112). The AbEhCP112 antibodies by means of immunofluorescencia assays and confocal microscopy recognized the EhCP112 protein uniformly distributed in the plasma membrane, as well as in some vacuoles. In addition, when we used policlonal antibodies against the adhesion domain of EhADH112 a collocation of the proteins EhCP112 and EhADH112 in the membrane of the amebic trofozoites was observed, confirming that the adhesin of 112 kDa is a complex, now called EhCPADH, formed by these two proteins.

INTRODUCCIÓN

En los países en vías de desarrollo, las deficientes condiciones de sanidad e higiene debidas al bajo nivel socioeconómico permiten la infección y propagación de una variedad de parásitos intestinales.

La amibiasis es la enfermedad infecciosa del ser humano causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Esta especie vive regularmente como comensal en el lumen intestinal, aunque por factores aún desconocidos puede invadir la mucosa, llegando incluso a diseminarse a otros órganos por vía sanguínea, principalmente al hígado y, con menos frecuencia, a pulmón, cerebro, piel, genitales, bazo y riñón (Martínez-Palomo, 1982). Este protozooario entérico infecta al 10% de la población mundial, produciendo la amibiasis intestinal y el absceso hepático amibiano, causando por lo menos 100,000 muertes cada año (WHO, 1997).

E. histolytica es un organismo eucariótico muy adaptado a su vida parasitaria. Anteriormente se pensaba que las amibas carecían de la mayoría de los organelos encontrados en células eucariotas típicas. Sin embargo, recientemente se ha encontrado por microscopía confocal, quitinasa retenida en un sistema membranal semejante al retículo endoplásmico y al complejo de Golgi (Ghosh y col, 1999), por otro lado, este complejo ha sido identificado también mediante microscopía electrónica de transmisión empleando tiaminopirofosfatasa (Mazzuco y col, 1997). Además, utilizando naranja de acridina y por hibridación *in situ* de trofozoítos con una sonda de rDNA, se ha detectado en trofozoítos vivos DNA citoplásmico en una estructura denominada EhKO (Orozco y col, 1997). Por otro lado, se ha reportado un organelo análogo a la mitocondria, basándose en la presencia de una proteína de origen mitocondrial como la chaperonina 60, en trofozoítos vivos de *E. histolytica* (Mai y col, 1999; Tovar y col, 1999).

1. EPIDEMIOLOGÍA.

La amibiasis se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo. Aproximadamente el 10 % de la población mundial es portadora del parásito, aunque sólo un pequeño porcentaje presenta síntomas. Esta infección presenta una morbilidad y mortalidad elevada, lo que le permite ser clasificada como la segunda enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial, precedida sólo por la malaria (WHO, 1997). En 1984 se estimó que cerca de 500 millones de personas estaban infectadas con este parásito, de las cuales 40 millones presentaron colitis o abscesos hepáticos y al menos 40, 000 personas murieron de amibiasis en ese año (Walsh, 1988).

La amiba es un parásito cosmopolita, encontrado con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales, y está relacionado a condiciones de sanidad deficientes, a la pobreza, la ignorancia y la mala nutrición del individuo (Cook, 1990).

En México, la amibiasis es una enfermedad endémica y es considerada un grave problema de salud pública, puesto que se encuentra entre las diez causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales (Conde-Bonfil y Mora-Zherpa, 1992). Caballero y Salcedo (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. La prevalencia es más alta en niños de edad escolar (Cifuentes y col., 1994).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (1999) reportó que en México la variación de frecuencia en casos de amibiasis es de entre el 13 y 47 %, empleando varias técnicas de diagnóstico y varios subgrupos poblacionales. En 1999, los estados de Veracruz, Chihuahua, Guerrero y Chiapas ocuparon los primeros lugares en índice de amibiasis intestinal. Sin embargo, la formación de abscesos hepáticos ha aumentado, presentándose con mayor incidencia en los estados de Veracruz, Sinaloa y Guerrero, en donde predomina un

clima cálido, apto para el desarrollo de esta parasitosis (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 1999).

En una revisión de reportes publicados de amibiasis invasiva y estudios de parasitología desde 1929 – 1997 se encontró que la amibiasis invasiva (disentería, absceso hepático, perforación colónica, peritonitis, apendicitis y ameboma) mostró una proporción mayor en hombres que en mujeres (3.2:1); sin embargo, la infección asintomática está igualmente distribuida entre ambos géneros (Acuña-Soto y col., 2000).

2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Inicialmente, se pensaba que *E. histolytica* había divergido de los eucariotes antes de la adquisición de mitocondrias y de 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 eucariotes actuales (Clark y Roger, 1995).

E. histolytica pertenece al phylum de los *Rhizopodos* cuya característica principal es la presencia de pseudópodos en algún estado de su vida y a la familia de los *Entamoebidae* cuyos miembros son todos parásitos.

3. CICLO DE VIDA.

E. histolytica presenta dos fases principales en su ciclo de vida. El quiste que es la fase infectiva, es inmóvil y resistente a los cambios ambientales, está rodeado por una pared quitinosa, es tetranucleado con un cariosoma central (Martínez-Palomo, 1982). El trofozoíto que es la fase invasiva, vive adherido a la mucosa de la parte terminal del intestino delgado y de la mucosa del intestino grueso, en donde se alimenta de residuos alimenticios, bacterias y células del huésped.

El humano se infecta al ingerir quistes que viajan por el aparato digestivo hasta el íleon donde desenquistan y dan lugar a un protoplasto desnudo tetranucleado. Cada uno de los núcleos se divide y el protoplasto da origen a ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados, los cuales migran al ciego y se adhieren a la mucosa intestinal del intestino delgado y grueso, y se dividen por fisión binaria. Los trofozoítos pueden seguir cualquiera de las siguientes vías: i) vivir en el intestino como comensales; ii) enquistarse; iii) invadir la mucosa intestinal y producir desde síntomas leves hasta disentería grave; iv) invadir otros órganos, lo que les impide completar su ciclo de vida, ya que no regresan al lumen del intestino, v) salir al ambiente con las heces para morir inmediatamente debido a su poca resistencia a las condiciones atmosféricas. El enquistamiento se realiza en el lumen del intestino y cuando éste madura, aparecen cuatro núcleos y el ciclo de vida se completa con la expulsión del quiste con las heces al medio ambiente, donde resiste las condiciones externas, hasta que infecta un nuevo huésped (Martínez-Palomo, 1989). Los mecanismos moleculares que definen cuál vía seguirán los trofozoítos se desconocen casi en su totalidad.

4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL TROFOZOÍTO.

Este parásito se diferencia de los procariotes por tener el núcleo organizado, posee un genoma complejo y presenta la superficie constituida por una sola membrana plasmática. En el laboratorio se trabaja únicamente con la fase trofozoítica, ya que no ha sido posible propagar los quistes en cultivo. Los trofozoítos se cultivan en el medio axénico (sin bacterias) TYI-S-33 descrito por Diamond en 1978 y éstos no enquistan espontáneamente, ni existe un método adecuado y reproducible para lograr el enquistamiento.

El trofozoíto mide de 8 – 40 μm , es pleomórfico y muy dinámico, se desplaza por medio de la formación de pseudópodos y filópodos, y presenta un uroide en la parte posterior. Es altamente sensible a los cambios de temperatura, pH y osmolaridad. Su citoesqueleto está

formado por actina, miosina y tubulina. Los filamentos de actina F se detectan en la parte posterior de los trofozoítos, en el uroide y en las “bocas fagocíticas” mientras que la actina despolimerizada (actina G) se concentra en los pseudópodos (Bailey y col., 1992). Se sugiere que la actina tiene un papel importante en la patogenicidad del parásito (De la Garza y col., 1989), ya que una vez que ocurre la adhesión se induce una rápida polimerización de filamentos de actina (Guillen, 1996).

4.1. Membrana plasmática.

La membrana de *E. histolytica* es similar a las membranas celulares de eucariotes superiores. La composición de lípidos difiere cualitativa y cuantitativamente de la de las células de mamífero, en las amibas predominan los lípidos que contienen etanolamina sobre los que contienen colina, la fosfatidilcolina se encuentra en grandes cantidades y además se encuentra un fosfolípido poco usual, la ceramida aminoetil fosfonato (Aley y col., 1980). La membrana plasmática es diferente en composición fosfolipídica de las membranas vesiculares, en estas últimas predomina la ceramida aminoetil fosfonato y los niveles de fosfatidilcolina son menores (Aley y col., 1980). La ceramida aminoetil fosfonato es un fosfolípido resistente a la hidrólisis enzimática, que probablemente protege al trofozoíto de las enzimas del aparato digestivo (Martínez-Palomo, 1986). Esta composición de lípidos podría explicar en parte la notable plasticidad y elasticidad de las membranas amibianas (Cerbón y Flores, 1981). La superficie de las amibas contiene carbohidratos como glucosa y manosa (Martínez-Palomo, 1986). Aley y col., (1980) obtuvieron doce glicoproteínas de membrana plasmática con pesos moleculares de 12, 000 a 200, 000 kDa.

La membrana plasmática del trofozoíto presenta una gran plasticidad, permitiendo así la continua producción de pseudópodos y el recambio constante de membrana observado durante la endocitosis y la exocitosis (Martínez-Palomo, 1986). La formación de parches y

“Caps”, es un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, además muestra un movimiento lateral y selectivo de las moléculas de la membrana (Calderón y col., 1980). El movimiento de estas moléculas se activa con la presencia de ligandos como anticuerpos o lectinas (Calderón y col., 1980; Martínez-Palomo y col., 1973) y de células que le sirven a la ameba de alimento (Ravdin y Guerrant, 1981). El movimiento lateral y selectivo de las moléculas sugiere una acelerada síntesis de componentes de la membrana, ya que el casquete puede ser endocitado o desprendido de la célula con la consecuente pérdida de proteínas y otras moléculas (Aust Kettis y Sunquist, 1980; Calderón y col., 1980). Sin embargo, se ha visto que durante el proceso de formación de casquetes la ameba sigue exponiendo nuevos antígenos en toda la membrana celular (Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 1991).

En la membrana plasmática se llevan a cabo varios eventos importantes para el establecimiento del parásito en su huésped como son: la formación del casquete para eliminar los anticuerpos o ligandos del huésped, la adhesión del trofozoíto con la célula blanco y como consecuencia de ésta, el efecto citopático dependiente de contacto, la fagocitosis, la presencia del amebaporo ó proteína que produce daño a la membrana de la célula huésped y la secreción de proteasas que producen daño en el huésped.

4.2. Citoplasma.

El citoplasma de los trofozoítos de *E. histolytica* comparte características de procarionte y eucarionte. El posible complejo de Gogi identificado por Ghosh y col., (1999) consiste de vesículas de diferente tamaño sensibles a brefeldina A y vesículas perinucleares grandes, por lo que estos autores concluyeron que la vía secretora en los trofozoítos tiene gran similitud con las de las células eucariotas típicas.

En el citoplasma existen vacuolas de diferentes tipos: endocíticas, fagocíticas, exocíticas y autofágicas, además de lisosomas primarios y secundarios (Martínez-Palomo, 1989). El

tamaño de las vacuolas varía desde menos de 0.1 hasta 10 μm (Proctor y Gregory, 1973), su función y contenido celular se desconoce. Los lisosomas se identificaron por la presencia de fosfatasa ácida, pero no existen marcadores moleculares para identificar a cada una de las vacuolas (Kobayashi y col., 1982). Aunque diversas ATPasas pequeñas de la familia Rab, pudieran actualmente ser usadas como marcadores para esas vesículas (Rodríguez y col., 2000, Saito-Nakano y col., 2005).

En el citoplasma de *E. histolytica* se presentan ribosomas con arreglos helicoidales de tamaño aproximado de 300 nm de largo y 40 nm de diámetro (Kress y col., 1971). Estos arreglos helicoidales ribosomales se compactan y forman los cuerpos cromatoides, los cuales aparecen principalmente en trofozoítos crecidos en medios bifásicos y en quistes, estas hélices ribosomales se encuentran asociadas a vacuolas digestivas y en ocasiones a cisternas membranosas (Morgan y col., 1968).

Anteriormente la ausencia de mitocondrias en este parásito era aceptada. Sin embargo, Orozco y col., (1997) encontraron DNA citoplásmico de trofozoítos de *E. histolytica* en una estructura que llamaron EhkO (*E. histolytica kinetoplast-like organelle*), el tamaño de estas estructuras es de aproximadamente 2.5 μm de diámetro. El DNA del EhkO tiene secuencias de genes ribosomales y su arreglo es en rosetas y círculos complejos (Orozco y col., 1997). En su membrana plasmática y en los EhkOs, se encuentra la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (Rodríguez y col., 1998).

Por otra parte, la chaperonina 60 (Hsp60), una proteína de origen mitocondrial se ha encontrado en una estructura llamada mitosoma (Tovar y col., 1999). Paralelo a este reporte Mai y col., (1999) encontraron un organelo análogo a mitocondria al cual denominaron "criptón". Al ser inducidos los trofozoítos por una incubación a 42 °C, se encontraron grandes cantidades de la proteína Hsp60 y de su transcrito (Mai y col., 1999). Es probable que tanto el mitosoma

como el criptón (Tovar y col., 1999 y Mai y col., 1999), correspondan a la estructura denominada EhkO (Orozco y col., 1997).

4. 3. Núcleo.

El núcleo es el único organelo bien definido en *E. histolytica*. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) y criofractura, muestran a la membrana nuclear formada por una bicapa lipídica con poros (Martínez-Palomo, 1982). El trofozoíto generalmente tiene un núcleo que mide de 4 a 7 μm . Albach y col., (1980) demostraron, utilizando experimentos de incorporación de [^3H]-uridina, que la pericromatina tiene tanto DNA como RNA y que ahí es donde se lleva a cabo la síntesis de RNA.

4. 4. Genoma y variabilidad genética en *E. histolytica*.

E. histolytica presenta una gran variabilidad fenotípica tanto en cepas como en clonas. Los trofozoítos en cultivo cambian frecuentemente de fenotipo, pierden la virulencia cuando se cultivan en medio axénico (Phillips y col., 1973), la cual recuperan al ser inoculados en hígado de hámster (Lushbaugh y col., 1978; Orozco y col., 1983), pueden aumentar o disminuir su capacidad de fagocitosis y presentar resistencia variable a la lisis por complemento humano (Calderón y Tovar Gallegos, 1986). Clonas obtenidas de una misma población también presentan estos cambios (Baca, 1991), lo cual indica la gran variabilidad genética en este parásito (Orozco y col., 2000).

El genoma de *E. histolytica* presenta un bajo contenido de G + C (22.4 %), está compuesto de cromosomas lineales y DNA circular de diferentes tamaños que van desde 5 a 60 kb (Orozco y col., 1997). Uno de los círculos más estudiados es una molécula de DNA de 25 kb, que corresponde al episoma ribosomal (Bhattacharya y col., 1989; Huber y col., 1989).

La amplificación genética no programada (AGNP), en células de mamífero transformadas ocurre por la presencia de secuencias palíndricas y repetidas, que originan

múltiples copias de genes y heterogeneidad genética (Báez-Camargo y col., 1996). *E. histolytica* posee un genoma rico en A + T con abundantes palíndromos y repetidos, así como una gran heterogeneidad genética entre clonas relacionadas genéticamente, por lo que se piensa que en este parásito también se presenta la AGNP (Báez-Camargo y col., 1996). Muestras de DNA de *E. histolytica* obtenidas por electroforesis de campos pulsados, mostraron formas clásicas del modelo de piel de cebolla de AGNP, tales como asas, burbujas, círculos concéntricos, estructuras en forma de mariposa y rosetas (Orozco y col., 1997).

La variación del contenido de DNA en trofozoítos de cultivo ha sido reportado por varios grupos, la cual puede ser debido al nivel de ploidía, repetidos de DNA y la heterogeneidad en células cultivadas axénicamente (Mackenstedt y col., 1990; López-Revilla y Gómez, R., 1978).

Se ha reportado que el tamaño del genoma haploide de los trofozoítos de *E. histolytica* es aproximadamente 0.33 pg ($10^{7.5}$ pb) y su contenido de DNA nuclear en fase semi-log es de 0.45 pg, lo que indicaría que la amiba pudiera tener una ploidía de 14 n. Sin embargo, varios grupos han encontrado que la cantidad de DNA de cepas y clonas cultivadas axénicamente varía (Albach, 1989; López-Revilla y Gómez, 1978). El contenido de DNA también ha sido determinado por análisis de citometría de flujo y se encontró que este parásito es hipoploide durante la fase exponencial de crecimiento, ya que tiene 20 % menos de DNA con respecto a la obtenida durante la fase diploide, la cual según estos autores es de 0.24 pg de DNA por célula (Dvorak y col., 1995).

La variación en el contenido de DNA puede ser debido a varios factores, como son la presencia de secuencias repetidas de DNA, las cuales juegan un papel importante en la recombinación genética de protozoarios parásitos (Lanzer y col., 1995) y en la regulación de genes como sucede en muchos organismos (Van Belkum y col., 1998) y por otro lado, la amplificación de algunos segmentos de DNA no identificados con precisión.

5. DIFERENCIACION DE LA ESPECIE.

E. histolytica presenta un comportamiento poco común, ya que con frecuencia actúa como comensal y menos habitualmente como invasor. Muchos autores plantean la existencia de dos especies, una no patógena llamada *E. dispar* y otra patógena denominada *E. histolytica* (Clark, 1998; Diamond y Clark, 1993). Así, de acuerdo a esta hipótesis, los portadores asintomáticos estarían infectados por la especie no patógena, incapaz de causar enfermedad y los pacientes con amibiasis invasiva estarían infectados por la especie patógena.

Sargeant y col, (1982) apoyan la existencia de dos especies, ya que observaron que las cepas obtenidas de pacientes con amibiasis invasora tienen distinto zimodemo (patrón electroforético de un conjunto de isoformas enzimáticas) a las cepas no patógenas.

Varias moléculas permiten distinguir entre trofozoítos patógenos y no patógenos. Entre éstas se encuentran: el antígeno de superficie de 29 kDa (Reed y col., 1992), la proteína inmunodominante de 96 kDa presente sólo en cepas patógenas y que es reconocida por sueros de pacientes con amibiasis sintomática, los cuales no reconocen lisados de amibas no patógenas (Torian y col., 1990). El antígeno de 30 kDa identificado por Tachibana y col., (1990) y Torian y col., (1990) es distinto entre cepas patógenas y no patógenas. También se han encontrado diferencias en las secuencias de genes que codifican algunas proteínas como en el antígeno de superficie de 125 kDa. Este es un gen que presenta una diferencia del 13 % en su secuencia entre amibas patógenas y no patógenas (Tannich y col., 1989).

El complejo EhCPADH, antes reportado como la adhesina de 112 kDa, es una molécula que no se expresa o es deficiente en mutantes no virulentas de cepas patógenas (Rodríguez y Orozco, 1986). Vargas y Orozco (1993) encontraron que esta molécula tampoco se expresa en la cepa MAV1 aislada de un portador asintomático, cuando se cultiva en medio polixénico y

tiene zimodemo no patógeno. Sin embargo, cuando la clona MAV1 se axenizó, su zimodemo cambió a patógeno y los anticuerpos reconocieron a la adhesina de 112 kDa.

Por tanto, estos marcadores sugieren una diferencia biológica acentuada entre cepas patógenas y no patógenas, y apoyan la existencia de dos especies. Sin embargo, existen reportes que indican que los zimodemos no son estables, pues varían con las condiciones de cultivo (Mirelman y col., 1986; Andrews y col., 1990; Vargas y Orozco, 1993). Al modificarse el zimodemo, parece modificarse también la expresión de algunas de las moléculas que participan en el reconocimiento de la célula blanco (Vargas, 1994) y de algunas secuencias de DNA (Garfinkel y col., 1989). Además, se han logrado amplificar algunos de los genes reportados como exclusivos de cepas patógenas, en cepas no patógenas (Vargas, 1994).

Algunos autores han propuesto que las diferencias moleculares observadas entre cepas patógenas y no patógenas se deben a interconversiones fenotípicas de cepas no patógenas a patógenas dentro de una misma especie, que pueden incluir desde modulaciones en la expresión de ciertos genes hasta amplificaciones y arreglos génicos (Spice y Ackers, 1992; Mirelman y col., 1993; Orozco y col., 1993b). Orozco y col., (1985) aislaron de la cepa heterogénea HM1:IMSS trofozoítos altamente agresivos y otros que son incapaces de adherir y/o fagocitar eritrocitos. También, se ha demostrado que luego de una exposición prolongada de los trofozoítos a suero al 20 % se pueden aislar amibas resistentes a la acción del complemento (Calderón y Tovar Gallegos, 1986; Baca, 1991) y después de clonaciones sucesivas y crecimiento durante varias generaciones de esta población clonal ocurre una gran variabilidad en el fenotipo de resistencia a complemento (Baca, 1991).

El desconocimiento de la complejidad del genoma amibiano y sus mecanismos de expresión, así como los cambios espontáneos que sufren las amibas en cultivo en varios fenotipos, ponen en duda la propuesta de las dos especies para explicar la diferencia en la

virulencia de las amibas e implican la necesidad de obtener más evidencias experimentales antes de hacer conclusiones definitivas.

6. FACTORES QUE AFECTAN LA VIRULENCIA DE *E. histolytica*.

Es difícil todavía de explicar por qué algunas cepas amibianas son capaces de invadir tejidos del hospedero, mientras que otras permanecen en la luz del intestino sin producir daño aparente. No se conocen con exactitud los factores que determinan la invasión epitelial por parte de microorganismos patógenos, pero se sabe que intervienen factores del huésped, del microambiente y del parásito (Cook, 1990).

6.1. Factores del huésped.

Factores del huésped como el aspecto nutricional, el inmunológico, el fisiológico y el genético, intervienen para favorecer o impedir una infección amibiana (Pérez-Tamayo y Brandt, 1971). En el desarrollo de la enfermedad es importante la dieta, ya que la intensidad de la amibiasis disminuye con una dieta rica en proteínas y aumenta con una dieta rica en carbohidratos (Ravdin, 1986). La carencia de vitamina B y C también favorece el desarrollo de esta parasitosis (Pérez-Tamayo, 1989). Así mismo, un aumento en el colesterol sérico se asocia con la incidencia de lesiones extraintestinales y de abscesos hepáticos (Ravdin, 1986). El sexo y la edad también son factores de riesgo en la amibiasis, ya que en el hombre el absceso hepático amibiano es tres veces más frecuente que en mujeres, mientras que el 30 % de los casos pediátricos se presentan en niños menores de dos años (Ravdin, 1986). El estrés y el estado inmunológico determinan en cierto grado la susceptibilidad de los individuos a la amibiasis (Kretschmer, 1989).

6.2. Factores del microambiente.

En la interacción parásito-célula blanco, los factores del microambiente, permiten o dificultan la colonización del tejido del parásito. Dentro de estos se incluyen a la flora intestinal,

a la mucosidad que reviste al epitelio, los estrechos rangos de temperatura, humedad, pH y la concentración de ciertos elementos nutricionales (Pérez-Tamayo, 1989).

La interacción de los trofozoítos con las bacterias se ha reportado como un fenómeno altamente específico, en el que intervienen componentes de la superficie de *E. histolytica* con actividad de lectina y residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina presentes en la superficie de las bacterias (Bracha y col., 1982; Kobilier y Mirelman, 1980). La virulencia de la amiba se ve incrementada por el contacto con bacterias y también se ha correlacionado con la presencia de receptores para manosa y con la actividad de catalasa de algunas cepas bacterianas (Bracha y Mirelman, 1984). Sin embargo, el aumento de la virulencia de los trofozoítos amibianos se da con la presencia de bacterias intactas, ya que lisados bacterianos y bacterias atenuadas por calor o por irradiación no tienen efecto sobre la virulencia, sugiriendo de esta manera que el mecanismo potenciador no se limita a la participación de unas cuantas moléculas, sino que es de mayor complejidad (Mirelman y col., 1983).

La interacción de bacterias *E. coli* de la cepa 055 irradiadas, hasta completa inactivación, con luz ultravioleta con trofozoítos de cepas con diferente grado de virulencia mostró un efecto activador de la virulencia, de la eritrofagocitosis, del efecto citopático y de la actividad citotóxica, tanto en trofozoítos virulentos como en los de virulencia atenuada. Las bacterias no incrementaron la adhesión, lo que sugiere que la adhesión por sí sola no es la responsable del aumento de la virulencia (García-Rivera, 1987). Posteriormente, Gómez y col., (1995) demostraron que la asociación de trofozoítos con bacterias *E. coli* 055 y 0115 produjeron un aumento significativo de la eritrofagocitosis y de la capacidad de destruir monocapas de células de mamífero en las amibas sólo de cepas patógenas, pero no en trofozoítos aislados de cepas no patógenas. Estos resultados sugieren la existencia de formas virulentas y no virulentas y por lo tanto, no apoyan la interconversión del fenotipo de virulencia.

Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo las bacterias influyen sobre la virulencia de las amibas, principalmente con los aislados de cepas no virulentas de portadores asintomáticos.

6.3. Factores propios del parásito.

Los factores intrínsecos del parásito incluyen a todas aquellas propiedades y moléculas que le permiten al trofozoíto llevar a cabo el mecanismo de agresión sobre la célula blanco. La mayoría de estas moléculas se describen en detalle en secciones posteriores.

Comparando ciertas cepas y clonas del parásito se han determinado las siguientes propiedades de los trofozoítos como marcadores de patogenicidad: i) Falta de carga eléctrica de superficie (Trissl y col., 1977), ii) alta susceptibilidad para aglutinarse en presencia de concanavalina A (Con A). La aglutinación de los trofozoítos con Con A se debe a la presencia de glicoproteínas con residuos de glucosa y manosa en la membrana de la amiba. Esta lectina aglutina trofozoítos de las cepas patógenas, pero no a los de las cepas no patógenas (Trissl y col., 1977). Sin embargo, Orozco (1981) no encontró diferencias en la aglutinación por esta lectina en tres cepas de diferente virulencia. Por lo tanto, es posible que los carbohidratos reconocidos por Con A participen de alguna manera en la relación huésped-parásito, pero que su presencia no sea suficiente por sí sola para que se realice el mecanismo de agresión de la amiba., iii) alta tasa de eritrofagocitosis (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1983) y iv) capacidad para destruir células en cultivo (Orozco y col., 1980).

7. BASES BIOLÓGICAS DEL MECANISMO AGRESOR DE *E. histolytica*.

E. histolytica es un parásito con una gran actividad lítica. El estudio de las propiedades biológicas de los trofozoítos amibianos que participan en la expresión de la virulencia, ha permitido distinguir cuatro etapas en el mecanismo agresor de *E. histolytica* sobre la célula blanco: adhesión, citólisis dependiente de contacto, fagocitosis y degradación intracelular (Orozco y col, 1983; Martínez-Palomo, 1986; Pérez-Tamayo, 1986; Ravdin, 1986).

7.1. Adhesión.

Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren a monocapas de células epiteliales en cultivo y también a superficies inertes como plástico y vidrio. La adhesión de los trofozoítos a substratos inertes es mediada por mecanismos inespecíficos, mientras que la adhesión a células epiteliales, requiere de un mecanismo específico donde se involucran moléculas de la superficie del parásito (adhesinas) y moléculas en la superficie de la célula blanco (receptores) (Martínez-Palomo, 1986).

Para la identificación de las moléculas de los trofozoítos de *E. histolytica* que participan directamente en la relación huésped-parásito se han realizado, entre otros, estudios de inhibición de la adhesión de trofozoítos a su célula blanco, mediante el uso de azúcares y de anticuerpos específicos. Estos estudios demostraron que si se inhibe la unión, también se inhibe el proceso patogénico sobre las células blanco (Ravdin y col, 1985; Cano-Mancera y López-Revilla, 1987; Arroyo y Orozco, 1987), sugiriendo que el contacto inicial entre el trofozoíto y éstas células es mediado por interacciones específicas, y que la adhesión es necesaria para que ocurra la fagocitosis y la citólisis.

Las primeras evidencias de que la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco está mediada por receptores específicos se obtuvieron a partir de experimentos de adhesión, utilizando eritrocitos de diferentes especies, las cuales mostraron que los trofozoítos tienen una preferencia para unir los eritrocitos de hámster y de humano (Olguín, 1984). En la adhesión participan dos proteínas con actividad de lectina que se identificaron por la capacidad de los extractos amibianos para aglutinar eritrocitos y células de la línea CHO. Una de ellas es inhibida por oligosacáridos de N-acetil-glucosamina (Kobiler y Mirelman, 1980), y tiene un peso molecular de 220 kDa (Rosales-Encinas y col, 1987). La otra lectina se inhibe por galactosa y N-acetil-galactosamina, aglutina eritrocitos humanos y células CHO (Ravdin y Guerrant, 1981),

tiene un peso molecular de 260 kDa y está formada por subunidades, de 170 y 35 kDa (Ravdin, 1989).

Otras proteínas que participan en la adhesión de los trofozoítos a su célula blanco son: la adhesina de 112 kDa (Arroyo y col, 1987; Rodríguez y col, 1989), la proteína rica en serinas de *E. histolytica* (SREHP) de 52 kDa (Stanley y col, 1990) y las proteínas de 90, 70, 50 y 24 kDa identificadas por ensayos de ligando (Rodríguez y col, 1989).

7. 2. Citólisis dependiente de contacto.

El efecto citoletal de los trofozoítos sobre la célula blanco fue demostrado por estudios micro cinematográficos (Ravdin y Guerrant, 1980 y 1981). Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto por medio del cual los trofozoítos amibianos lisan a la célula blanco, pero se sabe que la temperatura es un factor importante para que se efectúe, ya que a 37°C se observa el óptimo de dicho mecanismo (Ravdin y Guerrant, 1981).

Los microfilamentos amibianos son necesarios para que los trofozoítos puedan lisar a la célula blanco, ya que las citocalasinas B y D, drogas que interfieren en su formación, inhiben el efecto citoletal amibiano (Guerrant y col, 1981). El flujo transmembranal de calcio también interviene en la actividad lítica de los trofozoítos amibianos, agentes quelantes del calcio como el EDTA y el EGTA, inhiben el efecto citolítico del parásito sobre células blanco (Ravdin y col, 1982; Ravdin y col, 1985b).

La lisis de la célula blanco puede estar mediada, entre otros factores, por la actividad de cisteína proteasas, ya que se ha observado que su secreción es un factor importante para determinar el grado de agresividad de los trofozoítos (McKerrow, 1989) ; además, también se ha demostrado que monocapas de fibroblastos son destruidas por las cisteína proteasas purificadas de *E. histolytica* (Keene y col, 1990) y la inhibición por RNA antisentido de la

expresión de cisteína proteasas provoca una disminución en la producción de abscesos hepáticos en el animal de experimentación (Ankri y col., 1999b).

Otros factores que participan en el mecanismo de agresión dependiente del contacto de *E. histolytica* con sus células blanco son los lisosomas de superficie (Eaton y col, 1969 y 1979), la colagenasa (Muñoz y col, 1982) y la proteína formadora de poros (Lynch y col, 1982: Young y col, 1982).

7. 3. Fagocitosis.

Una vez que se ha llevado a cabo la citólisis dependiente de contacto, las amibas patógenas ingieren a las células lisadas, aunque los trofozoítos también pueden ingerirlas vivas (Martínez-Palomo, 1986). Hay reportes en los que se menciona que las cepas patógenas ingieren mayor número de eritrocitos con respecto a los trofozoítos de cepas no patógenas (Trissl y col, 1978). Orozco y col., (1983, 1985) y Rodríguez y Orozco (1986) aislaron clonas amibianas deficientes en fagocitosis a partir de amibas altamente virulentas. Para ello los trofozoítos amibianos se alimentaron con la cepa CR34 Tim⁻ de *E. coli* previamente cultivadas en un medio suplementado con bromodesoxiuridina (BrdU). Posteriormente, los trofozoítos se irradiaron con luz U.V., la cual rompe el DNA en los sitios donde se incorpora la BrdU. Con este tratamiento, las amibas con mayor poder fagocítico murieron a la hora de dividirse, mientras que las que fagocitaron en menor grado sobrevivieron y se cultivaron en el medio TYI-S-33 descrito por Diamond y col. (1978). Con esta estrategia se obtuvieron varias clonas que muestran una notable reducción en la velocidad de fagocitosis, en el efecto citopático, y en la formación de abscesos hepáticos en animales de experimentación.

La fagocitosis en *E. histolytica* puede ser de dos tipos: a) uno no específico por medio del cual los trofozoítos ingieren partículas como almidón, látex, hierro, etc., y el contacto inicial puede estar mediado por fuerzas electrostáticas (Martínez-Palomo, 1986) y b) un mecanismo

altamente específico en donde intervienen moléculas de superficie llamadas adhesinas, que participan en el reconocimiento y unión de los trofozoítos a la célula blanco (Arroyo y Orozco, 1987). La especificidad de este mecanismo se ha comprobado en repetidas ocasiones al observarse diferentes afinidades de los trofozoítos amibianos hacia eritrocitos de diferentes especies de mamíferos y de bacterias (Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y col, 1982; Olgúin, 1984). García–Rivera y col. (1982) demostraron, al utilizar mutantes en adhesión, que la disminución en esta función disminuye también la fagocitosis de los trofozoítos amibianos.

Orozco y col. (1988) propusieron un modelo para la fagocitosis en *E. histolytica*. Este modelo propone que los trofozoítos son atraídos quimiotácticamente hacia la célula blanco (Bailey, 1992). Posteriormente, se realiza la unión de los trofozoítos a la superficie de la célula blanco, mecanismo en el que intervienen las adhesinas localizadas en la superficie amibiana y receptores específicos de la célula blanco (Smith, 1977; Orozco y col, 1982). Una vez que se lleva a cabo la unión, existe una redistribución de las células blanco en la superficie de los trofozoítos (Trissl y col, 1977; Calderón y col, 1980), y ocurre un desencadenamiento de señales intracelulares que permiten la secreción de enzimas, entre ellas algunas proteasas, que producen la lisis de la célula blanco (McLaughlin y Aley, 1985). Mas tarde ocurre la emisión de pseudópodos por el trofozoíto, con el objeto de envolver a la célula blanco, permitiendo así la internalización de la vacuola fagocítica para su posterior fusión con el lisosoma, dando lugar a la formación del fagosoma (Chapman-Andresen, 1977). Finalmente, ocurre la acción de las enzimas digestivas amibianas sobre el material fagocitado. Así, las actividades de proteasas son muy importantes para la lisis dependiente de contacto y en la digestión de las células fagocitadas ya que la inhibición por RNA antisentido de las cisteína proteasas disminuyeron la fagocitosis (Ankri y col., 1999a). Entre las actividades proteolíticas detectadas en los trofozoítos amibianos se incluyen; la tripsina, la pepsina, la gelatinasa (Neal, 1960; Jarumilinta y

Maegraith, 1969), y actividades enzimáticas sobre caseína, fibrina, hemoglobina (Neal, 1960; Jarumilinta y Maegraith, 1969), azocol, azocaseína, hemoglobina y colágena (McLaughlin y Faubert, 1977).

8. PROTEASAS.

Las proteasas catalizan el rompimiento de enlaces peptídicos en proteínas y péptidos. Las proteasas han sido identificadas en sistemas biológicos desde virus hasta vertebrados. Conforme los proyectos de secuenciación de los genomas de distintos organismos se han ido completando, ha llegado a ser claro que las proteasas comprenden aproximadamente el 2 % de todos los genes de un organismo y son expresados con poca variación entre organismos (Barret, 1994). Las proteasas varían desde monómeros de 10 kDa a complejos multiméricos de varios cientos de kDa. La catálisis puede ser iniciada dentro de una cadena polipeptídica (actividad de endoproteasa) o también desde los extremos amino o carboxilo (actividad de exopeptidasa) (Sajid y McKerrow, 2002).

La mayoría de las proteasas son exopeptidasas que cortan uno o unos cuantos aminoácidos del extremo amino o carboxilo terminal (Barret y col., 2000). Las exopeptidasas que actúan en el amino terminal libre liberan un residuo de aminoácido simple (aminopeptidasas) o un dipéptido o tripéptido (dipeptidil – peptidasas y tripeptidil – peptidasas). Las que actúan en un carboxilo terminal libre liberan un residuo simple (carboxipeptidasas) o un dipéptido (peptidil – dipeptidasas). Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas) o eliminan residuos terminales que son sustituidos, ciclizados o unidos por puentes isopéptidos (otros enlaces peptídicos son aquellos de grupos α - carboxilo o α - amino) (Barret y col., 2000). Las endopeptidasas o proteasas actúan internamente en las cadenas de los polipéptidos y son divididas sobre la base del mecanismo catalítico usado durante el proceso hidrolítico. Los principales tipos catalíticos son serina, treonina, aspartato, metalo y

cisteína proteasas, otras proteasas no identificadas o crípticas pueden también existir (Barret y col., 2000). Las endopeptidasas, normalmente se unen a sus sustratos con los aminoácidos colocados en subsitios o en bolsillos que conforman el sitio activo de la enzima. La convención de Schechter & Berger (1967), permitió clasificar a los aminoácidos del sustrato y a los aminoácidos de los subsitios de la enzima que interactúan durante el proceso catalítico y es como sigue: “P” designa a un aminoácido del sustrato (péptido) y “S” se refiere a un aminoácido de un subsitio de la enzima. Para señalar donde la enzima rompe al sustrato, se utiliza asignar la apostrofe (prima) en los aminos que se encuentran hacia el lado carboxilo del sustrato proteico (P'), mientras que los aminoácidos no prima (P) se encuentran hacia el lado amino terminal: N-P3-P2-P1-/-P1'-P2'-P3'-C.

8. 1. Serina proteasas.

Las serina proteasas, son denominadas así por el aminoácido de serina, cuyo grupo hidroxilo es involucrado en la unión y catálisis del sustrato en el sitio activo. Su mecanismo catalítico involucra un enlace covalente de los sustratos con el residuo de serina (McKerrow y col., 1993). Este grupo de enzimas es el más ampliamente distribuido y diverso en la naturaleza, comprende dos familias distintas que son: a) la quimiotripsina, que se encuentra en procariotes, plantas, vertebrados e invertebrados, e incluye proteasas celulares y extracelulares como la tripsina, la elastasa, la trombina, la calicreína del plasma y las proteasas que participan en la coagulación sanguínea y b) la subtilisina, que solo se ha encontrado en bacterias (Barret, 1986; Bond y Butler, 1987).

Las serina proteasas se inhiben con diisopropilfluorofosfonato (DFP), la mayoría por fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF) y algunas por clorometilcetonas como N-p-tosil-L-lisin clorometilcetona (TLCK) o L-1-tosilamido-2-feniletíl-clorometilcetona (TPCK) (Bond y Butler, 1987).

8. 1. 1. Serina proteasas en protozoarios parásitos.

i) La PfSUB-1 y la PfSUB-2 de *Plasmodium falciparum*.

Son dos serina proteasas que mostraron una gran identidad entre las secuencias de sus regiones catalíticas (Hackett y col, 1999), el análisis filogenético mostró que están muy relacionadas a las subtisilinas de procariontes (Barale y col., 1999). Mientras que PfSUB-2 es una proteína tipo I de membrana, la secuencia de PfSUB-1 no parece contener un dominio transmembranal.

Evidencia circunstancial involucra a la PfSUB-1 y a la PfSUB-2 en la invasión de eritrocitos, ambas proteasas son expresadas en esquizontes y merozoítos (Barale y col., 1999; Hackett, 1999). Ensayos de inmunomicroscopía electrónica han revelado que PfSUB-1 y PfSUB-2 residen en una subpoblación de organelos secretorios del merozoíto, conocidos como gránulos densos (Bernard y col., 1987; Blackman y col, 1998). Esta localización parece inconsistente con un papel en la invasión, ya que la evidencia sugiere que la secreción de los gránulos densos por *Plasmodium spp.* y el parásito relacionado apicomplexa *Toxoplasma gondii* es un evento postinvasión (Carruthens y Sibley, 1997; Torii y col., 1989). Sin embargo, la subpoblación apical de gránulos densos podría descargar su contenido durante la invasión (Blackman y col., 1998). Apoyando este punto de vista, PfSUB fue encontrada en el sobrenadante del cultivo, pero no en parásitos anillados observados después de la invasión *in vitro*. La PfSUB-1 y la PfSUB-2 sufren eventos múltiples de procesamiento antes de la invasión (Blackman y col., 1998; Hackett y col., 1999). La PfSUB-1 activa se ha expresado en forma recombinante, y el análisis de dos sitios de autoproteólisis indican una preferencia para el rompimiento después de un residuo de ácido aspártico (Sajid y col., 2000). Aún no se tienen los sustratos utilizados *in vivo* por PfSUB-1 Y PfSUB-2.

ii) La P76/P68 en *Plasmodium*.

La serina proteasa p76 en *P. falciparum* (y la ortóloga p68 en *P. chabaudii*) es inactiva mientras está unida a la membrana, pero puede ser liberada en forma activa por tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol. Esta observación sugiere un mecanismo poco usual para la activación de esta proteasa; sin embargo, no está claro si este modo de activación es operante *in vivo*. El inhibidor de serina proteasa, diisopropil fluorofosfato (DFP), inhibe la invasión de los merozoítos de *P. chabaudii* (Breton y col., 1992) y el tratamiento de merozoítos con [³H]-DFP marcó a una proteína de 68 kDa, relacionando de esta manera a p68 con la invasión (Breton y col., 1992). Además, el pretratamiento de eritrocitos con p68 purificada cambió el efecto de la inhibición por DFP (Breton y col., 1992). P76 y p68 purificadas degradaron la banda 3, una proteína de superficie del eritrocito y p76 también rompió a la glicoforina A (Breton y col., 1992; Roggwiler y col., 1996). El tratamiento de eritrocitos humanos con p76 indujo a la endocitosis de vesículas de fosfolípidos fluorescentes (Roggwiler y col., 1996), lo cual sugiere que la proteólisis de la banda 3 por p76 puede facilitar la formación de la vacuola parasitófora.

iii) Oligopeptidasa B (OPB) en *Trypanosoma*.

Una serina proteasa de 81 kDa de la subfamilia de la oligopeptidasa B (OPB) ha sido involucrada en el señalamiento de Ca²⁺ en *Trypanosoma* (Burleigh y Andrews, 1995). Estudios de especificidad de sustratos e inhibidores de la OPB han revelado una marcada preferencia de corte para arginina o lisina en la posición P1 (Burleigh y col., 1997; Santana y col., 1992). La OPB es también expresada en estadios no invasivos de *T. cruzi*, lo cual sugiere que la proteasa puede tener un papel no relacionado con la invasión. El descubrimiento de una secuencia altamente relacionada a la OPB de *T. cruzi* en *T. brucei* apoyó esta posibilidad (Morty y col., 1999).

La función de la OPB de *T. cruzi* en la invasión fue más comprendida utilizando experimentos de rompimiento de genes (Caler y col., 1998; Caler y col., 2000). Las cepas *Knockout* simples (SKO) y las *Knockout* dobles (DKO) de la OPB mostraron una morfología normal, y no tenían defectos detectables en la movilidad o habilidad para diferenciar los epimastigotes de los tripomastigotes en cultivo (Caler y col., 1998). La habilidad de los parásitos DKO para invadir células de mamífero en cultivo fue reducida pero no abolida; la invasión de varios tipos celulares diferentes fue reducida un 75%. Estos resultados indicaron la existencia de una segunda ruta de invasión independiente de OPB. La OPB tipo silvestre recombinante puede restaurar la habilidad del extracto de DKO para inducir el rápido incremento de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en células de riñón de rata. La infectividad de los parásitos SKO y DKO en ratón fue dramáticamente reducida en relación a la tipo silvestre (Caler y col., 1998). Estos elegantes experimentos proveen evidencia para el involucramiento de la OPB en una ruta mayor de invasión en *T. cruzi* (Caler y col., 1998).

8. 2. Aspártico proteasas.

Las aspártico proteasas utilizan dos ácidos aspárticos a los lados de las cadenas en catálisis (McKerrow y col., 1993). La mayoría de estas proteasas pertenecen a la familia de la pepsina, que incluye enzimas digestivas como la pepsina y la quimiosina, así como las catepsinas lisosomales D y enzimas como la renina y ciertas proteasas de hongos. Una segunda familia comprende proteasas virales como la proteinasa del virus del SIDA (HIV) denominada retropepsina. En el mecanismo de acción de estas enzimas, en comparación con las serina y cisteína proteasas, no existe un intermediario covalente, aunque existe un intermediario tetrahédrico. El ataque nucleofílico se lleva a cabo por la transferencia simultánea de dos protones. Estas enzimas se inhiben específicamente por peptidasa (pentapéptidos

acilados aislados a partir de Actinomicetos) y por compuestos diazoacetilo, como el diazoacetil-L-fenil-metiléster.

8. 2. 1. Aspártico proteasas en protozoarios parásitos.

i) Plasmepsina I (PM I) y Plasmepsina II (PMII) de *P. falciparum*.

Dos aspártico proteasas muy relacionadas de *P. falciparum* juegan un papel crítico en los eventos tempranos de la degradación de la hemoglobina en la vacuola alimenticia. Ambas proteasas llamadas plasmepsinas (PM) I y II, inician la degradación de la hemoglobina hidrolizando el enlace peptídico entre los residuos Phe33 y Leu34 en la cadena α de la hemoglobina nativa (Gluzman y col., 1994; Goldberg y col., 1991). Este rompimiento inicial se piensa que promueve el desdoblamiento y liberación de los grupos hemo, seguido de la degradación por las plasmepsinas, por la cisteína proteasa llamada falcipaína y por la metaloproteasa llamada falcilisina (Gluzman y col., 1994; Eggleston y col., 1999, Francis y col., 1996). La evidencia *in vivo* para esta degradación semiordenada se dió cuando un tratamiento breve con un inhibidor de aspártico proteasas Ro 40-4388, previno la acumulación de la cloroquina antimalarial unida al hemo, lo cual sugiere que la liberación del grupo hemo ha sido bloqueado, ningún efecto se observó cuando se aplicó leupeptina, un inhibidor de cisteína proteasas (Bray y col., 1998). Recientemente, se han descubierto dos aspártico proteasas homólogas con alta similaridad en secuencia a PM I y II, estas son la PM IV y la histoaspártico proteasa (HAP) (Berry y col., 1999; Humphreys y col., 1999). La secuencia de HAP contiene solamente uno de los dos residuos catalíticos de ácido aspártico normalmente encontrados en los sitios activos de aspártico proteasas, el segundo es remplazado por histidina (Berry y col., 1999). HAP tiene actividad catalítica y parece jugar un papel en la degradación de la hemoglobina río abajo de las PM I y II (Banerjee y col., 2002). Plasmepsinas ortólogas a las I/II/IV se han caracterizado en otras especies de *Plasmodium* (Humphreys y col., 1999;

Wrestling y col., 1997), pero a la fecha sólo una ortóloga se ha encontrado en *P. falciparum*. Seis genes de plasmepsinas adicionales se han encontrado en los bancos de datos de la secuencia genómica de *P. falciparum* (Humphreys y col., 1999; Banerjee y col., 2002; Bowman y col., 1999; Coombs y col., 2001). Su relación a PM I, II, IV y HAP es distante y sus funciones en la biología de *Plasmodium* son desconocidas.

Además de su sustrato común (la α hemoglobina), las plasmepsinas I y II despliegan otras especificidades completamente diferentes. De los 10 sitios de rompimiento mapeados (seis para PM I y cuatro para PM II), solo el sitio 33-34 en la cadena α fue común a ambas (Gluzman y col., 1994). La PM I prefirió a la fenilalanina en la posición P1, mientras que PM II usa aminoácidos más pequeños. Mientras que PM II rompe en sitios que contienen sólo residuos hidrofóbicos en la posición P2, la PM I toleró una variedad de residuos en esta posición, incluyendo aminoácidos hidrofóbicos, polares y básicos (Gluzman y col., 1994). Diferencias en la actividad se han observado contra sustratos peptídicos sintéticos (Tyas y col., 1999). Estos datos sugieren que estas dos aspártico proteasas no son redundantes, más bien poseen especificidades complementarias.

Subsitios específicos de la PM II recombinante se han investigado en detalle usando una serie de sustratos de octapéptidos cromogénicos (Wrestling y col., 1999). Los residuos hidrofóbicos fueron preferidos en las posiciones P3, P2 y P3'. La prolina fue el residuo favorecido en la posición P4, aunque la fenilalanina y la alanina fueron también bien toleradas. El subsitio S2' exhibió una fuerte preferencia por la alanina, pero por otro lado, aceptó una variedad de cadenas laterales. Notablemente, las cadenas laterales básicas Lys o Arg fueron pobremente toleradas en todos los subsitios examinados; este resultado es desconcertante ya que el sitio inicial del rompimiento de la hemoglobina tiene arginina en la posición P3. En un esfuerzo para identificar los residuos importantes de la PM II en la especificidad de sustrato, un

número de mutantes de la PM II fueron producidos utilizando al examen de la estructura cristalina de PM II-pepstatina (Wrestling y col., 1999). El efecto mas dramático fue visto en la mutación de la serina 77, un aminoácido que se pensaba contribuía con la especificidad del subsitio S1, cuando este residuo fue mutado a ácido aspártico, la PMII ganó la actividad para romper sustratos con lisina en la posición P1 (Wrestling y col., 1999).

La estructura cristalina por rayos X de la pro-plasmepsina II (proPM II) y de la enzima madura PM II unida con el inhibidor pepstatina A, fue resuelta (Bernstein y col., 1999; Silva y col., 1996). La PM II posee un doble dominio, que es una estructura bilobal típica de aspártico proteasa de mamífero (Silva y col., 1998). Dos conformaciones que difieren por una rotación de 5.2° entre los dominios N y C, fueron observados en la unidad cristalográfica asimétrica (Silva y col., 1998). Este grado de flexibilidad es importante para permitir el acceso de la hemoglobina al sitio activo. La forma en la que la pepstatina A se une a la PM II es muy similar a la de la catepsina D de mamífero, pero diferencias significativas fueron notadas (Silva y col., 1996). Estudios calorimétricos han indicado que la termodinámica de la pepstatina uniéndose a la PM II y a la catepsina D difiere considerablemente (Xie y col., 1997). Estos resultados sugieren que pueden ser desarrollados inhibidores selectivos para la enzima del parásito. La estructura cristalina de la proPM II reveló un nuevo mecanismo para la inactivación de un cimógeno de proteasa (Bernstein y col., 1999).

Inhibidores potentes de PM I y/o PM II han sido identificados en colecciones químicas existentes (Tyas y col., 1999; Silva y col., 1996; Jiang y col., 2001; Moon y col., 1997) y en una nueva biblioteca combinatorial (Carrol y col., 1998; Haque y col., 1999). Varios inhibidores potentes de PM I son relativamente débiles contra la PM II, implicando importantes diferencias entre los sitios activos de estas dos enzimas (Tyas y col., 1999; Moon y col., 1997; Francis y col., 1994; Luker y col., 1996).

Además, la plasmepsina II se encontró en una preparación de esquizontes y fue capaz de degradar espectrina (Le Bonniec y col., 1999). La proteína recombinante PM II (rPMII) rompió los dominios SH3 de la α -espectrina a pH 5.0, y el mapeo de los sitios de corte indican una similitud semejante a aquellos generados por la espectrinasa del esquizonte. Para ser un candidato plausible como espectrinasa, la PM II debe ser activa al pH que existe en el citosol de los eritrocitos al tiempo de la liberación del merozoíto, y ser transportada a la periferia de los eritrocitos. La rPM II hidrolizó espectrina purificada y proteínas de los fantasmas de los eritrocitos a pH 6.8 (Le Bonniec y col., 1999), un valor cercano al esperado para el citosol de eritrocitos infectados (Yayon y col., 1984). Además la presencia de PM II de esquizontes en el citosol de los eritrocitos fue demostrado por inmunofluorescencia. Aunque estos resultados son consistentes con funciones de la PM II en la degradación del esqueleto de eritrocitos, su significado aún no se ha establecido. Es importante notar que la pepstatina A, un potente inhibidor de PM II, no es efectivo para prevenir la liberación del merozoíto en cultivo (Lyon y Haynes, 1986).

8. 3. Metaloproteasas.

Las metaloproteasas son hidrolasas en donde el ataque catalítico de la unión peptídica es mediada por una molécula de agua. Esta molécula puede ser activada por el catión divalente zinc, pero algunos miembros de esta familia pueden activarse por cobalto o manganeso. En muchas metaloproteasas sólo se requiere de un ión de zinc, pero algunas veces hay dos iones metálicos que actúan catalíticamente.

Las metaloproteasas son las enzimas proteolíticas más antiguas y son de amplia distribución, se encuentran en bacterias, hongos y organismos superiores, se han identificado extracelularmente en las membranas celulares (plasmática y del retículo endoplásmico) y en el citosol (Bond y Beinond, 1985). Muchas de las metaloproteasas de mamífero se secretan en

forma inactiva (zimógenos) que pueden activarse por proteólisis o por exposición a compuestos organomercuriales (Barret y col., 2000). Estas enzimas difieren ampliamente en sus secuencias y estructuras, pero la gran mayoría contienen un átomo de zinc el cual es activo catalíticamente. En algunos casos el zinc puede ser reemplazado por otros metales tales como el cobalto o níquel sin perder la actividad. El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermediario tetrahédrico no covalente (Sajid y McKerrow, 2002).

Los inhibidores de estas enzimas son agentes quelantes como el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y 1, 10-fenantrolina, algunas son inhibidas por fosforamidón (ramnosa-fosfato-leucina-triptófano) (Barret y col., 2000).

8. 3. 1. Metallo proteasas en protozoarios parásitos.

La leishmanolisina (también conocida como gp63 o proteasa de la superficie del promastigote) es una zinc metaloproteasa expresada en los estadios de promastigote y amastigote de las especies de *Leishmania* y es el mayor componente de la superficie del promastigote metacíclico infectivo (Bouvier y col., 1995). La leishmanolisina de promastigote es una glicoproteína unida a la membrana con un anclaje GPI (Voth y col., 1998), mientras que en el amastigote, la leishmanolisina está localizada en los lisosomas grandes (Bahr y col., 1993; Ilg y col., 1993). Genes múltiples altamente conservados de leishmanolisina se han encontrado en las especies de *Leishmania*; por lo menos 18 genes fueron detectados en *L. chagasi* (Roberts y col., 1993) y siete genes se han identificado en *L. major* (Voth y col., 1998; Button y col., 1989). Las isoformas de leishmanolisina se han dividido en tres clases basándose en la especificidad de estado y de su expresión (Voth y col., 1998, Ramamoorthy y col., 1992). Los sustratos *in vivo* de la leishmanolisina son desconocidos, la proteasa aislada de las membranas del promastigote rompe a los sustratos proteicos y peptídicos *in vitro* (Bouvier y col., 1990; Ip y col., 1990). La sobrerregulación de la expresión de la leishmanolisina en promastigotes

metacíclicos invasivos sugiere que la proteasa juega un papel en los estadios primarios de la infección del huésped mamífero (Ramamoorthy y col., 1992). Adicionalmente, se ha propuesto que la leishmanolisina contribuye a la sobrevivencia intracelular (Seay y col., 1996).

El examen de cepas de *Leishmania* expresando niveles variables de leishmanolisina ha sugerido que participa en la unión directa del parásito a macrófagos (McGwire y Chang, 1994; Liu y Chang, 1992). Además la secuencia SRYD en la leishmanolisina mostró ser antigénicamente relacionada a la secuencia RGDS de la fibronectina (Soteriadou y col., 1992). Un péptido conteniendo la secuencia SRYD inhibió la unión de parásitos a macrófagos (Soteriadou y col., 1992). Estos datos sugieren una interacción potencial de leishmanolisina con receptores de fibronectina del macrófago (Brittingham y col., 1999). La adición de suero permite la activación de complemento, incrementando la unión de las tres cepas de parásitos a macrófagos, resultando en un efecto sinérgico de unión, de ambas leishmanolisinas y el complemento activado, a receptores del macrófago (Brittingham y col., 1999). La conversión rápida de C3 a iC3b puede ser una forma en la cual la actividad de la leishmanolisina contribuye a la protección contra la lisis por complemento (Brittingham y col., 1995).

Grandes reducciones en la cantidad de leishmanolisina en parásitos se han efectuado usando técnicas de *knockout* e inhibición por RNA antisentido. Los genes del 1 - 6 fueron eliminados en *L. major*, dejando sólo al gen 7 (Joshi y col., 1998). Los promastigotes que carecían de las isoformas 1 - 6 de leishmanolisina ($\Delta 1-6$) fueron más susceptibles que los parásitos tipo silvestre a la lisis por complemento *in vitro*, y la reintroducción del gen 1 en el fondo del mutante nulo reinvirtió la susceptibilidad (Joshi y col., 1998).

La estructura cristalina de la leishmanolisina purificada de los promastigotes de *L. major* reveló que esta proteasa es un miembro de la familia de la metzincina de las zinc metaloproteasas (Schlagenhauf y col., 1998). La leishmanolisina consiste de tres dominios, dos

de los cuales (los dominios centrales y el N terminal) contribuyen a la formación del sitio activo. Además de proveer de un sitio para el anclaje GPI de la proteasa, el papel del dominio carboxilo terminal es oscuro: El ión zinc (II) en el sitio activo está ligado por cadenas laterales de tres histidinas. La estructura del sitio activo exhibió gran similitud a la neutrofil colagenasa humana (Schlagenhauf y col., 1998), lo cual sugiere que los inhibidores de colagenasa puedan también ser inhibidores efectivos de la leishmanolisina.

8. 4. Cisteína proteasas.

Las cisteína proteasas requieren de un residuo de cisteína esencial en el sitio activo para la hidrólisis. Cuatro aminoácidos del sitio activo son: Glu, Cys, His, y Asn. Estos forman el centro catalítico de las cisteína proteasas (Bruchhaus y col., 2003). Ellos pueden ser identificados con base en su localización dentro de la secuencia primaria de las moléculas ya que ellos están rodeados por aminoácidos bien conservados. El grupo tiol es un centro nucleofílico debido a la cercanía de una histidina del sitio activo, la cual actúa como una base general donadora de protones (Sajid y McKerrow, 2002). El grupo sulfhidrilo o $-SH$ de una cisteína, de una cadena lateral y el imidazol de una histidina, dan origen a una díada liberadora de carga tiolato-imidazolium (Sajid y McKerrow, 2002) (Fig. 1). Esto frecuentemente, pero no siempre, es estabilizado por una asparagina y una glutamina altamente conservadas que forman el hueco oxianión, un elemento crucial en la formación de un centro electrofílico para estabilizar al intermediario durante la hidrólisis (Sajid y McKerrow, 2002). Los dos grupos ionizables de la díada tiolato-imidazol permiten la actividad enzimática en un amplio rango de pH, consistente con un pK_a de cisteína alrededor de 4 y un pK_a de ionización de histidina de alrededor de 8.5. Dicho pH libera al sistema y es posteriormente estabilizado por el ambiente químico del sitio activo. Antes de la hidrólisis de uniones peptídicas, la proteasa coloca al substrato peptídico en su sitio activo. La eficiencia de unión es una función tanto de los ambien-

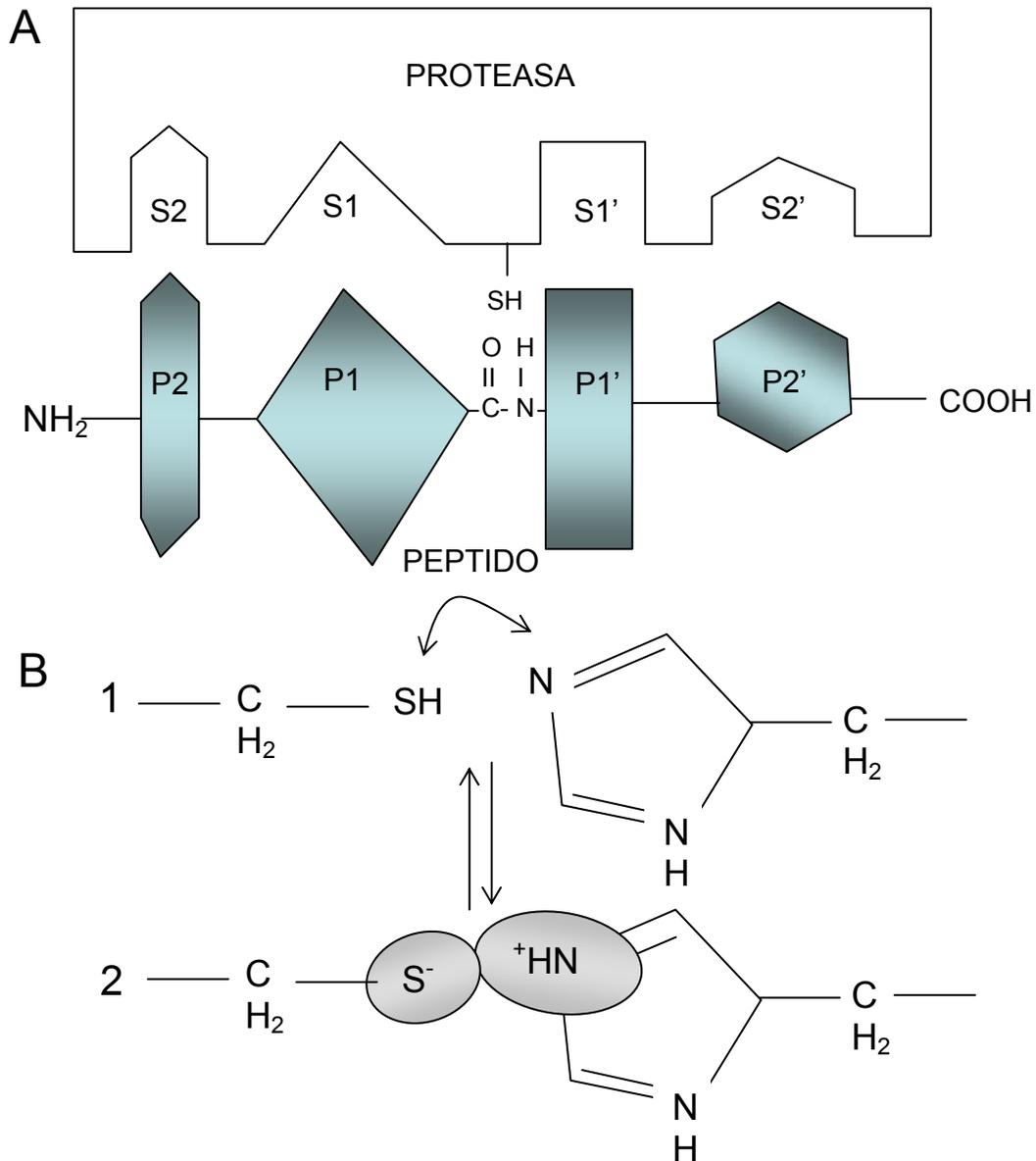


Fig. 1. Diagrama que representa la interacción del sustrato con el sitio activo de una cisteína proteasa. A. Los aminoácidos del péptido son denominados “P” y los aminoácidos de los subsitios de la enzima son denominados “S”. El sulfhidrilo del sitio activo de la cisteína proteasa se representa como –SH, la unión peptídica está señalada. El lado carboxilo del péptido y de los subsitios de la enzima a partir del sitio de ruptura son convencionalmente denominados “prima” y son P1’, P2’, Pn’ y S1’, S2’, Sn’, respectivamente. Los aminoácidos del lado amino del péptido y de los subsitios de la enzima son designados como P1, P2, Pn y S1, S2, Sn, respectivamente. B. Esquema que muestra la proximidad espacial en el sitio activo mostrando: (1). El sulfhidrilo de la cisteína y el grupo imidazol de la histidina. (2). La carga del tiolato y del imidazol liberan la diada. El área sombreada representa una nube electrodensa. (Sajid y McKerrow, 2002).

tes químicos correspondientes a cada subsitio, como de la naturaleza química del péptido que interactúa directamente con el surco del sitio activo (Sajid y McKerrow, 2002). Factores importantes que afectan las interacciones enzima-sustrato incluyen; tamaño, polaridad, carga, hidrofobicidad y accesibilidad. Aunque una sola unión peptídica sea rota durante la catálisis, varios aminoácidos a ambos lados del sitio de rompimiento son importantes para fijar el registro y la especificidad de una enzima (Sajid y McKerrow, 2002). Las secuencias que flanquean directamente el sitio activo de cisteína e histidina son también altamente conservadas para mantener el registro catalítico. Estas regiones conservadas han sido usadas para clasificar a las proteasas y para clonar genes ortólogos mediante genética inversa (Sajid y McKerrow, 2002). La especificidad de sustrato puede también ser explotada para la identificación de inhibidores selectivos antiproteasa. Las cisteína proteasas tienen similitudes mecánicas con serina proteasas pero son mejores nucleófilos debido a la cubierta extra de electrones presente en el grupo sulfuro del grupo tiol (Sajid y McKerrow, 2002). Se piensa que las principales interacciones de cisteína proteasas del tipo papaína con su sustrato ocurre en S_2 , S_1 y S'_1 (Turk y col., 1998). El mecanismo de hidrólisis de estas proteasas ha sido elucidado y bien documentado, la enzima es transitoriamente unida al sustrato y forma intermediarios inestables antes de regresar a un estado enzimático activo (Sajid y McKerrow, 2002).

Las cisteína proteasas se encuentran en bacterias, microorganismos eucarióticos, plantas y animales, y están representadas por tres superfamilias evolutivamente relacionadas que son: a) la papaína de *Carica papaya*, b) la proteinasa de *Streptococcus sp* y c) la proteinasa de *Clostridium histolytica* (Berti y col., 1995). La superfamilia más amplia es la de la papaína e incluye a las cisteína proteasas de plantas superiores y a las catepsinas B, L, H, y S de los lisosomas de las células de mamífero (Barret, 1986; Bond y Buttler, 1987).

Estas enzimas se inhiben por agentes bloqueadores del grupo tiol, como el p-hidroximercuribenzoato (PHMB) y por agentes alquilantes como el iodoacetato, la iodoacetamida y la N-etilmaleimida (NEM) y se activan por reactivos que generan grupos tiol a partir de puentes disulfuro, tales como el β -mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT) (Que y Reed, 2000).

8. 4. 1. Cisteína proteasas eucariotas.

Las catepsinas eucariotas (cisteína proteasas lisosomales) son mejor conocidas por el papel que juegan en el recambio proteico intracelular (Barret y Kirschke, 1981). Ellas son sintetizadas con una pre-secuencia hidrofóbica amino terminal (~20 residuos) que permiten la translocación de la proteína naciente en el retículo endoplásmico (ER), seguido por una extensión pro-amino terminal (~ 62 a 123 residuos), la cual estabiliza la enzima y puede ser esencial para el plegamiento apropiado de la proteína (Chan y col., 1986; Smith y Gottesman, 1989). Las catepsinas en la mayoría de las células eucariotas son glicosiladas en el complejo de Golgi y dirigidas a lisosomas por receptores manosa-6-fosfato, las cuales reconocen oligosacáridos ligados a la asparagina fosforilada de proteínas lisosomales durante su síntesis. El procesamiento de las proenzimas a enzimas maduras de ~27 a 30 kDa subsecuentemente ocurre en el ambiente ácido lisosomal (Griffiths y col., 1988).

8. 4. 2. Cisteína proteasas en protozoarios parásitos.

Las cisteína proteasas juegan numerosos papeles indispensables en la biología de organismos parásitos. Además de funciones catabólicas previamente conocidas, las cisteína proteasas pueden ser clave para la inmunoevasión parasitaria, el enquistamiento y el desenquistamiento, en la metamorfosis, y en la invasión celular y de tejidos. Las cisteína proteasas son inusualmente inmunogénicas y han sido explotadas como marcadores serodiagnósticos y blancos para vacunas (Cambrá y Berrens, 1996; Jankovic y col., 1996;

Dalton y col., 1996; Skuce y col., 1999). Aunque existen enzimas homólogas, las cisteína proteasas de parásitos tienen distinta especificidad estructural, de sustrato y de localización celular. La naturaleza dispar de las cisteína proteasas de parásitos comparada a las proteínas ortólogas del hospedero ha abierto oportunidades para la quimioterapia (Sajid y McKerrow, 2002).

Se ha establecido que muchas proteasas de parásitos pueden ser blancos quimioterapéuticos o vacunales. El interés en las cisteína proteasas como blancos deriva del reconocimiento de que ellas son importantes en el ciclo de vida y/o a la patogenicidad de muchos parásitos. Esta diversidad funcional es derivada de su nucleofilicidad, adaptabilidad a diferentes sustratos y estabilidad en diferentes ambientes biológicos.

i) Cruzaína en *T. cruzi*.

Una familia altamente relacionada de cisteína proteasas, conocidas colectivamente como cruzaína, cruzapaína, o GP57/51, constituyen la mayor actividad de proteasa en *T. cruzi*. La cruzaína es codificada por una familia multigénica; arriba de 130 copias de genes de cruzaína polimórfica se han encontrado en una cepa (Campetella y col., 1992). Las preparaciones de la cruzaína nativa contienen una mezcla de isoformas (Stoka y col., 1995). La composición de las isoformas de la cruzaína puede variar entre las cepas y entre diferentes estados del ciclo de vida (Lima y col., 2001). La heterogeneidad adicional puede elevarse por la N-glicosilación (Parodi y col., 1995). La cruzaína posee una rara extensión C-terminal (CTE) de aproximadamente 100 aminoácidos que ha sido encontrada solamente en las cisteína proteasas de parásitos relacionados, y de ciertas plantas (Aslund y col., 1991). La función de la CTE es desconocida, pero aparentemente no interviene en las siguientes funciones de la enzima; la catálisis, la inhibición enzimática, la estabilidad proteica, o el tráfico al lisosoma (Eakin y col., 1993; Stoka y col., 2000).

La cruzaina es expresada en todos los estadios del ciclo de vida (Eakin y col., 1992; Thomas y Nelly, 1996). La localización lisosomal de la cruzaina ha sido involucrada en el recambio proteico (Saouto-Padron y col., 1990) y se ha observado en la superficie de epimastigotes y amastigotes (Saouto-Padron y col., 1990; Nascimento, y de Souza, 1996). *In vitro*, la cruzaina generó al péptido proinflamatorio Lis-bradikinin de kininógeno (Del Nery y col., 1997), un proceso que puede ser importante durante la invasión (Scharfstein y col., 2000). Además, la sobre expresión de la cruzaina resultó en un realce de la metacicloogénesis (Tomas y col., 1997).

En estudios con inhibidores de proteasas se sugirió que una cisteína proteasa participa en la diferenciación de tripomastigote a amastigote después de la invasión y de amastigote a tripomastigote antes del egreso del parásito (Harth y col., 1993; Meirelles y col., 1992). La morfolinourea-fenilalanil-homofenilalanil-vinil fenil sulfona (Mu-Phe-Hphe-VSPH), potente inhibidor de la cruzaina, efectivamente bloquea el crecimiento del epimastigote en cultivo (Engel y col., 1998). El tratamiento de epimastigotes con Mu-Phe-Hphe-VSPH indujo a una serie de anomalías: dilatación periférica de las cisternas Golgi, ensanchamiento del retículo endoplásmico y el núcleo, aparición de vesículas citoplásmicas, y alargamiento de la mitocondria (Engel y col., 1998).

La función y estructura de una isoforma recombinante de cruzaina (r-cruzaina) que careció de CTE y de glicosilaciones, fueron comparadas con las observadas en poblaciones homogéneas de enzimas (Eakin y col., 1993). Las preferencias en aminoácidos para los subsitios S1, S2, S3 y S4 de la r-cruzaina fueron determinados usando colecciones combinatoriales de sustratos (Harris y col., 2000). El subsitio S2 fue el más restrictivo, aceptando solamente residuos largos hidrofóbicos y arginina. La habilidad para romper péptidos con ambos residuos hidrofóbicos y arginina en P2 indican que la r-cruzaina tiene

especificidad tipo catepsina B (Sajid y McKerrow, 2002). La r-cruzaína muestra una especificidad de sustrato relativamente amplia en S1, rompiendo a los péptidos con residuos básicos e hidrofóbicos P1. Los subsitios S3 y S4 mostraron poca discriminación (Sajid y McKerrow, 2002). El bolsillo S2 es el determinante primario de la especificidad del sustrato, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otras cisteína proteasas de la familia de la papaína (McGrath, 1999). Las estructuras mostradas por análisis cristalográficos por rayos X de la r-cruzaína alquilada en la cisteína catalítica con los inhibidores irreversibles Z-Phe-Ala-FMK, Z-Tyr-Ala-FMK y Z-Arg-Ala-FMK han provisto una explicación estructural para la capacidad del subsitio S2 para aceptar residuos hidrofóbicos y básicos (Gillmor y col., 1997; MacGrath y col., 1995). Un residuo de glutamato en la posición 205 de la r-cruzaína (Glu205) localizado en el fondo del subsitio hidrofóbico S2, juega un papel importante. Con la fenilalanina en la posición P2, el Glu 205 del bolsillo S2 gira e interactúa con el solvente. Cuando el subsitio S2 es ocupado por la arginina, el Glu 205 se balancea y forma un puente salino con la cadena lateral de la arginina (Gillmor y col., 1997).

ii) CAP5.5 de *T.brucei*.

La proteína, CAP5.5 o TbCALp1 presenta homología con cisteína proteasas y fue localizada en microtúbulos del citoesqueleto subpelicular de la forma procíclica. CAP5.5 es miristoilada y palmitoilada, lo cual sugiere que esta proteína puede estar involucrada en el anclaje de los microtúbulos a la membrana plasmática (Hertz y col., 2001). La CAP5.5 es una proteína de 94 kDa que contiene una región central con homología al dominio de la familia de la calpaína. Notablemente solo uno de los tres residuos catalíticos es conservado, con la cisteína nucleofílica del sitio activo reemplazada por serina. Varias cisteína proteasas homólogas con mutaciones en la cisteína catalítica también se han encontrado en *Plasmodium*

spp (Gor y col., 1998). Análisis posteriores han descubierto ocho marcos de lectura abiertos en *T. brucei* codificando proteínas con homología a la calpaína.

iii) Las cisteína proteasas como factores de virulencia en *Leishmania*.

Tres loci de genes de cisteína proteasas se han identificado como factores de virulencia en *L. mexicana*. El gen *Imcpa*, de una sola copia, codifica para una proteasa tipo catepsina L que carece de la extensión C-terminal tipo cruzaina y es expresada en promastigotes metacíclicos y amastigotes (Mottram y col., 1992). El arreglo en tandem de *Imcpb*, contiene 19 genes altamente relacionados tipo catepsina L, algunos de los cuales se ha demostrado poseen una extensión C-terminal de aproximadamente de 100 aminoácidos (Mottram y col., 1997). La actividad de cisteína proteasa de *Imcpb* es la más abundante en el estadio de amastigote del parásito; sin embargo los dos primeros miembros del arreglo se encuentran principalmente en promastigotes metacíclicos (Mottram y col., 1997). Los genes *Imcpc* codifican para una proteína homóloga de la catepsina B que es expresada en todos los estadios (Bart y col., 1995). La localización de las proteasas tipo catepsina L de *L. pifanoi* y *L. mexicana*, y la proteasa tipo catepsina B de *L. major* en lisosomas también implica a estas enzimas en la degradación proteica (Mottram y col., 1997; Duboise y col., 1994; Selzer y col., 1999). Un papel para la cisteína proteasa A de *L. mexicana* (CPA) y/o B (CPB) en la maduración de CPB se ha sugerido recientemente (Brooks y col., 2000).

El rompimiento de los loci *Imcpa*, *Imcpb* y *Imcpc* ha implicado a las cisteína proteasas en la virulencia de *Leishmania*. Un *knockout* de los 19 genes del arreglo del gen *Imcpb* resultó en un marcado decremento en la virulencia del parásito (Frame y col., 2000; Mottram y col., 1996). Además, se sugiere que las cisteína proteasas de *Leishmania*, directa o indirectamente, modulan la respuesta inmune del huésped de una manera favorable para el parásito

(Alexander y col., 1998). El *knockout* del gen *Imcpc* de una copia produjo parásitos con capacidad reducida para la infección de células de exudado peritoneal (Bart y col., 1997).

Dos inhibidores reversibles (ZLIII15A Y ZLIII43A) y un inhibidor irreversible vinil sulfona (Mu-Phe-Hphe-VSPH) fueron probados contra *L. major* en cultivo y en ratones infectados (Selzer y col., 1999). Cada inhibidor en concentraciones superiores a 20 μ M previno el crecimiento de promastigotes cultivados. Los inhibidores también redujeron significativamente la tasa de replicación de los amastigotes en un cultivo de macrófagos.

La sustitución sistemática de 23 aminoácidos en la posición P1 de un péptido indicó una preferencia por residuos básicos (Alves y col., 2001). La especificidad de sustrato de P4 a P4' fue analizado (Hilaire y col., 2000) y se encontró que la lisina o la arginina fueron altamente preferidas en las posiciones P1 y P3, y los residuos hidrofóbicos fueron dominantes en P2. Los péptidos sintéticos con el residuo P3 básico, P2 hidrofóbico y P1 básico (básico-hidrofóbico-básico) fueron eficientemente rotos por CPB2.8 Δ CTE (Hilaire y col., 2000).

La proteasa tipo catepsina B de *L. major* (LmajcatB) tiene las características estructurales de la familia de la catepsina B pero posee una especificidad de sustrato que recuerda a la de la familia de la catepsina L (Selzer y col., 1997). Debido a que el bolsillo S2 de la catepsina B contiene un residuo glutamato capaz de formar un puente de sal con residuos P2 básicos (Hasnain y col., 1993), esta enzima puede hidrolizar sustratos con una arginina en P2 mucho más rápidamente que la catepsina L. Este residuo de glutamato es reemplazado con glicina (Gly 234) en LmajcatB. También se expresó LmajcatB recombinante conteniendo ambas Gly o Glu en la posición 234 para determinar la eficiencia catalítica contra sustratos con aminoácidos P2 básicos. La LmajcatB G234 rompió Z-Arg-Arg-AMC con una eficiencia de ocho veces la de la tipo silvestre (Chan y col., 1999).

iv) Cisteína proteasa 2 (CP2) en *Giardia lamblia*.

Las cisteína proteasas son requeridas para el enquistamiento y desenquistamiento de los trofozoítos de *G. lamblia*, agente causal de la giardiasis gastrointestinal en humanos (Ward y col., 1997). Para que se inicie un ciclo de infección es necesario la ingestión de quistes de *Giardia spp.* y el subsecuente desenquistamiento de los trofozoítos en el intestino delgado. Al agregar inhibidores de cisteína proteasas a quistes de *G. muris*, durante el desenquistamiento *in vitro*, resultó en una reducción de los trofozoítos desenquistados (Ward y col., 1997). La cisteína proteasa CP2 fue purificada a partir de trofozoítos de *G. lamblia* utilizando una versión biotinilada de un inhibidor irreversible que redujo el desenquistamiento. El gen respectivo fue clonado y el análisis filogenético de su secuencia la agrupó en las catepsinas B (Ward y col., 1997).

v) CP30 en *Trichomona vaginalis*.

Un par de cisteína proteasas de 30 kDa sensibles a TLCK (Colectivamente llamadas CP30) con alta afinidad por la superficie a las células HeLa fueron identificadas a partir de extractos de *T. vaginalis* (Arroyo y Alderete, 1995; Mendoza y col., 2000) y mediante el uso de anticuerpos policlonales, se determinó su relación con la citoadherencia de este parásito. La CP30 se localiza en la superficie y en el citoplasma del parásito, y también es secretada, como fue evidenciado por su presencia en los sobrenadantes del cultivo y en los lavados vaginales de individuos infectados (Arroyo y Alderete, 1995). CP30 mostró actividad contra gelatina, colágeno IV, fibronectina y hemoglobina, *in vitro* (Mendoza y col., 2000).

vi) CP65 de *T. vaginalis*.

Los anticuerpos contra una cisteína proteasa de superficie de 65 kDa redujo la citotoxicidad sobre monocapas de células HeLa por arriba de un 64% (Alvarez y col., 2000). La destrucción de la espectrina, un componente del esqueleto de membrana, se observó después

del contacto de eritrocitos con *T. vaginalis* y se ha atribuido a la actividad de las cisteína proteasas (Fiori y col.,1997). Los parásitos intactos fueron requeridos para este efecto; ni el lisado de los parásitos, ni las proteasas extracelulares fueron capaces de degradar a la espectrina en eritrocitos intactos (Fiori y col., 1997).

9. CLASIFICACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LAS CISTEÍNA PROTEASAS.

Las cisteína proteasas de organismos parásitos son divididas en dos grupos principales referidos como clanes CA y CD (Barrett, 1994; Rawlings y Barret, 1993). En 1879 la primera cisteína proteasa fue purificada y caracterizada de *Carica papaya*, la papaya, y fue llamada papaína. La papaína fue la primera estructura de cisteína proteasa en ser resuelta. Desde su descubrimiento, numerosas proteasas que tienen secuencias en común con la papaína se han denominado tipo papaína o proteasas clan A, las cuales son divididas en familias (Fig.2). Las proteasas de parásitos son ubicados en la familia C1 (catepsina B y catepsina tipo L) y en la familia C2 (tipo calpaína). Otros clanes y familias relevantes de organismos patógenos son el clan CB, el CC (proteasas virales) y el CD (familia C13; tipo legumaína) (Fig.2). Convencionalmente, las proteasas son asignadas a clanes y familias dependiendo del número de características, incluyendo similitud en secuencia, posesión de horquillas de péptidos insertados, y especificidad bioquímica a substratos de péptidos pequeños (Sajid y McKerrow, 2002). Es claro al trabajar con proteasas de parásitos que hay un dogma previo en la clasificación biológica basada en cisteína proteasas de mamífero y papaína, el cual requiere una revisión.

El orden de la Cis/His catalítica (como en el clan CA) o His/Cis (como en el clan CD) en la secuencia peptídica lineal de cisteína proteasas de parásitos, sugiere que estas se originaron de varios eventos evolutivos independientes (Huges, 1994). Dentro de cada superfamilia de proteasas se pensó que la cisteína proteasa progenitora sufrió una rápida

duplicación genética inicial, generando proteínas parálogas, antes de la divergencia procariontes/eucariontes (Huges, 1994). La duplicación genética es también aparente en algunas cisteína proteasas de mamífero que son localizadas en el mismo cromosoma (Turk y col., 2000). Teóricamente, la evolución y especificidad observadas en organismos actuales se dedujo por la localización celular y la función bioquímica. Entonces, ocurrió una diversificación simultánea bajo selección natural positiva, con mutaciones originadas más rápidamente que lo que se esperaría si hubiera sucedido al azar. Hay poca evidencia de transferencia lateral de genes de cisteína proteasas entre organismos (Sajid y McKerrow, 2002).

9. 1. Familia tipo legumaina.

Estas enzimas llamadas tipo legumaina fueron primero identificadas y caracterizadas en la planta leguminosa *Caravalia ensiformis*, el frijol gato (Ishii y col., 1990). También se han localizado en *Schistosoma mansoni*, *F. hepatica* (Caffrey y col., 2000; Dalton y col., 1995), en muchas plantas y en mamíferos incluyendo humano, ratón, rata y cerdo (Sajid y McKerrow, 2002). Las legumainas se piensa que están localizadas en lisosomas donde ellas funcionan procesando otras proteínas.

Una de las características de las enzimas tipo legumaina es su insensibilidad a inhibidores genéricos de cisteína proteasas tales como E64 y leupeptina (Sajid y McKerrow, 2002). La actividad proteolítica es inhibida por reactivos generales como la iodoacetamida y el ácido iodoacético, que bloquean el sitio tiol, también por inhibidores de proteasas de amplia especificidad macromolecular como la α -2-macroglobulina y la cistatina (Sajid y McKerrow, 2002). Esta carencia de inhibidores selectivos ha impedido la caracterización bioquímica detallada.

Hay dos variedades en la familia 13 del clan CD tipo Legumaina y estas son las transamidases y las asparaginil endopeptidasas, que están agrupadas por su relación filogenética (Fig. 2).

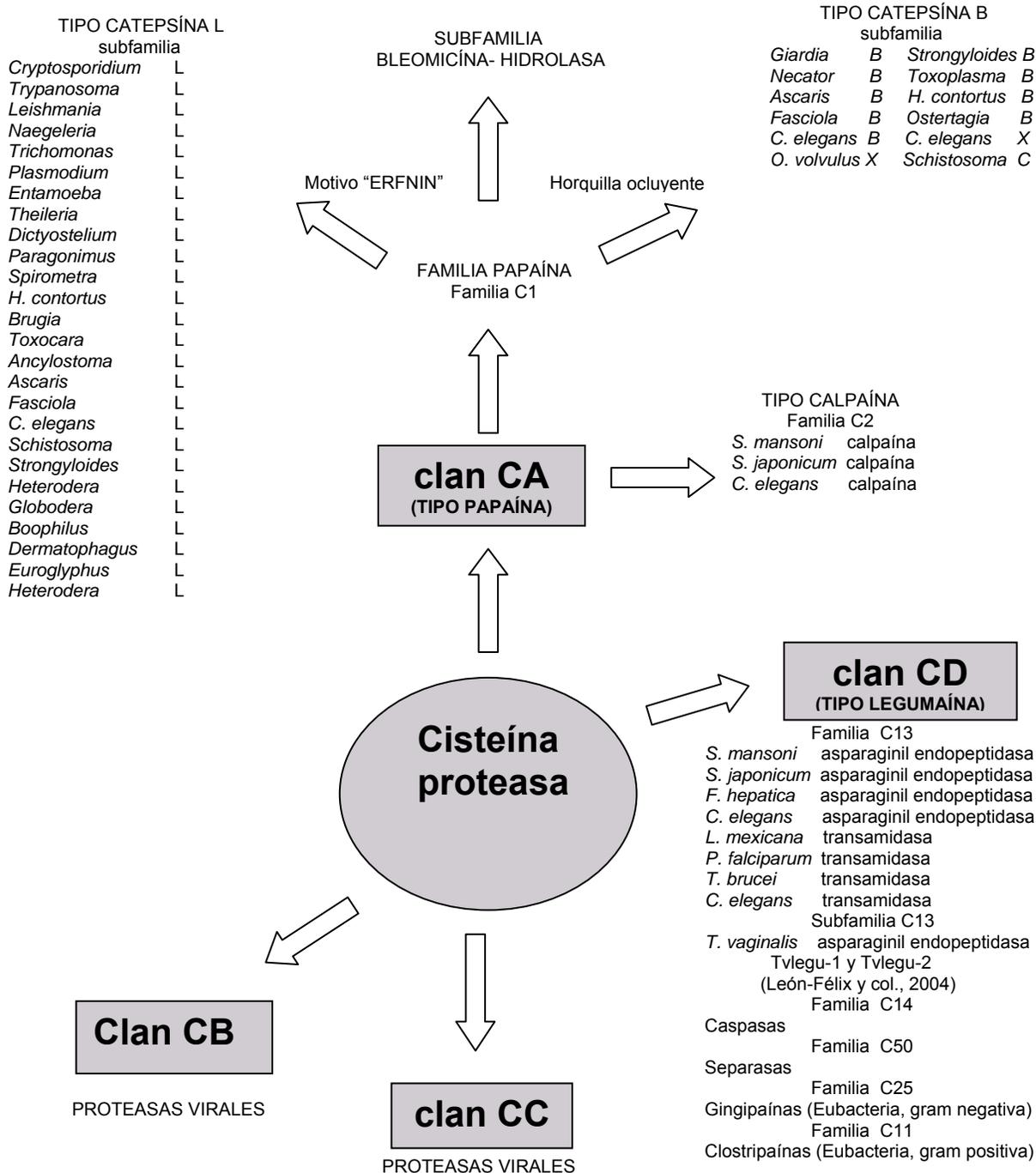


Fig. 2. Diagrama esquemático de la superfamilia de cisteína proteasas. Las subfamilias fueron determinadas por la homología en la secuencia de los aminoácidos que están alrededor del sitio activo (Sajid y McKerrow, 2002).

9. 1. 1. Asparaginil endopeptidasas.

Las asparaginil endopeptidasas hidrolizan exclusivamente péptidos y proteínas en el lado carboxilo de los residuos de asparagina (Sajid y McKerrow, 2002). En *S. mansoni* la asparaginil endopéptidasa es detectada en la gastrodermis y en el lumen cecal del parásito (Caffrey y col., 2000; Dalton y col., 1995). La enzima de la fasciola es expresada en dos formas derivadas de productos génicos distintos en cantidades aproximadamente iguales (Sajid y McKerrow, 2002). La proteína nativa activa ha sido bioquímicamente caracterizada y contiene el sitio activo Cys¹⁹⁷ (numeración de la asparaginil – endopeptidasa de *S. mansoni*). Además de esta proteasa, hay otra enzima distinta la cual tiene un residuo asparagina en lugar de la cisteína en el sitio activo. Esta es referida como la forma “inactiva” (Caffrey y col., 2000). La sustitución de la cisteína en lugar de la asparagina en la forma inactiva de *Schistosoma sp* asparaginil endopeptidasa (Asn¹⁹⁷→Cis¹⁹⁷) restaura la actividad enzimática y exhibe perfiles de sustrato similares a los de la enzima silvestre, cuando se usan colecciones de péptidos (Sajid y McKerrow, 2002). La razón por la que el parásito mantiene una enzima proteolíticamente inactiva con aparentes sitios intactos, no es claro.

Recientemente, una colección combinatorial de inhibidores vinil sulfona con una asparagina fijada en la posición P1 fue usada para mostrar asparaginil endopeptidasas en humano y *S. mansoni*. Los resultados indicaron que las vinil sulfonas pueden inhibir la actividad de asparaginil endopeptidasas y que hay especificidad en las posiciones P₂ y P₃. La asparaginil endopeptidasa de *S. mansoni* parece ser un blanco prometedor para la intervención quimioterapéutica, debido a que se afecta a un número importante de rutas río abajo al ser inhibida (Sajid y McKerrow, 2002).

9. 1. 2. GPI: transamidasas.

Las proteasas de humano, de *Saccharomyces*, de *L. mexicana*, de *C. elegans*, de *Drosophila melanogaster*, de *T. brucei* y de *Plasmodium falciparum* muestran similitudes sorprendentes a nivel de aminoácidos con la legumaína (Hilley y col., 2000; Sharma y col., 2000). Sin embargo, estas proteínas son asignadas a una subfamilia dentro de las proteínas tipo legumaína llamadas glicosilfosfatidilinositol (GPI): transamidasas. Estas proteínas han mostrado que juegan un papel en el anclaje de GPI preformadas a precursores de proteínas en el retículo endoplásmico (Hilley y col., 2000; Sharma y col., 2000). Es probable que las proteasas de *D. melanogaster*, *C. elegans* y *P. falciparum* puedan funcionar en la transamidación proteica GPI (Sajid y McKerrow, 2002). Hay una similitud de secuencias importante dentro de las asparaginil endopéptidasas alrededor del sitio activo His/Cys; mientras que, hay poca homología en secuencias alrededor de la His/Cys dentro de las transamidasas sugiriendo una divergencia temprana (Sajid y McKerrow, 2002).

9. 2. Proteasas tipo Papaína.

La mayoría de las cisteína proteasas de parásitos pertenece a la familia C1 dentro del clan CA (Fig. 2). Los miembros del clan CA son dirigidos a compartimentos vesiculares intracelulares, estos incluyen catepsinas B, C, H, K, L, y S (Turk y col., 2000), o son secretadas. Las proteasas del clan CA son caracterizadas por su sensibilidad al inhibidor general de cisteína proteasas el E64 (L – trans – epoxisuccini – leucil – amido (4-guanidino – butano) y por tener especificidad de substrato, definida por el sitio S₂. Estudios iniciales clasificaron a las catepsinas lisosomales usando sistemas vertebrados. La hidrólisis de pequeños péptidos que contienen arginina en P₂ han sido frecuentemente usados para discriminar la actividad de la catepsina B de la actividad de la catepsina L (Karrer y col., 1993). La especificidad en el sitio S₂ se ha atribuido a propiedades químicas del residuo

correspondiente a la posición 205 (numeración de la papaína); en la catepsina B y la catepsina L humanas estos residuos son glutamato y alanina, respectivamente (Karrer y col., 1993). Además, hay variaciones estructurales y de secuencia entre catepsina B y catepsina L. Las catepsinas L (incluyendo las muy relacionadas catepsinas S y K) han conservado un motivo en la pro-región, Glu, X₃ Arg, X₂, (Ile/Val), Phe, X₂, Asn, X₃, Ile, X₃, Asn; llamado “ERFNIN”, por el código de una letra para los aminoácidos (X es cualquier aminoácido) (Barrer y col., 1993). Las catepsinas B carecen de motivo ERFNIN pero tienen una horquilla peptídica en el dominio catalítico, referido como “horquilla ocluyente” (Fig. 2). Además de la actividad de endopeptidasa (igual a la catepsina L), las catepsinas B tienen una actividad dipeptidil carboxipeptidasa (Musil y col., 1991). Esto se ha atribuido a la horquilla ocluyente (Musil y col., 1991). La subfamilia de las catepsinas B y L puede ser delineada por la similitud en la longitud y la secuencia dentro de las respectivas pro-regiones así como también por el número y orden de los residuos de cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro (Llalmach y col., 1998). Las calpaínas (las cisteína proteasas citosólicas dependientes de Ca²⁺) son “tipo papaína”, pero carecen de una secuencia señal y tienen un dominio de regulación por calcio (Sajid y McKerrow, 2002).

Las secuencias de las catepsinas tipo B y L son completamente homólogas, sugiriendo una divergencia evolutiva reciente. Todas las catepsinas B de parásitos conocidas tienen residuos altamente conservados en el sitio activo. El árbol filogenético de la subfamilia de la catepsina B, confirma a la catepsina B de *Giardia* como la de linaje más temprano al ser comparada con otras secuencias génicas (Ward y col., 1997).

Muchas cisteína proteasas son sintetizadas como precursores que contienen un prodominio y un dominio maduro (catalítico). En algunos casos en las proteasas de *Leishmania*, *Trypanosoma* y varias plantas, tienen una extensión carboxilo terminal. La

proregión desarrollada provee un número de funciones independientes, incluyendo: actuar como una chaperona intramolecular para asistir a la proteína en el plegamiento; un inhibidor endógeno para regular la actividad de la proteasa (K_i de 0.4 nM para la catepsina B); y en algunos casos una señal que dirige la proteasa a su destino intracelular. Las cisteína proteasas que son dirigidas a un compartimiento intracelular o aquellas que son secretadas, también incluyen en el amino terminal una secuencia líder o péptido señal hidrofóbica de alrededor de 15 – 22 aminoácidos (García-Rivera y col., 1999; Sajid y McKerrow, 2002).

10. PAPEL QUE JUEGAN LAS CISTEINA PROTEASAS EN LA RELACION HUÉSPED PARÁSITO.

10. 1. Nutrición y desarrollo.

La filogenia molecular sugiere que las cisteína proteasas surgieron temprano en la evolución para degradar proteínas intra y extracelulares. Los protozoarios parásitos son una ventana en la evolución temprana de los eucariotes debido a que ellos representan las líneas más tempranas de las células eucariotes actuales (Sajid y McKerrow, 2002). Hay una gran cantidad de ejemplos donde proteínas exógenas son degradadas por cisteína proteasas de protozoarios parásitos (McKerrow y col., 1999), helmintos (Tort y col., 1999) y artrópodos (Sajid y McKerrow, 2002).

Estudios en parásitos sugieren que las funciones de las cisteína proteasas son diversas (Robertson y col., 1996; Rosenthal, 1999) e incluyen papeles claves en la adquisición de nutrientes y como parte del ciclo de desarrollo. Por ejemplo, las proteasas de *Plasmodium* hidrolizan a la globina para el crecimiento de parásitos intraeritrocíticos (Rosenthal y col., 1988) y los inhibidores de proteasas bloquean la degradación de la hemoglobina impidiendo así su desarrollo (Salas y col., 1995). Los inhibidores de cisteína proteasas también bloquean el desarrollo intracelular de *T. cruzi* (Eakin y col., 1992) y de *Leishmania* (Selzer y col., 1997).

Aunque *E. histolytica* no es un parásito intracelular, cuando sus trofozoítos fueron incubados con el inhibidor diazopeptidil, el crecimiento disminuyó por un 50% (De Meester y col., 1990), sugiriendo que las cisteína proteasas son importantes para la adquisición de nutrientes en un medio líquido.

En *T. cruzi* las cisteína proteasas también participan en el desarrollo. Inhibidores de proteasas específicos bloquean la transformación de epimastigotes a tripomastigotes (Franke de Cazzulo y col., 1994) y de amastigotes a tripomastigotes (Harth y col., 1993). En *T. brucei*, la actividad de cisteína proteasas se incrementa durante la diferenciación de formas alargadas a formas cortas (Pamer y col., 1989). Recientemente las cisteína proteasas han mostrado su importancia en el desenquistamiento de *Giardia* (Ward y col., 1997). En *E. invadens*, la cual se ha usado como un modelo para el enquistamiento y desenquistamiento de *E. histolytica*, inhibidores específicos de cisteína proteasas reducen significativamente la eficiencia del enquistamiento (Sharma y col., 1996). Más estudios son requeridos para esclarecer si las cisteína proteasas juegan un papel directo en la iniciación del enquistamiento o si el efecto de inhibición es secundario por reducir la multiplicación de los trofozoítos.

10. 2. Invasión del hospedero.

Las cisteína proteasas son importantes para la invasión del hospedero por varios parásitos. Inhibidores específicos bloquean la invasión de *T. cruzi* (Franke de Cazzulo y col., 1994), *P. falciparum* (Mayer y col., 1991), *Cryptosporidium parvum* (Forney y col., 1996) y *Toxoplasma gondii*. El papel de las cisteína proteasas en la invasión del tejido ha sido bien documentado en *E. histolytica*. Las proteasas purificadas degradan componentes de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, laminina y colágeno, así como la matriz extracelular de músculo liso vascular (Keene y col., 1986). Las cisteína proteasas son las responsables del efecto citopático, observado *in vitro* como la destrucción de monocapas celulares (Keene y col.,

1986; Reed y col., 1993). El efecto citopático correlaciona con la cantidad de actividad de cisteína proteasas liberadas en el medio por aislados clínicos de *E. histolytica* (Reed y col., 1989) y puede ser bloqueada por inhibidores peptídicos específicos.

10. 2. 1. Invasión celular y de tejidos.

Los parásitos usan proteasas para ayudarse en la invasión de células y/o tejidos, así como para facilitarse la migración en los tejidos. Este proceso es muy parecido al observado en la invasión celular tumoral. Hay muchos ejemplos de serina y metaloproteasas involucradas en la invasión celular y tisular en organismos parásitos, en contraste, hay relativamente pocas cisteína proteasas involucradas en ello.

En *T. cruzi* hay cisteína proteasas involucradas en varios procesos celulares, relacionados con la invasión celular (Meirelles y col., 1992). Las cisteína proteasas se han implicado en la invasión de hepatocitos *in vitro* por esporozoítos de *P. berghei* (Kumar y col., 1994). Las cisteína proteasas en *E. histolytica* han sido implicadas en la invasión y destrucción de tejidos, y son consideradas factores de virulencia (Que y Reed, 2000; Reed, 1995). En pacientes que tienen amibiasis invasiva hay una correlación de los niveles de cisteína proteasas extracelulares, con el daño epitelial y la producción de anticuerpos anticisteína proteasa (Reed y col., 1989). Se piensa que el daño tisular no es una consecuencia de la expresión y liberación de cisteína proteasas, más bien, el incremento de actividad proteolítica de las especies patógenas ayuda en la degradación de proteínas del hospedero o de bacterias para la nutrición e involuntariamente guía a la destrucción de tejidos (Sajid y McKerrow, 2002). Se ha mostrado que *E. histolytica* tiene al menos 20 genes diferentes (Bruchhaus y col., 2003).

La amiba *Naegleria fowleri* es el agente causal de la meningoencefalitis amibiana, una enfermedad fatal de los humanos que inicia por la invasión vía mucosa nasal (Aldape y col.,

1994). En esta amiba las cisteína proteasas secretadas pueden estar involucradas en la destrucción del tejido por invasión (Aldape y col., 1994).

10. 3. Enquistamiento, desenquistamiento, muda y eclosión.

Las proteasas se requieren para la salida del protozooario, helmintos y artrópodos de los quistes protectores, cutículas o huevos. En *G. lamblia* el inicio de la infección comienza por la ruptura de quistes lo cual requiere de cisteína proteasas (Ward y col., 1997). La adición de inhibidores de cisteína proteasas a los quistes de *G. muris* durante la inducción del desenquistamiento *in vitro*, resultó en una reducción substancial de el número de trofozoítos desenquistados (Ward y col., 1997). Usando una versión biotinilada de un inhibidor irreversible que reduce el desenquistamiento, una cisteína proteasa (CP2) fue purificada de los trofozoítos de *G. lamblia* y el gen respectivo fue clonado. El análisis filogenético colocó a esta secuencia en el grupo de las catepsinas B (Ward y col., 1997).

En *Paragonimus westermani* una cisteína proteasa está involucrada en el desenquistamiento de la metarcecaria en el lumen intestinal del huésped (Chung y col., 1995).

En el nemátodo filarial, inhibidores irreversibles de cisteína proteasa arrestan a la muda en los estadios larvales L3 de *Onchocerca volvulus* (Lustigman y col., 1997), *Dirofilaria immitis* (Richer y col., 1992) y *Brugia pahangi* (McKerrow, 1994). En los nemátodos antes mencionados, la larva L3 se encontró viable, pero fueron incapaces de mudar. Los inhibidores o los anticuerpos contra las cisteína proteasas fueron marcados, y permitieron localizar la actividad de proteasa tipo catepsina L en el espacio lleno de fluido colocado entre el tegumento del nemátodo, y la cutícula de la muda (Richer y col., 1992; Lustigman y col., 1996). También las cisteína proteasas se han identificado en huevos de *S. mansoni* y se ha propuesto que están involucrados en la eclosión y la posterior invasión al tejido del huésped (Sung y Dresden, 1986).

10. 4. Procesamiento de proteínas y activación.

Algunas proteasas tienen una preferencia limitada y específica de sustratos. En *T. gondii* se libera una proteína de superficie, MIC2, la cual participa en el proceso de invasión celular. MIC2 es proteolíticamente procesada por lo menos por dos actividades independientes, una de las cuales es en parte sensible a los inhibidores de cisteína proteasas (Carruthers y col., 2000).

En *G. lamblia* hay tres proteasas tipo catepsinas B, las cuales funcionan en el enquistamiento y en el desenquistamiento. Este parásito es también el huésped de un giardiavirus de doble cadena de RNA el cual sintetiza un gran precursor proteico de la cápside, a diferencia de muchos precursores virales los cuales son procesados por una proteasa viral. Los giardiavirus emplean una de las cisteína proteasas del huésped para procesar específicamente a la proteína de la cápside de 100 kDa (Yu y col., 1995).

10. 5. Serodiagnósticos, alergias y vacunas.

Las cisteína proteasas son muy inmunogénicas, esta característica ha sido explotada para usarlas como marcadores inmunodominantes en enfermedades infecciosas, ya que en varios casos la identidad de los marcadores del serodiagnóstico confirmó la presencia de una cisteína proteasa.

Las cisteína proteasas también son responsables de la respuesta alérgica en humanos y en animales. La alergia al polen de las plantas, detergentes y ácaros del polvo se debe a la hipersensibilidad a las proteasas (Sajid y McKerrow, 2002). Entre los alérgenos mejor caracterizados están las cisteína proteasas, Der p1 y Der f1, encontradas en las heces del pequeño ácaro del polvo *Dermatophagus sp* (Stewart y col., 1992). La Der p1 rompe las uniones fuertes en la mucosa pulmonar y nasal, facilitando su propio paso a través de los vasos sanguíneos, promoviendo la alergia y el asma asociada, así como la rinitis y la dermatitis

atópica. En un trabajo reciente con Der p1, se comparó la secuencia del antígeno del ácaro con homólogos en parásitos y animales. Los resultados de este estudio sugirieron que existe un epítotope IgE genérico y es potencialmente accesible en Der p1 y las otras cisteína proteasas. El alérgeno del ácaro es LDAFRRHYDGRTIIQ (Takai y col., 2000). Otros investigadores propusieron que la actividad proteolítica de las cisteína proteasas, de la familia de la papaína, contribuye a su potencial alérgico (Sajid y McKerrow, 2002).

Los anticuerpos dirigidos contra las cisteína proteasas pueden tener un efecto inhibitorio en su actividad proteolítica como se ha visto con los anticuerpos anti-catepsina L de *F. hepática* (Smith y col., 1994), anti cisteína proteasas de *D. viviparus* y anti Der p1 de *D. pteronyssinus* (Cambra y Berrens, 1996). La protección inmunológica usando cisteína proteasas se ha también observado contra antígenos SERA/SERP de *P. falciparum* en ratón, y contra antígenos cisteína proteasas de *E. histolytica in vitro* y en modelos animales (Inselburg y col., 1993; Sugiyama y col., 1996). La calpaína de *S. mansoni* fue implicada como blanco de inmunidad protectora y también se ha usado como una vacuna en modelos murinos. La secuencia oligopeptídica protectora mínima es EWKGAWCDGS, los linfocitos T CD4+ que usaron este epítotope como un blanco antigénico pudieron ser transferidos pasivamente y continuaron protegiendo contra subsecuentes desafíos de *S. mansoni* (Jankovic y col., 1996). Además, se han reportado vacunas protectoras, anti-cisteína proteasas, contra parásitos como *F. hepática* y *Haemonchus contortus* (Dalton y col., 1996; Skuce y col., 1999).

10. 6. Las cisteín proteasas en la evasión del sistema inmune.

10. 6. 1. Degradación de la IgA humana.

La IgA es la inmunoglobulina predominante de defensa en la superficie mucosa (Underdown y Schiff, 1986). Las funciones biológicas de la IgA no son completamente entendidas pero incluyen la inmovilización y prevención de la adherencia de microorganismos,

unión de toxinas e inhibición de la absorción de antígenos (Kilian y col., 1988; Underdown y Schiff, 1986). La mayoría de los linfocitos en la mucosa externa están dedicados a la producción de IgA, la cual es liberada en la mucosa intestinal como un dímero unido por puentes disulfuro y un componente secretado rico en carbohidratos, el cual es necesario para la secreción transepitelial (Underdown y Schiff, 1986). La IgA puede jugar un papel indirecto en la citotoxicidad mediada por anticuerpos a través de receptores $Fc\alpha$ y la potenciación de la acción de factores antibacterianos no específicos tales como lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima (Kilian y col., 1988).

La IgA inmune secretoria (sIgA) se ha demostrado en pacientes con amibiasis invasiva por mediciones de anticuerpos fecales (Sharma y col., 1981) calostrales (Grundy y col., 1983) y salivales (Abou-El-Magd y col., 1966). El grupo de Ximenez ha mostrado que portadores de *E. dispar* también desarrollan una respuesta salival con sIgA (Ramos y col., 1997). Ambos sIgA salival humana (Carrero y col., 1994) e IgA monoclonal anti amiba (Levya y col., 1995) bloquean la adherencia de trofozoítos de *E. histolytica* a monocapas celulares epiteliales.

Bacterias invasivas vía mucosa, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, producen proteasas que degradan IgA1 (Genco y col., 1975; Kilian y col., 1980; Kornfeld y Plaut, 1981). Todas las proteasas IgA1, que han sido caracterizadas son extracelulares, son endopeptidasas neutras que rompen la región de la bisagra de la IgA1 específicamente para producir Fab y Fc (Plaut, 1983). El rompimiento de IgA1 puede reducir su afinidad por el antígeno, interfiriendo con el antígeno o enmascarando determinantes antigénicos cubriéndolos con fragmentos Fab (Kilian y col., 1988). Quezada-Calvillo y col., (1986) han demostrado el rompimiento limitado de IgA por amibas. Kelsall y Ravdin (1993) encontraron que la degradación de IgA parece ser mediada predominantemente por cisteína proteasas.

10. 6. 2. Rompimiento de IgG inmune.

Gran número de parásitos liberan proteasas las cuales rompen IgG. Los tripomastigotes de *T. cruzi* unen IgG a través de los fragmentos Fab y entonces rompen la fracción Fc con cruzapaína, su cisteína proteasa principal (Bontempi y Cazzulo, 1990). *Schistosoma mansoni* une Igs vía un receptor Fc y entonces degrada la porción Fab de IgG (Auriault y col., 1981). Las cisteína proteasas de *Tritrichomonas foetus* (Talbot y col., 1991), *Trichomonas vaginalis* (Provenzano y Alderete, 1995) y *Fasciola hepatica* (Carmona y col., 1993) también degradan IgG.

Una respuesta sistémica IgG se desarrolla en pacientes que son colonizados o tienen una infección invasiva con *E. histolytica*, en contraste a aquellos colonizados con *E. dispar* (Jackson y col., 1985). Un papel protector por IgG en enfermedades amebianas ha sido difícil de establecer y niveles del anticuerpo correlacionan con la longitud de la enfermedad, no con la respuesta clínica a la infección (Jackson y col., 1985). En modelos animales, una respuesta de anticuerpos en suero no protegen al hámster, pero ratones SCID fueron pasivamente protegidos por suero inmune policlonal de conejo (Cieslak y col., 1992). Tran y col., (1998) encontraron que cisteína proteasas extracelulares purificadas y de trofozoítos de *E. histolytica* intactos rompieron la cadena pesada de IgG. Cuando un anticuerpo monoclonal contra la superficie antioxidante tiol específica fue roto por una proteasa purificada, la unión a trofozoítos decreció por arriba de un 80% (Tran y col., 1998). Estos resultados sugieren que el rompimiento de IgG por cisteína proteasas extracelulares puede limitar la efectividad de la respuesta humoral del hospedero.

10. 7. Resistencia a la lisis mediada por complemento.

Para invadir exitosamente, los parásitos deben ser capaces de evadir múltiples defensas locales y sistémicas del hospedero, incluyendo la acción de proteínas del complemento

activadas. Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una superficie rica en carbohidratos y fue demostrado que consumen componentes de las rutas clásicas y alternativa de complemento (Calderón y Schreiber, 1985; Reed y col., 1986). La especificidad de substrato para las cisteína proteasas amibianas es por aminoácidos cargados positivamente, lo cual es similar a la de las proteasas generadas durante la activación del complemento. Se ha demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* activan complemento por un mecanismo único, rompiendo la cadena α de C3, generando un C3b funcionalmente activo (Reed y col., 1989). Componentes terminales de complemento activados son también generados, los cuales lisan a *E. dispar* pero no a *E. histolytica* por lisis reactiva (Reed y Gigli, 1990). *E. histolytica* es resistente a la lisis por el complejo de ataque a membrana en virtud de la lectina inhibible por galactosa la cual tiene reactividad antigénica cruzada con CD59, un inhibidor de C5b-9 en células sanguíneas humanas (Braga y col., 1992). Este puede ser un mecanismo por el cual *E. dispar* es confinado al lumen del intestino debido a la muerte mediada por complemento en tejidos o en el tejido sanguíneo. Otro grupo ha reportado que las cepas de *E. dispar* son resistentes a la lisis mediada por complemento, mientras que las cepas de *E. histolytica* son susceptibles (Hamelmann y col., 1992). No es claro si los resultados antagónicos sean debido a las diferentes condiciones de cultivo, pero se considera que clínicamente, solo *E. histolytica* causa enfermedad invasiva.

10. 8. Degradación de las anaflatoxinas C3a y C5a.

Las anaflatoxinas, C3a y C5a, son potentes estimuladores de la respuesta inflamatoria del hospedero. C3a y C5a son generadas por rompimiento de las cadenas α de C3 y C5 por sus respectivas convertasas. La porción restante de cada molécula, C3b y C5b, participan en la activación de los componentes de acción tardía, guiando a la formación del complejo de ataque a la membrana (Tack y col., 1981). C3a tiene efectos fisiológicos múltiples, incluyendo el

aumento en la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso, suprimiendo la proliferación de células T, y liberando histamina de los mastocitos e interleucina-1 (IL-1) de los macrófagos (Hugli, 1986). C5a induce la quimiotaxis de neutrófilos, activa macrófagos y estimula la liberación de IL-1, IL-6 e IL-8 (Hugli, 1986). La misma cisteína proteasa extracelular de *E. histolytica* que activa complemento, produce C3b hemolíticamente activa (Reed y col., 1989) y también degrada a la C3a y a la C5a, las cuales serán subsecuentemente formadas (Reed y col., 1995). Ambas C3a y C5a son susceptibles de destrucción proteolítica con pérdida de su actividad biológica en una forma dosis dependiente (Reed y col., 1995). Así, la cisteína proteasa extracelular de *E. histolytica*, la cual es capaz de activar complemento, puede también evadir la respuesta inmune normal del hospedero inactivando las anafatoxinas, C3a y C5a.

10. 9. Especificidad de sustrato.

La especificidad de sustrato de las proteasas de *E. histolytica* es la típica de las proteasas tipo catepsina B de la familia de la papaína (Keene y col., 1986; Luaces y Barrett, 1988). La mayoría de sus cisteína proteasas son activas contra un sustrato peptídico sintético, Z-Arg-Arg-AMC (benziloxycarbonil-arginina-arginina-4amino-7metilcuramina), con arginina en las posiciones P1 y P2. Las cisteína proteasas amibianas tienen poca afinidad por el sustrato para la catepsina L, Z-Phe-Arg-AMC, y el sustrato para la catepsina H, Z-Arg-AMC, aunque por el análisis de los genes de proteasas amibianas han sido identificadas sólo secuencias tipo catepsina L (Que y Reed, 2000).

10. 10. pH dependientes.

Las cisteína proteasas de los parásitos funcionan en una amplia variedad de ambientes químicos en comparación con las enzimas homólogas del hospedero. Las cisteína proteasas lisosomales de mamífero son relativamente inestables en pH neutro cuando son comparadas con sus ortólogas de parásitos. La excepción es la catepsina S de mamífero (Sajid y McKerrow,

2002). La estabilidad de las catepsinas de mamífero puede ser un mecanismo de regulación para minimizar la proteólisis no deseada en compartimentos celulares o tisulares inapropiados. Se ha estimado que el pH lisosomal es tan bajo como 4.0, y éste puede activar enzimas lisosomales así como desnaturalizar substratos protéicos (Turk y col., 1995). Mientras que las catepsinas de parásitos son también activas en pH bajo, en marcado contraste a las proteasas de vertebrados las proteínas de parásitos son más activas y permanecen estables en pH neutro (Sajid y McKerrow, 2002). Aunque el pH óptimo de las cisteína proteasas de *E. histolytica* es amplio, variando de pH 5 a 9, la mayoría de estas enzimas son activas en pHs ligeramente ácidos y neutros (Barret y Kirschke, 1981). Este amplio perfil de pH de las cisteína proteasas de parásitos es consistente con las numerosas funciones extralisosomales que han sido caracterizadas (Sajid y McKerrow, 2002).

10. 11. Inhibidores de cisteína proteasas como quimioterapia antiparasitaria.

Las proteasas de parásitos juegan un papel crucial en las interacciones entre parásito y hospedero, incluyendo la adquisición de nutrientes, facilitan la invasión de tejidos y defensa contra el ataque inmune. Por lo tanto, las proteasas de parásitos son blancos importantes para nuevas estrategias quimioterapéuticas. Sólo unos cuantos reportes han identificado inhibidores de cisteína proteasas producidas por los mismos parásitos. Inhibidores de la papaína fueron detectados en una variedad de protozoarios parásitos, incluyendo *Leishmania*, *Trichomonas* y *Trypanosoma*, sugiriendo que moléculas parecidas a la cistatina pueden estar ampliamente distribuidas (Irvine y col., 1992). Un gen que codifica a una molécula parecida a la cistatina también ha sido encontrada en *S. mansoni* (Cao y col., 1993). Es probable que las cistatinas encontradas dentro de parásitos puedan jugar un papel protector contra sus propias cisteína proteasas y la descripción de su estructura provea de información importante en los requerimientos de unión a las enzimas del parásito.

Las pro-regiones de las cisteína proteasas pueden inhibir la correspondiente enzima madura, el análisis de estas estructuras proveerá información valiosa acerca de la especificidad del inhibidor y ayudará en el diseño de inhibidores específicos (Coulombe y col., 1996). Las células, para protegerse de la degradación incontrolada, sintetizan todas sus proteasas como precursores inactivos. El propéptido en el amino terminal de estos precursores facilita el plegamiento de la enzima madura actuando como una chaperona intramolecular, manteniendo la estabilidad de la proteasa mientras pasa por la ruta secretoria, actuando además como un inhibidor intrínseco de la enzima. La enzima activa se obtiene al liberar la proregión por autoproteólisis bajo condiciones ácidas. Recientemente se ha demostrado en un gran número de estudios acerca de cisteína proteasas de mamíferos y plantas, que los propéptidos libres son inhibidores potentes y altamente selectivos para sus correspondientes enzimas maduras (Roche y col., 1999; Taylor y col., 1995). Además, los propéptidos exhiben la más alta selectividad de inhibición para la enzima de la cual se originaron; por ejemplo, el propéptido de la catepsina L fue más activo contra la catepsina L que para otros miembros relacionados de la superfamilia, tales como la catepsina S, y no mostró actividad inhibitoria en contra de las catepsinas B (Coulombe y col., 1996; Maubach y col., 1997). Roche y col., han investigado la especificidad del propéptido de la catepsina L de *F. hepatica* para su enzima madura (Roche y col., 1999), el propéptido recombinante expresado en *E. coli* mostró ser un potente inhibidor de la catepsina L1 y en menor grado de la catepsina L2 (Roche y col., 1999). Taylor y col., (1995) mostraron que la especificidad para la inhibición de las cisteína proteasas, de la superfamilia de la papaína por sus propéptidos, correlaciona con la identidad en la secuencia (Taylor y col., 1995). Conforme los mecanismos de inhibición sean revelados, más información molecular respecto a que define que la estructura de los propéptidos sean inhibidores específicos para

sus enzimas parentales, nos guiará al diseño de drogas antiparasitarias más potentes y selectivas.

10. 11. 1. E-64 e inhibidores de péptidos sintéticos.

E-64, el cual fue aislado de *Aspergillus japonicum*, es un inhibidor de cisteína proteasas de amplio espectro (Barrett y col., 1982) y ha sido una herramienta útil en experimentos para bloquear la actividad de cisteína proteasas, aunque es limitado en su capacidad para penetrar a las células. El E-64 bloquea por completo la actividad de cisteína proteasas de trofozoítos cultivados de *E. histolytica* e inhibe la destrucción de monocapas de células de mamífero (De Meester y col., 1990; Reed y col., 1993). En estudios recientes en ratones SCID infectados con trofozoítos de *E. histolytica* preincubados con E-64, se observó una marcada reducción en la formación de abscesos hepáticos amibianos (Seydel y col., 1997). Las cisteína proteasas amibianas tienen diferencias estructurales significativas con sus contrapartes de mamífero, por lo que debe ser posible producir inhibidores de proteasas no peptídicos, altamente específicos (análogos al E-64), por análisis bioinformático de la estructura secundaria y técnicas de modelaje. Nuevas generaciones de inhibidores específicos de cisteína proteasas, incluyendo diazometanos, vinil sulfonas y péptidos sintéticos, han sido activos en el rango micromolar a nanomolar contra *E. histolytica* (Reed y col., 1993), así como contra otros parásitos (Rosenthal, 1999). Un inhibidor específico de cisteína proteasas es la vinil sulfona, que previene la infección letal de *T. cruzi* en ratón (Engel y col., 1998) mostrando a estos inhibidores como una terapia antiparasitaria.

Inhibidores como el peptidil clorometil cetona, diazometil cetona y clorometil cetona bloquean la actividad de proteasas de parásitos cuando se presentan en concentraciones micromolares (Rosenthal, 1999). Al usar derivados biotinilados de estos inhibidores, se mostró que las cisteína proteasas están probablemente localizadas (Walsh, 1988). Se han probado

inhibidores péptido sintéticos los cuales entran a las células libremente y tienen un 50% de inhibición contra las cisteína proteasas de *E. histolytica* que se encuentran con una concentración menor a 5 μ M (Reed y col., 1993). Las nuevas generaciones de inhibidores serán herramientas útiles para establecer definitivamente el papel que juegan las cisteína proteasas en la patogénesis de la amibiasis y podrá proporcionar drogas antiamebianas.

10. 11. 2. Efecto de la inhibición por RNA antisentido de cisteína proteasas.

El RNA antisentido es otra técnica que se ha utilizado para bloquear la expresión de un gen de cisteína proteasa. El grupo de Mirelman produjo un transfectante de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* con un plásmido episomal replicante, en el cual el RNA de *Ehcp5* fue transcrito en antisentido reduciendo fuertemente la expresión de EhCP5 y probablemente tiene reacción cruzada con otras cisteína proteasas debido a que se redujo hasta en un 90 % la actividad proteolítica de CPs en trofozoítos de *E. histolytica* (Ankri y col., 1998). El total de actividad de cisteína proteasa en los lisados de la transfectante fue de aproximadamente el 10 % del nivel de actividad de cisteína proteasa mostrado en los controles. Los trofozoítos transfectantes tenían actividad de eritrofagocitosis más baja que la observada en la cepa parental (Ankri y col., 1998). El efecto de la inhibición en antisentido fue dramática, ya que ningún absceso fue detectado en hámsteres inyectados con trofozoítos transfectados en contraste al 100 % de los controles no tratados (Ankri y col., 1999).

11. CISTEÍNA PROTEASAS COMO FACTORES DE VIRULENCIA EN *E. histolytica*.

La producción y liberación de cisteína proteasas extracelulares es de 10 a 1000 veces más en los lisados de células de *E. histolytica* que en lisados de *E. dispar*, amiba no invasiva (Reed y col., 1989). Las cisteína proteasas purificadas de *E. histolytica* axenizadas rompen colágeno, elastina, fibrinógeno y laminina, elementos de la matriz extracelular que los trofozoítos deben penetrar para ser invasivos (Keene y col., 1986; Luaces y Barrett, 1988). Las

cisteína proteasas son responsables del desprendimiento de monocapas celulares, el ensayo más ampliamente usado para determinar toxinas amibianas. El efecto citopático sobre monocapas de fibroblastos de sobrenadantes de cepas de *E. histolytica* es completamente inhibido por Z-Phe-Arg-CH₂F, un inhibidor de cisteína proteasas específico e irreversible que no es tóxico a células del hospedero (Reed y col., 1993). Sin embargo, la lisis celular *in vitro* causada por trofozoítos vivos de *E. histolytica* es un proceso más complejo, requiriendo la unión del parásito (Petri y col., 1987) y la lisis de la célula blanco por el amebaporo (Leippe y col., 1991).

12. LOCALIZACION Y TRÁFICO DE CISTEÍNA PROTEASAS AMIBIANAS.

El tráfico de cisteína proteasas amibianas puede diferir de la ruta normal de los eucariontes superiores. El complejo de Golgi, retículo endoplásmico (ER), y lisosomas, los organelos claves del transporte proteico, son solamente estructuras rudimentarias en *Entamoeba* (Mazzuco y col., 1997). Verdaderos lisosomas se han identificado en *Entamoeba*, aunque numerosas vesículas ácidas están presentes en el citoplasma (Ravdin y col., 1986). Solamente una cisteína proteasa amibiana, EhCP5, tiene un sitio potencial de glicosilación ligado a asparagina, pero no se sabe si la manosa-6-fosfato está presente en la enzima madura (Jacobs y col., 1998). Por lo tanto, la ruta dependiente de manosa-6-fosfato no puede ser el mecanismo mayor para dirigir cisteína proteasas amibianas. En otros sistemas se han identificado varias rutas independientes de manosa-6-fosfato de tráfico de proteasas (Sloane y col., 1990; McIntyre y col., 1994; Huete-Pérez y col., 1999; Brooks y col., 2000). Los precursores de la catepsina B liberados extracelularmente por tumores malignos normalmente no tienen carbohidratos ricos en manosa, sugiriendo un posible defecto en el procesamiento postraduccional (Sloane y col., 1990). Una secuencia prodominio conservada interactúa con receptores microsomales de membrana con un blanco independiente de manosa-6-fosfato de

catepsinas en células de mamífero (McIntyre y col., 1994). Un papel similar es jugado por un prodominio en forma de horquilla localizado en las catepsinas de *T. cruzi* y *L. mexicana*, las cuales no tienen modificaciones de carbohidratos (Huete-Pérez y col., 1999). Por lo tanto rutas independientes de manosa-6-fosfato para las proteasas, en el tráfico proteico lisosomal en células amibianas parece posible, aunque es necesario confirmarlo.

La existencia de vesículas acídicas en *E. histolytica* y la presencia de secuencias conservadas tipo catepsina L en las proregiones de las CPs sugiere que algunos de los mecanismos de síntesis, procesamiento y tráfico pueden ser similares a aquellos de eucariontes superiores. Un bajo nivel de proteasas maduras se ha detectado en la membrana plasmática de los trofozoítos. La amebapaína (ACP3) se ha localizado en la superficie celular amibiana y en vesículas pinocíticas subcelulares (Scholze y col., 1992). La EhCP5 se piensa está asociada con membranas de *E. histolytica* vía una secuencia hidrofóbica (Jacobs y col., 1998). La cisteína proteasa de superficie más recientemente identificada, la fusión cisteína proteasa – adhesina de 112 kDa, tiene un dominio transmembranal y una secuencia RGD (García-Rivera y col., 1999), Durante la fagocitosis de eritrocitos, la proteína completa es translocada a vesículas fagocíticas (García-Rivera y col., 1999). Aunque *E. histolytica* realmente libera cisteína proteasas extracelularmente, no se sabe si este es un proceso secretor activo.

13. IDENTIFICACIÓN DE CISTEÍNA PROTEASAS EN *E. histolytica*.

Un gran número de cisteína proteasas con masas moleculares de 16 a 96 kDa se han observado en varios extractos de *E. histolytica*. Al correr electroforéticamente lisados de trofozoítos de *E. histolytica* en geles copolimerizados con gelatina se revelan de cuatro a seis bandas de actividad de proteasa (Que y Reed, 2000). Las formas predominantes de cisteína proteasas en *Entamoeba* son enzimas maduras de 27 a 30 kDa. Los trofozoítos de *E.*

histolytica liberan grandes cantidades de cisteína proteasas en el medio de cultivo. Muestras clínicas recientes de *E. histolytica* liberan de 10 a 1000 veces más actividad de cisteína proteasa que lo observado en el sobrenadante de *E. dispar*, aunque hubo variabilidad diaria significativa (Reed y col., 1989). Keene y colaboradores detectaron una abundante proteasa neutra en secreciones de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente. Esta proteasa tiene una masa molecular de ~ 56 kDa, un pH óptimo neutro y un pI de 6 (Keene y col., 1986). Investigadores que iniciaron el estudio de proteasas en *E. histolytica* purificaron por lo menos dos similares pero con distintas actividades de cisteína proteasas caracterizadas como amebapaína (Scholze y Schulte 1988) e histolisina (Luaces y Barret 1988). Dos cisteína proteasas de 27 kDa pudieron ser purificadas por su afinidad a la laminina: la amebapaína (EhCP1 o ACP3) y la ACP2 (EhCP2) (Li y col., 1995). Las aparentes diferencias en masa molecular de estas y otras preparaciones pueden reflejar diferencias en protocolos de purificación, resultando en formación de multímeros, autoproteólisis, o la secreción de proenzimas de alto peso molecular.

Por otra parte la liberación de cisteína proteasas extracelulares esta relacionada con la invasión de tejidos según se ha observado en *E. histolytica* y en tumores metastásicos. Se piensa que una forma unida a la membrana de la enzima, en líneas celulares de melanoma, contribuye a la disolución focal de matrices extracelulares que precede a la invasión tisular por parte de células de melanoma (Rozhin y col., 1987; Sloane y col., 1986). La liberación de proenzimas por células tumorales y por trofozoítos amibianos presenta mecanismos evolutivamente conservados de metástasis que aún esperan su caracterización.

Bruchhaus y col., (2003) aprovechando el progreso reciente que se tiene en la secuenciación del genoma de *E. histolytica* (más del 99 %), analizó con el programa BLAST el banco de datos del genoma de *E. histolytica* e identificó un total de 20 genes diferentes con

marcos de lectura abiertos que corresponden a cisteína proteasas de la superfamilia de la papaína. Hasta el momento se ha secuenciado el 99 % de todos los genes de *E. histolytica*, es probable que estas 20 secuencias de CPs representen el repertorio completo de genes de cisteína proteasas de este protozoo parásito. Estos comprenden los 8 genes *Ehcp* previamente identificados (*Ehcp1* a *Ehcp7* y *Ehcp112*) así como 12 genes *Ehcp* no descritos y que se designaron como *Ehcp8* hasta *Ehcp19*. Las cisteína proteasas amibianas consisten de polipéptidos con una presecuencia hidrofóbica de 12 a 20 aminoácidos, un prodominio de 55 a 148 aminoácidos y un dominio catalítico (enzima madura) de 190 a 488 aminoácidos. Todas las secuencias muestran sitios específicos de cisteína proteasas: varios aminoácidos involucrados en el sitio activo y seis cisteínas invariables, de las cuales se sabe están involucradas en los puentes disulfuro que estabilizan la estructura terciaria de las enzimas y que pueden formar parte del sitio activo. El número relativamente grande de genes de CPs dentro del genoma de *E. histolytica* no parece ser simplemente el resultado de la amplificación génica reciente, el alineamiento mostró que hay entre ellas de un 10 a un 86 % de identidad (Bruchhaus y col., 2003). Además, los marcos de lectura abiertos de dos de los genes, *Ehcp14* y *Ehcp16*, son interrumpidos por intrones cortos de 77 y 59 pb, respectivamente y ambos contienen secuencias de splicing (Willhoeft y col., 1999). La construcción de árboles filogenéticos indica que hay dos grupos de enzimas, sugiriendo que los 20 genes de cisteína proteasas se desarrollaron de dos ancestros separados en un estadio temprano de la evolución del parásito. De acuerdo a esto las enzimas amibianas fueron agrupadas en dos subfamilias, designadas EhCP-A y EhCP-B.

13.1. Subfamilia EhCP-A.

Las cisteína proteasas de la subfamilia EhCP-A tienen prodominios y dominios catalíticos más cortos que los observados en los miembros de la subfamilia EhCP-B. Los

prodominios comprenden de 72 a 90 aminoácidos en esta subfamilia y los dominios catalíticos comprenden de 190 a 254 aminoácidos. Además, los miembros de EhCP-A contienen un motivo conservado, Asp-Trp-Arg (DWR) en las posiciones +6 a la +8, y la cisteína del sitio activo es localizada alrededor de la posición +25. A esta subfamilia pertenecen: EhCP1, EhCP2, EhCP3, EhCP4, EhCP5, EhCP6, EhCP8, EhCP9, EhCP10, EhCP17 y EhCP19 (Bruchhaus y col., 2003).

13. 2. Subfamilia EhCP-B.

Las cisteína proteasas de esta subfamilia tienen prodominios y dominios catalíticos más largos. Los prodominios pueden tener de 105 a 144 aminoácidos y los dominios catalíticos comprenden de 230 a 353 aminoácidos. Además, los miembros de EhCP-B contienen el motivo conservado DWR en la posición +8, y la cisteína del sitio activo está localizada entre las posiciones +30 y +38. Esta subfamilia agrupa a; EhCP7, EhCP11, EhCP12, EhCP13, EhCP14, EhCP15, EhCP16, EhCP18 y EhCP112 (Bruchhaus y col., 2003).

13. 3. Subclases de cisteína proteasas tipo Catepsinas L y tipo Catepsinas B.

Las cisteína proteasas pueden ser también divididas en dos subclases, tal y como fueron divididas las enzimas tipo catepsinas B y L, basándose en la secuencia primaria y la especificidad de sustrato. El alineamiento de secuencias reveló la más alta similaridad de casi todas las CPs a la subclase tipo catepsinas L, independientemente de si ellas pertenecen a la subfamilia EhCP-A o EhCP-B. Esto es apoyado por el hecho de que 19 de las 20 CPs amibianas (excepto EhCP15) contienen el motivo ERFNIN conservado dentro de la pro-región. Este motivo y su posición dentro de la pro-región se sabe que es específico de las proteasas tipo catepsina L (Barrer y col, 1993). Sin embargo, a pesar de su similaridad a las catepsinas L, las CPs amibianas han mostrado que son capaces de degradar Z-Arg-Arg, un péptido sintético que es específicamente cortado por las enzimas tipo catepsina B (Helberg y col., 2001; Jacobs

y col., 1998; Scholze y Scholze, 1989; Scholze y Tannich, 1994). La especificidad de sustrato de las cisteína proteasas en el bolsillo S2 se ha atribuido a las propiedades químicas del aminoácido 205 de la secuencia de la papaína. Las catepsinas B normalmente tienen grupos ácidos (Asp o Glu) en esta posición, mientras que las catepsinas L de mamífero tienen una alanina en esta posición (Barrett, 1998). Consistente con su especificidad de sustrato, ninguna de las cisteína proteasas amibianas contienen una alanina en el bolsillo S2, pero siete de ellas contienen un Asp en esta posición (Bruchhaus y col., 2003). Una observación similar se hizo para la cruzapaína, una cisteína proteasa del protozoario *T. cruzi*. Esta enzima mostró una estructura primaria tipo catepsina L, pero tiene una especificidad de sustrato tipo catepsina B y contiene un Glu en el bolsillo S2 (Sajid y McKerrow, 2002).

Todas las cisteína proteasas amibianas tienen cisteínas en su sitio activo. Y 16 de las 20 CPs tienen los cuatro aminoácidos conservados. Las excepciones son EhCP6, EhCP11, EhCP16 y EhCP19, en las cuales uno de los aminoácidos es sustituido (Bruchhaus y col., 2003).

Estudios previos han sugerido que *E. histolytica* también contiene cisteína proteasas unidas a superficie (Avila y Calderón, 1993; García-Rivera y col., 1999; Spinella, 1999). Sin embargo, las enzimas identificadas de este modo no contienen secuencias típicas de proteínas de membrana. En contraste, 7 de las 12 enzimas amibianas recientemente identificadas, las cuales pertenecen a la subfamilia EhCP-B, tienen secuencias hidrofóbicas cerca o directamente en el extremo carboxilo terminal, a las cuales se les ha predicho que constituyen regiones transmembranales o son posteriormente procesadas para permitir la unión vía el ancla GPI. Para nuestro conocimiento, esta propiedad parece ser única, ya que no se ha descrito para cisteína proteasas encontradas en eucariontes superiores (Bruchhaus y col., 2003).

Muchas de las cisteína proteasas amibianas contienen por lo menos un sitio aceptor potencial para N-glicosilación. La glicosilación de las enzimas amibianas no ha sido determinada experimentalmente. Se sabe que para la catepsina L, la glicosilación permite la estabilidad proteica y la correcta direccionalidad intracelular (Dwek, 1998). Para algunas proteasas de mamífero la glicosilación del prodominio y subsecuente unión al receptor para manosa-6-fosfato es necesaria para llevar las moléculas a la ruta lisosomal (Kornfield, 1989). Sin embargo, solo dos de las proteasas de *E. histolytica* contienen posibles sitios de N-glicosilación dentro del prodominio. Además de la ruta dependiente de manosa-6-fosfato, una ruta independiente de manosa-6-fosfato se ha descrito para las catepsinas D y L (McIntyre y col., 1994; Zhu y Conner, 1994). El mecanismo se basa en el reconocimiento por receptores asociados a membrana del prodominio, este mecanismo también es conocido para la cruzipaina en la cual se ha atribuido a la presencia de la secuencia Trp/Phe-Lys-(Ala)-X-X-X-Lys/Arg-Arg/Leu/Val/-Phe/Tyr en el prodominio (Huete-Pérez y col., 1999). Este motivo está presente en la catepsina B de *Giardia* (Sajid y McKerrow, 2002) y una secuencia similar se encuentra en la mayoría de las enzimas de *E. histolytica* (EhCP1-14 y EhCP18-19).

Otra clase de receptores que participan en la conducción celular de las proteínas son las integrinas, las cuales son blanco para la unión de una secuencia tripéptida concenso, Arg-Gly-Asp (RGD). Este motivo sirve para unir proteínas a la superficie sin tener dominios transmembranales o anclas GPI (Ruoslahti, 1996; Torshin, 2002). Tres de las enzimas de *E. histolytica* (EhCP5, EhCP18 y EhCP112) contienen un motivo RGD, el cual se encuentra dentro del dominio catalítico en dos de estas enzimas (Bruchhaus y col., 2003; García-Rivera y col., 1999).

Estudios previos han mostrado que, en promedio, las regiones codificantes en *E. histolytica* y *E. dispar* tienen un 95% de identidad en sus secuencias (Willhoeft y col., 1999).

Esto ha permitido en *E. dispar* la identificación y clonación de genes correspondientes a CPs (*Edcp 2*, *Edcp 3*, *Edcp4* y *Edcp 6*) usando secuencias *Ehcp* como sondas de hibridación cruzada (Bruchhaus y col., 1996). Esta técnica reveló que ortólogos funcionales correspondientes a *Ehcp1* y *Ehcp5* estén ausentes en *E. dispar* (Bruchhaus y col., 1996; Willhoeft y col., 1999). De acuerdo con esto, análisis de Southern blot comparativos fueron realizados usando *Ehcp7* y los genes *Ehcp* recientemente identificados, como sondas. Los resultados indican que las secuencias ortólogas a todos estos genes están presentes en *E. dispar* (Bruchhaus y col., 2003). Así, con respecto a la propiedad patogénica de *E. histolytica*, EhCP1 y EhCP5 parecen ser de particular importancia.

Basados en análisis de proteínas y RNA, estudios previos (Bruchhaus y col., 1996; Bruchhaus y col., 2003) sugieren que EhCP1, EhCP2 y EhCP5 son las cisteína proteasas más abundantemente expresadas en trofozoítos cultivados de *E. histolytica*, mientras que la expresión más alta en *E. dispar* fue para la EdCP3. Además, un nivel medio de expresión fue encontrado para *Ehcp3*, *Ehcp8* y *Ehcp9*, ya que las señales de hibridación aparecieron antes de las primeras 24 h. Doce de los 20 genes *Ehcp* no revelaron hibridación alguna, lo que sugiere que la mayoría de los genes *Ehcp* no se expresan en trofozoítos cultivados de *E. histolytica* (Bruchhaus y col., 2003). De igual manera, una minoría de sólo 6 genes *Ehcp* se expresan en trofozoítos cultivados de *E. dispar*; *Edcp1*, *Edcp2*, *Edcp3*, *Edcp8*, *Edcp9*, *Edcp16* y *Edcp17*. Estos resultados confirman resultados previamente obtenidos en donde se mostraba que la cantidad de cisteína proteasas en *E. histolytica* es considerablemente más alta que en *E. dispar* (Hellberg y col., 2001; Reed y col., 1989).

La expresión de genes en *E. histolytica* es efectuado en forma monocistrónica (Bruchhaus y col., 1993), y los regiones 5' río arriba y las 3' río abajo contribuyen a la regulación de la transcripción (Nickel y Tannich, 1994). Así, las secuencias dentro de las

regiones flanqueantes pueden contribuir a las diferencias en la expresión de varios genes *Ehcp*. El análisis de las regiones flanqueantes reveló que los seis genes *Ehcp* que son substancialmente expresados en trofozoítos cultivados (*Ehcp1*, *Ehcp2*, *Ehcp3*, *Ehcp5*, *Ehcp8* y *Ehcp9*), contienen un motivo tipo caja TATA extendido TATTTAAACT, ubicado alrededor de 35 bp río arriba del sitio del inicio de la traducción ATG. En contraste, este motivo está ausente en todos los demás genes, los cuales no revelaron señales de hibridación en los Northern blots (Bruchhaus y col., 2003).

Las cisteína proteasas amibianas que hasta el momento han sido las más estudiadas a nivel molecular y funcional son:

I) La EhCP1 (*acp3*), designada como amebapaína (Schulte y Scholze, 1989), y descrita por Reed y col., (1993). Scholze y col., (1992) por ensayos de inmunocitoquímica demostraron que la EhCP1 colocaliza con el óxido de fierro pinocitado, por lo que estos autores sugieren que esta enzima se recicla entre la membrana plasmática y las vesículas pinocíticas. El gen completo de esta enzima (*acp3*) fue clonado, es 85 % idéntico a *acp2*, y se demostró su expresión tanto en aislados de *E. histolytica* como de *E. dispar* (Reed y col., 1993; Mirelman y col., 1996).

Ehcp1 (*acp3*) fue el segundo gene reportado como único en *E. histolytica* (Bruchhaus y col., 1996), pero sus secuencias fueron detectadas en cepas clínicas de *E. dispar* (Reed y col., 1993).

ii) La EhCP2 denominada histolisina (Luaces y Barret, 1988; Tannich y col., 1992), está codificada por el gen *Ehcp2* (*acp2*). Esta enzima no degrada colágena tipo I o elastina, pero es activa contra proteoglicanos de cartilago y desprende células de su sustrato *in vitro* (Luaces y Barret, 1988). Esta molécula se encuentra tanto en cepas patógenas como en no patógenas

(Reed y col., 1993; Mirelman y col., 1996). Por otro lado Que y col., (2002), mediante el uso de microscopía confocal, demostraron que EhCP2 está asociada a membrana.

Recientemente, Helberg y col., (2001), al tratar de sobreexpresar a las cisteína proteasas EHCP1, EhCP2 y EhCP5 tanto en cepas patógenas como no patógenas por transfección episomal, solamente lograron expresar EhCP2 en ambas especies amibianas. En contraste en estudios previos se observó que las cisteína proteasas están involucradas en la eritrofagocitosis y la formación de abscesos hepáticos, las células que sobreexpresaron EhCP2 no mostraron diferencias en eritrofagocitosis y en la formación de abscesos hepáticos en comparación con los controles. Por lo tanto, EhCP2 parece no tener relevancia en la citotoxicidad.

iii) La EhCP3 (ACP1) (Tannich y col., 1991) o cisteína proteasa neutra principal de 56 kDa (Keene y McKerrow, 1985). Esta enzima se purificó a partir de las secreciones de los trofozoítos. Se sabe que está codificada por tres genes distintos y ninguno de los productos génicos está glicosilado, la especificidad de sustrato de la actividad de esta enzima es semejante a la catepsina B (Keene y col., 1986).

Ehcp3 (acp1) fue inicialmente reportada para estar presente únicamente en *E. histolytica* (Reed y col., 1993), pero un homólogo relacionado, con un 95% de identidad, fue encontrado en *E. dispar* (Bruchhaus y Tannich, 1996; Mirelman y col., 1996)

Esta cisteína proteinasa es una de las más estudiada en la amiba, Luaces y Barret, (1988) clonaron el gen correspondiente y encontraron que codifica para una proteína de 27 kDa lo cual sugiere que está formada por dímeros, puesto que el peso molecular era de 56 kDa. Esta enzima degrada laminina, fibronectina y colágena tipo I y desprende del sustrato células en cultivo sin dañarlas (Luaces y Barret, 1988), lo cual sugiere que está involucrada en la degradación de proteínas de las uniones intercelulares. La expresión de esta enzima

correlaciona con la virulencia, además trofozoítos mutantes bajos en virulencia carecen de esta actividad proteolítica (Keene y col., 1990; Hidalgo y col., 1990).

El análisis de la secuencia de aminoácidos muestra homología con las cisteína proteasas liberadas por macrófagos activados y células cancerosas invasivas, lo cual sugiere un mecanismo evolutivo conservado de la invasión de tejidos (Reed y col., 1993). La proteasa neutra principal puede participar en mecanismos de evasión de la respuesta inmune, puesto que es capaz de activar la ruta alterna del sistema de complemento y su acción está directamente relacionada con la inactivación de las anafilotoxinas C3a y C5a (Reed y col., 1995).

En cepas patógenas el incremento de la actividad y la expresión de la proteinasa correlacionan con el efecto citopático sobre monocapas de fibroblastos (Reed y col., 1993; Mirelman y col., 1996). Además, Que y col., (2002), mediante el uso de microscopía confocal, demostraron que ACP 1 (EhCP3) tiene una localización citoplásmica.

iv) La enzima EhCP5 fue descrita por Bruchhaus y col., (1996). El gen que codifica para esta enzima se identificó simultáneamente con los genes *Ehcp4* y *Ehcp6* los cuales se expresan en amibas xénicas y axénicas. La enzima EhCP5 se encuentra asociada a la membrana y produce efecto citopático sobre monocapas en cultivo. El gen se ha reportado estar presente solamente en *E. histolytica* (Jacobs y col., 1998), ya que el gen está altamente degenerado en *E. dispar*, conteniendo numerosas inserciones y deleciones, resultando en múltiples codones de paro dentro de su marco de lectura (Willhoeft y col., 1999).

EhCP5 tiene más del 10 % de la actividad de cisteína proteasa (CP) en *E. histolytica* (Ankri y col., 1999) y junto con EhCP1 y EhCP2 llegan a tener hasta un 90% (Bruchhaus y col., 1996). CP5 degrada fibronectina, inmunoglobulina IgG, y factores de complemento C3 y C9

(Jacobs y col., 1998). Además, en *E. histolytica* CP5 puede bloquear la respuesta inflamatoria del hospedero por un mecanismo nuevo, que es la inactivación de la IL-18 (Que y col., 2003).

EhCP5 tiene actividad proteolítica específica hacia sustratos sintéticos (Z-Arg-Arg-pNA), esta actividad es óptima a pH 6 – 8 (Jacobs y col., 1998), la cual es abolida por inhibidores de cisteína proteinasas como E-64 (10 μ M), PHMB (100 μ M) e iodoacetamida (100 μ M) (Jacobs y col., 1998).

Ankri y col., (1998) inhibieron aproximadamente el 90% de la actividad total de CP, aplicando la metodología del RNA antisentido del gen *Ehcp5*. Las transfectantes mostraron un efecto citopático y hemolítico semejante al control (cepa HM1: IMSS), pero una actividad fagocítica menor. Posteriormente, Ankri y col., (1999) observaron que estos trofozoítos no produjeron abscesos hepáticos en hámsteres.

Recientemente se ha encontrado que las cisteína proteasas son factores de virulencia claves en la colitis amibiana, puesto que ratones infectados con trofozoítos de *E. histolytica* que expresan un mensaje antisentido del gen *Ehcp5* y que por lo tanto generaron amibas deficientes en esta cisteína proteinasa, no produjeron inflamación del epitelio intestinal (Zhang y col., 2000). Estos experimentos nos demuestran que esta enzima es muy importante en el mecanismo de citotoxicidad de la amiba.

v) Los genes de las EhCP4 y EhCP6 fueron identificados simultáneamente con el gen *Ehcp5* al tamizar un banco genómico de *E. histolytica* construido en el vector λ Zap utilizando como sonda una secuencia conservada de los genes de cisteína proteasas de la amiba (Bruchhaus y col., 1996). Los genes *Ehcp4* y *Ehcp6* se expresan en amibas xénicas y axénicas. *E. dispar* presenta cuatro de los seis genes expresados en *E. histolytica* (*Edcp2*,

Edcp3, *Edcp4* y *Edcp6*), pero solamente EhCP2 y EhCP3 son expresadas en la fase de trofozoíto.

Además de los sitios de unión a membrana, EhCP6 contiene una inserción carboxilo terminal. Esta inserción es extraordinariamente rica en cisteínas (18%) y tiene una estructura repetitiva con la secuencia C-(X)₅-C-(X)₂-C-(X)₆-C-(X)₁₀-C-(X)₃-C-(X)₆-C-(X)₆-C-(X)₂-C-(X)₁₀-C. Este repetido tiene una importante similaridad en secuencia a la furina y a la PACE 4A, proteínas que pertenecen a la familia de las serinas proteasas dependientes de Ca²⁺ (proteína convertasas), las cuales tienen homología a la proteasa subtilina (bacteria) y kexina (levadura) (Van de Ven y col., 1991). Estas enzimas son responsables para la conversión de precursores de hormonas, neuropéptidos, y muchas otras proteínas en sus formas biológicamente activas (Beinfeld, 1998).

EhCP6, EhCP112 y EhCP18 contienen el extremo amino terminal del repetido rico en cisteínas, C-(X)₅-C-(X)₂-C-(X)₆-C-(X)₂-C-(X)₁₁-C cercano al extremo carboxilo terminal de las proteínas (Bruchhaus y col., 2003).

vi) Los transcritos de los genes *Ehcp4*, *Ehcp6*, *Ehcp7*, *Ehcp10*, *Ehcp11*, *Ehcp12*, *Ehcp13*, *Ehcp14*, *Ehcp15*, *Ehcp18*, *Ehcp19* y *Ehcp112*, de los cuales ya se conoce la secuencia nucleotídica y aminoacídica, no fueron detectados por Northern blot en trofozoítos en cultivo. Sin embargo, se especula que estas enzimas son importantes para el parásito durante la infección del hospedero humano o bien para completar el ciclo de vida. Las enzimas pueden ser requeridas para soportar el crecimiento y/o la sobrevivencia de las amibas durante la colonización del intestino humano y pueden ser responsables de la digestión del material (eritrocitos y bacterias), el cual está ausente del medio de cultivo. Algunas de las moléculas, en particular aquellas que se predice que están localizadas en la membrana, pueden jugar un papel durante la invasión del parásito y la destrucción del tejido del hospedero (Bruchhaus y

col., 1996 y 2003). Otra función en la que pueden estar involucrada es en el proceso de enquistamiento y desenquistamiento del parásito, como se ha mostrado para la enzima tipo catepsina C en *Giardia lamblia* (Toux y col., 2002).

ANTECEDENTES DIRECTOS.

LA ADHESINA DE 112 kDa DE *E. histolytica*.

La adhesina de 112 kDa 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 la adhesina de 112 kDa se localiza en forma uniforme en la superficie de los trofozoítos amibianos y en la membrana de algunas vacuolas (García-Rivera y col, 1994). Esta proteína se une específicamente a la superficie de eritrocitos humanos, indicando que esta molécula participa en la interacción de los trofozoítos con la célula blanco (Rodríguez y col, 1989). Además, esta adhesina es muy inmunogénica, ya que es una de las principales proteínas reconocidas por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo y Orozco, 1987). La adhesina de 112 kDa, además de mediar el contacto inicial entre el trofozoíto y los receptores de la célula blanco, podría participar en la invasión de los tejidos, puesto que la proteína purificada presenta una actividad proteolítica significativa en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina (García-Rivera y col, 1994). Esta proteína es susceptible de sufrir una ruptura cuando se somete a un pH extremo o bien, como resultado de una autoproteólisis, originando dos fragmentos de aproximadamente 70 y 50 kDa (Rigothier y col, 1992).

Ayala (1989) realizó el inmunotamizaje de un banco genómico de *E. histolytica* con tres pasos de purificación: a) anticuerpos contra proteínas de superficie, b) con sueros de pacientes con absceso hepático amibiano y c) con anticuerpos policlonales anti-adhesina de 112 kDa. Mediante esta estrategia se aisló la clona recombinante λ gt112-19, la cual contiene un

fragmento de DNA amibiano de 900 pb y cuyo producto de expresión fue reconocido por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la adhesina de 112 kDa (García-Rivera, 1999). Posteriormente, el fragmento de la clona λ gt112-19 se utilizó como sonda para el aislamiento del gen completo (García-Rivera y col, 1999).

La adhesina de 112 kDa está formada por dos proteínas codificadas por genes adyacentes (García-Rivera y col, 1999). El primer gen codifica para una proteína con homología a cisteína-proteasas. Adyacente a esta región se localiza un fragmento de 188 pb de DNA no codificante y posteriormente se localiza el gen que codifica para un polipéptido de 78 kDa que contiene el epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales anti-adhesina (García-Rivera, 1999) (Fig. 3).

El primer gen (*Ehcp112*) de la adhesina de 112 kDa codifica una proteína de 446 aminoácidos (EhCP112) con un 27-31% de identidad a las cisteína proteasas reportadas para *E. histolytica* (Bruchhaus y col., 1996) (Fig. 3). Los primeros 19 aa forman el péptido señal, en la posición que abarca de los aa – 90 al – 70 hay una secuencia ExxxRxxVFxxNxxxlxxxN (x = cualquier amino ácido), la cual es importante en el proceso de maduración de la enzima, el sitio activo de EhCP112 fue localizado en los residuos 25 a 33, 193 y 212 a 214 (Fig. 4). En las posiciones 111 y 182 se encuentran las cisteínas involucradas en el plegamiento propio de las cisteína proteasas además, se presenta un presunto segmento transmembranal en los aa 259-280 y una secuencia RGD en los residuos 114-116 (Fig.4). (García-Rivera y col.,1999). Este análisis sugiere que el gen *Ehcp112* codifica para un polipéptido con actividad de cisteína proteinasa.

Con el fin de iniciar el estudio de la actividad proteolítica de EhCP112, el gen *Ehcp112* fue expresado en bacterias *E. coli* (Ocádiz, 1998). En este sistema las bacterias expresaron

una proteína de 53 kDa (49 kDa de EhCP112 y 4 kDa del vector). En el presente trabajo se inició la caracterización de la actividad enzimática y biológica de la proteína EhCP112.

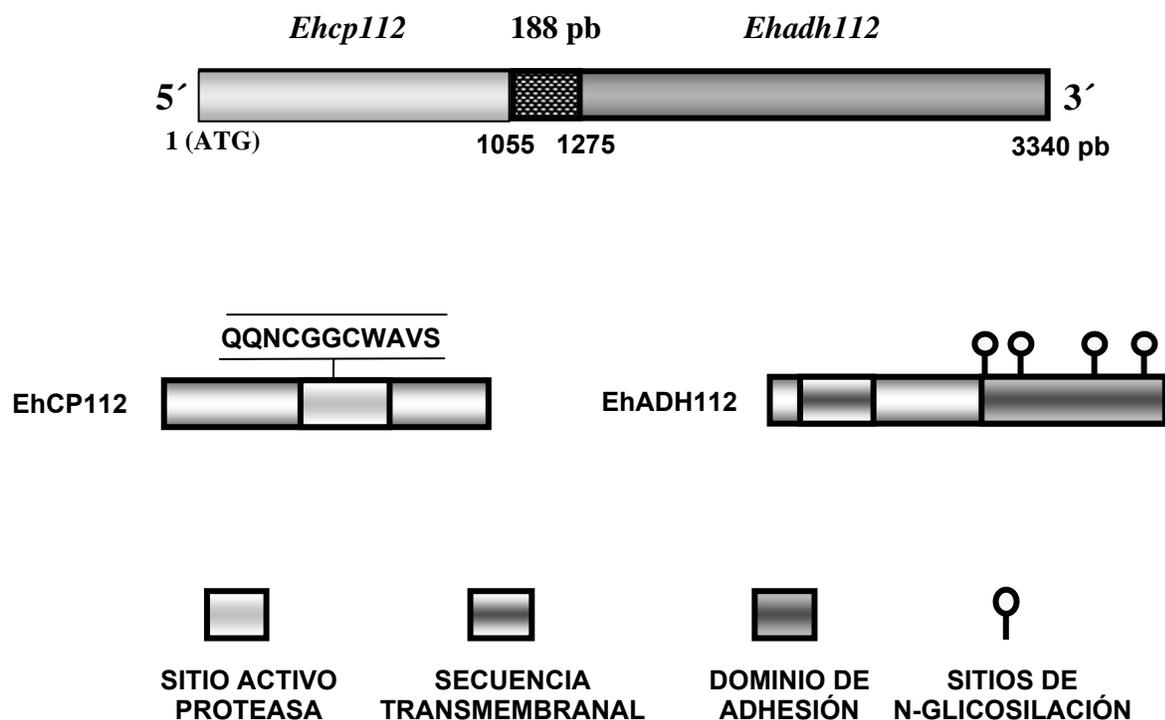


Fig. 3. Genes de la adhesina de 112 kDa de *E. histolytica*. El gen de la adhesina de 112 kDa esta formado por tres regiones bien definidas, en el extremo 5' se encuentra un marco de lectura abierto de 1338 pb (*Ehcp112*), seguido de un fragmento de 188 pb no codificante y en el extremo 3' un marco de lectura de 2061 pb. Los productos de estos genes presentan motivos definidos como el sitio homólogo a cisteína proteasas, secuencias transmembranales, un dominio de adhesión y sitios de N-glicosilación.

I

ExxxRxxVFxxN

Ehcp112 -----MTAIVVAFLLVSNQKTQSIAFNLE-----LPVDKLFIQFKTKYNKHYSLT-EEQFRFQIFKNN

Ehcp1 -----MFTFILMFY-----IGYGID-----FNTWVANNKHFHTAV-ESLRRRAIFNMN

Ehcp2 -----MFAFICLLA-----IASAID-----FNTWASKNNKHFTAI-EKLRRAIFNMN

Papaina MAMIPSIKLLFVAICLFVYMGSLFSGDFSIVGYSQNDLTSTERLIQLFESWMLKHNKIYKNIDEKIYRFEIFKDN

xxxIxxxN

Ehcp112 LKNIKTLNEKRTQPSDAFHDINMYTDLIDEELPISKGMaipvssydneHFNSKELKKVEKpwNEVPPLPSGDNLp

Ehcp1 ARIVAENNRK-----ETFK-----LSVDG-----PFAAMTNEEYNSLLKLRSGE--EKGEVRY---L-

Ehcp2 AKFVDSFNKI-----GSFK-----LSVDG-----PFAAMTNEEYRLLKSKRTTE--ENGQVKY---L-

Papaina LKYIDETNKK----NNSYW-----LGLN----VFADMSNDEFKEKYTGSIAGNY--TTTELSYEEVLN

+1

Ehcp112 QNYAFCGEYVSKNTDRPKVDLCGEVFSQONCGGCWAVSLANLAQYLYSNLTYQRYGCIKTPPKFSAQRFLDVTKT

Ehcp1 -----NIQAPKAVDWRKKGKVTPIRDQGNCGSCYTFGSIAA-LEGRLLIEKGGDSET-LDLSEEHMVQCTRE

Ehcp2 -----NIQAPESVDWRKEGKVTPIRDQAQCGSCYTFGSLAA-LEGRLLIEKGGDANT-LDLSEEHMVQCTRD

Papaina DG----DVNIPEYVDWRQKGAVTPVKNQSGCGSCWA--FSAVVT-IEGIKI-RTGNLN---EYSEQELLDCCR

*

Ehcp112 ---KATKRLLLWSSRRCLIAVKSFSLDADYPFVDGPNKNVCTIRGDQNPVQIQMAITGKYKTFGISKDQNMVLL

Ehcp1 DGNNGCNGGLGSNVYN--YIMENGIAKESDYPY-TGSDS-TCRSDVK-----AF-AKIKSYNRVARNNEVELKAA

Ehcp2 NGNNGCNGGLGSNVYD--YIIIEHGVAKESDYPY-TGSDS-TCKTNVK-----SF-AKITGKYTKVPRNNEAELKAA

Papaina --SYGCNGGYPWSALQ--LVAQYGIHYRNTYPY-EGVQR-YCRSREK----GPYAAKTDGVRQVQPYNEGALLYN

*

Ehcp112 LKKLLHHYGPFLVSVKVSgtGFSSYSsGIFsFPSSSIcDTSSSSFMTHHEVVLMDGY--RECVEYFIIIFNSWASG

Ehcp1 ISQ-----GLVDVSIASSVQFQLYKSGAYTDQ---CKNN--YFALNHEVCAV-GYGVVDGKECWIVRNSWGTG

Ehcp2 LSQ-----GLVDVSIASSAKFQLYKSGAYTDK---CKNN--YFALNHEVCAV-GYGVVDGKECWIVRNSWGTG

Papaina IAN-----QPVSVVLEAAGKDFQLYRGGIFVGP---CGNK-----VDHAVA AV-GY----GPNYILIKNSWGTG

Ehcp112 WEGEDNYIRIKTTNLcGIGWRIGDYVYPLNMIVYANTCKLdkycSScNISSNIcSScVSGYyLNSNNKCVKNTAK

Ehcp1 WGE-KGYINMVI EG-----NTCGVATDPLYPTGVE-----

Ehcp2 WGD-KGYINMVI EG-----NTCGVATDPLYPTGVQ-----

Papaina WGE-NGYIRIKRGT-----G-----NSY-----GVCGLYTSsFYpVKN-----

Ehcp112 LVKYHSNSTYVQFYNHTI

Ehcp1 -----YL-----

Ehcp2 -----YL-----

Papaina -----

Fig. 4. Alineamiento de la secuencia de EhCP112 con otras cisteína proteasas. La secuencia de aminoácidos de EhCP112 se comparó con las secuencias de otras cisteína proteasas de *E. histolytica* (EhCP1 y EhCP2) y con la papaína por el programa MSA. Los guiones representan espacios entre las secuencias para un óptimo alineamiento. La secuencia subrayada indica un posible péptido señal y la cabeza de flecha el punto de corte de éste péptido. La secuencia ExxxRxxV/FxxNxxxIxxxN representa el motivo ERFNIN presente en la mayoría de los propéptidos de cisteína proteasas. **c** : indica los residuos de cisteína involucrados en los puentes disulfuro de la papaína. □ Los aminoácidos que conforman el sitio activo de la papaína. El posible sitio +1 de la EhCP112 madura. (____) sitio RGD. (----) posible secuencia transmembranal.

JUSTIFICACIÓN

La adhesina de 112 kDa (ahora llamado complejo EhCPADH) puede tener una doble función como adhesina y como proteasa, por lo que es necesario caracterizar la actividad de esta proteasa para poder explicar su participación en el mecanismo agresor de este parásito y poder, eventualmente, bloquearlo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la actividad proteolítica de la proteína EhCP112 y establecer su posible participación en la virulencia de *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar que EhCP112 es parte de la adhesina de 112 kDa de *E. histolytica*.
- Obtener la proteína recombinante EhCP112 con actividad proteolítica.
- Evaluar la actividad proteolítica de la proteína recombinante EhCP112.
- Determinar el pH y la temperatura óptimos para la actividad de proteasa de EhCP112.
- Analizar la actividad de proteasa de EhCP112 sobre algunas proteínas que conforman los tejidos del huésped.
- Evaluar la capacidad proteolítica de EhCP112 para destruir células MDCK.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- CULTIVO DE TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoítos de la clona A (cepa HM1:IMSS) se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 (Diamond y col., 1978). El medio se suplementó con 15% de suero bovino (HyClone Laboratories, USA) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min, 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (KC Biological, USA), 40 UI de penicilina/ml y 57 µg/ml de estreptomicina (Lakeside). Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento se recolectaron por incubación en baño de hielo durante 5 a 10 min y centrifugación a 400 X g por 7 min. Antes de realizar los experimentos la pastilla celular se lavó 3 veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) a 4°C para eliminar los restos del medio.

2.- CULTIVO DE CÉLULAS DE LA LÍNEA MDCK.

Las células epiteliales de la línea MDCK (*Madin Darby Cell Kidney*, línea celular aislada del riñón de perro), se cultivaron en multicámaras de 24 pozos (Linbro/EUA) en medio Eagle (1959), suplementado con suero de ternera al 10 % (Gibco) y antibióticos 500 UI/ml de penicilina y 0.69 µg/ml de estreptomicina. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ y aire (5: 95 % v/v) hasta que formaron capas confluentes entre 3 y 5 días después de la siembra.

3.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE ERITROCITOS HUMANOS.

Eritrocitos humanos frescos se obtuvieron por punción venosa con una jeringa estéril conteniendo 0.5 ml de solución Alsever pH 6.1 (Garvey y col., 1977) compuesta de 0.272 g de ácido cítrico (Sigma / EUA), 4 g de citrato de sodio (Merck / México) y agua bidestilada, cbp 500 ml. Para cada experimento, se obtuvieron 5 ml de sangre que fue transferida suavemente a un tubo de centrifuga de 15 ml. Inmediatamente se agregaron 10 ml de solución Alsever, se

agitó suavemente el tubo por inversión y se centrifugó durante 10 min a 720 x g a 4 °C. Se repitió este lavado en solución Alsever 3 veces y después se ajustaron los eritrocitos a una concentración de 1×10^8 células / ml de PBS.

4.- DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (PRIMERS).

Para iniciar el estudio de la EhCP112, tres fragmentos del gen *Ehcp112* se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): a) el gen completo de 1338 pb (preproenzima); b) un fragmento de 1281 pb que no codifica al péptido señal (proenzima); y c) un fragmento de 984 pb que codifica la secuencia de la proteasa madura.

Como iniciadores en sentido se usaron oligonucleotidos conteniendo las secuencias localizadas en: i) posición 1 – 21 (5'-CGC GGA TCC ATG ACA GCG ATT GTT GTC GCT-3'); ii) posición 60 – 81 (5'-GCG TTT AAT CTA GAA CTC CCC G-3'); y iii) posición 354 – 374 (5'-CCA TGG AAT GAA GTA CCG CCA -3'). Como iniciador en antisentido para las tres reacciones usamos la secuencia complementaria de los nucleotidos localizados en las posiciones 1314 – 1338 (5'-CCG GAA TTC GAT TGT ATG ATT GTA GAA TTG GAC-3').

5.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Para la amplificación de los fragmentos por PCR se utilizaron, 30 ng de DNA del plásmido pG1 (García-Rivera y col., 1999) el cual contiene el gen *Ehcp112* de *E. histolytica*, 400 ng de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores, 40 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), solución amortiguadora Termopol (New England, Biolabs), 1 mM de sulfato de magnesio $MgSO_4$, y 2 U de la enzima Deep Vent DNA polimerasa en un volumen de reacción de 50 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 (M. J. Research) utilizando el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 52°C por 35 s y extensión a 72°C por 50 s, seguidos de una extensión adicional a 72°C por 7 min y una etapa final a 4°C por 10 min.

6. - ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.

Para la separación de los fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa al 1 y 2% preparados en cámaras EASY-CAST (Owl Scientific, Inc.) en solución de TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001M EDTA pH 8). El amortiguador usado para el corrimiento electroforético fue la misma solución de TAE 1X. Las muestras se mezclaron con 1 μ l del buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30% en agua bidestilada) y se depositaron en los pozos. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V durante 45 min aproximadamente. Para detectar el DNA, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante dos minutos, se lavaron con agua destilada y se visualizaron con la ayuda de un transiluminador de luz UV (UVP, U.S.A).

7.- PURIFICACIÓN DE DNA SEPARADO EN GELES DE AGAROSA.

La purificación de DNA se realizó utilizando el juego de reactivos “Gene Clean” basado en la afinidad del DNA a perlas de vidrio (glass milk). Los trozos de agarosa que contenían a los fragmentos de DNA del tamaño deseado se cortaron del gel y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 3 volúmenes de NaI 3 M frío para disolver la agarosa y se incubaron a 55°C durante 5 a 10 min. Posteriormente, se agregaron 8 μ l de perlas de vidrio (“glass milk”) (Bio 101, USA) y se incubaron de 10 min a 12 h a 4°C. Al término de este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12 000 X *g* durante 5 min en una microcentrífuga Eppendorf, se desecharon los sobrenadantes y el DNA unido a las perlas de vidrio se lavó tres veces con 300 μ l de una solución de lavado New Wash (Bio 101, USA), se centrifugaron y se desecharon los sobrenadantes. Finalmente el DNA se eluyó a 55°C durante 10 min en 20 μ l de agua bidestilada esterilizada.

8.- RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE DNA.

Para la digestión del DNA plasmídico, éste se incubó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, excepto donde sea señalado, con la solución amortiguadora recomendada por el proveedor (Gibco, BRL), durante 2.5 h a 37°C. Finalmente los productos generados fueron separados en geles de agarosa como se describió anteriormente.

9.- CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *Ehcp112* EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pRSET A y pTrcHis2.

El DNA de los fragmentos generados por PCR y de los plásmidos pRSET A y pTrcHis2 se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, como se mencionó anteriormente. Para clonar el inserto en el vector de expresión (Fig. 5), fue necesario conocer la concentración del DNA del inserto y del vector (ng/μl) en solución. Esto fue determinado por D.O._{260nm}, o bien por fluorescencia del DNA con bromuro de etidio en gel de agarosa. Para calcular la cantidad de cada uno de los DNAs en solución utilizados para la reacción de ligación, fue necesario obtener la relación molar del vector con el inserto. Los cálculos efectuados se basaron en la siguiente formula:

$$X \text{ ng inserto} = \frac{(\text{relación}) (\text{pb del inserto}) (50 \text{ ng del vector linealizado})}{\text{pb del vector}}$$

Por ejemplo, para determinar la cantidad de DNA del inserto en ng que se agregaron a 50 ng del DNA del vector, cuando requerimos una relación molar de 3:1, se realizó la siguiente operación:

$$X \text{ ng inserto} = \frac{(3) (1,338 \text{ pb del inserto}) (50 \text{ ng del vector})}{2,930 \text{ pb del vector pRSET A}} = 68.49 \text{ ng}$$

Cuando requerimos de una relación 5:1 (inserto:vector) se realizó lo siguiente:

$$X \text{ ng inserto} = \frac{(5) (1,338 \text{ pb del inserto}) (50 \text{ ng del vector})}{2,930 \text{ pb del vector pRSET A}} = 114.16 \text{ ng}$$

Por lo tanto, para la ligación se utilizaron las siguientes cantidades;

Relación	Inserto	vector
3 : 1 =	68.4 ng	50 ng
5 : 1 =	114.1 ng	50 ng

Estas mezclas se incubaron en la solución amortiguadora para la enzima DNA ligasa (New England, Biolabs) y T4 DNA ligasa (3 U/ μ l) en un volumen de reacción de 10 μ l, durante 16 h a 15°C.

10.- PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES PARA TRANSFORMACIÓN.

A 5 ml de medio LB se le adicionó una colonia bacteriana de *E. coli* [cepa XL1 blue o BL21 (DE3) pLysE], se incubó toda la noche en agitación constante a 250 rpm a 37°C. De este cultivo se tomaron 2.5 ml y se agregaron a 250 ml de medio LB, se crecieron de 2 a 4 h con agitación constante a 37°C hasta que se obtuvo una $D.O_{.595nm} = 0.5$, el cultivo entonces se centrifugó a 1,000 X g (Rotor JA-10, BECKMAN J2-HS) durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 ml de 0.1 M de $MgCl_2$ frío. Las bacterias se centrifugaron nuevamente a 1,000 X g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 ml de 0.1 M de $CaCl_2$ frío, se colocó en hielo de 20 min a 12 h, se volvió a centrifugar a 1,000 X g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 10 ml de $CaCl_2$ y 1.75 ml de glicerol estéril, se hicieron alícuotas de 500 μ l en tubos de microcentrífuga y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

10.1. Genotipos de cepas de la bacteria *Escherichia coli*.

BL21(DE3) pLysE: $F^- ompT hshS_B(r_B^- m_B^- gal dcm)$ (DE3) pLysE (Cam^R)

La designación DE3 significa que la cepa contiene la lisógena λ DE3 que lleva el gen para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. El IPTG es requerido para inducir la

expresión de la T7 RNA polimerasa. Esta cepa es *E. coli* B/r y no contiene la proteasa *lon*, también es deficiente en la proteasa de la membrana externa, Omp T. La carencia de dos proteasas claves reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en las cepas. Esta cepa lleva el plásmido pLysE, el cual produce grandes cantidades de la lisozima T7 para reducir la expresión basal del gen de interés, además confiere resistencia a cloramfenicol (Cam^R) y contiene el origen p15A para compatibilidad con plásmidos que contienen el origen ColE1 o pMB1. Esta cepa es recomendable para la expresión de genes tóxicos.

DH5 α : F⁻ Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*.

DH5 α es muy usada para la clonación de genes, asegura gran estabilidad al gen inserto, debido a la mutación *rec A1*, incrementa grandemente la producción y la calidad del DNA plasmídico, a partir de minipreparaciones, debido a la mutación *endA1*. Permite la rápida diferenciación de colonias recombinantes blancas y azules debido a *lacZ* Δ M15.

11.- AISLAMIENTO DEL DNA DEL PLÁSMIDO POR CALOR (MINIPREPARACIÓN).

De un cultivo de toda la noche, de bacterias *E. coli* con los plásmidos de interés, se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron durante 20 s a máxima velocidad en una microcentrífuga (Eppendorf). La pastilla bacteriana se resuspendió en 300 μ l de solución STET (NaCl 0.1 M, Tris.HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8 y Tritón X-100 al 5%) añadiendo 200 μ g de lisozima (20 μ l de una solución de 10 mg/ml). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente 10 min y se hirvieron a 94°C durante 2 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 30 min a máxima velocidad. El sobrenadante conteniendo el plásmido se pasó a un tubo nuevo con cuidado de no tocar la pastilla, se mezcló con 300 μ l de isopropanol frío y se incubó a -20°C por 30 min. El DNA se recuperó al centrifugar a máxima velocidad durante 5 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante invirtiendo el tubo rápidamente y se dejó secar 10

min a temperatura ambiente. Posteriormente, el DNA se resuspendió en 60 μ l de TE (Tris.HCl 10 mM pH 8 y EDTA , 1mM pH 8) o de agua bidestilada. Finalmente, los plásmidos aislados fueron analizados mediante digestión con endonucleasas de restricción como se mencionó anteriormente.

12.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

12.1. Transformación de *Escherichia coli*.

Para la introducción de los plásmidos a bacterias *E. coli*, 50 ng de los plásmidos pRSETA-*Ehcp112* o pTrcHis2-*Ehcp112* se mezclaron con 100 μ l de bacterias *E. coli* competentes [cepas XL1 Blue o BL21 (DE3) Lys E], se incubaron en hielo por 30 min, se aplicó un choque térmico a 42°C por 90 s y después se incubaron en hielo 5 min. Al término de éste tiempo se adicionaron 600 μ l de medio LB y se incubaron en agitación 1 h a 37°C. Finalmente, 200 μ l del cultivo se espatularon en cajas LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C por 18 h.

12.2. Inducción de la expresión de la proteína recombinante.

Una colonia de bacterias transformadas se creció en 2 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y cloramfenicol (37 μ g/ml) hasta que apareció turbidez (~ 3 h), entonces se tomó 1 ml del cultivo, se agregaron 20 ml de medio LB-ampicilina-cloramfenicol y se continuó el crecimiento hasta que el cultivo alcanzó una D.O. _{595nm} = 0.4. En este punto se tomó una muestra de bacterias (control sin inducir) y al resto se le agregó 1 mM de IPTG y se incubó por 3 h más. Finalmente, las células se cosecharon y la expresión de la proteína recombinante se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie.

12.3. Extracción de proteína.

Alícuotas de 1.5 ml de los cultivos bacterianos se centrifugaron a 12 000 x g en una microcentrífuga durante 1 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla bacteriana se

resuspendió en 200 μ l de solución de muestra 1 X (Tris. HCl 125 mM, SDS 2% y glicerol 20% pH 6.8), se mezcló con vortex durante 1 min y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, finalmente las muestras se almacenaron a -20°C .

12.4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se realizó de la siguiente manera: El gel separador se preparó con acrilamida al 10%, Bis-acrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS al 0.1%. El gel polimerizó al agregar 0.05% de persulfato de amonio (PAS) y 0.003 % de TEMED. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 4%, 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%. Como amortiguador de corrida se usó una solución Tris 0.25 M, Glicina 1.92 M, 0.1% de SDS y la electroforesis de 30 μ g de proteína se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante de 110 V (25 miliamperios) durante 1 h y 20 min.

12.5.- Tinción de geles de poliacrilamida.

Después de la separación de las proteínas en el gel de poliacrilamida, éste se desmontó tanto de las cámaras como de los vidrios y se tiñó durante 30 min en agitación, con una solución de azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad / EUA) al 0.05 % en etanol (Merck / México) al 50 % y ácido acético al 10 % a temperatura ambiente. Para desteñir el gel, éste se incubó con agitación en una solución de etanol al 5 % y ácido acético al 7 %, hasta que las bandas de las proteínas aparecieron azules sobre un fondo transparente. En este momento, el gel se transfirió a un recipiente que contenía agua destilada y se fotografió.

12.6. Purificación de la proteína rEhCP112 por cromatografía de afinidad, condiciones desnaturizantes.

Una vez comprobada la inducción de la proteína recombinante, 40 ml de las bacterias inducidas se cosecharon a 12 000 x g por 20 min, la pastilla se resuspendió en 8 ml del

amortiguador de lisis (Guanidina HCl 6M, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 7.8), las células se agitaron en el vortex, durante 20 min. Entonces, el lisado celular se sonicó en hielo con pulsos de 30 s en alta intensidad y se centrifugó a 3 000 x g por 15 min para empastillar los desechos celulares. Para purificar la proteína recombinante, 8 ml del lisado celular se agregaron a 1 ml de la columna de níquel, previamente equilibrada con el amortiguador de unión (Urea 8 M, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 7.8). La mezcla se incubó en agitación por 15 – 30 min a T° ambiente para mantener suspendida la resina en la solución de lisado. Después, la mezcla se transfirió a una columna y se permitió que la resina se precipitara con suavidad, y el lisado saliera, el cual se colectó en un tubo cónico de 15 ml. Posteriormente, la columna se lavó con 4 ml del amortiguador de unión. Entonces, la columna se lavó con 4 ml del amortiguador de lavado desnaturizante pH 6 (Urea 8 M, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 6.0) y con 6 ml del amortiguador de lavado desnaturizante pH 5.3 (Urea 8 M, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 5.3). Por último, para eluir la proteína de la columna, se agregaron 4 ml del amortiguador de elución pH 4 (Urea 8 M, 20 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 4). La proteína se colectó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las muestras que contuvieron la proteína purificada se reunieron y se dializaron contra Tris 10 mM pH 8, 0.1 % de tritón X-100 toda la noche a 4 °C para remover la urea. Los tubos se guardaron a – 70 °C hasta su uso.

12.7. Purificación de la proteína rEhCP112 por electroelución.

Los extractos bacterianos con la proteína recombinante inducida se corrieron en geles preparativos de PAGE–SDS al 10 %, el gel se tiñó con azul de Coomassie, la banda de la proteína rEhCP112 se identificó y se cortó de los geles preparativos, posteriormente la proteína se eluyó por 3 h en una cámara de electroelución (Bio-Rad). La pureza y la integridad de la proteína se analizó por electroforesis PAGE-SDS y ensayos de Western blot.

13.- INMUNIZACIÓN Y ELISA.

Para obtener anticuerpos contra la proteína EhCP112, que nos sirvieran en la inmunodetección y localización subcelular de la proteína nativa, se procedió a inmunizar un conejo (cepa New Zealand) de aproximadamente 2 meses de edad, el cual fue retado 4 veces con 100 μg de la proteína recombinante (rEhCP112), primero con adyuvante completo de Freund y los posteriores retos con adyuvante incompleto de Freund (retos espaciados cada 15 días). Después de 7 días de la última inmunización, se extrajo la sangre del conejo y con el suero obtenido se realizaron ensayos tipo ELISA para determinar el título de los anticuerpos contra la proteína recombinante (AbEhCP112). Para los ensayos de ELISA, 60 pozos de placas de microtitulación se cubrieron con la proteína recombinante EhCP112 (1 μg /pozo), las dos columnas flanqueantes (12 pozos) se cubrieron con proteínas totales (1 μg /pozo) de *E. histolytica*. Posteriormente, el antígeno se retiró y se lavó con PBS-Tween 0.5 % durante 5 min. Las regiones de los pozos que no fueron recubiertos por las proteínas, se bloquearon con 50 μl de BSA al 2 % e incubación por 1 h a 37 °C. Después, se lavó durante 5 min con PBS-Tween 0.05% y las dos primeras filas fueron expuestas al suero preinmune, las siguientes dos filas se expusieron al suero inmune $\alpha\text{EhCP112}$ y las dos últimas filas se expusieron al anticuerpo monoclonal (Mab 5), incubándose durante 2 h a 37 °C. Entonces, se lavó con PBS-Tween 5 min y se incubó 2 h a 37 °C con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:2 000). Como controles se usaron anticuerpos anti-actina y muestras expuestas únicamente al segundo anticuerpo. La determinación del título de los anticuerpos, así como la especificidad de los mismos se efectuó mediante el revelado con O-fenilendiamina y lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA (ICN, MS2).

14.- INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).

Para el ensayo de Western Blot, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS, después el gel se equilibró con el amortiguador de transferencia durante 5-10 min a temperatura ambiente. Por otra parte, así también se equilibró un papel de nitrocelulosa del tamaño del gel a transferir. Para la transferencia se utilizó el sistema miniprotean 2 (Bio-Rad). Primeramente se formó un sandwich sujeto por un folder de plástico con la parte oscura hacia abajo, con los siguientes elementos: una fibra Scotch, luego un papel filtro previamente equilibrado en el buffer de transferencia, sobre el cual se colocó el gel y luego el papel de nitrocelulosa. A continuación se agregaron 2 papeles filtro, otra fibra Scotch y el folder se cerró, la parte oscura se colocó hacia el polo negativo y el papel de nitrocelulosa quedó orientado al polo positivo. Las proteínas del gel se transfirieron al papel de nitrocelulosa a 150 V (400 mA) durante 30-45 min (o bien toda la noche a 30 mA) utilizando un refrigerante o un baño de hielo. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau por dos minutos para visualizar las proteínas transferidas, después se destiñó y se bloqueó con PBS-Tween + leche descremada al 2% durante 1 h a 37 °C o bien toda la noche a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, el filtro se lavó con PBS-Tween al 0.05 % (PBS-T), se incubó con el anticuerpo primario (ej. 1:1500) en PBSTween + leche descremada al 1% durante 1-2 h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C. Entonces el papel se lavó 3 veces durante 5 min con PBS-Tween y se incubó con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (ej. 1:2000) PBS-Tween + leche descremada al 1% a 37 °C durante 1 h o a temperatura ambiente, durante 2 h. El filtro se lavó 2 veces durante 5 min con PBS 20 mM, 2 veces durante 5 min con PBS 50 mM y se reveló utilizando 4-Cl-1-naftol y H₂O₂ por 10 min.

15.- MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA Y CONFOCAL.

Para realizar la inmunolocalización de la proteína EhCP112 nativa en el ambiente celular amibiano, trofozoitos de *E. histolytica* fueron crecidos toda la noche sobre cubreobjetos estériles, luego fueron fijados con 4 % (v/v) de paraformaldehído a 37 °C por 1h, permeabilizados con 0.5% (v/v) de tritón X-100 1 min a temperatura ambiente, bloqueados con 1% (w/v) de BSA por 20 min a temperatura ambiente y lavados dos veces con tritón X-100 al 0.2 % en PBS (PBS-Tritón). A continuación, los trofozoítos fueron incubados con los anticuerpos policlonales AbEhCP112 a una dilución de 1:1000 durante toda la noche a 4 °C. Los trofozoítos fueron lavados dos veces con PBS-Tritón e incubados con los anticuerpos secundarios (policlonal de chivo anticonejo) acoplados a fluoresceína (Sigma; 1:1000) por 1 h a 37 °C. Al final las células fueron contrateñidas con 0.5 mg/ml de yoduro de propidio por 5 min a temperatura ambiente y examinadas con un microscopio Nikon acoplado a un sistema de escaneo láser confocal MRC1024 (Bio-Rad). Las observaciones fueron efectuadas en 15 planos desde el fondo a la parte superior de cada muestra, y la distancia entre los planos de escaneo fue de 0.5 μm .

Para la colocalización de EhCP112 y de EhADH112, los trofozoítos fueron tratados como se mencionó anteriormente, después fueron incubados con el anticuerpo policlonal AbEhCP112 a una dilución de 1:1000 durante toda la noche a 4 °C, y con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (1: 60) por 1 h a 37 °C. Entonces, las muestras se incubaron con un anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido que contiene el dominio de adhesión del complejo de 112 kDa (AbEhAdh112) (Martínez-López, 2004) a una dilución de 1: 400 y por último con una dilución de 1:200 del anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína por 1 h a 37 °C. Finalmente, las células se examinaron con un microscopio Nikon acoplado a un sistema de escaneo láser confocal MRC1024 (Bio-Rad), como se mencionó anteriormente.

16.- PROCESAMIENTO Y ACTIVACION DE LA PRE-PROENZIMA EhCP112.

Alícuotas de 1.5 ml de los cultivos bacterianos inducidos se centrifugaron a 12 000 x g en una microcentrífuga durante 1 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla bacteriana se resuspendió en 500 µl de una solución de acetato de sodio 50 mM a pH 3.5, se les agregó pepsina 40 µg/ml y se incubó durante 2 h a 37 °C.

17.- ELECTROFORESIS EN GELES DE SUSTRATO, POLIACRILAMIDA–SDS CON GELATINA.

La actividad de rEhCP112 fue analizada en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina (0.2%) (Rigothier y col., 1992). Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en Tritón X-100 al 2.5% por 1 h a temperatura ambiente. La enzima fue activada por incubación en Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, CaCl₂ 10 mM y 2-mercaptoetanol al 0.02% (amortiguador de activación) por 12-16 h a 37°C (Keene y col., 1986). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 al 0.25% y las bandas claras indicaron actividad proteolítica. La actividad de la rEhCP112 fue también determinada en geles de poliacrilamida copolimerizados con colágeno tipo I al 0.1%, fibronectina al 0.1%, hemoglobina al 0.2% y revelados como se menciona arriba.

Para analizar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad de la proteasa, secciones de 1 X 2 cm de los geles de poliacrilamida fueron incubados 1 h a temperatura ambiente con 1 µg de rEhCP112 purificada. Entonces, los fragmentos del gel fueron incubados de 12-16 h en el amortiguador de activación (pH 6.8) a 4, 25, 30, 37 or 42 °C, o a pHs de 3 a 9 (37 °C). Los fragmentos fueron teñidos en azul de Coomassie al 0.05% disuelto en metanol al 5% y ácido acético 10%, durante 20 min a 2 h y se destiñó con una solución de metanol 5% y ácido acético 7% hasta visualizar bandas claras de degradación sobre un fondo oscuro. Las

imágenes fueron registradas y la actividad de proteasa fue cuantificada por densitometría de imágenes.

18.- EFECTO CITOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS AMIBIANOS.

El efecto citotóxico de los extractos amibianos, o de la proteína recombinante, sobre la monocapa de la línea celular MDCK fue determinada de acuerdo a la técnica descrita por Lushbaugh y col. (1978), Bos (1980) y Mattern y col. (1980). Extractos de amibas equivalentes a 1×10^6 trofozoítos o bien la proteína rEhCP112 purificada a diferentes concentraciones, de 1.5 a 4.5 $\mu\text{g/ml}$ de solución, se les agregó 2-mercaptoetanol (Merk-México) a una concentración final de 0.02% y 0.5 ml de los extractos amibianos se vertió a las monocapas de células MDCK cultivadas en multicámaras Linbro, las cuales previamente habían sido lavadas tres veces con solución salina isotónica. Las monocapas con los extractos se incubaron a 37 °C durante 2 h o el tiempo necesario para que los trofozoítos de la clona A destruyeran las monocapas. Para medir cuantitativamente la destrucción de la monocapa, se utilizó la técnica descrita por Orozco y col., (1978) y Bracha y Mirelman (1984). Después de lavar la multicámara 3 veces con PBS, las monocapas se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en PBS durante 30 min a 37 °C (0.5 ml/pozo). Transcurrido este tiempo las preparaciones se lavaron 3 veces con solución salina fría y se incubaron durante 10 min con 160 μl de solución de azul de metileno al 1% en amortiguador de boratos 0.01 M, pH 8.7 (BB) (100 ml de ácido bórico 0.2 M y 150 ml de tetraborato de sodio 0.05M). Posteriormente, se lavaron 3 veces con 1 ml de BB y el colorante absorbido por las monocapas se extrajo con 1 ml de HCl 0.01N, durante 30 min a 37 °C. Por último, 100 μl de la muestra anterior se diluyeron en 900 μl de HCl 0.01N y la muestra se leyó a 660 nm en el espectrofotómetro (Beckman DU-7). Los valores registrados para monocapas celulares que no estuvieron en contacto con los extractos de trofozoítos se tomó como el 0 %

de destrucción de la monocapa y se tomó como el 100 % de la destrucción de la monocapa el valor registrado para las células que estuvieron en contacto con los extractos de la clona A.

19. UNIÓN DE rEhCP112 A ERITROCITOS (ENSAYOS DE LIGANDO).

Las proteínas rEhCP112 y rEhRaB (40 μ g), usada como control interno, fueron incubadas por 30 min a 4 °C con 1×10^5 eritrocitos fijados con paraformaldehido en presencia de BSA al 1 %. Como control se utilizaron eritrocitos incubados solamente con BSA al 1 %. Las muestras se lavaron exhaustivamente con PBS (pH 6.8), y entonces, se incubaron durante 1 h a 37 °C con anti-EhCPADH Mab. Después, las células se incubaron con un anticuerpo secundario fluoresceinado durante 1 h a 37°C y lavadas con PBS. Finalmente, las muestras fueron analizadas con un microscopio Nikon Diaphot 200 acoplado a un sistema de escaneo confocal con láser MRC 1024 (Bio-Rad), como se describió anteriormente.

RESULTADOS

AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *Ehcp112*.

Para estudiar la actividad de la proteína EhCP112 independientemente del complejo EhCPADH, el gen *Ehcp112* se expresó en bacterias *E. coli*. Dado que la proteasa EhCP112 se sintetiza como una preproenzima y que la bacteria no posee la maquinaria para el procesamiento de esta proteína, en este trabajo iniciamos el estudio de EhCP112 haciendo construcciones diferentes. Una donde se colocó el gen completo (preproenzima) (construcción I), otra con una construcción que carece de la secuencia codificante del péptido señal (proenzima) (construcción II) y otra donde no se incorporaron ni la secuencia codificante del péptido señal, ni la de la región que sintetiza el propéptido de la enzima (enzima madura) (construcción III). La amplificación de la región codificante para la proteína EhCP112 se realizó por medio de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR). Para hacer estas construcciones se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para amplificar los tres fragmentos diferentes y como DNA molde se usó el plásmido G1, el cual proviene de un banco genómico de *E. histolytica* y contiene el gen *Ehcp112* completo (García-Rivera y col., 1999).

Los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron tomando en cuenta un mínimo de veinte nucleótidos correspondientes al inicio (sentido), y al final (antisentido) de cada región. Los oligonucleótidos iniciadores incluyeron los sitios de reconocimiento para el corte con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI para facilitar la clonación de los fragmentos amplificados. Después de realizar la reacción de amplificación, los productos fueron analizados en geles de agarosa. Los fragmentos obtenidos presentaron los tamaños esperados de 1338 pb para el gen completo, 1281 pb para el fragmento que codifica para la proenzima y 984 pb para el fragmento que codifica la enzima madura (Fig. 6).

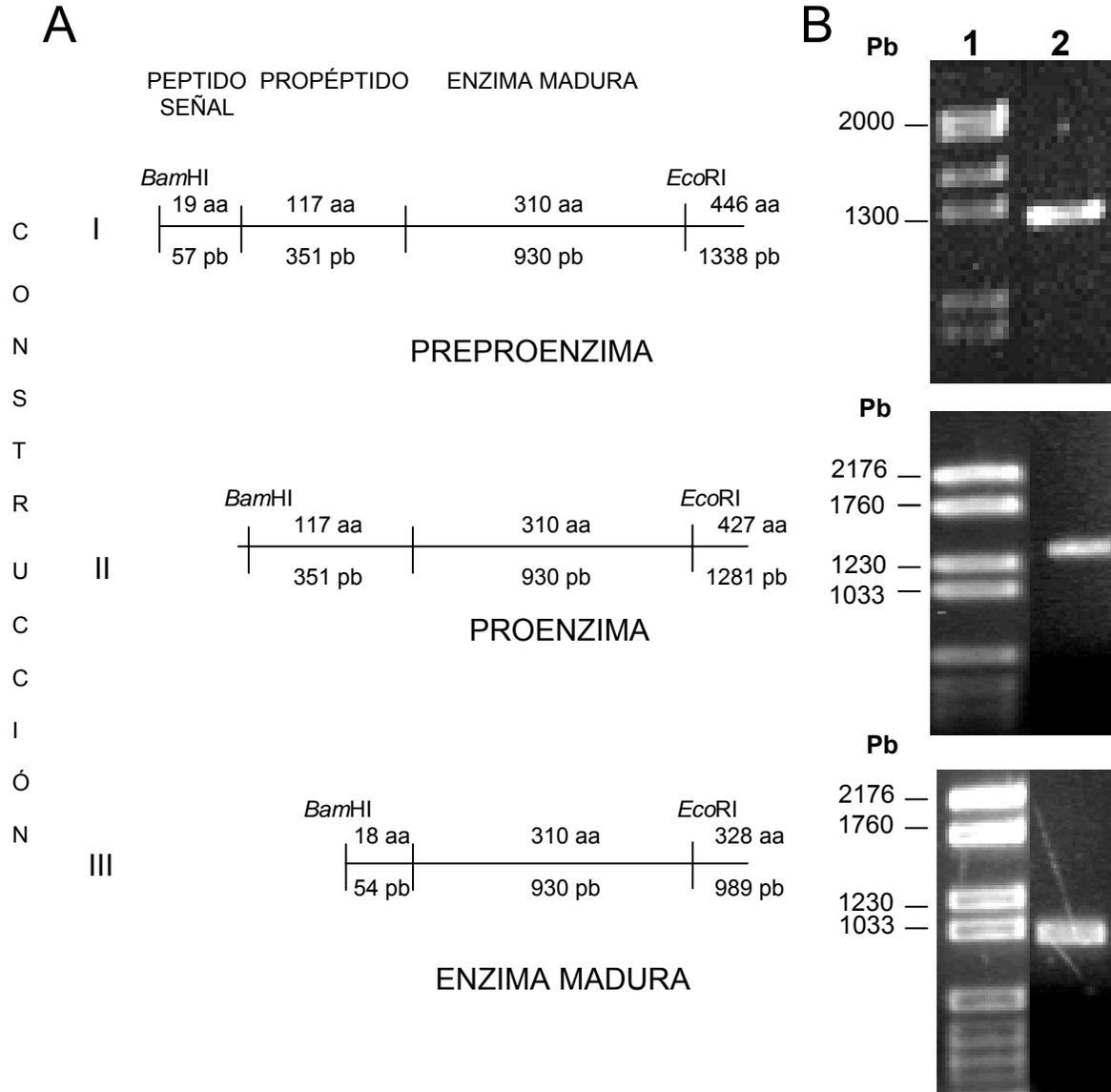


Fig. 6. Amplificación de tres fragmentos del gen *Ehcp112* por medio de PCR.

Para obtener cada uno de los fragmentos del gen *Ehcp112*, se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores (primers), la amplificación se realizó por medio de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR). A: Para ello se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para amplificar tres fragmentos: I) el gen completo de 1338 pb (preproenzima); II) un fragmento de 1281 pb que no codifica el péptido señal (proenzima); y III) un fragmento de 984 pb que codifica la secuencia de la proteasa madura. B: Geles de agarosa al 1% muestran la amplificación de cada fragmento, con el tamaño esperado, mencionado en A. Carril 1, Marcadores de tamaño molecular (VI, Boehringer). Carril 2, reacciones de amplificación.

CLONACIÓN EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pRSET A y pTrcHis2.

Para la expresión de los diferentes fragmentos de la EhCP112 en la bacteria *E.coli* se utilizaron dos vectores, pRSET-A y pTrcHis2, los cuales contienen una etiqueta de 6 histidinas para la purificación de las proteínas recombinantes. El vector pRSET contiene la etiqueta en el extremo amino de las proteínas recombinantes y se escogió este vector ya que en nuestro laboratorio ha sido utilizado con éxito para la expresión de varios genes amibianos. Sin embargo, existía la posibilidad de que las construcciones I y II pudieran tener actividad de autoprosesamiento en el extremo amino, lo que ocasionaría la separación de la etiqueta de histidinas junto con el propéptido de la proteasa, dificultando así la purificación de las proteínas recombinantes. Por esta razón también se utilizó la clonación en el vector pTrcHis2, ya que la etiqueta de histidinas se localiza en el extremo carboxilo de las proteínas recombinantes, de esta manera aunque haya autoactivación de la proteasa, la enzima madura quedaría unida a la etiqueta de histidinas.

Para la clonación de los insertos en los vectores pRSET-A y pTrcHis2, el DNA amplificado y el vector se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y se procedió a realizar la ligación. Posteriormente, con los productos de la reacción de ligación se transformaron bacterias de *E. coli* XL1 blue, y DH5 α obteniéndose varias colonias de bacterias a las cuales se les aisló el DNA plasmídico para analizarlo con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI, y así verificar la inserción de los fragmentos del gen *Ehcp112* en los vectores.

Al analizar por electroforesis los productos de digestión de cada una de las construcciones obtenidas, se observó la banda correspondiente al DNA de los vectores de expresión y los fragmentos liberados que corresponden, en cada caso, al tamaño esperado: a) un fragmento de 1338 pb (preproenzima); b) un fragmento de 1281 pb (proenzima); y c) un fragmento de 984 pb que codifica la secuencia de la proteasa madura (Fig. 7).

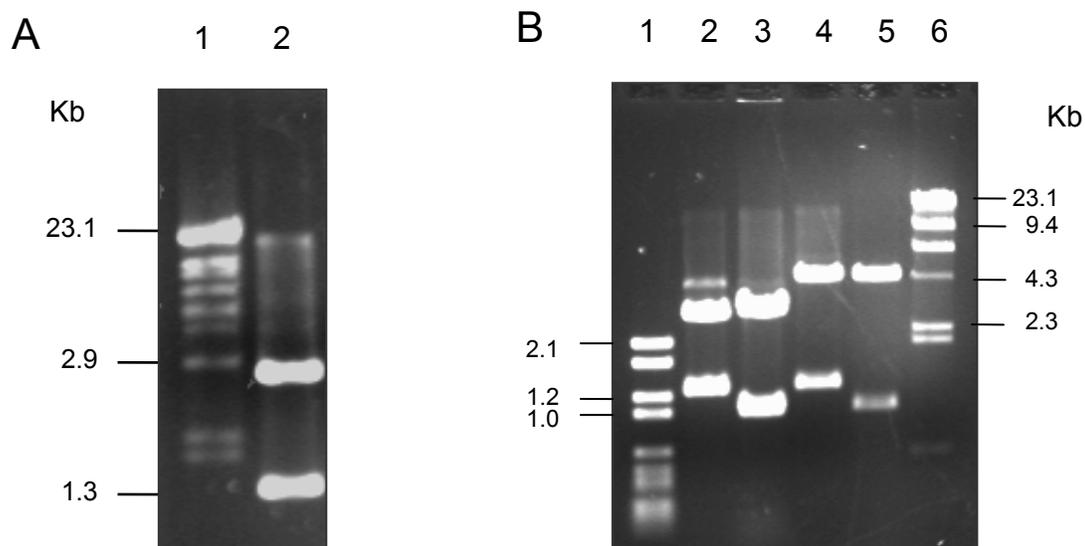


Fig. 7. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DEL GEN *Ehcp112* EN VECTORES DE EXPRESIÓN pRSET y pTrcHis2. Los productos obtenidos de la PCR fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, y ligadas a los vectores pRSET y pTrcHis2. Las mezclas de ligación fueron introducidas en bacterias *E. coli* y de las colonias obtenidas se aisló el DNA plasmídico. Cada una de las construcciones obtenidas se cortó con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI y los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. A. Carril 1, Marcador de tamaño molecular DNA de λ / *Hind* III. Carril 2, Construcción I (pRSETA-preproenzima). B. Carril 1, marcador VI; Carril 2, DNA de la Construcción II (pRSET-proenzima); Carril 3, DNA de la construcción III (pRSET-enzima); Carril 4, DNA de la construcción II his (pTrcHis2-proenzima); Carril 5, DNA de la construcción III his (pTrcHis2-enzima); Carril 6, Marcador de tamaño molecular DNA de λ / *Hind* III.

Para verificar si las proteínas recombinantes, en cada una de las construcciones, estaban en el mismo marco de lectura de los péptidos líderes de los vectores (5') y con la etiqueta de histidinas (3'), los plásmidos recombinantes se secuenciaron. La secuencia de la construcción I se mostró en un trabajo previo (Ocádiz, 1998). La secuencia de las construcciones II (proenzima) y III (enzima madura), en donde se utilizó el vector de expresión pRSET-A, se muestran en la figura 8a. En ambos casos la secuencia de nucleótidos indicó que cada uno de los fragmentos clonados estaban en marco de lectura con el péptido líder del vector.

A partir de las secuencias de las construcciones II his (proenzima) y III his (enzima madura) en el vector pTrcHis2, se dedujo que cada una de ellas estaban en marco de lectura con el péptido líder del vector (5'), y con el fragmento que codifica la etiqueta de histidinas en el extremo 3'. La traducción de las secuencias mostraron que en la fusión vector-inserto de ambos extremos, existe unión del péptido del vector con los polipéptidos codificados por los diferentes fragmentos del gen *Ehcp112* (Fig. 8b). Así, las proteínas de fusión contienen un péptido líder, el péptido de EhCP112 y un péptido en su extremo carboxilo que contiene la etiqueta de 6 histidinas para su purificación.

Con las construcciones realizadas se transformaron bacterias *E. coli* cepa BL21 (DE3) y Lys E, para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Para monitorear la cinética de inducción se agregó IPTG 1 mM y cada 20 min se tomó una alícuota de 1.5 ml del cultivo bacteriano para procesarla y obtener las proteínas de la bacteria, las cuales se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%.

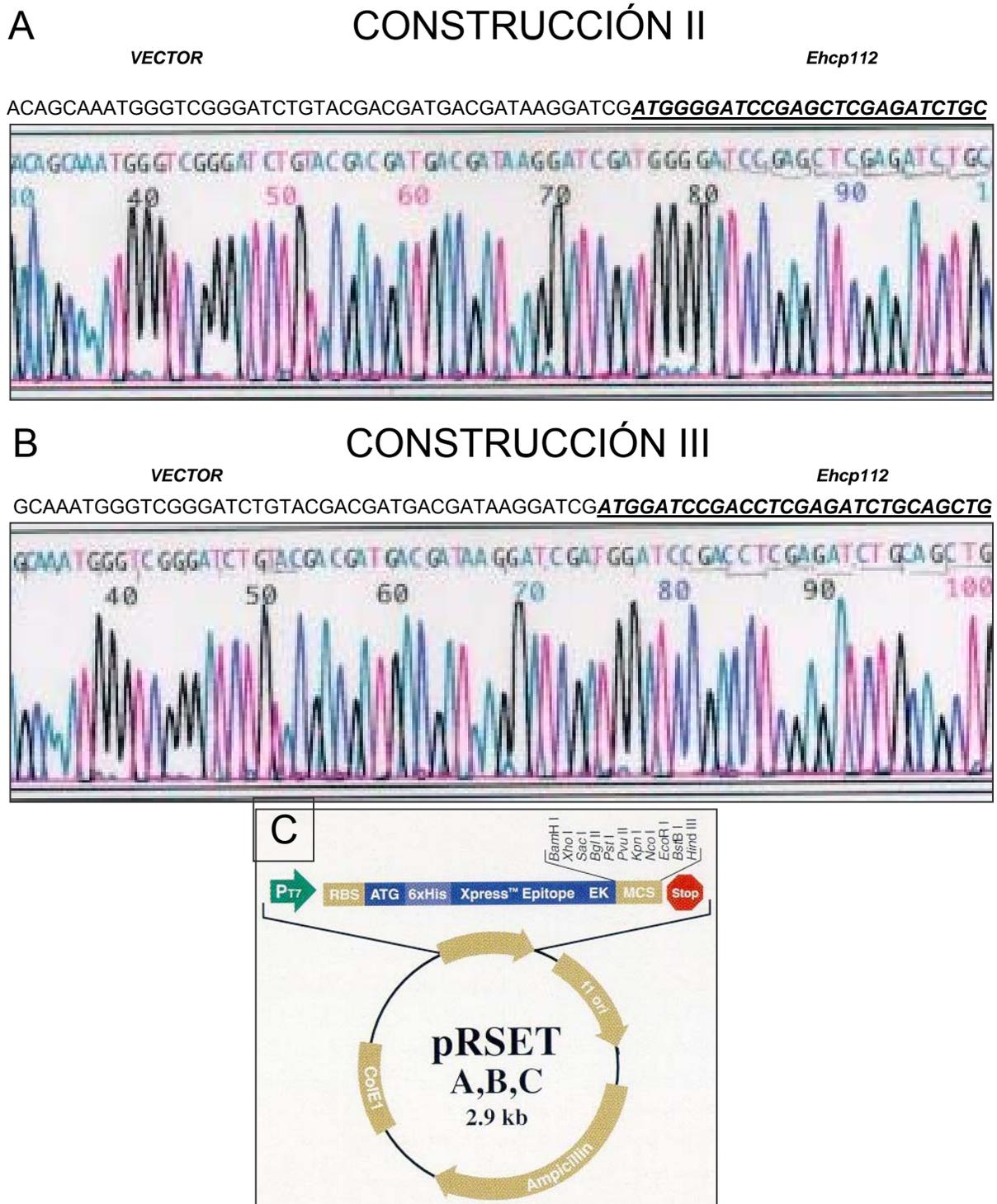
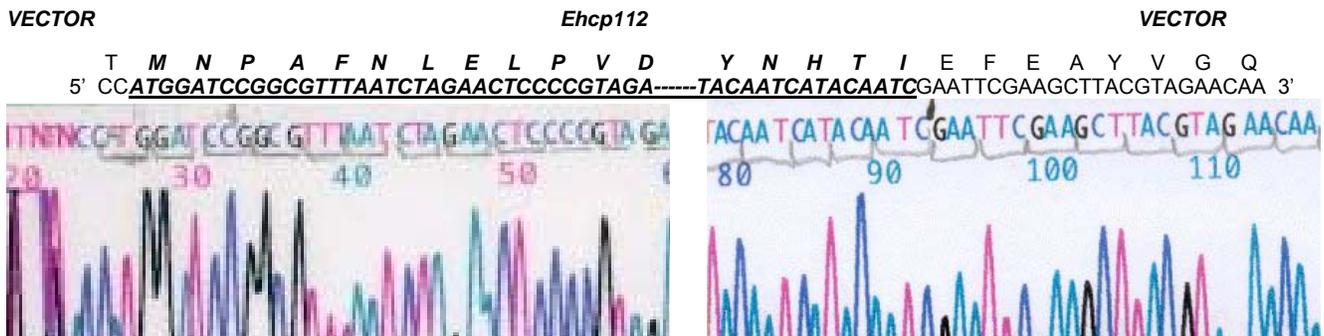


Fig. 8a. Secuencias alrededor del sitio de clonación en las construcciones II (pRSET-proenzima) y III (pRSET-enzima) en el vector pRSET. Para verificar si las proteínas recombinantes estaban en marco de lectura con el péptido líder del vector (5') se secuenciaron dichos sitios. A. Electroferogramas de la construcción II. B. Electroferogramas de la construcción III. C. Esquema del vector de expresión pRSET. ATG... secuencia del gene *Ehcp112*.

A CONSTRUCCIÓN II HIS



A CONSTRUCCIÓN III HIS

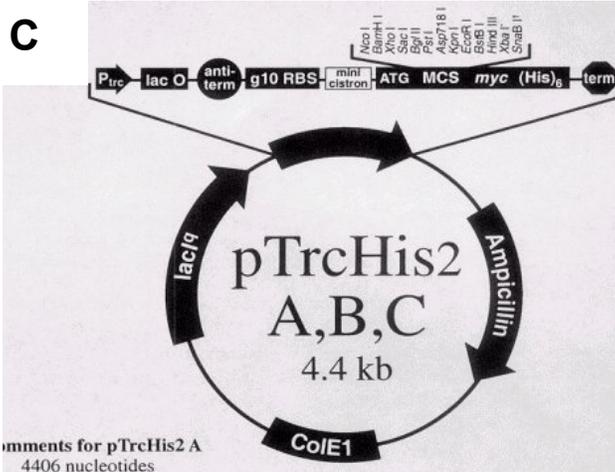
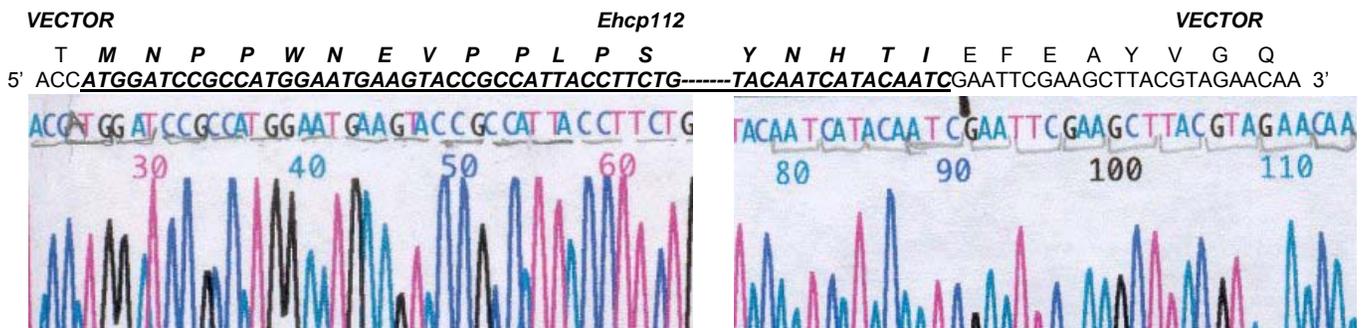


Fig. 8b. Secuencias del sitio de clonación en las construcciones II his (pTrcHis2-proenzima) y III his (pTrcHis2-enzima). Para verificar si las proteínas recombinantes estaban en marco de lectura con el péptido líder del vector (5') y con la etiqueta de histidinas (3') se secuenciaron dichos sitios. A. Electroferogramas de la construcción II his (pTrcHis2-proenzima). B. Electroferogramas de la construcción III his (pTrcHis2-enzima), encima de cada secuencia se muestra la secuencia de aminoácidos mostrando continuidad en los marcos de lectura. C. Esquema del vector de expresión pTrcHis2.

En bacterias transformadas con la construcción I (preproenzima) en el vector pRSET-A se observó la inducción de una proteína de aproximadamente 53 kDa que coincide con el peso molecular esperado de acuerdo a la suma de los pesos del péptido líder (4 kDa) y la preproenzima (49 kDa) (fig. 9). La proteína recombinante se expresó a partir de los 20 min de inducción, aumentando su expresión hasta los 80 min (Fig. 9A) en donde permanece constante la cantidad de proteína. Esta proteína fue purificada utilizando columnas de Ni²⁺ (Fig 9B), confirmando que se trata de la proteína recombinante. La inducción de la expresión de las construcciones II (proenzima) y III (enzima madura), en ambos vectores se realizó en bacterias *E. coli* cepa BL21 (DE3) Lys E, ya que esta cepa permite expresar proteínas altamente tóxicas.

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*.

Estas proteínas se trataron de inducir en otras cepas bacterianas, pero no se obtuvo proteína recombinante (datos no mostrados), probablemente debido a la toxicidad de la enzima expresada. La única construcción que nos permitió expresar una proteína recombinante fue la construcción II his (pTrcHis2-proenzima). La proteína expresada fue de 52 kDa (46.9 kDa de la CP más 4.8 kDa péptido líder del vector) que fue el peso esperado (Fig. 10). Las demás construcciones no mostraron inducción tal vez por la toxicidad de las proteínas recombinantes, por lo que las construcciones I (pRSET-preproenzima) y II his (pTrchis2-proenzima) fueron las utilizadas durante este trabajo en la expresión, purificación y caracterización de la proteína EhCP112.

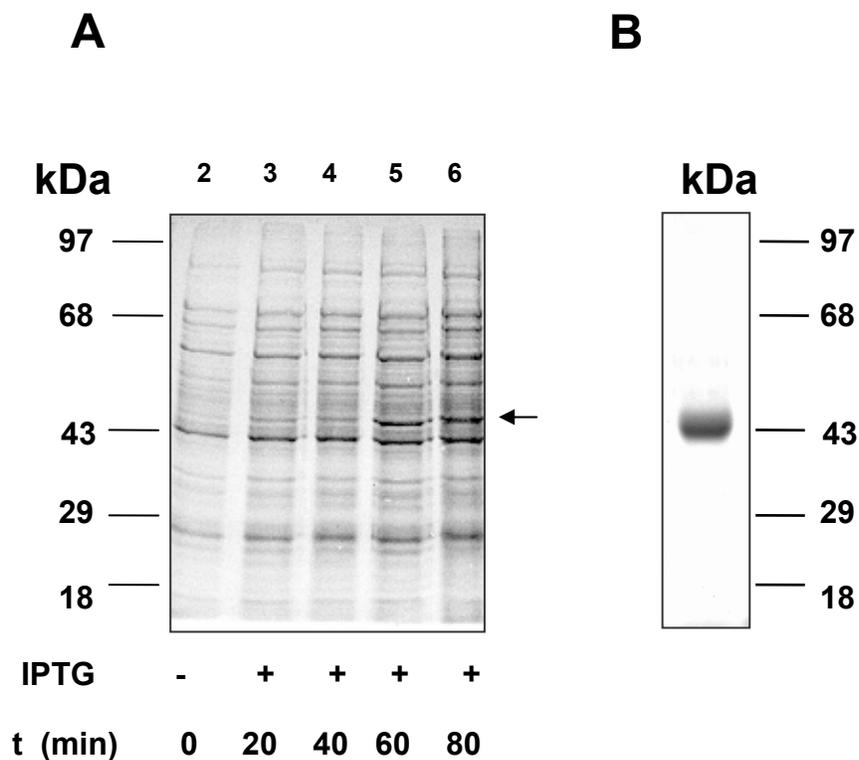


Fig. 9. Cinética de expresión y purificación de la preenzíma.

A) En un gel de poliacrilamida-SDS se separaron los extractos bacterianos, conteniendo la construcción I, obtenidos durante la cinética de inducción con IPTG en los tiempos señalados en la parte inferior. Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carriles 2-6: Extractos bacterianos obtenidos durante la cinética. (+) presencia, (-) ausencia. La flecha indica la proteína recombinante. B) EhCP112 purificada mediante columna de afinidad.

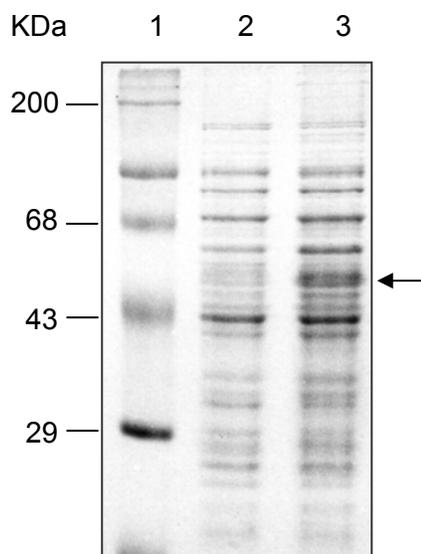


Fig. 10. Inducción y expresión de la proenzima. La construcción II his (pTrcHis2-proenzima) fue utilizada para transformar bacterias BL21 (DE3) Lys E. Los extractos de las bacterias inducidas con IPTG se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie. Carril 1: Marcadores de peso molecular. Carril 2: Extractos bacterianos sin inducir; y Carril 3: Extractos bacterianos inducidos. La flecha indica la proteína recombinante.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE (rEhCP112).

Después de ver la inducción de la proteína recombinante (pTrcHis2-proenzima), esta se purificó mediante columnas de afinidad a níquel (Ni^{+2} -NTA-agarosa, Qiagen). La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes, ya que la proteína recombinante se detectó en cuerpos de inclusión (datos no mostrados).

Para detectar a la proteína recombinante (rEhCP112) durante el proceso de purificación, se realizó un análisis por SDS-PAGE en muestras de cada paso (Fig. 11). Cada una de las muestras se corrieron, en dos geles iguales, en una corrida electroforética (SDS-PAGE) efectuada después de la purificación, en donde uno de los geles después de la corrida se tiñó con azul de Coomassie (Fig. 11A), mientras que el otro sirvió para realizar un Western blot el cual se reveló con un anticuerpo anti-etiqueta de histidinas (Qiagen). En estos experimentos se detectaron dos bandas, una de 52 kDa y otra de 40 kDa en la solución de elución a pH 4 (Fig. 11), la presencia de dichas bandas posiblemente se debe a que la enzima fue clonada con el propéptido que pudiera desprenderse en la presencia de pHs bajos utilizados durante la purificación. Durante todo el proceso de purificación se pueden observar varias proteínas de diferentes pesos, las cuales no se adhirieron, o se fueron desprendiendo de la columna durante los lavados con amortiguadores con pHs cada vez menores (Fig. 11, Carriles 2- 8). Las proteínas que son eluidas con un amortiguador a pH 4, al final del proceso de purificación, son las únicas que son reconocidas por el anticuerpo anti-etiqueta de histidinas y que se observan en el Western blot (Fig 11B, Carril 10). La proteína reconocida por el anticuerpo anti-etiqueta de histidinas fue colectada y dializada para posteriormente ser utilizada en la caracterización bioquímica de la proteína EhCP112.

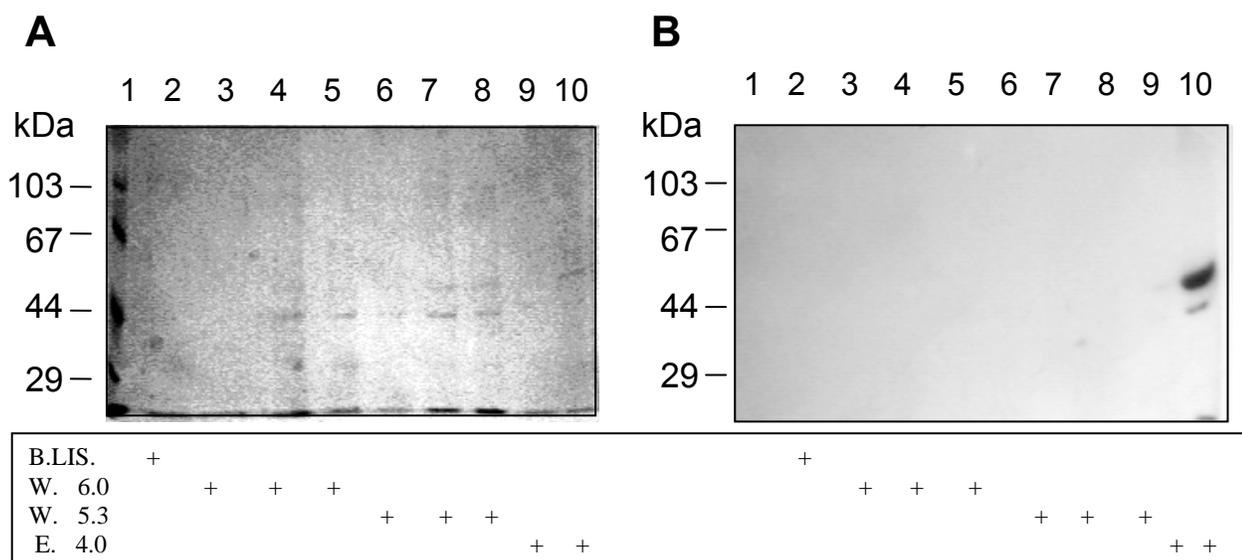


Fig. 11. Purificación de la proteína EhCP112. Después de inducir la expresión de la proteína recombinante (rEhCP112), a partir de la construcción II his (pTrcHis2-proenzima) en bacterias *E. coli*, fue purificada por un método desnaturizante con la ayuda de una columna de afinidad. Cada paso del proceso de purificación fue analizado en geles de poliacrilamida-SDS. A. PAGE-SDS, gel teñido con azul de Coomassie; Carril 1, Marcadores de peso molecular; Carril 2, Solución de lisis pH 7.8; Carriles 3-5, Solución de lavado pH 6; Carriles 6-8, Solución de lavado pH 5.3; Carriles 9 y 10, Solución de elución pH 4. B. Western Blot de A, utilizando un anticuerpo anti-etiqueta de histidinas. W.- Solución de lavado. E.- Solución de elución.

1. EhCP112 FORMA PARTE DE LA ADHESINA DE 112kDa DE *E. histolytica*.

Con el fin de confirmar que EhCP112 forma parte de la adhesina de 112 kDa se utilizaron las siguientes estrategias:

1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

Con la proteína rEhCP112 expresada al utilizar la construcción II his (pTrcHis2-proenzima) y purificada, se procedió a inmunizar un conejo, el cual fue retado 4 veces con dicha proteína. Al finalizar el protocolo de inmunización, se obtuvo suero anti-EhCP112 (AbEhCP112) y se realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de los anticuerpos aislados. En estos ensayos, el anticuerpo policlonal AbEhCP112 reconoció la proteína recombinante, hasta un título de 1:1000 (Fig. 12). Este mismo suero mostró reacción contra extractos de amibas (Fig.12, círculo azul marino), lo que indicó que los anticuerpos AbEhCP112 reconocen a la proteína nativa en *E. histolytica*. Por otra parte, el Ab monoclonal Mab5 dirigido contra el complejo EhCPADH, utilizado como control (Arroyo y Orozco, 1987), reconoció al extracto de *E. histolytica* y a la proteína recombinante (EhCP112) (Fig. 12) sugiriendo que EhCP112 forma parte de dicho complejo.

En estos experimentos un anticuerpo contra actina reconoció a los extractos de *E. histolytica* pero no a la proteína EhCP112 (Fig.12), mostrando la especificidad del AbEhCP112 y del Mab5 por rEhCP112. Como control negativo se utilizó un anticuerpo secundario sin añadir el Ab primario y no hubo reconocimiento (Fig. 12, círculo color verde). Estos resultados sugieren que los anticuerpos generados contra la proteína recombinante reconocen específicamente tanto a la proteína recombinante como a la proteína nativa.

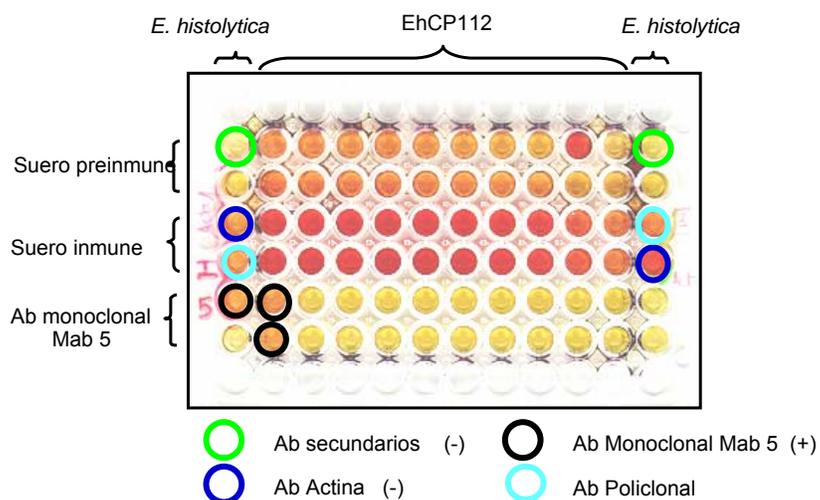


Fig. 12. Título y especificidad del anticuerpo policlonal AbEhCP112, por ELISA. En placas de microtitulación los 60 pozos centrales se cubrieron con rEhCP112 (1 μ g/pozo). El anticuerpo policlonal AbEhCP112 reconoce a la proteína recombinante, así como a las proteínas ambientales (círculo azul cielo). El anticuerpo monoclonal Mab5 (círculo negro) reconoce a la proteína recombinante y también a las proteínas de *E. histolytica*. Los controles positivos Mab5 y Ab actina fueron específicos para las proteínas de *E. histolytica*, el Ab Actina (círculo azul marino) y el suero preinmune (las dos primeras filas) no reconocen a rEhCP112. Como control negativo se usó un anticuerpo secundario sin añadir el Ab primario, no hay reconocimiento (círculo color verde).

1.2. PAGE – INMUNOTRANSFERENCIA (Western Blot)

Otra estrategia para confirmar que EhCP112 forma parte del complejo EhCPADH fue la de analizar por Western blot, a las proteínas recombinantes, con el anticuerpo monoclonal contra el complejo EhCPADH (Mab 5), para ello, proteínas de *E. histolytica* o de bacterias conteniendo la construcción I, se separaron por PAGE-SDS al 10%. Después de la electroforesis, el gel se cortó en dos partes que contenían exactamente la misma cantidad de proteína y muestras en el mismo orden. Una de las mitades se tiñó con azul de Coomassie y la otra mitad se transfirió a papel de nitrocelulosa, el cual posteriormente se expuso al anticuerpo monoclonal 5 (Mab5). En el gel teñido con azul de Coomassie se observó la expresión de la proteína recombinante rEhCP112 en el extracto bacteriano (Fig.13A, carril 3), así como la proteína EhCP112 purificada (Fig.13A, carril 4). En el Western blot, el Mab5 reconoció una sola banda de aproximadamente 120 kDa en proteínas de *E. histolytica* (Fig. 13B, carril 5). Además, reconoció a la proteína recombinante en un extracto bacteriano (carril 3) y a la proteína purificada (carril 4). Este anticuerpo también reconoció a la proteína recombinante producida por la construcción II (Fig. 13C). Estos resultados confirman que EhCP112 forma parte del complejo EhCPADH.

1.3. LA PROTEINA RECOMBINANTE EhCP112 (rEhCP112) ES RECONOCIDA POR SUEROS DE PACIENTES CON AMIBIASIS.

Para saber si EhCP112 es reconocida por sueros de pacientes con amibiasis invasiva, la proteína recombinante producida por la construcción II his fue purificada, transferida a filtros de nitrocelulosa y revelada con sueros de pacientes.

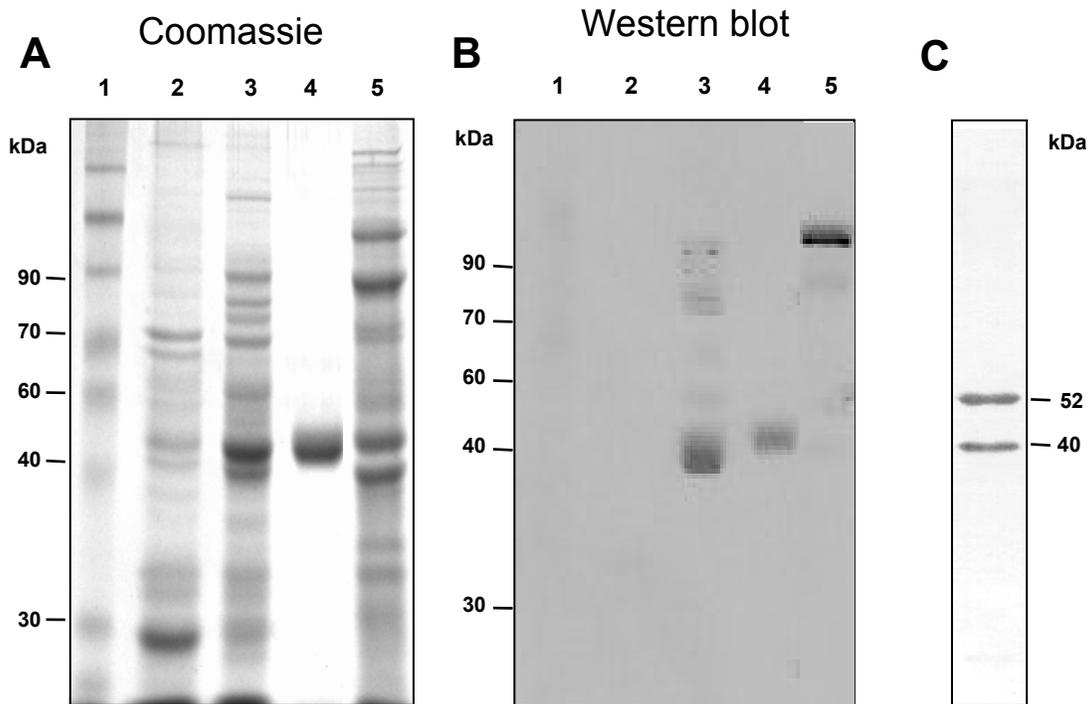


Fig. 13. Reconocimiento de las proteínas recombinantes de EhCP112 por el Mab 5.

A. Extractos bacterianos conteniendo la construcción I e inducidos con IPTG, fueron separados en PAGE-SDS al 10 % y teñidos con azul de Coomassie. Carril 1, marcadores de peso molecular; Carril 2, extractos totales de bacterias no inducidas; Carril 3, extractos de bacterias inducidas; Carril 4, proteína recombinante purificada; Carril 5, extractos totales de trofozoitos *E. histolytica*. B. Western blot con las proteínas descritas en (A) usando Mab5. C. Western blot con la proteína EhCP112 (producida por la construcción II) purificada y reconocida por el anticuerpo mAb5.

La identidad de la proteína recombinante fue probada primero con un anticuerpo comercial que reconoce la etiqueta de histidinas. En experimentos de Western blot usando los extractos crudos de bacterias inducidas con IPTG, los anticuerpos reconocieron dos bandas una de 52 y otra de 40 kDa, las cuales no fueron detectadas en las bacterias no inducidas (Fig 14, carriles 4 y 5). En igual forma, la rEhCP112 purificada por la columna de níquel, fue también reconocida por el anticuerpo antihistidina como dos bandas una de 52 y la otra de 40 kDa (Fig. 14, carril 1). La banda de 52 kDa puede corresponder a una banda enriquecida vista en el gel teñido con azul de Coomassie de la bacteria inducida, y va de acuerdo con el peso molecular predicho, esta banda corresponde a la proenzima. La proteína de 40 kDa puede ser un producto de degradación o bien por su peso molecular podría corresponder a la enzima rEhCP112 madura. Por otra parte, sueros de pacientes con amibiasis invasiva también dan reacción positiva con las proteínas de 52 y 40 kDa de la rEhCP112 purificada (Fig. 14, carriles 3-5), mientras que el suero de personas aparentemente sanas no reaccionaron con la rEhCP112 (Fig. 14, carril 6). Estos resultados muestran que EhCP112 es inmunogénica como se había reportado previamente (Arroyo, 1987).

1.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE EhCP112.

Para determinar la localización subcelular de EhCP112, se realizaron experimentos de inmunomarcaje. Los trofozoitos fueron fijados, permeabilizados e incubados con los anticuerpos policlonales AbEhCP112 y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína. El análisis realizado con la ayuda de un microscopio confocal, reveló que EhCP112 es una proteína presente en la membrana plasmática y en pequeñas vacuolas cercanas a la membrana plasmática (Fig. 15), una distribución similar a la observada para el complejo EhCPADH mediante el Mab 5 (García-Rivera y col., 1999).

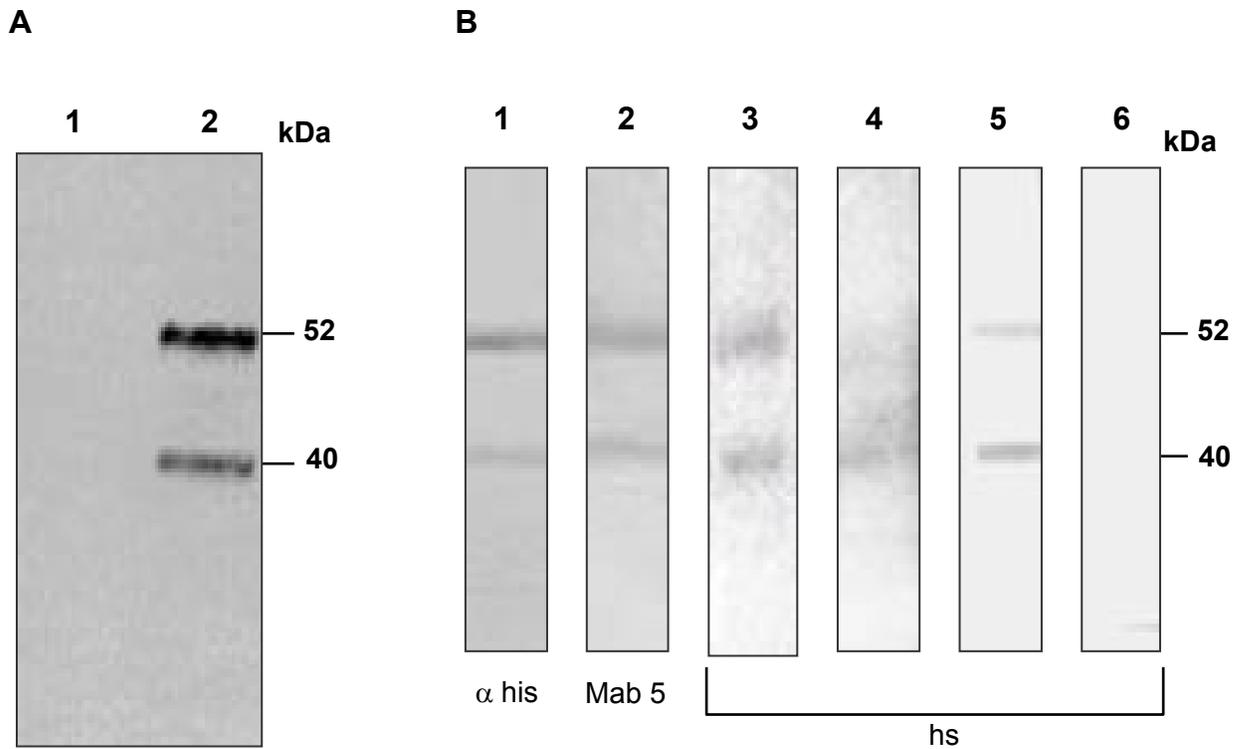


Fig.14 . Inmunogenicidad de EhCP112.

rEhCP112 fue expresada en bacterias inducidas con IPTG, purificada con columnas de afinidad enriquecidas con níquel y analizada por Western blot. A. Extractos de bacterias no inducidas (carril 1) e inducidas (carril 2) la proteína recombinante fue detectada con anticuerpos anti-etiqueta de histidinas. B. Tiras de membrana de nitrocelulosa en las cuales la proteína rEhCP112 fue transferida a partir de un gel preparativo y revelada con: Carril 1, anticuerpo anti-etiqueta de histidinas (α his); Carril 2, anticuerpo monoclonal Mab5; Carril 3 – 5, sueros de pacientes con amibiasis; Carril 6, suero de una persona sana. Hs: Suero humano.

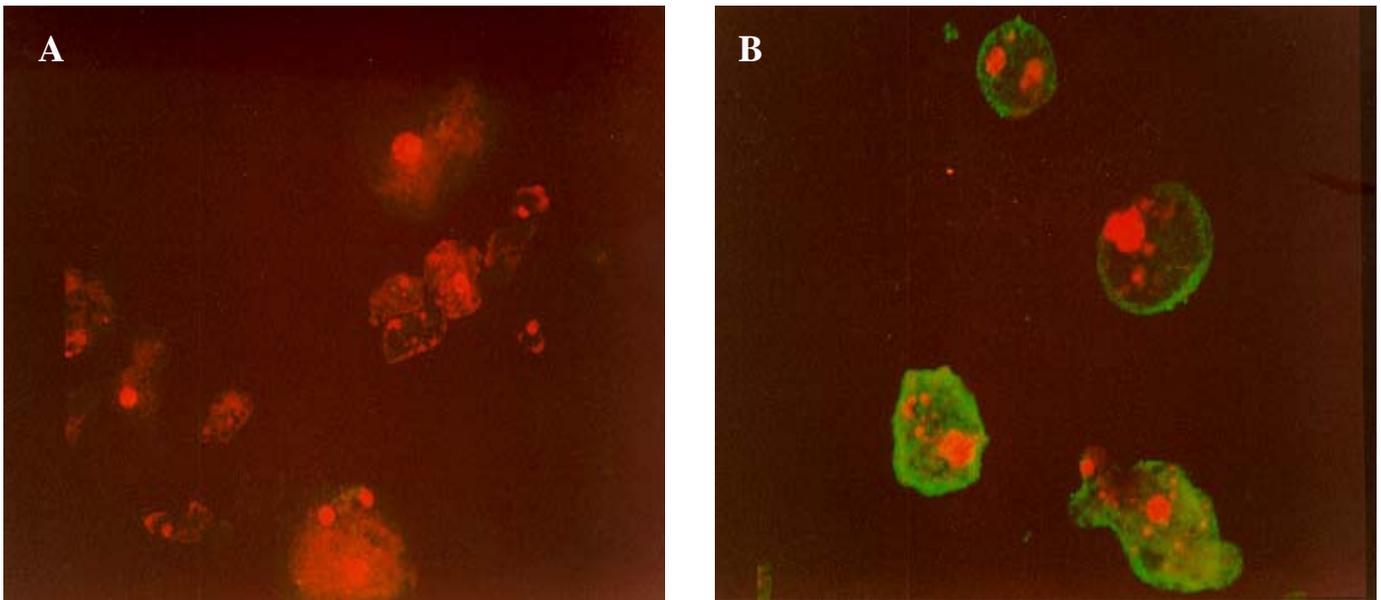


Fig. 15 . Inmunolocalización de la proteína EhCP112 en trofozoítos de *E. histolytica*.

Trofozoítos de *E. histolytica* fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos anti-EhCP112, y después, con un segundo anticuerpo fluoresceinado IgG anti-conejo (verde). Posteriormente los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo). Finalmente, las células fueron examinadas por microscopía confocal. A. Control usando solo anticuerpos secundarios y núcleos teñidos con yoduro de propidio. B. Localización de EhCP112. Las imágenes corresponden a una sección óptica.

1.5. COLOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EhCP112 Y EhADH112.

Para confirmar si el complejo EhCPADH está formado por las proteínas EhCP112 y EhADH112, codificadas por dos genes contiguos en el DNA genómico de *E. histolytica*, se analizó la localización de estas proteínas en el ambiente subcelular de *E. histolytica* utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra cada una de las proteínas recombinantes. Los trofozoitos amibianos, se incubaron con el anticuerpo AbEhCP112, y después se incubaron con el segundo anticuerpo rodaminado. Entonces, se incubaron con los anticuerpos policlonales AbEhAdh112 (Martínez-López y col., 2004) y con un segundo anticuerpo fluoresceinado. El análisis realizado con la ayuda del microscopio confocal reveló que EhCP112 y EhADH112 son proteínas que se encuentran colocalizadas en la membrana citoplásmica, y en vesículas cercanas a ésta, de los trofozoitos amibianos (Fig. 16). Por lo tanto podemos confirmar que el complejo EhCPADH está conformado por las proteínas EhCP112 y EhADH112, explicando con ello las actividades de adhesión y de actividad de proteasa observadas en la adhesina purificada (Rigothier y col., 1992; García-Rivera y col., 1999).

2. LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EhCP112 PRESENTA ACTIVIDAD DE PROTEASA.

Uno de los principales objetivos del presente trabajo fue el de analizar la actividad biológica de la proteína EhCP112, por lo que fue de nuestro interés obtener a la proteína recombinante activa. La actividad proteolítica de la proteína recombinante se analizó en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina. La proteína producida por la construcción I no mostró actividad (datos no mostrados), tal vez porque ésta se sintetizó como una preproenzima y en la bacteria no se realizó el procesamiento. Debido a que hay reportes acerca de que algunas proteasas sufren un proceso de autoactivación cuando éstas son incubadas a pHs bajos (Rigothier y col., 1992), decidimos que la preproenzima purificada se incubara a diferentes pHs y posteriormente se analizó su actividad proteolítica. Este tratamiento no tuvo

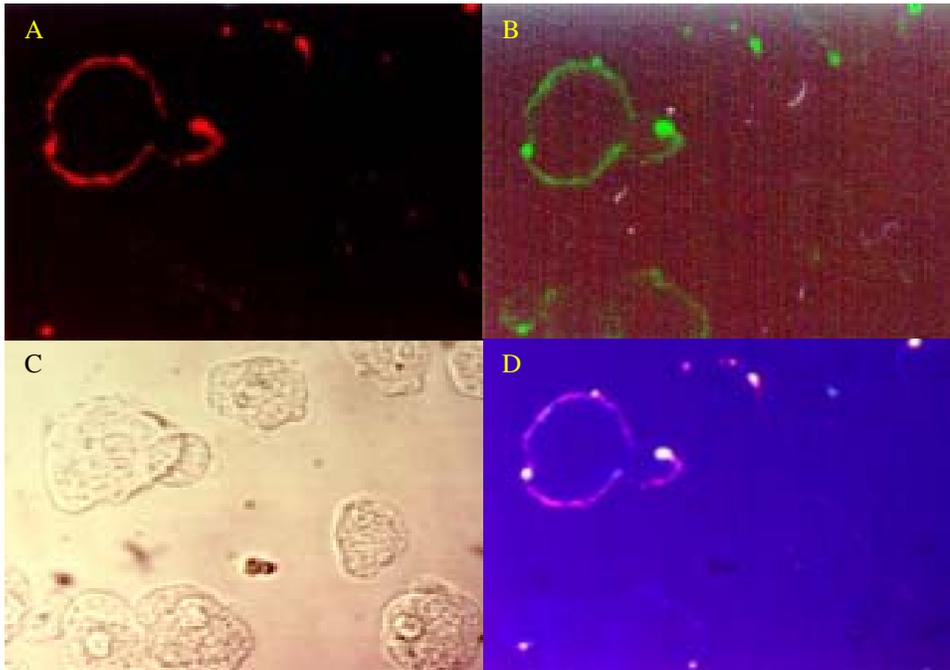


Fig. 16. Colocalización de las proteínas EhCP112 y EhADH112 mediante microscopía confocal. Trofozoitos crecidos en cubreobjetos estériles, se fijaron y se permeabilizaron. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo policlonal AbEhCP112 (1:1000), después se incubaron con un segundo anticuerpo rodaminado (1:60); enseguida se incubaron con el anticuerpo policlonal AbEhAdh (1:400) y por último con un segundo anticuerpo fluoresceinado. A, localización de EhCP112 (rojo). B, localización de EhADH112 (verde). C, microscopía de transmisión; D, Colocalización de EhCP112 y EhADH112 (amarillo). Las imágenes corresponden a una sección óptica.

éxito en la activación de la enzima (datos no mostrados), por lo que se procedió a realizar una digestión parcial con pepsina para tratar de separar el propéptido de la enzima madura. Así, bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido que contienen la construcción I, fueron tratadas para expresar la proteína recombinante de 53 kDa. Entonces, los extractos bacterianos que expresan a la proteína recombinante, así como también a los que no la expresan, fueron sometidos a proteólisis parcial con pepsina. La Fig. 17 muestra que los extractos bacterianos sin inducir no presentan actividad sobre los geles de sustrato. En cambio, en los extractos de bacterias inducidas se observó la actividad proteolítica en una proteína de 30 kDa. Estos experimentos indican que EhCP112 presenta actividad de proteasa. Sin embargo, la preincubación con otra proteasa como la pepsina dificultaría la caracterización de la actividad.

Cuando analizamos en geles de sustrato a la proteína recombinante producida por la construcción II his, encontramos una banda de actividad de aproximadamente 52 kDa tanto en los extractos de bacterias inducidas como en la proteína purificada (Fig. 18), ésta actividad no se presentó en los extractos de bacterias no inducidas (Fig. 18), indicando que esta actividad no era debido a una proteasa de la bacteria. Estos resultados indicaron que las bacterias expresaron a la EhCP112 en forma activa sin necesidad de realizar pretratamientos, lo cual nos permitió la caracterización enzimática de EhCP112. Sin embargo, la actividad solo se obtuvo con preparaciones frescas (hasta 2 h después de su purificación), ya que la proteína fue rápidamente degradada, posiblemente por autocatálisis o por alguna proteasa bacteriana contaminante (Ocádiz y col., 2005), por lo que toda caracterización de la actividad enzimática fue realizada con proteína recién purificada.

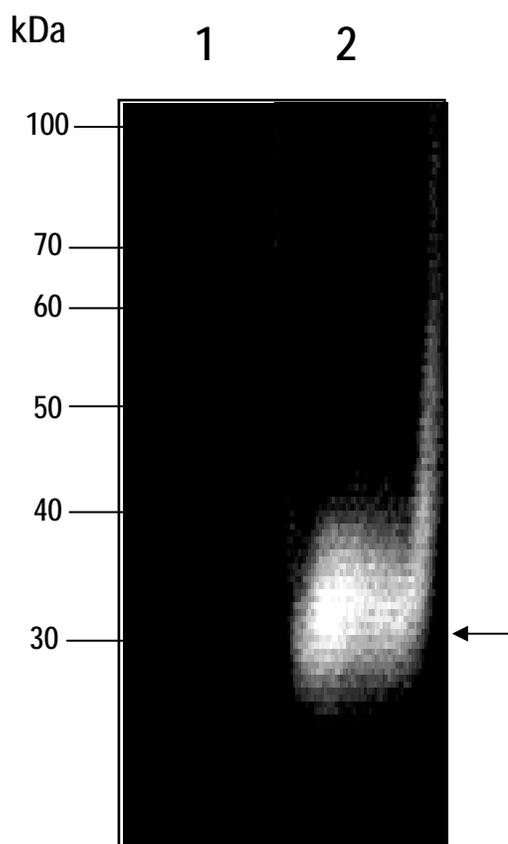


Fig. 17. Actividad proteolítica de la proteína recombinante EhCP112 tratada con pepsina. Extractos de bacterias inducidas y no inducidas fueron incubados con pepsina. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. Carril 1, extracto de bacterias no inducidas; Carril 2, extracto de bacterias inducidas. La flecha muestra la banda de actividad de 30 kDa.

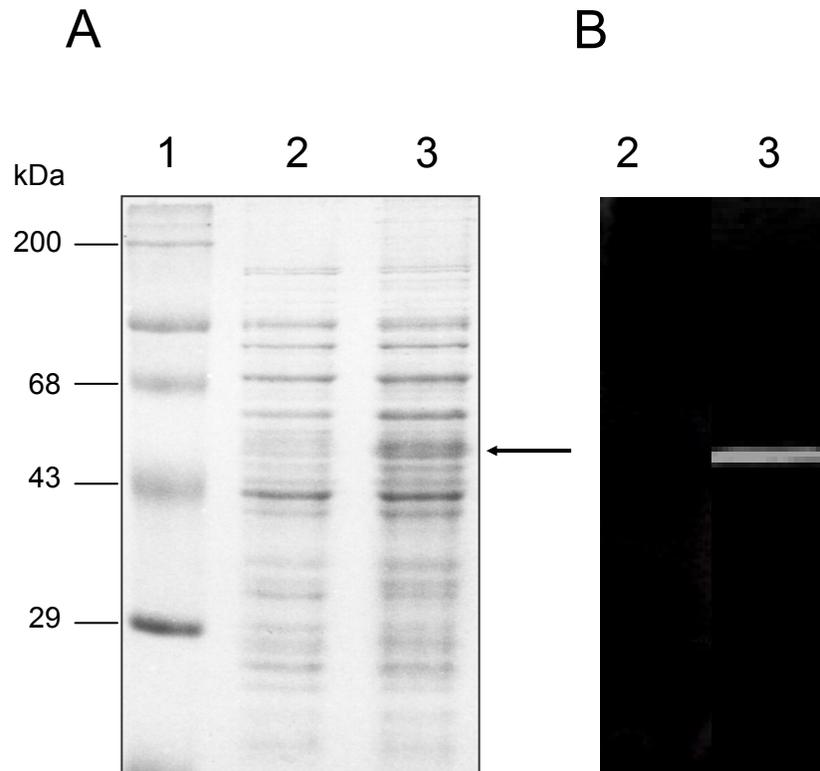


Fig. 18. Actividad proteolítica de la proteína rEhCP112. Extractos de bacterias inducidas y no inducidas fueron analizadas en geles de poliacrilamida (A) y copolimerizados con gelatina (B). Carril 1, marcadores de peso molecular; Carril 2, extracto de bacterias no inducidas; Carril 3, extracto de bacterias inducidas. La flecha muestra la banda de actividad de 52 kDa.

2.1. rEhCP112 ES ACTIVA EN UN AMPLIO RANGO DE pH Y TEMPERATURA.

En la caracterización de la actividad enzimática de EhCP112 evaluamos su actividad proteolítica bajo diferentes condiciones de pH y de temperatura. Para esto, tiras de geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, fueron incubados con la proteína rEhCP112 purificada durante 1 h a diferentes temperaturas (4 – 42 °C), o bien la proteína fue incubada a diferentes pHs (3.0 - 9.0) a 37°C. Después de esto, los fragmentos del gel fueron teñidos con azul de Coomassie y desteñidos, y el color fue registrado por densitometría (Fig. 19). Estos ensayos mostraron que la proteína recombinante fue activa a pH de 3 hasta 9, con la más alta actividad a pH 5 (Fig. 19A), que fue tomada como 100 % de actividad, la actividad mas baja fue obtenida a pH 9 (30 %). La enzima mostró entre 70% y 80% de actividad a pH fisiológico, con el máximo de actividad a 37°C. Por otro lado, a pH 7 la rEhCP112 fue activa desde 20°C hasta 37°C, en donde mostró la máxima actividad proteolítica (Fig. 19B). Estos resultados muestran que EhCP112 puede actuar bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, por lo que puede ser una enzima activa en diferentes tejidos del huésped.

2.2. rEhCP112 DEGRADA COLÁGENO TIPO I, FIBRONECTINA Y DESTRUYE MONOCAPAS DE CÉLULAS MDCK .

En general las CPs participan en la invasión de tejidos por trofozoítos de *E. histolytica* (Reed y col., 1989b; Bruchhaus y col., 1996; Ankri y col., 1999). Durante la invasión, las CPs se encuentran con diferentes substratos del hospedero, principalmente aquellos que forman la matriz extracelular, los cuales deben ser degradados para permitir la invasión de los trofozoítos. Con base a este antecedente, nosotros investigamos la actividad de rEhCP112 en geles de acrilamida copolimerizados con las proteínas de matriz extracelular colágeno tipo I y fibronectina. Como control en estos experimentos se usaron extractos totales de *E. histolytica*, corridos electroforéticamente en geles de poliacrilamida copolimerizados con colágeno tipo I y

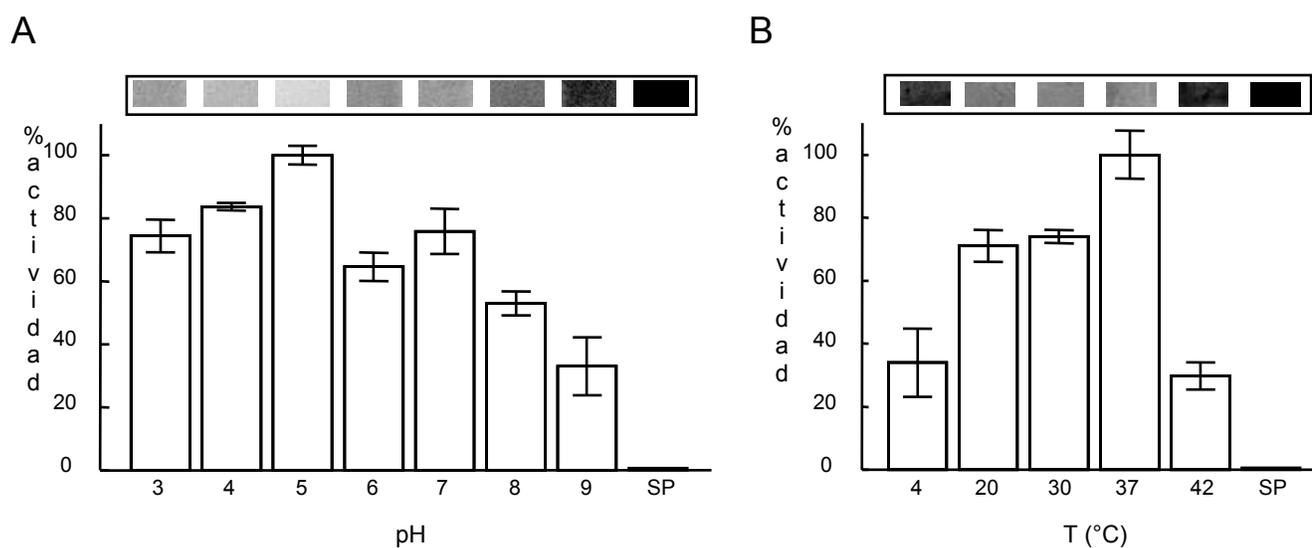


FIG. 19. rEhCP112 tiene actividad a diferentes pHs y temperaturas. Tiras de geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina fueron incubados por 1 h con 10 μ g de rEhCP112 purificada a diferentes temperaturas y pHs. La actividad de proteasa relativa de EhCP112 fue medida después de la destinción del gel en cada tira. En la parte superior de cada gráfica está la tira correspondiente. SP, tira del gel sin proteasa, utilizada como control negativo.

otros con fibronectina. rEhCP112 degradó ambos sustratos (Fig. 20A y B). La migración de la proteasa en los geles y los patrones de degradación fueron diferentes para cada sustrato. Mientras que en colágeno tipo I se observó un barrido y una banda de 52 kDa (Fig. 20A), en la fibronectina se identificó una sola banda con migración atípica la cual fue reproduciblemente detectada (Fig. 20B). Los extractos totales de trofozoítos mostraron un barrido desde el origen del gel hasta el fondo del gel en ambos sustratos, pero la actividad sobre el colágeno tipo I fue mucho más fuerte (Fig. 20A y B).

La destrucción de las monocapas de las células MDCK por extractos de trofozoítos comienza con el redondeo de las células, seguido por su liberación del sustrato, sugiriendo que las proteasas de los trofozoítos producen desprendimiento celular (Ravdin y col., 1980). Para determinar si EhCP112 puede participar en este evento, las monocapas de células MDCK fueron incubadas con distintas cantidades de rEhCP112. Después de 1 a 2 h de interacción, los extractos de trofozoítos destruyeron el 100 % de las células MDCK (Fig. 20C), mientras que 4.5, 3, y 1.5 μg de rEhCP112 dañan las monocapas en un $65 \% \pm 13 \%$, $55 \% \pm 10 \%$ y $40 \% \pm 15 \%$, respectivamente (Fig. 20C). La adición de 1 μg del anticuerpo monoclonal anti-EhCPADH a un pozo conteniendo también 4.5 μg de rEhCP112 inhibió la destrucción celular (Fig. 20C). Estos resultados mostraron que EhCP112 es capaz de degradar colágeno tipo I y fibronectina, y producir daño a monocapas de células MDCK.

3. rEhCP112 SE UNE A LA CÉLULA BLANCO.

3.1. rEhCP112 SE UNE A ERITROCITOS Y DIGIERE HEMOGLOBINA HUMANA.

Los eritrocitos son también células blanco de los trofozoítos de *E. histolytica*. Para determinar si EhCP112 se une a esta célula blanco, se realizaron ensayos de ligando con la proteína purificada. Para ello, los eritrocitos fueron incubados con la proteína recombinante

purificada rEhCP112 o con rEhRabB (Rodríguez y col., 2000), como control negativo. Entonces, las células fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos anti- EhCPADH o con anti-EhRabB y la unión de las proteínas recombinantes a eritrocitos fue revelada con anticuerpos secundarios fluoresceinados. Como control positivo, estos ensayos se realizaron incubando los eritrocitos con proteínas totales de *E. histolytica* y revelando con el anticuerpo monoclonal anti-EhCPADH. La figura 21 C muestra que el complejo EhCPADH se une a la superficie de los eritrocitos como se había reportado previamente (Rodríguez y col., 1989). La fluorescencia también fue detectada alrededor de los eritrocitos que fueron incubados con la rEhCP112 seguido por el mAb antiEhCPADH (Fig. 21B). Ninguna señal fue observada cuando la proteína rEhCP112 fue omitida (Fig. 21D), o cuando los eritrocitos fueron incubados con la proteína recombinante EhRabB y anticuerpos anti-EhRabB (Fig. 21A). Estos resultados sugieren que EhCP112 puede unirse a la superficie de las células blanco, probablemente por el motivo RGD, y que por lo tanto también EhCP112 puede participar en la destrucción de la célula blanco. Además, se observó que EhCP112 es capaz de digerir hemoglobina cuando se encuentra en geles de sustrato (Fig. 21E).

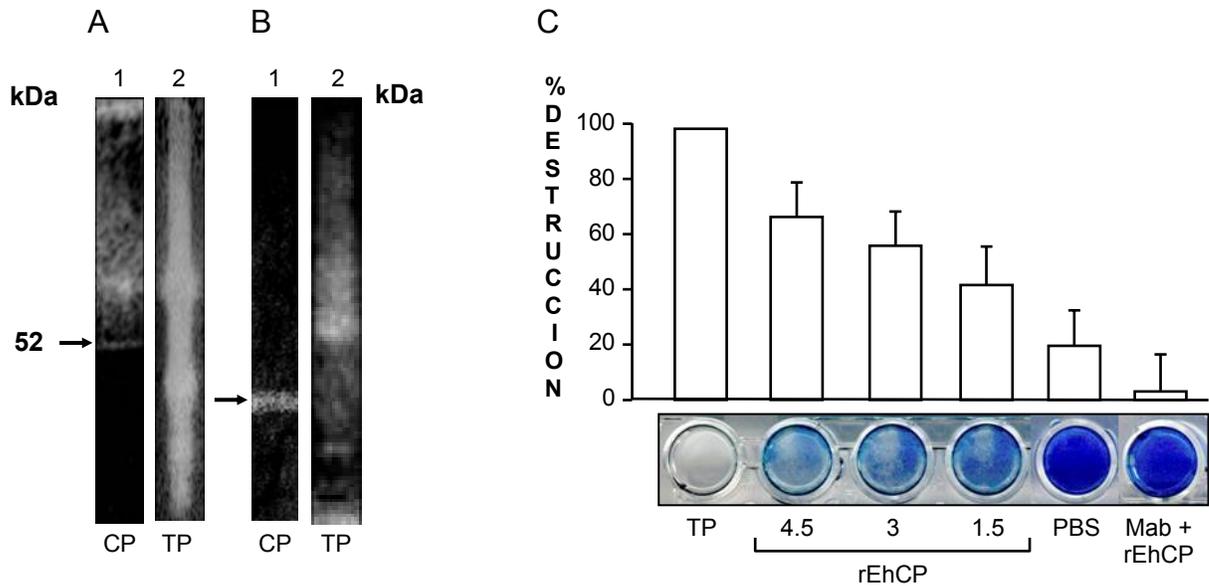


Fig. 20. rEhCP112 tiene actividad en colágeno tipo I, fibronectina y monocapas de células MDCK. A. Geles de poliacrilamida copolimerizada con colágeno. B. Geles de poliacrilamida copolimerizada con fibronectina. Carril 1, rEhCP112 purificada; Carril 2, Extractos totales de trofozoíto. Las flechas indican la proteína recombinante EhCP112 de 52 kDa. C. Destrucción de monocapas de células MDCK usando: TP, extractos de 1×10^6 trofozoítos; 4.5, 3 y 1.5 μg de la rEhCP112; PBS, monocapas incubadas con PBS; mAb+rEhCP112, 4.5 μg de la enzima más 1 μg del mAb anti-EhCPADH.

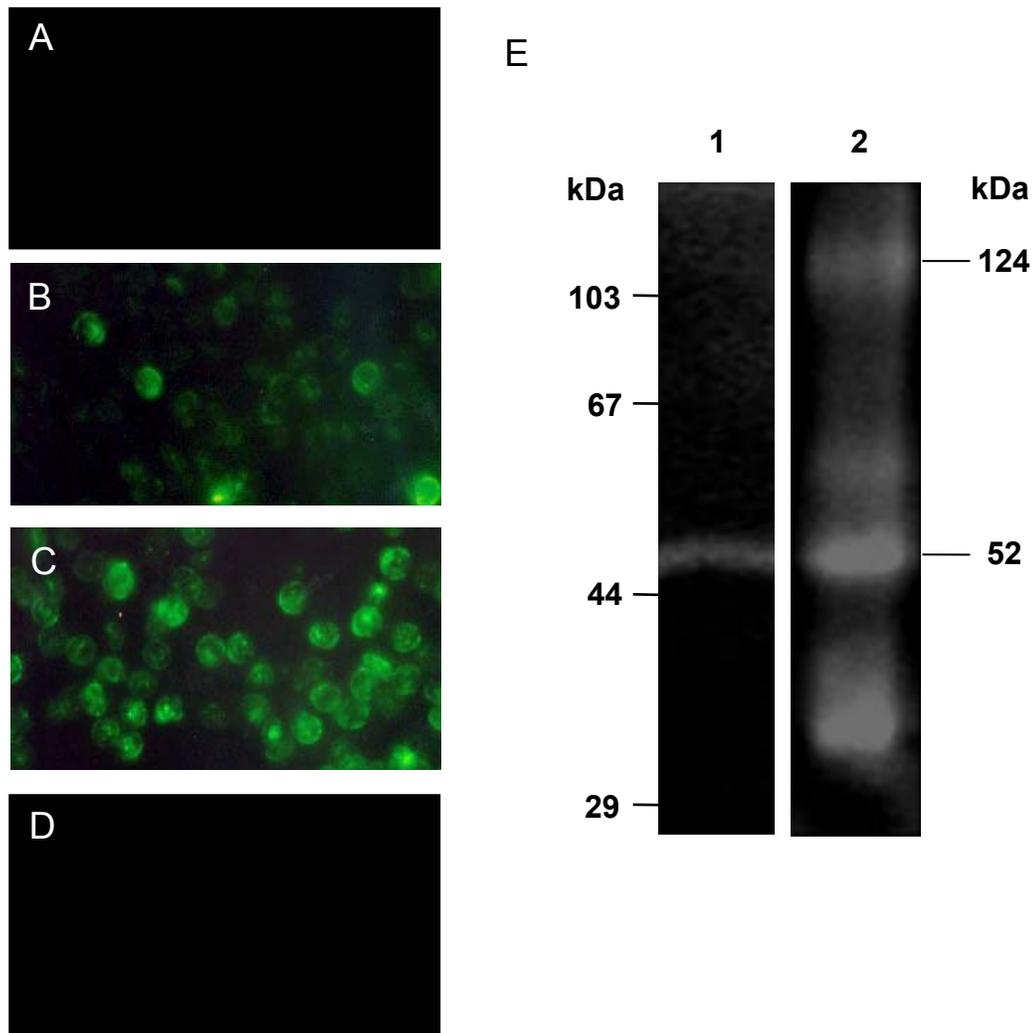


Fig. 21. rEhCP112 se adhiere a eritrocitos y digiere hemoglobina.

(A – D) inmunofluorescencia de eritrocitos cubiertos con: A. rEhRabB y revelado con anti-EhRabB como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo un anti-conejo fluoresceinado. B. rEhCP112 revelada con mAb Anti-EhCPADH y como segundo anticuerpo un anti-ratón fluoresceinado. C. Como control positivo, se incubaron los eritrocitos con proteínas totales de *E. histolytica* y se revelaron con el anticuerpo monoclonal anti-EhCPADH y como segundo anticuerpo un anti-ratón fluoresceinado. D. BSA revelada con mAb Anti-EhCPADH y como segundo anticuerpo un anti-ratón fluoresceinado. E. Gel de poliacrilamida copolimerizada con hemoglobina. Carril 1, rEhCP112; Carril 2, Proteínas totales de *E. histolytica*. La flecha indica a la proteína recombinante EhCP112.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que las cisteína proteasas juegan un papel importante en la virulencia de parásitos protozoarios, tales como *T. vaginalis* (Alvarez-Sanchez y col., 2000), *L. major* (Joshi y col., 2002), *T. cruzi* (Tomas y col., 1997) o *P. vivax* (Rosenthal y col., 1994) lo que hace de estas moléculas una promesa como blancos quimioterapéuticos o bien como vacunas (McKerrow, 1999).

Estudios encaminados hacia el conocimiento de las bases moleculares del mecanismo agresor de *E. histolytica* también sugieren la participación de las cisteína proteasas en la formación de las lesiones tisulares asociadas a la amibiasis invasiva (Ravdin y col, 1980; McLaughlin y Aley, 1985). La actividad de dichas enzimas citolíticas correlaciona con la virulencia amibiana (Ravdin y col, 1980; Muñoz y col, 1984), sugiriendo que hay una interacción necesaria entre el parásito y la célula blanco que dispara la síntesis y secreción de sustancias líticas del interior de la amiba (Martínez-Palomo, 1982; McLaughlin y Aley, 1985). Las cisteína proteasas de *E. histolytica* en geles de sustrato, varían en peso desde 17 hasta 195 kDa (Luaces y Barret, 1988; Scholze y Schulte, 1988; Avila y Calderon 1993; Spice y Ackers, 1993).

Por otra parte, se sabe que *E. histolytica* es una célula con 30 diferentes CPs (Loftus, 2005), aunque la mayoría de estas aún no han sido estudiadas. Reportes previos sugirieron que la mayoría de los genes de CPs de *E. histolytica*, incluyendo a *Ehcp112*, no son expresados durante su cultivo *in vitro* (Bruchhaus y col., 2003). Sin embargo, ensayos de Northern blot y RT-PCR efectuados por nosotros y por otros autores, mostraron que el gen *Ehcp112* es expresado por los trofozoítos en cultivo (Carpeniseanu y col., 2000; García-Rivera y col., 1999). Es claro que diferentes condiciones de cultivo o bien trofozoítos con diferente patogenicidad pueden determinar estos resultados. Por lo tanto es necesario la caracterización

de cada una de estas enzimas para poder determinar su papel biológico en los trofozoítos amibianos.

Una proteína originalmente descrita con un peso molecular de 112 kDa que es reconocida por sueros de pacientes con absceso hepático amibiano, fue una de las primeras moléculas identificadas en este parásito con una función celular de adhesina (Arroyo y Orozco, 1987). Además, esta proteína en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina mostró actividad de proteinasa (Rigothier y col, 1992), sugiriendo la participación de ésta proteína tanto en la adhesión como en la invasión de los tejidos del huésped. Recientemente, se reportó que esta molécula es un complejo formado por dos polipéptidos, uno con homología a cisteína proteasas y otro con actividad de adhesina (García-Rivera y col., 1999), por lo que ahora se le ha llamado el complejo EhCPADH, que de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas tiene un peso molecular de 124.6 kDa.

En este trabajo se dieron más evidencias de que EhCP112 forma un complejo con una proteína con actividad de adhesina dando lugar al complejo EhCPADH de *E. histolytica*. La purificación de la proteína recombinante EhCP112 se realizó con una columna de afinidad de Ni²⁺, una vez pura, sirvió para inmunizar conejos y obtener los anticuerpos policlonales AbEhCP112, que mostraron un título de 1:1000 en ensayos de ELISA. Los anticuerpos policlonales AbEhCP112 sirvieron para hacer la localización subcelular en trofozoítos de *E. histolytica* de EhCP112, mediante el uso de microscopía confocal, el resultado mostró que la proteína se localiza uniformemente en la membrana plasmática así como también en algunas vacuolas, mismo patrón encontrado al utilizar un anticuerpo monoclonal contra la adhesina de 112 kDa (García-Rivera y col, 1999). Además, al utilizar anticuerpos policlonales AbADH112 dirigidos contra el dominio de adhesión de la adhesina de 112 kDa se pudo observar una colocalización de las proteínas EhCP112 y EhADH112 en la membrana de los trofozoítos

amibianos, demostrando así que la adhesina de 112 kDa es un complejo formado por las dos proteínas mencionadas anteriormente. Esto fue apoyado por el reconocimiento de la proteína recombinante mediante ensayos de “Western blot” utilizando el anticuerpo monoclonal 5 (Mab5) que esta dirigido específicamente contra el complejo EhCPADH de *E. histolytica*.

Otros experimentos que apoyan la hipótesis de que el complejo EhCPADH esta formado por EhCP112 y EhADH112 son los siguientes: 1) Los anticuerpos policlonales y monoclonales anti-EhCPADH reconocen a los polipéptidos recombinantes de EhCP112 y EhADH112 (Martínez-López y col., 2004) y la proteína de 124 kDa en extractos totales de *E. histolytica* (Fig. 13). 2) Anticuerpos policlonales generados contra un fragmento de la proteína recombinante EhADH112, o contra la proteína recombinante EhCP112, reaccionaron con una sola banda de 124 kDa en las proteínas de *E. histolytica* (Martínez-López y col., 2004; Madriz y col., 2004).

En otros organismos como en las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, que producen la enfermedad inflamatoria de los tejidos que sostienen los dientes se ha encontrado un complejo de proteasas y adhesinas el cual es el principal factor de virulencia (Pike y col., 1996). Este complejo se encuentra asociado a la célula y consta de dos proteasas (específicas de lisina y arginina) y varias adhesinas. Estas proteínas son codificadas por dos genes (*prtR* y *prtK*) y cada uno de estos genes presenta en su organización estructural; un péptido señal, seguido por una cisteína proteasa y varias adhesinas (Pike y col., 1996; Bhogal y col., 1997). La asociación de proteínas de superficie como adhesinas y proteasas también ha sido reportada en *Staphilococcus saprophiticus* (Hell y col., 1998). En *T. vaginalis* también se ha sugerido y demostrado la participación de cisteína proteasas en la adhesión a la célula blanco (Arroyo y Alderete, 1989; Mendoza-López y col., 2000). Así, la asociación adhesina-proteasa puede ser importante en la invasión de los tejidos del huésped, ya que ambas moléculas pueden ser

necesarias para que los parásitos se adhieran a la matriz extracelular e inicien la invasión de los tejidos mediante la digestión de la matriz extracelular.

En el caso del complejo EhCPADH se sabía que el péptido de 78 kDa (EhADH112) tiene actividad de adhesina, mientras que el péptido de 49 kDa contiene secuencias típicas de cisteína proteasa (Rigothier y col., 1992). Sin embargo, había que demostrar en forma experimental que este péptido en realidad tiene actividad de proteasa.

El principal obstáculo en el estudio de las CPs es la dificultad para obtener grandes cantidades de enzima nativa.

En la tesis de maestría (Ocádiz, 1998) reportamos la expresión del gen *Ehcp112* en la bacteria *E. coli*. Para esto, el gen fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos en sentido y en antisentido que contenían sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI respectivamente, lo que permitió la clonación direccional del fragmento en el vector pRSETA lo que permitió regular la expresión de la proteína recombinante y la purificación de ésta con relativa sencillez. La proteína recombinante fue exitosamente expresada aunque no mostró actividad en los geles de sustrato (Ocádiz, 1998; García-Rivera, 1999).

La secuencia expresada pertenece a un precursor de la enzima, que al ser producido en un procarionte, no sufrió su procesamiento postraduccional, lo cual impidió ver la actividad de cisteína proteasa, ya que de alguna manera el sitio activo estaba obstruido. En este trabajo, extractos bacterianos que expresan a EhCP112 fueron tratados con pepsina para separar el propéptido y así obtener la actividad de proteasa de la enzima madura, mostrando en geles de sustrato una actividad de gelatinasa que corresponde a una proteína de 30 kDa. Este tratamiento con endoproteasas en algunos sistemas *in vitro* se ha utilizado con éxito, ya que es necesario un corte que separe el propéptido de la secuencia de la enzima madura, permitiendo así la liberación de la actividad proteolítica (Kuhelj y col., 1995). En algunos otros casos la

separación del propéptido se da por simple autoproteólisis, cuando la proenzima se purifica en ambientes extremos de pH (Mach y col., 1994). En el caso de la preproenzima de EhCP112 (construcción I) esto no funcionó, ya que cuando se sometió a pHs extremos no se observó actividad proteolítica. Sin embargo, dado que la presencia de la pepsina para activar la enzima dificultaba la caracterización de la actividad proteolítica de EhCP112, ya que se tiene que discriminar entre la actividad de esta enzima y la de la pepsina, se decidió realizar nuevas construcciones que pudieran tener actividad sin la presencia de otra proteasa.

Debido a que la bacteria no posee la mayoría de los mecanismos de procesamiento postraduccional de las células eucariotas, exploramos la expresión de diferentes fragmentos de la EhCP112, los cuales incluyeron al gen completo con; i) péptido señal, propéptido y enzima madura; ii) propéptido y enzima madura e iii) enzima madura.

En las construcciones realizadas en el presente trabajo, la pro-enzima fue expresada (rEhCP112), pero no la enzima madura, sugiriendo que ésta última es muy tóxica para las bacterias y que el propéptido es necesario para el control de la actividad enzimática. Además el propéptido es necesario para el correcto plegamiento de la enzima madura (Coulombe y col., 1996), fue por esta misma razón que las enzimas maduras, EhCP2 y EhCP3, expresadas en un sistema de baculovirus, fueron inactivas, mientras que las pre-pro-enzimas fueron activas (Que, 2002). Además rEhCP112 fue activa en geles de sustrato, sugiriendo que pudo poseer actividad autocatalítica para producir la enzima madura.

La actividad de proteasa de rEhCP112 en geles de sustrato fue observada en una banda de 52 kDa, que fue el peso molecular esperado para el polipéptido conteniendo al propéptido y a la enzima madura. Estos resultados son interesantes, debido a que las CPs son procesadas por rompimiento del prodominio, antes de llegar a ser activas. Sin embargo, es generalmente aceptado que en el análisis efectuado con geles de sustrato las proteínas no migran de

acuerdo a su peso molecular, y que probablemente la actividad mostrada en nuestros experimentos fue debido a la enzima procesada con una migración anómala. La proteína rEhCP112 fue expresada en su forma activa y fue capaz de digerir diferentes sustratos, sugiriendo que la proenzima fue procesada por proteasas bacterianas o bien por autocatálisis dentro de la bacteria o después de su aislamiento, produciendo a la proteína madura. La proteína rEhCP112 fue extremadamente lábil y fue degradada en menos de 24 h a 4 °C (Ocádiz y col., 2005). Cuatro horas después de la purificación los anticuerpos policlonales revelaron los diferentes productos de degradación de la enzima, y los anticuerpos anti-etiqueta detectaron dos bandas, la superior fue desapareciendo con el tiempo, solamente la banda de 52 kDa fue activa, ya que fue la banda clara que apareció en los geles de sustrato (Ocádiz y col., 2005). En contraste, se ha demostrado que la enzima nativa es secretada en vesículas como complejo EhCPADH y que EhCP112 conserva su actividad por largo tiempo dentro de las vesículas secretadas (Ocádiz y col., 2005).

Recientemente, se sugirió que *E. histolytica* tiene CPs con propiedades bioquímicas redundantes, debido a que varias CPs con diferente localización en ausencia de células blanco son translocadas a vacuolas fagocíticas durante la ingestión de las células (Que y col., 2002). Esto implica que la principal función de las CPs es la adquisición de nutrientes. Sin embargo, EhCP2, EhCP5 y EhCP112 están localizadas en la superficie de los trofozoítos (Que y col., 2002; Jacobs y col., 1998; García-Rivera y col., 1999) y esta última también es secretada (Ocádiz y col., 2005). Además, EhCP1 y EhCP5 están ausentes en la amiba no patógena *E. dispar* (Bruchhaus y col., 1996) y EhCP112 no fue detectada en una cepa avirulenta obtenida de un portador asintomático (Vargas y col., 1990) y es pobremente expresada en la clona L-6, una mutante deficiente en fagocitosis, en efecto citopático y en virulencia (Guzmán-Medrano y col., 2005). Estos resultados sugieren que ciertas CPs pueden estar involucradas en la invasión

a tejidos. Sin embargo, el papel de estas proteasas en la virulencia de *E. histolytica* necesita ser probado en modelos animales usando trofozoítos, en los cuales estas moléculas esten ausentes. Estos experimentos no han sido efectuados debido a la carencia de la tecnología de *knock out* en genes de *Entamoeba*, aunado a la carencia de modelos animales apropiados que pudieran reproducir el ciclo de la infección completa de esta parásito. Sin embargo, dado que rEhCP112 se une específicamente a eritrocitos humanos, y que destruye monocapas de células epiteliales, se sugiere que está involucrada en la adherencia y/o en la citopatogenicidad, como se ha sugerido para otras CPs de parásitos que se unen a la célula blanco (Alvarez-Sanchez y col., 2000; Mendoza-López y col., 2000).

Finalmente, proponemos que EhCP112 puede estar involucrada en la virulencia de *E. histolytica* debido a: i) EhCP112 forma parte del complejo de virulencia EHCPADH. ii) Se une y destruye colágeno, fibronectina y monocapas de células MDCK . Sin embargo, la degradación de estas proteínas es una característica de muchas proteasas y puede que lo hagan o no *in vivo*. iii) EhCP112 se une a eritrocitos y degrada hemoglobina. iv) Es pobremente expresada en una mutante deficiente en virulencia (L-6). v) Es secretada en forma activa por trofozoítos vivos (Ocádiz y col., 2005). vi) Contiene el dominio RGD que podría ser funcional y vii) Es activa en amplios rangos de pH y temperatura.

CONCLUSIONES.

Con los datos obtenidos hasta el momento podemos concluir que:

- EhCP112 es parte del complejo EhCPADH de *E. histolytica*.
- EhCP112 se localiza en la membrana celular y en vesículas cercanas.
- Las proteínas recombinantes que contienen a la preproenzima y a la proenzima tienen actividad de proteasa, pero la preproenzima necesita de otra proteasa para su procesamiento.
- EhCP112 es activa en un amplio rango de pH con un óptimo de 5.
- EhCP112 es activa en rango amplio de temperatura con un óptimo de 37 °C.
- EhCP112 degrada gelatina, colagena I, fibronectina y hemoglobina.
- EhCP112 se adhiere y destruye a la célula blanco.
- EhCP112 es una cisteína proteasa que probablemente participa activamente en la patogenicidad de *E. histolytica*.

PERSPECTIVAS.

- Aislar a la proteína EhCP112 nativa, para conocer el sitio exacto de separación entre el propéptido y la enzima madura, y además conocer su actividad proteolítica natural.

- Realizar transfecciones con RNA en antisentido o RNA interferente de EhCP112 y caracterizar a los organismos transfectados.

- Incorporar la tecnología *knockout* al estudio de *E. histolytica*, y aplicarla al estudio de las CPs amibianas.

- Determinar la función específica de EhCP112, así como la de cada una de las CPs de *E. histolytica*.

- Determinar el potencial inmunogénico y de protección de cada una de las CPs, para su posible aplicación en el desarrollo de vacunas.

- Utilizar programas computacionales, ya desarrollados, para determinar las diferencias y similitudes entre las diferentes CPs, esto con miras al desarrollo de un inhibidor que sea utilizado para unirse a la mayoría de las CPs de *E. histolytica*, inhibiéndose el crecimiento y desarrollo en el hospedero, y a su vez siendo inocuo para el humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña-Soto, Maguirre, IH. and Wirth, D.F. (2000). Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *Am. J Gastroenterol.* **95**(5): 1277-1283.
- Abou-El-Magd, I., C.G. Soon, A.M. El-Hawey, and J.I. Ravdin. (1966). Humoral and mucosal, IgA antibody response to a recombinant 52 kDa cysteine-rich portion of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin correlates with detection of native 170 kDa lectin antigen in serum of patients with amebic colitis. *J. Infect. Dis.* **174**: 157–162.
- Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. and Downing, S. (1980). Concepts of functions of peripheral non-chromatin and endosome in *Entamoeba histolytica*. *Arch. de Invest. Méd.* (Méx). **11** Suppl. 1: 63-74.
- Albach, R.A. (1989). Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.* **36**: 197-205.
- Aldape, K., Huizinga, H., Bouvier, J., and McKerrow, J. (1994). *Naegleria fowleri*: Characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol.* **78**(2): 230-41.
- Alderete, IF. and Garza, G.E. (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect. Immun.* **56**: 28-33.
- Aley, S.B., Scott, W.A. and Cohn, Z.A. (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **152**(2): 391-404.
- Alvarez-Sánchez, M.E., Avila-González, L, Becerril-García, C., Fattel-Facenda, LV., Ortega-López, J. and Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb. Pathogen.* **28**: 193-202.
- Alves, LC, Judice, WA, St Hilaire, PM, Meldal, M, Sanderson, SJ, Mottram, JC, Coombs, GH, Juliano, L, and Juliano, MA. (2001). Substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* **116**(1):1-9.
- Andrews, BJ, Mentzoni, L and Bjorvant, B (1990). Zimodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Trop. Med.Hyg.* **84**: 63-65.
- Ankri, S., Stolarsky, T., and Mirelman, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinase in *Entamoeba histolytica* does not affect cytopathic or hemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol. Microbiol.* **28**: 777-785.
- Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L, and Mirelman, D. (1999a). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GaINAc lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbio.* **33**: 327-337.
- Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R, Padilla-Vaca, F., and Mirelman, D. (1999b). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinase affects *Entamoeba histolytica*-induced

formation of liver abscess in hamsters. *Infect. Immun.* **67**: 421-422.

Arroyo, R and Orozco, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molec. Biochem. Parasitol.* **23**: 151-158.

Arroyo, R. and Alderete, J.F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase. Activity is necessary for parasite adherence to epithelial cell. *Infect. Immun* **57**: 2991-2997.

Arroyo, R. and Alderete, J.F. (1995). Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.* **26**: 279-285.

Aslund, L, Henriksson, J, Campetella, O, Frasch, AC, Pettersson, U, and Cazzulo, JJ. (1991). The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **45**(2):345-7.

Aust-Kettis, A., and Sundquist, K.G. (1980). Dynamics of the interactions between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. 11. On the distinction of surface-bound and internalized anti-amoeba antibodies. *Scand. J Immun.* **12**: 443-451.

Avila, E.E. and Calderón, J. (1993). *Entamoeba histolytica* trophozoites: A surface associated cysteine protease. *Exp. Parasitol.* **76**: 232-241.

Ayala, B.P. (1989). Aislamiento de genes de *Entamoeba histolytica* que participan en su antigenicidad o virulencia. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Molecular). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.

Baca, V. (1991). Expresión fenotípica de la resistencia a la lisis por complemento en varias generaciones clonales de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Molecular). Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F.

Báez-Camargo, M., Riverón, A.M., Delgadillo, M.D., Flores, E., Sánchez, T. and Orozco, E.(1996). *Entamoeba histolytica*: gene linkage groups and relevant features of his karyotype. *Mol Gen Genet.* **253**: 289-296.

Bahr, V, Stierhof, YD, Ilg, T, Demar, M, Quinten, M, and Overath, P. (1993). Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* **58**(1):107-21.

Bailey, G.B, Shen, P. S., Beanan, M.J. and McCoomer, N. E. (1992). Actin associated proteins of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* **23**: 129-132.

- Banerjee, R, Liu, J, Beatty, W, Pelosof, L, Klemba, M, and Goldberg, DE. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(2):990-5.
- Barale, JC, Blisnick, T, Fujioka, H, Alzari, PM, Aikawa, M, Braun-Breton, C, Langsley, G. (1999). *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(11):6445-50.
- Barret, AJ. (1986). An introduction to the proteinases. In proteinases inhibitors. AJ. Barretand and G. Salvesen (eds.). *Elsevier*. Pp. 3.22.
- Barret, A.J. (1998). Cysteine peptidase. In A. J. Barret, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner (ed.), Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Barret, A.J., and H. Kirchke. (1981). Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Meth Enzymol*. **80**: 535-561.
- Barret, AJ., Rawlings, N.D. and Woessner J.F. (2000). "Handbook of proteolytic enzymes" Academic Press.
- Barret, A.J. and Rawlings, N.D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem*. **382**: 727-733.
- Bart G, Coombs GH, Mottram JC. (1995). Isolation of Imcpc, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol*. **73**(1-2):271-4.
- Bart, G, Frame, MJ, Carter, R, Coombs, GH, and Mottram, JC. (1997). Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. **88**(1-2):53-61.
- Bernard, F, and Schrevel, J. (1987). Purification of a *Plasmodium berghei* neutral endopeptidase and its localization in merozoite. *Mol Biochem Parasitol*. **26**(1-2):167-73.
- Bernstein, NK, Cherney, MM, Loetscher, H, Ridley, RG, and James, MN. (1999). Crystal structure of the novel aspartic proteinase zymogen proplasmepsin II from *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct Biol*. **6**(1):32-7.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, LS. and Soldo, A.T. (1989). Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J. Protozool*. **36**: 455-458.
- Bhattacharya, A., Anand, M.T., Paul, J., Yadav, N. and Bhattacharya, S. (1998). Molecular Changes in *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. *J. Euk. Microbiol*. **45**: 285-335.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., and Bhattacharya, S. (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *Intest. J. for Parasitol*. **30**: 401-410.

- Bhogal, S.P., Sialeski, N. and Reynolds, C.E. (1997). A cell associated protein complex of *Porphyromonas gingivalis* W50 composed of Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. *Microbiol.* **143**: 2485-2495.
- Blackman, M.J., Fujioka, H., Stafford, W.H., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S.L., Aikawa, M., Grainger, M., and Hackett, F. (1998). A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Biol Chem.* **273**(36): 23398-409.
- Boinfeld, M.C. (1998). Prohormone and proneuropeptide processing. Recent progress and future challenges. *Endocrine.* **8**: 1-5.
- Bond, J.S. and Butler, P.E. (1987). Intracellular protease. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 333-364.
- Bond, J.S. and Beynon, R.J. (1985). Mammalian Metalloendopeptidases. *Int. J. Biochem.* **17**: 565-574.
- Bontempi, E., and Cazzulo J.J. (1990). Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:337-342.
- Bos, H.J. and van den Eijk, A.A. (1980). Serum-inhibited toxicity of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Mex).* **11**(1 Suppl): 135-141.
- Bouvier, J, Schneider, P, Etges, R, and Bordier, C. (1990). Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry.* **29**(43):10113-9.
- Bracha, R., Kobilier, D. and Mirelman, D. (1982). Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **36**: 396-406.
- Bracha, R. and D. Mirelman. (1984). *Entamoeba histolytica* trophozoites: Effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. *J. Exp. Med.* **160**: 353-368.
- Breton, CB, Blisnick, T, Jouin, H, Barale, JC, Rabilloud, T, Langsley, G, and Pereira da Silva, LH. (1992). *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**(20): 9647-51.
- Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. (1999). Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun.* **67**(9):4477-84.
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* **155**(6):3102-11.
- Brooks, D.R., Tetley, L., Coombs, G.H., and Mottram., J.C. (2000). Processing and trafficking

of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. *J Cell Sci.* **113**(2):4035-41.

Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C. and Tannich, E. (1993). Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* DNA. *Cell Biol.* **12**: 925933.

Bruchhaus, I. and Tannich, E. (1996). A gene highly homologous to ACPI encoding cysteine proteinase 3 in *Entamoeba histolytica* is present and expressed in *Entamoeba dispar*. *Parasitol. Res.* **82**: 189-192.

Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., and Tannich, E. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* **22**: 255-263.

Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N. and Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryot cell.* **2**: 501-509.

Burch, D. 1. Li, B., Reed, S. Jackson, T.S. and Stanley, S.L: (1991). Isolation of an strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA done. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 696-701.

Burleigh, BA, Caler, EV, Webster, P, and Andrews, NW. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol.* **136**(3):609-20.

Button, LL, Russell, DG, Klein, HL, Medina-Acosta, E, Karess, RE, and McMaster, WR. (1989). Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. *Mol Biochem Parasitol.* **32**(2-3):271-83.

Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, 1., Gutierrez, G. and Ortiz-Ortiz, L. (1994). Seroepidemiology of Amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 412-419.

Caffrey, C.R., Mathieu, M.A., Gaffney, A.M., Salter, J.P., Sajid, M., Lucas, K.D., Franklin, C., Bogyo, M., and McKerrow, J.H. (2000). Identification of a cDNA encoding an active asparaginyl endopeptidase of *Schistosoma mansoni* and its expression in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **466**(2-3): 244-8.

Calderón, J., Muñoz, M. L. and Acosta, H. M. (1980). Surface redistribution and release of antibody induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.* **151**: 184-193.

Calderón, J. and Tovar-Gallegos (1986). Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica*. *Immunol.* **58**: 467-71.

- Caler, EV, Morty, RE, Burleigh, BA, and Andrews, NW. (2000). Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **68**(12):6602-10.
- Caler, E.V., Vaena de Avalos, S., Haynes, P.A., Andrews, N.W., and Burleigh, B.A. (1998). Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* **17**(17): 4975-86.
- Cambra, O., and Berrens, L. (1996). Monoclonal antibodies against Dermatophagoides group I allergens as pseudo-cystatins blocking the catalytic site of cysteine proteinasas. *Immunol Lett.* **50**(3): 173-7.
- Campetella, O, Henriksson, J, Aslund, L, Frasch, AC, Pettersson, U, and Cazzulo, JJ. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol.* **50**(2):225-34.
- Carruthers, VB, and Sibley, LD. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* **73**(2):114-23.
- Cerbón, J. and Flores, J. (1981). Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas. *Comp. Biochem. Physiol.* **69B**: 487-492.
- Chan, V.J., Selzer, P.M., McKerrow, J.H. and Sakanari, J.A. (1999). Expression and alteration of the S2 subsite of the *Leishmania major* cathepsin B-like cysteine protease. *Biochem J.* **340**: 113-7.
- Chapman-Andersen, M. (1977). Endocytosis in freshwater amebas. *Physiol. Rev.* **57**: 371-385.
- Chung, Y.B., Kong, Y., Joo, I.J., Cho, S.Y., and Kang, S.Y. (1995). Excystation of *Paragonimus westermani* metacercariae by endogenous cysteine protease. *J Parasitol.* **81**(2): 137-42.
- Cieslak, P.R., Virgin, H.W. and Stanley S.L. (1992). A severe combined immunodeficient (SCID) mouse model for infection with *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **176**: 1605-1609.
- Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruíz-Palacios, G., Bennett, S. and Peassey, A. (1994). Ambiente epidemiológico del uso de aguas negras en agricultura: Valle del Mezquital, México. *Salud Pública (Méx.)* **36**: 3-9.
- Clark, C.G. and Roger, AJ. (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **92**: 6518-6521.

- Conde-Bonfil Ma. Del C. y de la Mora-Zerpa (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública Méx.* **34**: 335-341.
- Cook, G.C. (1990). Parasitic disease in clinical practice. The Bloomsbury series in clinical science. Springer- Verlag. Lond on. G.B. pp 103-112.
- Coombs, GH, Goldberg, DE, Klemba, M, Berry, C, Ka,y J, and Mottram, JC. (2001). Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol.* **17**(11):532-537.
- Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Menard, R. Mort, J.S. and Cyger M. (1996). Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* **15**: 5492-5503.
- Dalton, J.P., Hola-Jamriska, L., and Bridley, P.J. (1995). Asparaginyl endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* **111**(5): 575-80.
- Dalton, J. Mcgonicle, S., Rolph, T.P., and Andrews, S.J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinasas and with hemoglobin. *Infect Immun.* **64**:5066-74.
- De la Garza, M., Gallegos, B. and Meza, I. (1989). Characterization of a cytochalasin D-resistant mutant of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.* **36**: 556-560.
- De Meester, F., Shaw, E. Scholze, H. Stolarsky, T. and Mirelman, D. (1990). Specific labeling of cysteine proteinasas in pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **58**: 1396-1401.
- Del Nery, E, Juliano, MA, Lima, AP, Scharfstein, J, and Juliano, L. (1997). Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **272**(41):25713-8.
- Diamond, LS., Harlow, D.R. and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Roy. Soc Trop. Med. Hyg.* **72**: 431-432.
- Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Alling, D.W. and Hallanan, C.W. (1995). Elucidation of the DNA synthetic cycle of *Entamoeba* spp. Using flow cytometry and mathematical modeling. *J Eukaryot. Microbiol.* **42**: 610-616.
- Dwek, R.A. (1998). Biological importance of glycosylation. *Dev. Biol. Stand.* **96**: 43-47.
- Eakin, A.E., Mills, A.A., Harth, G., McKerrow, J.H., and Craik, C.S. (1992). The sequence, organization, and expression of the major cysteine proteinase (cruzain) from

Trypanosoma cruzi. *J. Biol. Chem.* **267**: 7411-7420.

Eakin, A.E., Mc Grath, M.E., McKerrow, J.H., Fletterick, R.J. and Craik, C.S. (1993). Production of crystallizable cruzain, the mayor cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol. Chem.* **268**: 6115-6118.

Eggleston, KK, Duffin, KL, and Goldberg, DE. (1999). Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* **274**(45):32411-7.

Engel, J.C., Doyle, P.S., Palmer J., Hsieh, I., Bainton, D.F. and McKerrow, IH. (1998). Cysteine proteases inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **188**:725-734.

Espinosa-Cantellano, M. and Martínez-Palomo, A. (1991). The plasma membrane of *Entamoeba histolytica*: structure and dynamics. *Biol. Cell.* **72**: 189-200.

Forney, J.R., Yang, S., and Healey, M.C. (1996). Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocyst. *J. Parasitol.* **82**: 889-892.

Frame, MJ, Mottram, JC, and Coombs, GH. (2000). Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology.* **121** (Pt 4):367-77.

Francis, SE, Gluzman, IY, Oksman, A, Banerjee, D, and Goldberg, DE. (1996). Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol.* **83**(2):189-200.

Francis, SE, Gluzman, IY, Oksman, A, Knickerbocker, A, Mueller, R, Bryant, ML, Sherman, DR, Russell, DG, and Goldberg, DE. (1994). Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *EMBO J.* **13**(2):306-17.

Franke de Cazzulo, B.M., Martínez, J., North, M., Coombs, G.H., and Cazzulo J.J. (1994). Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**: 81-86.

García, J. (1994). Caracterización inmunobioquímica de un antígeno de superficie de *Entamoeba histolytica* que participa en el contacto con la célula blanco. Tesis de Licenciatura (Biología). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D. F.

García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y Guameros, G. (1982). Aislamiento de clonas de *E. histolytica* deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. *Arch. Inv. Méd. (Méx.)* **13** (Supl. 3): 129-136.

- García-Rivera, G. (1987). Papel de la adhesión, de la fagocitosis y de la interacción con bacterias en la virulencia de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D. F.
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocádiz, R., Martínez-López M. C., Arroyo, R., González-Robles, A. and Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* **33**: 556-568.
- Garfinkel, L. Giladi, M., Huber, M., Gigler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblett, S. (1989). DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and non- pathogenic zymodemes. *Infect. Immun.* **57**: 926.
- Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H. (1977). Reagents. Cap IV In: Methods in Immunology. Benjamin (Ed) Inc. Reading. Massachusetts 3rd edition.
- Genco, R.J., Plaut, A.G., and Moellering, R.C. (1975). Evaluation of human oral organisms and pathogenic *Streptococcus* for production of IgA protease. *J. Infect. Dis.* **131**(1):s17-s21.
- Ghosh, S.K., Field, I, Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. and Samuelson, I. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica*: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Infect. Immun.* **67** (6): 3073-3081.
- Gluzman, I.Y., Francis, S.E., Oksman, A., Smith, C.E., Duffin, K.L., and Goldberg, D.E. (1994). Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest.* **93**(4):1602-8.
- Gómez, M.A., Martins, M.S., Costa, A.O. and Silva E.F. (1995). Influence of bacteria upon cytopathic effect and erythrophagocytosis of different axenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Pauta.* **37** (3): 197-200.
- Gómez. M.C., Pérez, D.G., López-Bayghen, Gariglio, P. and Orozco, E. (1997). Characterization of the 5 'flanking region of the *Ehpgpl* gene of multidrug resistance in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **28**: 562-563.
- Gómez-Conde, E., Hemández,-Jauregui, P. and Argüello-López, C. (1997). A morphodynamic study of the structural organization of *Entamoeba histolytica* chromatin during nuclear division. *Arch. Med. Res.* **28**: 5124-5126.
- Griffiths, G., Hoflack, B., Simmons, K., Mellman, I., and Kornfeld, S. (1988). The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell.* **52**: 329-341.

- Grundy, M.S., Cartwright-Taylor, L., and Lundin, L. (1983). Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum in Kenya. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 753-758
- Guillen N. (1996). Role of signaling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends in Microbiol.* **4**: 191-197.
- Hackett, F, Sajid, M, Withers-Martinez, C, Grainger, M, and Blackman, MJ. (1999). PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* **103**(2):183-95.
- Hamelmann, C., Foerster, B., Burchard, G.D., and Horstmann, R.D. (1992). Lysis of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by human complement: methodological analysis. *Parasite immunol.* **14**: 23-35.
- Haque, TS, Skillman, AG, Lee, CE, Habashita, H, Gluzman, IY, Ewing, TJ, Goldberg, DE, Kuntz, ID, and Ellmanm, JA. (1999). Potent, low-molecular-weight non-peptide inhibitors of malarial aspartyl protease plasmepsin II. *J Med Chem.* **42**(8):1428-40.
- Harris, J.L., Backes, B.J., Leonetti, F., Mahrus, S., Ellman, J.A., and Craik, C.S. (2000). Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**(14): 7754-9.
- Hart, G., Andrews, N., Mills, A.A., Engel, J.C., Smith, R., and McKerrow J.H. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 17-24.
- Hell, W., Meyer,W.H., and Gatennan, G. S. (1998). Cloning of aas, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol. Microbiol.* **29**: 871-881.
- Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E. and Bruchhaus, I. (2001). Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction *in vitro* but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell. Microbiol.* **3**: 13-20.
- Hertz-Fowler, C, Ersfeld, K, and Gull, K. (2001). CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **116**(1):25-34. Erratum in: *Mol Biochem Parasitol.* **28**;117(1):119.
- Hidalgo, M.E., Hernández, R., Keene, W. McKerrow, J.H. and Orozco, E. (1990). Relación directa entre secreción y virulencia en *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* **21** (supl. 1): 133-138.
- Hidalgo, M.E. and Orozco, E. (1997). Structural characterization of the *Entamoeba histolytica*

enolase gene promoter *Arch. Med. Res.* **28**: 62-63.

Hilley, J.D., Zawadzki, J.L., McConville, M.J., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (2000). *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI): protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol. Biol. Cell.* **11**(4): 1183-95.

Horwitz, A.F. (1997). Integrins and health. *Sci. Am.* May: 46-53.

Huber, I, Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L (1989). *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**: 285-296.

Hugli, T.E. (1986). Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement.* **3**: 111-127.

Huete-Pérez, J.A. Engel, J.C. Brinen, L.S., Mottram, J.C. and McKerrow, J.H. (1999). Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J Biol Chem.* **274**(23): 16249-56.

Humphreys, MJ, Moon, RP, Klinde, r A, Fowler, SD, Rupp, K, Bur, D, Ridley, RG, Berry, C. (1999). The aspartic proteinase from the rodent parasite *Plasmodium berghei* as a potential model for plasmepsins from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* **463**(1-2):43-8.

Inselburg, J., Bathurst, I.C., Kansopon, J., Barr, P.J. and Rossan, R. (1993). Protective immunity induced in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of *Plasmodium falciparum* further studies using SERA 1 and MF75.2 adjuvant. *Infect Immun.* **61**(5): 2048-52.

Ishii, S. (1994). Legumain: asparaginyl endopeptidase. *Methods Enzymol.* **244**: 604-615.

Jackson, T.F.H.G., Gathiram, V., and Simjee, A.E. (1985). Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Lancet.* **11**:716-719.

Jacobs, T., Bruchhaus, 1., Dandekar, T., Tannich, E. and Leippe, M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **27**: 269-276.

Joshi, P.B., Sacks, D.L., Modi, G., and McMaster, W.R. (1998). Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). *Mol Microbiol.* **27**(3):519-530.

Karrer, K.M., Peiffer, S.L., and DiTomas, M.E. (1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3063-3067.

- Keene, W.E. and McKerrow, I.H. (1985). Isolation and characterization of the neutral thiol proteinase of virulent *Entamoeba histolytica*. *Fed. Proc.* **44**: 1335.
- Keene, W.E., Pettit, M.G., Allen, S., and McKerrow, J. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **163**: 536-549.
- Keene, W.E., Hidalgo, M.E., Orozco, E. and McKerrow, J.H. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease. *Exp. Parasitol.* **71**: 199-206.
- Kelsall, B.L., and Ravdin, J.I. (1993). Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **168**: 1319-1322.
- Killian, M., Mestecky, J., and Russel, M.W. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial Immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev.* **52**: 296-303.
- Klemba, M., and Goldberg, D.E. (2002). Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 275-305.
- Kobayashi, S. Takeuchi, T., Asami, K. And Fujiwara, T. (1982). *Entamoeba histolytica*: ultrastructural localization of Ca²⁺ -dependent nucleotidases. *Exp. Parasitol.* **54**: 202-212.
- Kobiler, D. and Mirelman, D. (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **29**: 221-225.
- Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**: 483-525.
- Kornfield, S.J., and Plaut, A.G. (1981). Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 521-534.
- Kress, Y., Wittner, M. and Rosenbaum, R.M. (1971). Sites of cytoplasmic ribonucleoprotein-filament assembly in relation to helical body formation in axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *J. Cell Biol.* **49**: 773-784.
- Kretschmer, R.R. (1989). Inmunología de la amibiasis. En: Amibiasis. A. Martínez-Palomo (ed). Editorial Médica Panamericana, México, p. 79.
- Lanzer, M., Fischer, K., and Le Blancq, S.M. (1995). Parasitism and chromosome dynamics in protozoan parasites: is there a connection? *Mol Biochem Paras.* **70**: 1-8.

- Le Bonniec, S, Deregnacourt, C, Redeker, V, Banerjee, R, Grellier, P, Goldberg, DE, and Schrevel J. (1999). Plasmepsin II, an acidic hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* food vacuole, is active at neutral pH on the host erythrocyte membrane skeleton. *J Biol Chem.* **274**(20):14218-23.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger. O.L., Horstmann, R.D. and Muller-Eberhard, H.J. (1991). Pore forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Frac. Natl. Acad Sci. USA.* **88**: 7659-7663.
- León-Félix, J., Ortega-López, J., Orozco-Solis, R., and Arroyo, R. (2004). Two novel asparaginyl endopeptidase like cysteine proteinases from the protist *Trichomonas vaginalis* their evolutionary relationship within the clan CD cysteine proteinases. *Gene.* **335**: 25-35.
- Levy, O., Rico, G., Ramos, F., Moran, P., Melendro, E.I., Ximenez, C. (1995). *Entamoeba histolytica* adherente: inhibition by IgA monoclonal antibodies, p. 681-683. In J. Mestecky (ed.) *Advances in mucosal immunology* Plenum Press. New York. N.Y.
- Li, E., Yang, W.G. Zhang, T., and Stanley, S.L. (1995). Interaction of laminina with *Entamoeba histolytica* cystein proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect Immun.* **63**: 4150-4153.
- Lima, A.P, dos Reis, FC, Serveau, C, Lalmanach, G, Juliano, L, Menard, R, Vernet, T, Thomas, DY, Storer, AC, and Scharfstein, J. (2001). Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol Biochem Parasitol.* **25**;114(1):41-52.
- Llalmach, G., Lecaille, F., Chagas, J.R., Authie, E., Scharfstein, J., Juliano, M.A. and Gauthier, F. (1998). Inhibition of trypanosomal cysteine proteinases by their propeptides. *J Biol Chem.* **273**(39): 25112-6.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., 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., Guillén, N., Gilchrist, C., Stroup, S.E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P.G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., El-Sayed, N.M., Petri Jr, W.A., Graham, C., Embley, T.M., Barrell, B., Fraser, C.M., y Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* **433**: 865-868.
- López-Revilla, R. y Gómez, R. (1978). Inestabilidad del contenido de DNA en *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* **9** suppl. **1**: 117-120.
- Luaces, A.L. and Barret AJ. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of

- histolysin, the mayor cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* **250**: 903-909.
- Luker, K.E., Francis, S.E., Gluzman, I.Y., and Goldberg, D.E. (1996). Kinetic analysis of plasmepsins I and II aspartic proteases of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole. *Mol Biochem Parasitol.* **79**(1):71-8.
- Luna-Arias, J.P., Hemández-Rivas, R., de Dios-Bravo, G., García, J., Mendoza, L. and 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**: 33-40.
- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Cantey J.R., Hotbauer A.F., Pittman, J.C. and Pittman F.E. (1978). Citotoxicity of a cell-free extract of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* **9** (suppl1): 233-236.
- Lustigman, S., McKerrow, J.H., Shah, K., Lui, J., Huima, T., Hough, M., and Brotman, B. (1996). Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J Biol Chem.* **271**(47): 30181-9.
- Lynch, E.C., Rosemberg, I.M. and C. Glitter. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* **1**: 801-804.
- Mackenstedt, D., Schmidt, M., Raether, W., Mehlhom, H., and Dphoff, M. (1990). Increase of DNA content in tissue stages of *Entamoeba histolytica* stain SFL3. *Parasitol Res.* **76**: 373-8.
- Madriz, X., Martínez, M.B., Rodríguez, M.A., Sierra, G., Martínez-López, C., Riverón, A.M., Flores, L. and Orozco, E. (2004). Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiology.* **150**: 1251-1260.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Roosenthal, B., Rogers, R. and Samuelson, J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("Crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell Biol.* **19** (3): 2198-2205.
- Martínez-López, C., Orozco, E., Sánchez, T., García-Pérez, R.M., Hernández-Hernandez, F. and Rodríguez, M.A. (2004). The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol.* **6**: 367-376.
- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. y de la Torre, M. (1973). Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by Con A. *Nature New Biol.* **245**:

186-187.

- Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. John Wiley & sons. G.B.
- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. and Chávez, B. (1985). Structural basis of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica* *J. Protozool.* **32**: 165.
- Martínez-Palomo, A. (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In: *Amebiasis*. A. Martínez-Palomo (ed.) Amsterdam Elsevier Biomedical, pp 11-43.
- Martínez-Palomo, A. (1987). Las amibas enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica. Méx. D.F.
- Martínez-Palomo, A. (1989). Biología de la *Entamoeba histolytica*. En: *Amibiasis*. Martínez-Palomo, A. (Ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D. F. P 17.
- Mattem, C.F.T., Keister, D.B., and Natovitz, P.C. (1980). *Entamoeba histolytica* "toxin" fetuin neutralizable and lectin-like. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 6.
- Maubach, G., Schilling, K., Rommerskirch, W., Wenz, I., Schultz, J.E., Weber, E., and Wiederanders. (1997). The inhibition of cathepsin S by its propeptide-specificity and mechanism of action. *Eur. J. Biochem.* **250**: 745-750.
- Mayer, R., Picard, I., Lawton, P. Grellier, P. and Barrault, C. (1991). Peptide derivatives specific for a *Plasmodium falciparum* proteinase inhibit the bullan erythrocyte invasion by merozoites. *J. Med. Chem.* **34**: 3029-3035.
- Mazzuco, A., Benchimol, M., and DeSouza, W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron.* **28**: 241-247.
- McIntyre, G.F., Godhold, G.D., and Erickson, A.H. (1994). The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by 9-residue sequence within the propeptide. *J. Biol. Chem.* **269**: 567-572.
- McKerrow, IH. (1989) Parasite proteases. *Exp. Parasitol.* **68**: 111-115.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Roshenthal, P.1. and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 821-853.
- McKerrow, J.H. (1994). Proteases as therapeutic targets. *Perspect Drug Discov Design.* **2**: 437.

- McKerrow, J.H. (1999). Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, mechanism of action. *Int J Parasitol.* **29**: 833-7
- McKerrow, J.H., Engel, J.C., and Caffrey, C.R. (1999). Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem.* **7**(4): 639-44
- Meireles, M.N. Juliano, L., Carmona, E., Silva, S.G., Costa, E.M., Murta, A.C., and Scharfstein, J. (1992). Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol.* **52**(2): 175-184.
- Mendoza-López, M.R., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, LV., Avila-González, L Ruíz-Tachiquín, M.E., Ortega-López, J. and Arroyo, R. (2000). CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect. and Immun.* **68**(9): 4907-4912.
- Mirelman, D., Feingold, C., Wexler, A. M. and Bracha, R. (1983). Interactions between *Entamoeba histolytica*, bacteria and intestinal cells. En: *The cytopathology Of parasitic diseases*. Kelliot y Whollao (Eds.). Pitman Medical Press, London.
- Mirelman, D, Bracha, R, Chayen, A, Aust-Kettis, A and Diamond, LS (1986). Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Exp. Parasitol.* **62**: 142-148.
- Mirelman, D., Eichenbaum, Z., Nuchamowitz, Y., Stolarsky, T. and Bracha, R. (1993). Arguments in favour of convertibility of *Entamoeba histolytica*. Abstracts of the Fogarty International Center Conference on Host-parasite relationships in amebiasis. Sept. 8-10. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
- Mirelman, D., Nuchamowitz, Y., Bohm-Gloning, B. and Walderich, B. (1996). A homologue of a cysteine proteinase gene (ACP1 or Eh-CPp3) of pathogenic *Entamoeba histolytica* is present in non-pathogenic *E. dispar* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**: 1-2,47-54.
- Morgan, R.S., Slayteer, H.S. and Weller, D.L (1968). Isolation of ribosomes from cysts of *Entamoeba invadens*. *J. Cell Biol.* **36**: 45-51.
- Morty, RE, Lonsdale-Eccles, JD, Morehead, J, Caler, EV, Mentele, R, Auerswald, EA, Coetzer, TH, Andrews, NW, and Burleigh, BA. (1999). Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. *J Biol Chem.* **274**(37):26149-56.

- Muñoz, M.L, Calderón, J. and Rojkind, M. (1982). The Collagenase of *E. histolytica*. *J. Exp. Med.* **155**: 42-51.
- Muñoz, M.L, Rojkind, M., Calderón, J., Tanirnoto, M., Arias-Negrete, S., and Martínez- Palomo, A. (1984). *Entamoeba histolytica*: Collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* **31**: 468-470.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I. Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., and Katunuma, N. (1991). The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **10**(9):2321-30.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin /Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327**: 625-635.
- Nascimento, AE, and de Souza, W. (1996). High resolution localization of cruzipain and Ssp4 in *Trypanosoma cruzi* by replica staining label fracture. *Biol Cell.* **86**(1):53-8.
- Nickel, R., and Tannich, E. (1994). Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 7095-7098.
- Ocádiz, R. (1998). Clonación y expresión de un fragmento del gen de la adhesina de 112 kDa de *Entamoeba histolytica* que codifica para un péptido con homología a cisteína proteinasas. Tesis de Maestría. CICATA I.P.N. México, D.F.
- Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintel, L.I., Ortega-López, J., García-Pérez, R.M., Sanchez, T., Castillo-Juárez, B.A., García-Rivera, G., and Rodríguez, M.A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol.* **7**(2): 221.
- Olgún, T. (1984). Estudio comparativo de la fagocitosis de dos donas de *Entamoeba histolytica* de diferente virulencia. Tesis de licenciatura. UNAM. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A., y Guarneros, G. (1980). Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*. **11** (sup.1):153.
- Orozco, E. (1981). Virulencia y propiedades de superficie de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Guarneros, G. and Mora-Galindo, I. (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de *E. histolytica* a

células epiteliales. *Arch. Inv. Méd. (Méx.)* **13** (Supl.3): 153-157.

Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. and Sánchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp. Med.* **158**: 1511-1521.

Orozco, E., Hemández, F.c. and Rodríguez, M.A. (1985). Isolation and characterization of *Entamoeba histolytica* mutants resistant to emetine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15**: 49-59.

Orozco, E., Arroyo R., Rodríguez M.A., and García-Rivera G. (1987). Identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin using adhesion-deficient mutants and monoclonal antibodies. In *Molecular Strategies of Parasitic Invasion*. UCLA. Symposia on Molecular and Cellular Biology. Alan R. Inc. New York. p. 532-540.

Orozco, E., Rodríguez, M.A. and De la Cruz-Hemández, F. (1988). The role of phagocytosis in the pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *En: Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. 1.1. Ravdin (ed). John Wiley & sons. U.S.A.

Orozco, E., Báez-Camargo, Gamboa, L.I. Flores, E. Valdéz, J. and Hernández, F. (1993a). Molecular Karyotype of related clones of *Entamoeba histolytica*. *Mol and Biochem. Parasitol.* **00**: 000-000.

Orozco, E., Lazard, D., Sánchez, T., Sánchez, M.A., Hemández, R. and Silva, E.F. (1993b). A variable DNA region of *Entamoeba histolytica* is expressed in several transcripts which differ in genetically related clones. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 271-279.

Orozco, E., Gharaibeh, R., Riverón, A.M., Delgadillo, D.M., Mercado, M., Sánchez, T., Gómez-Conde, E., Vargas, M.A. and López-Revilla, R. (1997). A novel cytoplasmic structure containing DNA networks in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 250-257.

Orozco, E., Rodríguez, M.A., Báez-Camargo, M. y Riverón, A.M. (2000) *Biología Molecular de Entamoeba histolytica*. *Genética y Biología Molecular*. Colección Textos Politécnico. **18**: 267-286.

Oyama, V.I. and Eagle, H. (1956). Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin Ciocalteu). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **91**: 305.

Pamer, E.G., So, M. and Davis, C.E. (1989). Identification of a developmentally regulated cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 27-32.

Parodi, A.J., Cabriola, C., and Cazzulo, J.J. (1995). The presence of complex-type oligosaccharides at the C-terminal domain glycosylation site of some molecules of cruzipain. *Mol Biochem Parasitol.* **69**(2):247-55.

- Pérez-Tamayo, R. and Brandt, H. (1971). Pathology of protozoa and helminthic diseases. Baltimore, Williams and Wilkins (eds.).
- Pérez- Tamayo, R. (1989). Patología de la amibiasis. A. Martínez- Palomo (ed). 42.
- Petri, W.A. Jr. and Ravdin, J.I. (1987). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis. *Eur. J Epidemiol.* **3**(2): 123-136.
- Phillips, B.P., Diamond, L.S., Bartigis, I.L and Stupler, S.A. (1972) Results of intracecal inoculation of germfree and conventional guinea pigs and germfree rats with axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.* **19**: 498-499.
- Pike, N.R., Potempa, J. McGraw , W., Coetzer, H.T. and Travis, J. (1996). Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* **178**: 2876-2882.
- Plaut, A.G. (1983). The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 603-622.
- Proctor, E.M. and Gregory, M.A. (1973). Ultrastructure of cyst of *Entamoeba histolytica*. *Int. J Parasitol.* **3**: 457-460.
- Provenzano, D. and Alderete, J.F. (1995). Analysis of human immunoglobulin degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis* *Infect. Immun.* **63**: 3388-3395.
- Que, X. and Reed, S.L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**(2): 196-206.
- Ramamoorthy, R, Donelson, JE, Paetz, KE, Maybodi, M, Roberts, SC, and Wilson, ME. (1992). Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem.* **267**(3):1888-95.
- Ramos, F., Valenzuela, O., Moran, P., Gonzalez, E., Ramiro, M., Cedillo, R., Martínez, M., Gomez, A., Muñoz, O., Melendro, E., and Ximenez, C. (1997). Anti-*E. histolytica* IgA antibodies in saliva of *E. histolytica* or *E. dispar* infected individuals: longitudinal study of cohorts. *Arch. Med. Res.* **28**:s327-s329.
- Ravdin, J.I., Croft, B. Y. and Guerrant, RL. (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp. Med.* **152**: 377-390.
- Ravdin, J.I. and Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Study with mammalian tissue culture cells and human

erythrocytes. *J Clin. Invest.* **68**: 1305-1313.

Ravdin, J.I., Sperelakis, N. and Guerrant, R. L. (1982). Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **152**: 377-390.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F. Guerrant, R.L. and Hewllet, E.L. (1985). Effect of calcium and phospholipase A antagonist in the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect. Dis.* **152**: 542-549.

Ravdin, J.I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*. Studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* **8**: 247-260.

Ravdin, J.I. (1988). Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. Jhon Wiley and Sons. U.S.A. p. 838.

Ravdin, J.I., Petri, Jr., W.A., and Mirelman, D. (1988). Mechanisms of adherence by *Entamoeba histolytica*. *En: Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. J.I. Ravdin (ed). JoOO Wiley & Sons. U.S:A.

Reed, S., Bouvier, J., Pollack, A.S., Engel, J.C., Brown, M., Hirata, K., Que, X., Eakin, A., Hagblom, P. and Gillin, F. (1993). Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*. Pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene. *J Clin. Invest.* **91**: 1532-1540.

Reed, S.L., Ember, J.A., Herdman, D.S., DiScipio, R.G., Hugli, T.E. and Gigli, I. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades Anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* **155**: 266-274.

Reed, S.L., Flores, B.M., Batzer, M.A. and Stein, M.A. (1992). Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: Differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect. Immun.* **60**: 542-549.

Reed, S.L., and Gigli, I. (1990). Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J. Clin. Investig.* **86**: 1815-1822.

Reed, S.L. Keen, W.E., and McKerrow, J.H. (1989). Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2772-2777.

Richer, J.K., Sakanari, J.A., Frank, G.R., and Grieve, R.B. (1992). *Dirofilaria immitis*: proteases produced by third- and fourth-stage larvae. *Exp Parasitol.* **75**(2):213-22.

- Rigothier, M.C., García-Rivera, G., Guaderrama, M. and Orozco, E. (1992). Purification and functional characterization of the 112 kDa adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Méd. (Méx.)* **23** (No. 2): 239-241.
- Riverón, A.M., López-Cánovas, L., Báez-Camargo, M., Flores, E., Pérez-Pérez, G., Luna-Arias, J.P. and Orozco, E. (2000). Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *Eur. Biophys. J.* **29**: 48-56.
- Robertson, C.D., Coombs, G.H., North, M.J. and Mottram. (1996). Parasite cysteine proteinase. *Perspect. Drug Discov. Des.* **6**: 99-118.
- Roche, L., Tort, J., and Dalton. (1999). The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L. is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* **98**: 271-277.
- Rodríguez, M.A. and Orozco, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis-and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **154**: 27-32.
- Rodríguez, M.A. Hemández, F., Santos, L., Valdez, A. and Orozco, E. (1989) *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**: 87-100.
- Rodríguez, M.A. (1990). Proteínas y genes que participan en la interacción de *Entamoeba histolytica* con la célula blanco. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Molecular). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.
- Rodríguez, M.A. García-Pérez, R.M., Mendoza, L. Sánchez, T., Guillen, N., and Orozco, E. (1998). The piruvate: ferredoxin oxidoreductase enzyme is located in the plasma membrane and in a cytoplasmic structure in *Entamoeba histolytica*. *Microbial Pathogenesis.* **25**: 1-10.
- Rodríguez, M.A. García-Pérez, R.M., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., Ortíz-Navarrete, V. and Orozco, E. (2000). An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol. Biochem. Parasitol.* **108**: 199-206.
- Roggwiller, E, Betoulle, ME, Blisnick, T, Braun and Breton, C. (1996). A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **82**(1):13-24.
- Rosales-Encina, J.L., Meza, I., López de León, A., Talamás-Rohana, P. and Rojking, M. (1987). Isolation of a 22-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of

Entamoeba histolytica. *J Infect. Dis.* **156**: 790-797.

Rosenthal, P.J. (1999). Proteases of protozoan parasites. *Adv. Parasitol.* **43**: 105-159.

Rozhin, J., Robinson, D., Stevens, M.A. Lah, T.T., Honn, K.V., Ryan, R.E., and Sloane, B.F. (1987). Properties of a plasma membrane-associated cathepsin B-like cysteine proteinase in metastatic B16 melanoma variants. *Cancer Res.* **47**: 6620-6628.

Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 697-715.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.1., Higuchi, R., Hom, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 487-491.

Sajid, M., Withers-Martínez, C., and Blackman, M.J. (2000). Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum*-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *J Biol Chem.* **275**(1): 631-641.

Sajid, M., and McKerrow, J.H., (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem. Parasitol.* **120**: 1-21.

Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Salas, F., Fichmann, J., Lee, G.K., Scott, M.D., and Rosenthal, P.J. (1995). Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cystein proteinase, supports its role as a malarial heomoglobinase. *Infect Immun.* **63**(6): 2120-2125.

Salvati, L, Mattu, M, Polticelli, F, Tiberi, F, Gradoni, L, Venturini, G, Bolognesi, M, and Ascenzi, P. (2001). Modulation of the catalytic activity of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, by temperature and pH. *Eur J Biochem.* **268**(11): 3253-8.

Sanger, F. Nicklen, S., and Coulson , A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Sargeant, P.G., Jackson, T.F.H.G. and Simjee, A.E. (1982). Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. *Lancet.* **i**: 1386-1388.

Schlagenhauf, E, Etges, R, and Metcalf, P. (1998). The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure.* **6**(8):1035-46.

- Scholze, H. And Schulte, W. (1988). On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed. Biochem. Acta.* **47**: 115-123.
- Scholze, H., Lohden-Bendinger, D., Müller, G., and Bakker-Grunwald, T. (1992). Subcellular distribution of amebapain, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* **23**(2): 105-108.
- Schulte, E. and Scholze, H. (1989). Action of the mayor protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J Protozool.* **36**: 538-543.
- Seay, MB, Heard, PL, and Chaudhuri, G. (1996). Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun.* **64**(12):5129-37.
- Selzer, P.M., Chen, X., Chan, V.J., Cheng, M., Kenyon, G.L., Kuntz, I.D., Sakanari, J.A., Cohen, F.E., and McKerrow, J.H. (1997). *Leishmania major*: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. *Exp. Parasitol.* **87**: 212-221.
- Serrano, J.I., de la Garza, M., Moreno, M.A., Tovar, R., León, G., Tsutsumi, V. and Muñoz, M.L. (1994) *Entamoeba histolytica*: electron-dense granule secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Mol. Microbiol.* **11**:(4) 787-792.
- Serveau, C, Lalmanach, G, Hirata, I, Scharfstein, J, Juliano, MA, and Gauthier, F. (1999). Discrimination of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, and mammalian cathepsins B and L, by a pH-inducible fluorogenic substrate of trypanosomal cysteine proteinases. *Eur J Biochem.* **259**(1-2):275-80.
- Seydel, K.B., Li, E., Swanson, P.E., and Stanley, S.L. (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect. Immune.* **65**: 1631-1639.
- Sharma, D.K., Hilley, J.D., Bangs, J.D., Coombs, G.H., Mottram, J.C., and Menon, A.K. (2000). Soluble GPI8 restores glycosylphosphatidylinositol anchoring in a trypanosome cell-free system depleted of luminal endoplasmic reticulum proteins. *Biochem J.* **351**(Pt3): 717-22.
- Sharma, M., Hirata, K., Herdman, S., and Reed, S. (1996). *Entamoeba invadens*: characterization of cysteine proteinases. *Exp. Parasitol.* **84**: 84-91.
- Sharma, P., Das, P., and Dutta, G.P. (1981). Use of glutaraldehyde-treated sheep erythrocytes in indirect haemagglutination test for amoebic corpoantibody. *Indian J. Med. Res.* **74**:

215-218.

Shegal, D., Mittal, V., Ramachandran, S, Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S. (1994). Nucleotide sequence organization and analysis of the nuclear of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**: 205-214.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sitio web: <http://www.ssa.gob.mx>

Skuce, P.J., Redmond, D.L., Liddell, S., Stewart, E.M., Newlands, G.F., Smith, W.D., and Knox, D.P. (1999). Molecular cloning and characterization of gut-derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* **119**(Pt 4): 405-12.

Sloane, B.F., Moin, K., Krepela, E., and Rozhin, J. (1990). Cathepsin B and its endogenous inhibitors the role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis. Rev.* **9**: 333-352.

Sloane, B.F., Rozhin, J., Johnson, K., Taylor, H., Crissman, J.D., and Honn, K.V. (1986). Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 2483-2487.

Smith, A.M., Carmona, C., Dowd, A.J., McGonigle, S., Acosta, D., and Dalton, J.P. (1994). Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite immunol.* **16**(6):325-8.

Smith, H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol.* **41**: 475.

Smith, H. (1978). The determinants of microbial pathogenicity. In J.R. Norris y Richmond, M.H. (eds): *Assays in Microbiology*. Chichester, N.Y.: John Wiley & Sons, p. 13/1.

Spice and Ackers (1992). The amoeba enigma. *Parasitol. Today.* **8**: 402-406.

Spinella, S., Levavasseur, E., Farhettin, P. and Rigother, M.C. (1999). Purification and biochemical characterization of a novel cysteine protease of *Entamoeba histolytica*. *Eur. J. Biochem.* **266**: 170-180.

Stanley, S.L Jr., Becker, A., Kunz-Jenkin, C. and Foster, L (1990). Cloning and expression of an membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing tandem repeats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 4976-4980.

Stanley, S.L, Zhang, T., Rubin, D. and Li, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infec. Immun.* **63**: 1587-1590.

- Stoka, V, Nycander, M, Lenarcic, B, Labriola, C, Cazzulo, JJ, Bjork, I, and Turk, V. (1995). Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. *FEBS Lett.* **14**;370(1-2):101-4.
- Stoka, V, Turk, B, McKerrow, JH, Bjork, I, Cazzulo, JJ, and Turk, V. (2000). The high stability of cruzipain against pH-induced inactivation is not dependent on its C-terminal domain. *FEBS Lett.* **469**(1):29-32.
- Sugiyama, T., Suzue, K., Okamoto, M., Inselburg, J., Tai, K. and Horii, T. (1996). Production of recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli* by using synthetic genes. *Vaccine.* 14(11): 1069-76.
- Sung, S.K., and Dresden, M.H. (1986). Cysteinyln proteinasas of *Schistosoma mansoni* eggs: purification and partial characterization. *J Parasitol.* **72**(6):891-900.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Kato, Y., Nagakura, K., Kaneda, Y. and Takeuchi, T. (1990). Identification of pathogenic isolate-specific 30'000 - Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **58**: 955-960.
- Tack, B.F., Janatova, J., Thomas, M.L., Harrison, R.A., and Hammer, C.H. (1981). The third, fourth, and fifth components of human complement: isolation and biochemical properties. *Methods Enzymol.* **80**: 64-101.
- Takai, T., Ichikawa, S., Yokota, T., Hatanaka, T., Inagaki, F., and Okumura, Y. (2000). Unlocking the allergenic structure of the major house dust mite allergen Der F 2 by elimination of key intramolecular interactions *FEBS Lett.* **484**(2): 102-7.
- Talbot, J.A., Nielsen, K., and Corbell, L.B. (1991). Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *Can. J. Microbiol.* **37**: 384-390.
- Tannich, E., Horatman, R.D., Knoblock, I. and Arnold, H.H. (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Sci. USA.* **86**: 5118.
- Tannich, E., Ebert, F. and Horstman, RD. (1991). Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **88**: 18491853.
- Tannich, E., Nickel, R., Buss, Ho and Horstman, R.D. (1992). Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 109-112.

- Taylor, M.A., Baker, K.C., Briggs, G.S., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Pratt, K.A., Revell, D.F., Freedman, R.B., and Goodenough, P.T. (1995). Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng.* **8**: 59-62.
- Temesvari, LA. Harris, EN. Stanley, S.L.Jr, and Cardelli, J.A. (1999). Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **103**: 225-241.
- Tomas, A.M., Miles, M.A. and Kelly, J.M. (1997). Overexpression of cruzipain, the mayor cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur. J Biochem.* **244**: 596-603.
- Torian, B.E., Reed, S.A., Flores, B.M., Creely, C.M., Coward, J.E. Vial, K. and Stamm, W.E. (1990). The 96-kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: Potential Differences in pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect. Immun.* **58**: 753-760.
- Torii, M, Adams, JH, Miller, LH, and Aikawa, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infect Immun.* **57**(10):3230-3.
- Torshin, I. (2002). Structural criteria of biologically active RGD-sites for analysis of protein cellular function D a bioinformatics study. *Med. Sci. Monit.* **8**: BR301-BR312.
- Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H., and Dalto, J.P. (1999). Proteinases and associated genes of parasitic helminthes. *Adv Parasitol.* **43**: 161-266.
- Touz, M.C., Nores, M.J., Slavin, I., Carmona, C., Conrad, J.T., Mowatt, M.R., Nash, T.E., Coronel, C.E., and Lujan, H.D. (2002). The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia Lamblia*. *J. Biol. Chem.* **277**: 8474-8481.
- Tovar, J., Fisher, A. and Clark, C.G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1013-1021.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, G. (1979). Electroforetic transfer of proteins form polyacrilamide gel s to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.
- Tran, V.Q., Herdman, D.S., Torian, B.E., and Reed, L. (1998). The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J. Infect. Dis.* **177**: 508-511.

- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Arguello, C., De la Torre, M. and De la Hoz, R. (1977). Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. *J Exp. Med.* **145**: 652-655.
- Trissl, D., Martínez Palomo, A., De la Torre, M., De la Hoz, R. and Pérez de Suárez, E. (1978). Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp. Med.* **148**: 1137-1145.
- Turk, B., Bieth, J.G., Dolence, I., Turk, D., Cimerman, N., Kos, J., Colic, A., Stoka, V., and Turk, V. (1995). Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinasas by pH-induced inactivation and or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem.* **376**(4):225-30.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**: 98-111.
- Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., and Turk, B. (1998). Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem.* **379** (2): 137-47.
- Tyas, L, Gluzman, I, Moon, RP, Rupp, K, Westling, J, Ridley, RG, Kay, J, Goldberg, DE, and Berry, C. (1999). Naturally-occurring and recombinant forms of the aspartic proteinases plasmepsins I and II from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* **454**(3):210-4.
- Underdown, B.J., and Schiff, J.M. (1986). Immunobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* **4**: 389-417.
- Van Belkum A., Schere, S., van Alphen, L. and Verbrugh, H. (1998). Short sequence repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 275-293.
- Van de ven, W.J., Creemers, J.W., and Roebroek. (1991). Furin: the prototype mammalian subtilisin-like proprotein-processing enzyme. Endoproteolytic cleavage at paired basic residues of proproteins of the eukaryotic secretory pathway. *Enzyme.* **45**: 257-270.
- Vargas, M.A., Isibasi, A., Kumate, J. and Orozco, E. (1990). Non-pathogenic *Entamoeba histolytica*: functional and biochemical characterization of a monoxenic strain. *Mol Biochem Parasitol.* **40**: 193-201.
- Vargas, M.A. and Orozco, E. (1993). *E. histolytica*: changes in the zimodeme of cloned nonpathogenic trophozoites cultured under different conditions. *Parasitol. Res.* **79**: 353.
- Vargas, M.A. (1994). Variabilidad fenotípica y genotípica en *Entamoeba histolytica*: El efecto

modulador del medio y su relación con la virulencia. Tesis de Doctorado en Ciencias (Patología Experimental). Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.

- Walsh, J.A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. *En: Amibiasis. Human infection by Entamoeba histolytica.* I 1. Ravdin (ed.). John Wiley & sons. U.S.A.
- Ward, W., Alvarado, L. Rawlings, N.D. Engel, J.C. Franklin, C., and Mckerrow, J.H. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell.* **89**(3): 437-44
- WHO (1997) *WHO Weekly Epidemiol. Record* **72**: 97-100.
- Willhoeft, U., Hamann, L., and Tannich, E. (1999). A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun.* **67**: 5925-5929
- Williams, AG, and Coombs, GH. (1995). Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Int J Parasitol.* **25**(7):771-8.
- Xie, D, Gulnik, S, Collins, L, Gustchina, E, Suvorov, L, and Erickson, JW. (1997). Dissection of the pH dependence of inhibitor binding energetics for an aspartic protease: direct measurement of the protonation states of the catalytic aspartic acid residues. *Biochemistry.* **36**(51):16166-72.
- Young, J.D., Young, TM., Lu. P.L., Unleess, IC. and Cohn, Z.A. (1982). Characterization of a membrane pore- forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.***156**: 1677-1690.
- Yu, D., Wang, D.Y.C.C., and Wang, A.L. (1995). Maturation of giardavirus capsid protein involves posttranslational proteolytic processing by a cysteine protease. *J Virol.* **69**(5):2825-30.
- Zhai, Y.and Saier M. H. Jr., (2000). The amebaporo superfamily. *Biochem. Biophys. Act.* **1469**: 87-99.
- Zhang, T. and Stanley, S.L.Jr. (1999). DNA vaccination with the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevenís amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine.* **18**: 868-874.
- Zhang, Z., Wang, L., Seydel, K.B., Li, E., Ankri, S., Mirelman, D. and Stanley, S.L. Jr. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-I beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol. Microbiol.* **37**: 542-548.

Zhu, Y., and Conner, G.E. (1994). Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 3846-3851.

ANEXOS

El trabajo realizado en la presente tesis fue publicado en dos artículos, los cuales han recibido reconocimientos por su calidad: el primero de ellos por la Camara Nacional de la Industria Farmaceutica (CANIFARMA 1999) y el segundo en este año (2005) por la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) .

ANEXO 1

García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., **Ocádiz, R.**, Martínez-López M. C., Arroyo, R., González-Robles, A. and Orozco, E. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* **33**: 556-568.

ANEXO 2

Ocádiz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintel, L.I., Ortega-López, J., García-Pérez, R.M., Sanchez, T., Castillo-Juárez, B.A., García-Rivera, G., and Rodríguez, M.A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol.* **7**(2): 221.

From: [Relaciones profesionales](#)

Dr. R Ocádiz
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
IPN

México D.F.
México

* Ref.: CoSIIC 73352

Estimado Dr. R Ocádiz:
Hemos leído con atención el trabajo de su autoría «EhCP112 Is an Entamoeba histolytica Secreted Cysteine Protease that May Be Involved in the Parasite-Virulence », recientemente editado por «Cellular Microbiology», publicación ésta que clasifica nuestra [SIIC Data Bases](#) (1).

Vista su calidad nos agradecería promover su lectura entre los profesionales afines de lengua hispana y portuguesa(2). Para ello, le sugerimos describirlo mediante una comunicación que editaríamos en la sección Autores comunican <<http://www.siicsalud.com/tit/autcom.htm>>, en los medios especializados de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC)(3) y entre las publicaciones, sociedades colegas y editoriales de la región.

Por favor, ingrese a la página <<http://www.siicsalud.com/autores/cosiic.htm>>, consulte las sencillas pautas de redacción propuestas y remítanos el texto con el que promovería su trabajo.

Esperamos que nuestra iniciativa sea de su interés. Ante cualquier duda quedo a disposición.

Le saluda cordialmente

Rafael Bernal Castro
Director editorial
Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC)
Tel.: +54 11 4342 4901
Fax: +54 11 4331 3305
Buenos Aires - Argentina
direccion@siicsalud.com

(1) SIIC Data Bases sólo clasifica artículos seleccionados de publicaciones estratégicas. Es la única internacional, citada junto a Medline, Embase y otras, que escoge los trabajos principales de las mejores revistas para editarlos, objetivamente resumidos, en castellano, portugués e inglés.

(2) Las páginas de SIIC En Internet reciben alrededor de 3 millones de visitas (page views) mensuales. Las ediciones de SIIC en soporte papel, superan los 100.000 ejemplares mensuales; circulan en todos los países de América Latina, España y Portugal.

(3) Para conocer los objetivos y trayectoria de SIIC ingrese a Acerca de SIIC

<<http://www.siicsalud.com/main/acercade.htm>>.

Si desea conocer la nómina de investigadores que colaboran con SIIC ingrese a

<<http://www.siicsalud.com/main/comitsde.htm>>.

***Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein**

G. García-Rivera,^{1,2} M. A. Rodríguez,^{1,2} R. Ocádiz,¹
M. C. Martínez-López,¹ R. Arroyo,^{1,2} A. González-
Robles² and E. Orozco^{1,2*}

¹Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y
Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional
(CICATA-IPN), Legaria 694, Col. Irrigación, México, DF
11500.

²Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-
IPN, AP14-740 México, DF 07000.

Summary

Here, we present evidence that a cysteine protease (EhCP112) and a protein with an adherence domain (EhADH112) form the *Entamoeba histolytica* 112 kDa adhesin. Immunoelectron microscopy and immunofluorescence assays using monoclonal antibodies (mAbAdh) revealed that, during phagocytosis, the adhesin is translocated from the plasma membrane to phagocytic vacuoles. mAbAdh inhibited 54% adherence, 41% phagocytosis, and 35% and 62% destruction of MDCK cell monolayers by live trophozoites and their extracts respectively. We cloned a 3587 bp DNA fragment (*Eh112*) with two open reading frames (ORFs) separated by a 188 bp non-coding region. The ORF at the 5' end (*Ehcp112*) encodes a protein with a cysteine protease active site, a transmembranal segment and an RGD motif. The second ORF (*Ehadh112*) encodes a protein recognized by mAbAdh with three putative transmembranal segments and four glycosylation sites. Northern blot, primer extension and Southern blot experiments revealed that *Ehcp112* and *Ehadh112* are two adjacent genes in DNA. *Ehcp112* and *Ehadh112* genes were expressed in bacteria. The recombinant peptides presented protease activity and inhibited adherence and phagocytosis, respectively, and both were recognized by mAbAdh. The EhCP112 and EhADH112 peptides could be joined by covalent or strong electrostatic forces, which are not broken during phagocytosis.

Introduction

Adherence, phagocytosis and proteolytic activity are three key events in the target cell destruction by *Entamoeba histolytica*, the protozoan causative agent of human amoebiasis. This parasite kills 100 000 individuals each year around the world (WHO, 1997). The phagocytic and vacuole-rich trophozoites, the invasive form of *E. histolytica*, are a suitable model for studying adherence, phagocytosis and proteolytic activity, functions in which membrane molecules are important players. Several surface proteins have been reported as involved in the trophozoite–target cell contact, but their specific role in subsequent steps to adherence, such as phagocytosis and cell destruction, is not known (Arroyo and Orozco, 1987; Petri *et al.*, 1987; Rosales-Encinas *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1989; Stanley *et al.*, 1990; Vinayak and Shandil, 1990; Vohra *et al.*, 1992). Some authors have shown that antibodies against membrane proteins inhibit virulence of the trophozoites *in vitro* (Petri *et al.*, 1987; Rosales-Encinas *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1989). However, inhibition could be caused by adherence blockage, because adherence of trophozoites is a necessary step for phagocytosis and cellular destruction to occur.

Proteases have also been involved in *E. histolytica* virulence (Gadasi and Kessler, 1983; McKerrow, 1989; Keene *et al.*, 1990; Reed *et al.*, 1992; Tannich *et al.*, 1992). There is experimental evidence demonstrating a direct correlation between virulence and rate of phagocytosis and protease activity (Orozco *et al.*, 1985; Ankri *et al.*, 1998; 1999), but other reports contradict this assumption (Spice and Ackers, 1992; Montfort *et al.*, 1993).

Identification of parasite molecules and definition of their role in virulence are necessary to understand how trophozoites produce damage to human tissues. Additionally, better diagnosis methods and vaccines against the parasite may be developed using parasite molecules with a known function.

E. histolytica virulence-deficient mutants obtained in our laboratory have alterations in the 112 kDa surface protein. Experiments using monoclonal and monospecific polyclonal antibodies (mAb5 and pAb112 respectively) have shown that the 112 kDa adhesin exhibits affinity for epithelial and red blood cells (RBCs) (Arroyo and Orozco, 1987; Rodríguez *et al.*, 1989). We present here experimental evidence suggesting that two polypeptides form the 112 kDa adhesin: a cysteine protease (EhCP112) and

Received 9 February, 1999; revised 5 May, 1999; accepted 10 May, 1999. *For correspondence. E-mail esther@mail.cinvestav.mx; Tel. (+52) 5 747 3800, ext. 5650; Fax (+52) 5 747 7108.

a protein with an adherence domain (EhADH112). Genes encoding for both proteins were cloned and expressed to corroborate their role in adherence, phagocytosis and tissue destruction.

Results

The 112 kDa adhesin is translocated from the plasma membrane to phagocytic vacuoles during phagocytosis

Laser confocal microscopy experiments of phagocytic trophozoites have previously shown the presence of the 112 kDa adhesin in the plasma membrane and in the edges of the phagocytic channel (García-Rivera *et al.*, 1997a). Here, using transmission electron microscopy (TEM), we examined thin sections of trophozoites incubated with mouse monoclonal antibodies (mAbAdh) against the 112 kDa adhesin and, then, with colloidal gold (Fig.

1A). Non-permeabilized trophozoites showed gold conjugates uniformly distributed around the plasma membrane (Fig. 1Ab), whereas permeabilized trophozoites also presented gold label in vacuoles (Fig. 1Ac).

Location of the adhesin during phagocytosis was performed in cryosectioned trophozoites that were in contact with RBCs for different times and then incubated with mAbAdh and a fluoresceinated second antibody (Fig. 1B). In trophozoites not in contact with RBCs, the adhesin appeared in the plasma membrane and in cytoplasmic vacuoles. Interestingly, not all vacuoles were recognized by the antibody. (Fig. 1Ba and b). At 30 s interaction, the fluorescence was found at the plasma membrane, where the RBCs were adhered (Fig. 1Bc). After 10 min, the RBCs ingested by the trophozoites appeared completely illuminated inside the trophozoites (Fig. 1Bd). When digestion had advanced, 20 min later, the signal was found at the edges of the RBCs, which appeared to be deformed

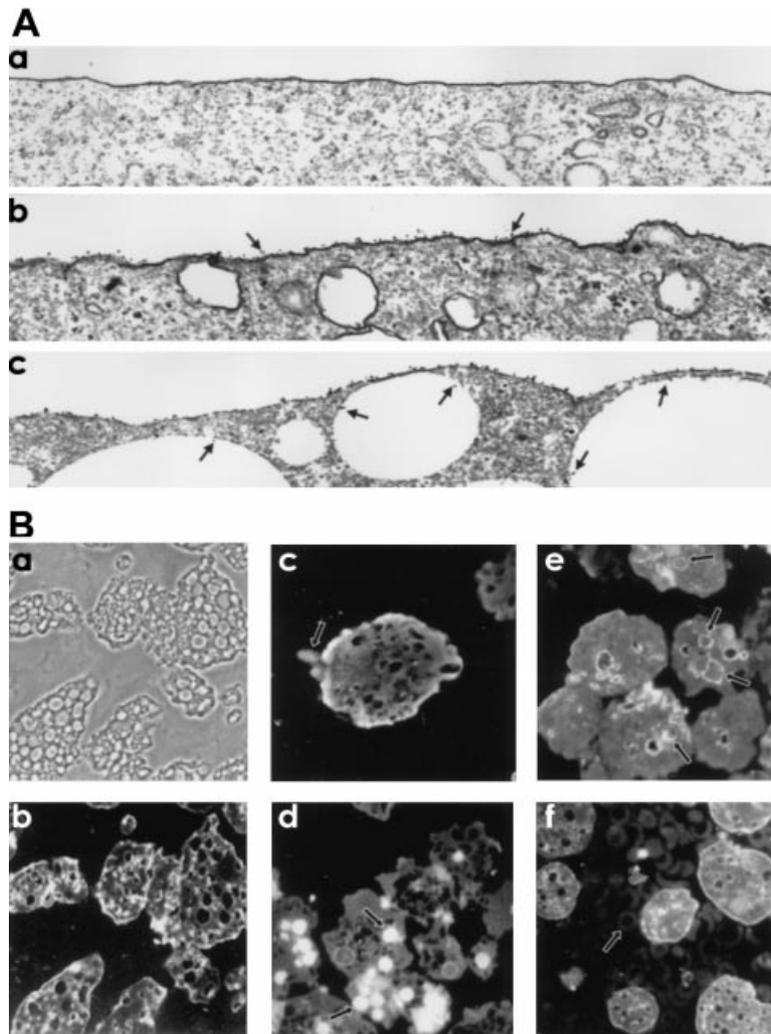


Fig. 1. Immunolocalization of the 112 kDa adhesin in *E. histolytica* trophozoites.

A. Thin sections of trophozoites examined by TEM using: (a) preimmune serum; (b) mAbAdh on non-permeabilized trophozoites; (c) mAbAdh on Triton X-100 permeabilized trophozoites. Arrows show some streptavidin–colloidal gold complexes used to detect mAbAdh. B. Immunofluorescence on cryosectioned trophozoites at different times of phagocytosis using mAbAdh: (a) phase contrast of trophozoites without RBCs; (b–f) immunofluorescence using mAbAdh. (b) Trophozoites without RBCs; (c–f) trophozoites after interaction with RBCs: (c) 30 s; (d) 10 min; (e) 20 min; (f) 30 min. In (f), RBCs were not lysed. Arrows show some RBCs.

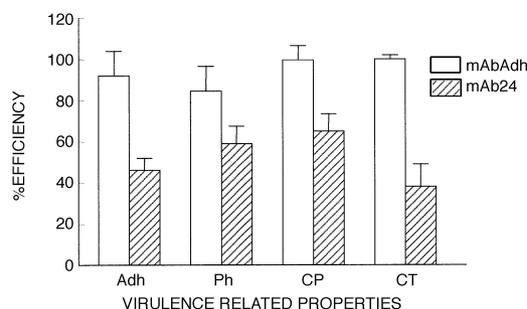


Fig. 2. Inhibition of adherence (Adh), phagocytosis (Ph), cytopathic (CP) and cytotoxic effects (CT) by mAbAdh. Live trophozoites were incubated with mAbAdh or mAb24 for 20 min at 4°C before carrying out Adh, Ph and CP assays. Trophozoite extracts were also incubated 20 min at 4°C with mAbs before carrying out CT on MDCK cells. Adh, Ph, CP and CT in the absence of antibodies were taken as 100% efficiency. Bars = SD.

(Fig. 1Be). After 30 min of phagocytosis, the 112 kDa adhesin was again located mainly in the plasma membrane (Fig. 1Bf), suggesting recycling of the protein from the phagocytic vacuoles. In some experiments, we did not lyse RBCs to demonstrate that only those in contact with or inside the trophozoites reacted with the antibody (Fig. 1Bf).

mAbAdh inhibits adherence, phagocytosis, cytopathic effect and cytotoxicity

Live trophozoites were incubated with mAbAdh for 20 min at 4°C to block the 112 kDa adhesin before contact with RBCs or MDCK cell monolayers. mAbAdh inhibited 54% of the adherence of the RBCs. Phagocytosis of RBCs was blocked by 41%, whereas destruction of MDCK cell monolayers by live trophozoites was inhibited by 35%. Inhibition of cell monolayer destruction by trophozoite extracts incubated with mAbAdh was 62% (Fig. 2). A monoclonal antibody against a surface protein (24 kDa) with unknown function had no significant effect on the virulence properties studied (Fig. 2) and was used as a control. These experiments were performed in duplicate at least five times each.

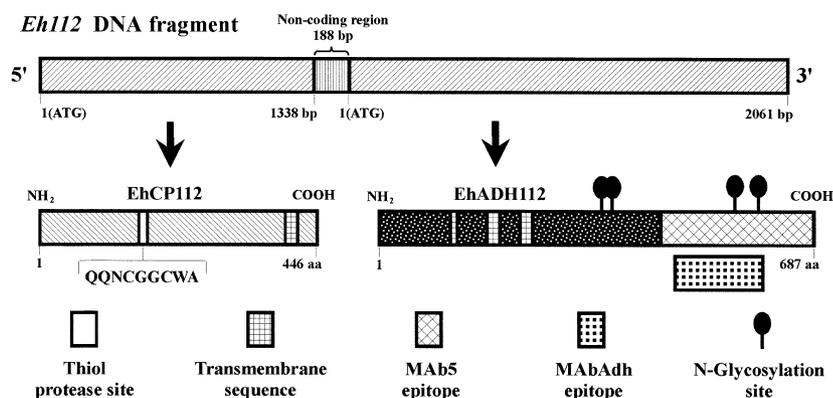


Fig. 3. Schematic representation of the *Eh112* DNA fragment and peptides. EhCP112, cysteine protease; EhADH112, adhesin.

Isolation of the 112 kDa adhesin gene(s)

After the functional studies were performed, we cloned and analysed the genes encoding for the 112 kDa adhesin. Using as a probe an 800 bp fragment that encodes a peptide recognized by a monoclonal against the adhesin (García-Rivera *et al.*, 1997b), we obtained a 5.6 kb clone (see *Experimental procedures*) with two open reading frames (ORFs) (1338 and 2061 bp) separated by 188 bp (Fig. 3). The DNA fragment containing the ORFs was called *Eh112*.

The ORF at the 5' end of the Eh112 encodes a cysteine protease-like protein

The 1338 bp ORF encodes a predicted protein of 446 amino acids (EhCP112) with 27–31% identity to the cysteine proteases reported for *E. histolytica* (Scholze and Schulte, 1988; Tannich *et al.*, 1992; Bruchhaus *et al.*, 1996) (Figs 3 and 4). The computer program SIGNAL PV1.1 suggested that the first 19 amino acids form the signal peptide of the EhCP112 preproenzyme (Fig. 4). By comparison with other cysteine proteases, we also found that the EhCP112 mature enzyme could start around the amino acid 137 (Fig. 4). In the position –90 to –71 amino acids is the sequence ExxxRxxVFxxNxxxlxxxN (x = any amino acid residue), characteristic of the cathepsins H- or L-like propeptides (Karrer *et al.*, 1993; Berti and Storer, 1995). This sequence plays an important role in the activation and processing of the mature cysteine proteases. The active site of EhCP112 was located at the 25–33, 193 and 212–214 amino acid residues. In positions 111 and 182 are the cysteine residues that confer the proper folding to cysteine proteases (Cohen *et al.*, 1986). EhCP112 protein presents a putative transmembrane segment in 259–280 amino acid residues and an RGD sequence (114–116 amino acids), which has been reported as an integrin attachment domain (Horwitz, 1997). This motif could have a role in the contact of trophozoites with extracellular matrix proteins in EhCP112. Mutation experiments, currently in progress, will elucidate its function. No other

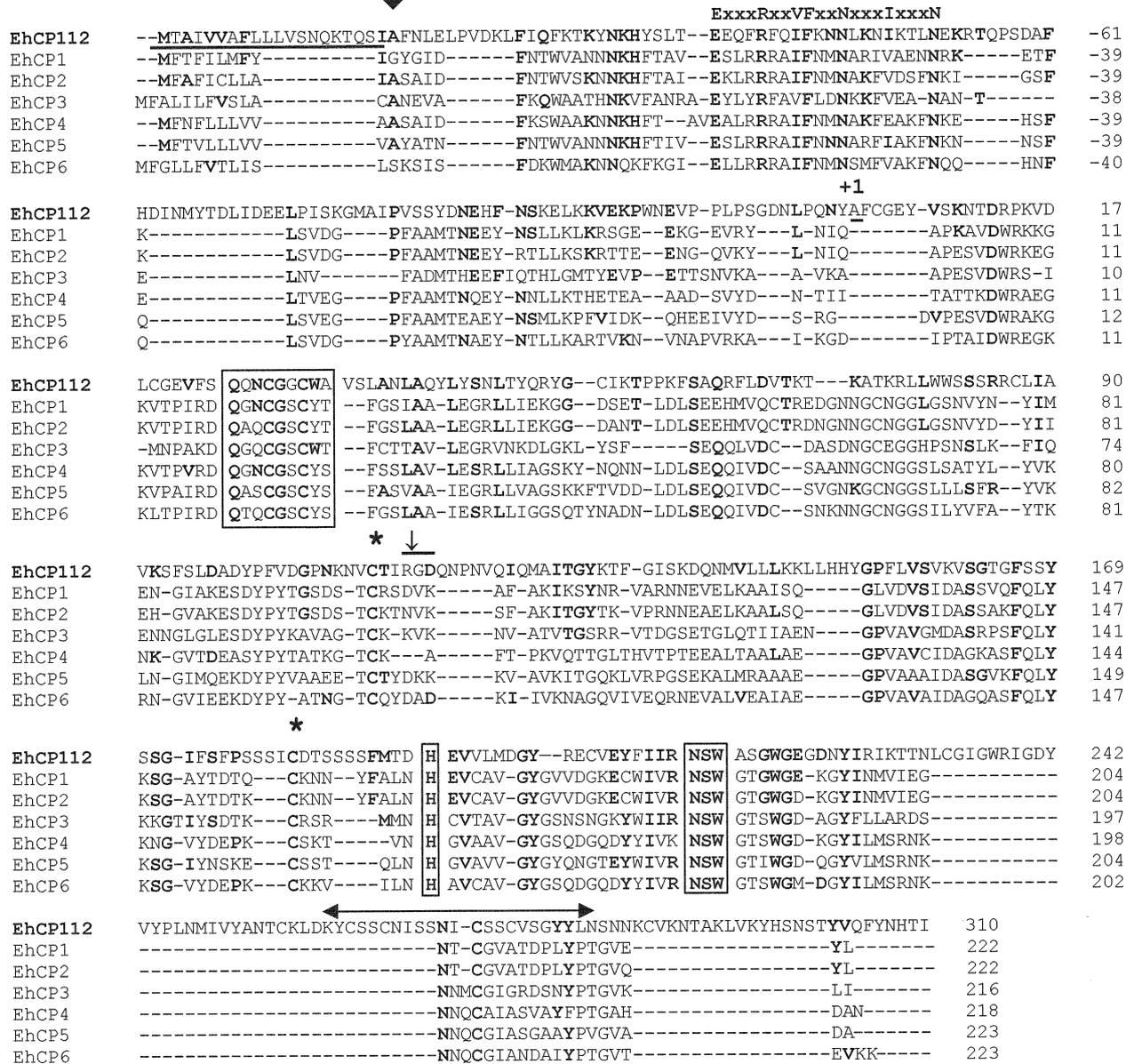


Fig. 4. Alignment of EhCP112 with *E. histolytica* cysteine proteases (EhCP1 to EhCP6). Amino acid sequences were aligned by CLUSTAL W and MAS programs. Amino acid residues are numbered at the end of each line. Common amino acid residues are in bold. Dashes represent gaps. The putative signal peptide is underlined, and the arrowhead indicates the putative signal peptide cutting site. Putative beginning of the mature enzyme is marked by (+1). The amino acid residues involved in the active site are boxed. *C residues involved in the folding of the mature enzyme. (←→) Putative transmembranal segment. (↓) Arg-Gly-Asp (RGD) motif.

known *E. histolytica* mature cysteine proteases exhibit an RGD domain.

The second ORF of the Eh112 DNA fragment encodes a 687-amino-acid protein

The *Eh112* second ORF has 2061 bp (Fig. 3) and predicts a protein (EhADH112) (Fig. 5) with no significant homology to any polypeptide in the databases. According to the TM base program, the EhADH112 protein contains three putative transmembranal segments at 114–130, 176–195 and

224–247 amino acids and four possible N-glycosylation sites at 352, 369, 562 and 600 amino acid residues (Fig. 5). EhADH112 has the fragment encoded by the recombinant clone (422–687 amino acids) used as a probe (Fig. 3) (García-Rivera *et al.*, 1997b).

The Ehcp112 and Ehadh112 ORFs correspond to two distinct genes, which may be in two genomic copies

We investigated whether the *Ehcp112* and *Ehadh112* ORFs were included in a single gene separated by a



Fig. 5. Amino acid sequence of EhADH112. Amino acid residues are numbered at the end of each line. The epitope recognized by mAbAdh is in bold. (→) Putative transmembranal segments. *N-glycosylation sites.

188 bp putative intron, or whether they were two different genes. In Northern blot assays, a 423 bp fragment (242–665 bp) from the *Ehcp112* gene recognized a 1.6 kb single transcript, whereas a 600 bp probe (239–839 bp) from the *Ehadh112* gene hybridized with a single 2.1 kb band (Fig. 6A). Both transcripts are slightly larger than the size predicted from their sequences, because they have long untranslated regions (UTRs), although *E. histolytica* gene transcripts contain short 5'-UTRs (9–18 nucleotides) in general (Bruchhaus *et al.*, 1993; Purdy *et al.*, 1996; Hidalgo and Orozco, 1997). Primer extension assays confirmed the presence of two transcripts in the *Eh112* fragment with long 5'-UTRs. The *Ehcp112* transcript starts 280

nucleotides upstream of the initiation codon, whereas the *Ehadh112* transcript exhibited two initiation sites at 69 and 150 nucleotides upstream of the initiation codon (Fig. 6B).

To corroborate that the *Ehcp112* and *Ehadh112* genes are joined in the genomic DNA, we carried out polymerase chain reaction (PCR) experiments using primers flanking the 188 bp non-coding region (sense: *Ehcp112* 991–1008 nucleotides; antisense: *Ehadh112* 106–89 nucleotides) and genomic DNA. The PCR amplified a 641 bp fragment corresponding to the predicted size, according to the primers used (Fig. 7A and C). Simultaneously, we carried out a reverse transcriptase (RT)-PCR assay using total RNA and the same primers. Reactions did not amplify

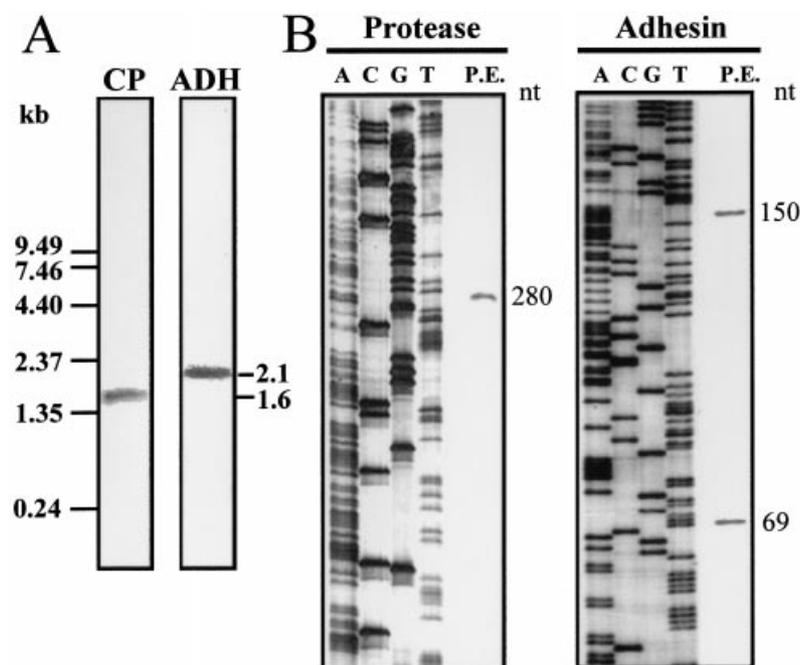


Fig. 6. Northern blot and primer extension assays.

A. Northern blot assays. *E. histolytica* poly(A)⁺ RNA was fractionated by formaldehyde-agarose electrophoresis, transferred to nylon membranes and hybridized with *Ehcp112* (CP) or *Ehadh112* (ADH) [α -³²P]-ATP-labelled probes. Molecular size markers (Gibco BRL) are indicated at the left.

B. Primer extension assays. The start sites of transcripts were mapped using antisense primers located downstream of the start codons of the *Ehcp112* (protease) and *Ehadh112* (adhesin) genes. A, C, G and T are products of the sequencing reactions using the same primers. P.E. lanes, cDNA products of the primer extension assays. Numbers indicate the distance from the start codon.

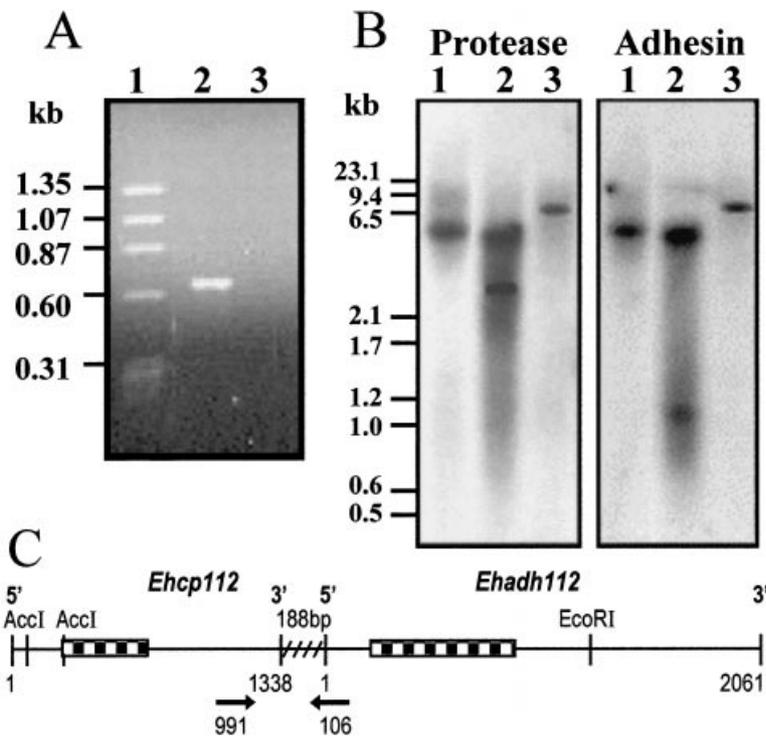


Fig. 7. PCR and Southern blot assays using *Eh112* DNA fragments as primers and probes. **A.** PCR and RT-PCR. Genomic DNA (lane 2) and cDNA (lane 3) were used as template to amplify a 641 bp fragment containing the 188 bp non-coding region of *Eh112*. Lane 1, size markers. **B.** Southern blot assays. *E. histolytica* genomic DNA (3 μ g) was digested with: *AccI* (lane 1); *EcoRI* (lane 2); *HindIII* (lane 3), electrophoresed on 1% agarose gels and blotted onto nylon membranes. The filters were hybridized with probes from *Ehcp112* (protease) and *Ehadh112* (adhesin). **C.** Map of the *Eh112* fragment. Probes used for Southern blot assays are shown as boxed areas. Primers used for PCR and RT-PCR assays are marked by arrows. Numbers below the line correspond to the nucleotide numbers in *Ehcp112* and *Ehadh112*.

any fragment in these conditions (Fig. 7A), showing the absence of a single transcript in the *Eh112* fragment. Positive controls using actin primers and internal primers for the *Ehcp112* gave the expected bands (data not shown).

We performed Southern blot experiments using endonucleases that cut in sites flanking the 5' end of the *Ehcp112* (*AccI*) or the 3' end of the *Ehadh112* (*EcoRI*) probes or outside the *Eh112* fragment (*HindIII*). Probes from each gene hybridized with the same DNA bands, except that, in *EcoRI* fragments, besides the signal for both genes at 4.1 kb, we detected specific 2.3 kb and 1.0 kb fragments for *Ehcp112* and *Ehadh112* probes, respectively, suggesting that there are two copies for both genes (Fig. 7B). At least a *Ehcp112* and a *Ehadh112* gene copy are adjacent in the genomic DNA, whereas the second genes may be joined and have an extra *EcoRI* site between the probes, or they may be separated. This second assumption is less probable because the probes gave a single band with *AccI* and *HindIII* fragments.

Proteolytic activity of the recombinant EhCP112 peptide

mAbAdh inhibited the destruction of cell culture monolayers by trophozoite extracts (Fig. 2), and the EhCP112 amino acid sequence suggests that it is a cysteine protease (Fig. 4). Inhibition of the cytotoxic effect by mAbAdh could result from the blockage of proteolytic activity present in the 112 kDa adhesin. Bacteria transfected with

the *Ehcp112* gene expressed a 53 kDa protein (49 kDa from EhCP112 and 4 kDa from the vector) that was purified through a Ni^{2+} affinity column. mAbAdh recognized a single 112 kDa band in trophozoite extracts, a 53 kDa protein in total extracts of IPTG-induced bacteria and the purified recombinant protein (Fig. 8A and B). Additionally, the purified recombinant protein, treated with pepsin, gave a 30 kDa band corresponding to the mature EhCP112 protein degraded by the pepsin, which was also recognized by mAbAdh (Fig. 8A and B). In these experiments, we detected another band of about 75 kDa that may be a remnant EhCP112-pepsin complex, because the samples were not boiled to avoid loss of protease activity. Pure pepsin was not recognized by mAbAdh (Fig. 8A and B). In the absence of protease inhibitors, the pepsin-treated peptide presented gelatinase activity, not detected in non-induced bacteria (Fig. 8C). The 112 kDa band purified from preparative gels was also recognized by the mAbAdh and showed proteolytic activity in polyacrylamide-gelatin gels (Fig. 8D).

The recombinant EhADH112 peptide inhibits adherence and phagocytosis

Different EhADH112 fragments were used in adherence and phagocytosis experiments to investigate their inhibitory effect on these functions. A peptide containing the last 240 amino acids at the carboxy-terminal region (EhADH240) was recognized by the mAbAdh (Fig. 9A and B). EhADH240

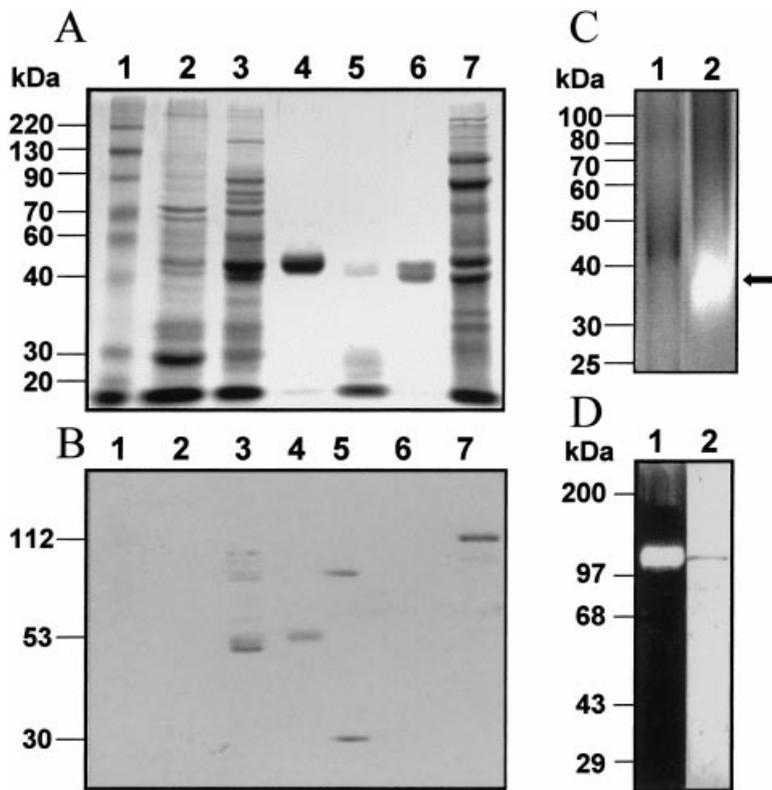


Fig. 8. Expression and proteolytic activity of the recombinant EhCP112 protein. **A.** Extracts from IPTG-induced bacteria, transformed with the *Ehcp112* gene, cloned in the pRSET vector, were separated on 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular markers; lane 2, total extracts from non-induced and induced (lane 3) bacteria; lane 4, the EhCP112 recombinant protein purified through a Ni²⁺ affinity column; lane 5, the recombinant protein digested with pepsin; lane 6, pepsin; lane 7, total extracts from *E. histolytica* trophozoites. **B.** Western blot of proteins described in (A) using mAbAdh. **C.** Proteolytic activity on polyacrylamide-gelatin gels of the pepsin-treated EhCP112 recombinant protein separated by PAGE co-polymerized with 0.1% gelatin. Lane 1, non-induced bacteria; lane 2, induced bacteria. Arrow shows the mature 34 kDa cysteine protease. **D.** Protease activity of the 112 kDa adhesin. Lane 1, the adhesin analysed on 10% SDS-PAGE co-polymerized with 0.1% gelatin and stained with Coomassie blue; lane 2, the adhesin transferred to nitrocellulose and incubated with mAbAdh.

inhibited adherence and phagocytosis by 60% and 79% respectively (Fig. 9C). In contrast, the peptide EhADH86, with the last 86 amino acids of the carboxy-terminal region, did not react with mAbAdh (Fig. 9A and B) and did not inhibit

adherence and phagocytosis, suggesting that the epitope involved in adherence could be located between residues 447 and 601 of the EhADH112 protein. mAbAdh inhibits the cytotoxic effect, a function related to protease activity,

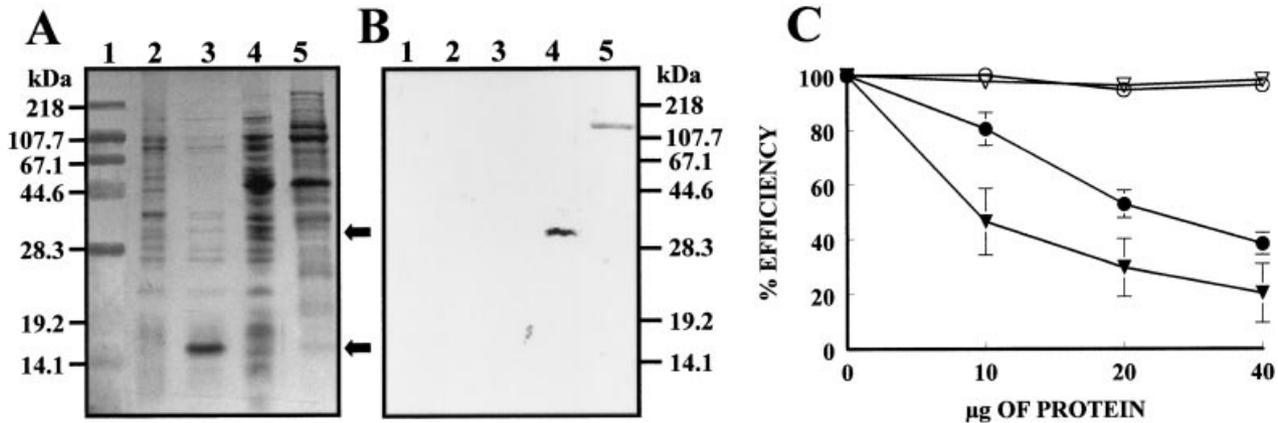


Fig. 9. Expression of the recombinant EhADH112 protein and inhibition of adherence and phagocytosis. **A.** Extracts from IPTG-induced bacteria transformed with fragments of *Ehadh112*, cloned in the pRSET vector, were separated on 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular size markers; lane 2, proteins from non-induced bacteria; lane 3, induced bacteria transformed with a plasmid encoding for the last 86 amino acids; lane 4, induced bacteria transformed with a plasmid encoding for the 240 amino acids at the carboxy-terminal region of the EhADH112; lane 5, total extracts from *E. histolytica* trophozoites. Arrows show the position of recombinant proteins in lanes 3 and 4. **B.** Western blot of proteins described in (A) using mAbAdh. **C.** Adherence and phagocytosis inhibition by EhADH240. RBCs were incubated with the EhADH240 recombinant protein for 20 min at 4°C. Then, adherence (●) and phagocytosis (▼) assays were performed. (○, ▽) Controls. Adherence and phagocytosis in the absence of the recombinant protein were taken as 100%. Bars = SD.

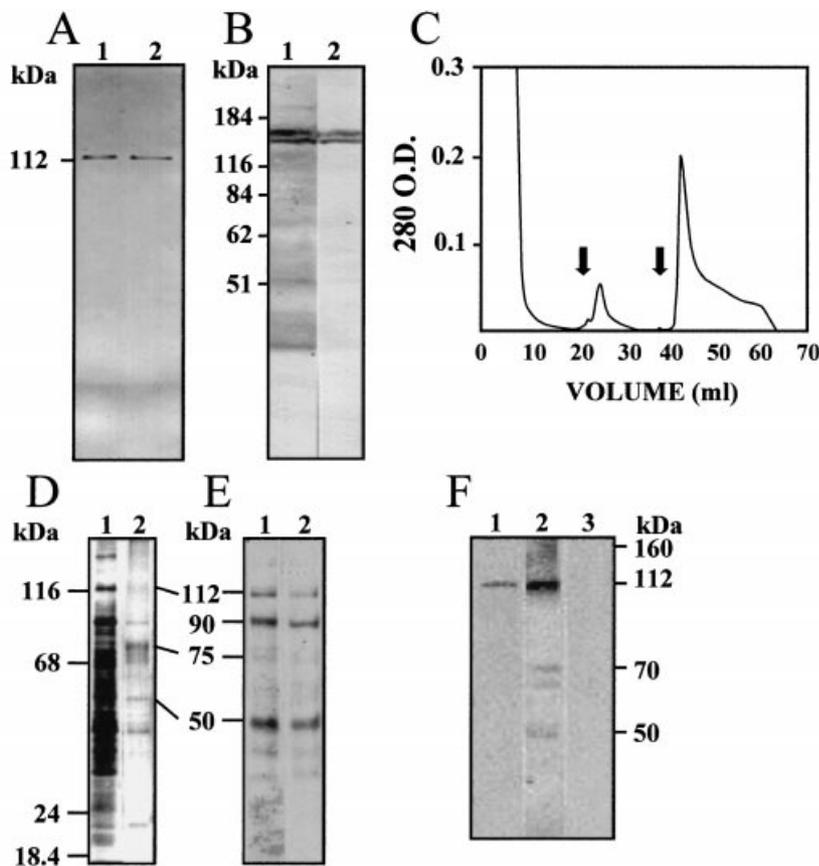


Fig. 10. Analysis and purification of the 112 kDa adhesin and ligand assays.

A. Trophozoite proteins were separated by PAGE without (lane 1) or with (lane 2) 5% β -mercaptoethanol, transferred to nitrocellulose and revealed with mAbAdh.
 B. Proteins were electrophoresed on 8M urea SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and incubated with mAbAdh without (lane 1) or with (lane 2) 5% β -mercaptoethanol. Proteins in lane 1 were over-exposed to the 4-chloro-1-naphthol.
 C. Purification of the 112 kDa adhesin by mAbAdh affinity column. Left arrow indicates the point of wash buffer addition, and right arrow indicates the point of elution buffer addition (0.05 M diethylamine, pH 11.5, 0.2% DOC).
 D. Silver-stained gel of purified proteins from the mAbAdh affinity column. Lane 1, total extracts from *E. histolytica*; lane 2, proteins eluted from the affinity column, specifically bound to mAbAdh (fractions 40–45).
 E. Western blot of the eluted proteins. Lane 1, eluted proteins separated by PAGE without or with (lane 2) 5% β -mercaptoethanol, transferred to nitrocellulose and incubated with the mAbAdh.
 F. Ligand assays. Western blot of trophozoite proteins adhered to fixed RBCs incubated with pAb112 (lane 1); IgGs against total *E. histolytica* proteins (lane 2); RBCs proteins incubated with IgGs against the 112 kDa adhesin (lane 3).

but it also inhibits adherence and phagocytosis. Besides this, it recognizes EhCP112 and EhADH112. We searched for homologous epitopes in both peptides. A 50% identity was found between the amino acids located at position 281–292 in EhCP112 and the amino acids located at 562–573 in EhADH112. This identity could explain the cross-reactivity of mAbAdh; however, more experiments are necessary to find the epitopes recognized by mAbAdh accurately in both peptides. The region with 50% identity to the EhCP112 fragment is located in the EhADH240 peptide.

The EhCP112 and EhADH112 peptides could be joined by covalent or strong electrostatic forces

Once we knew that the 112 kDa adhesin is formed by two polypeptides encoded by two different genes, we investigated the effect of reducing and denaturing agents on the adhesin. In total amoeba proteins, EhCP112 and EhADH112 peptides were not separated in PAGE by reducing agents such as 5% β -mercaptoethanol, indicating that disulphide bonds are not involved in the peptide interaction (Fig. 10A). Urea (8M) modified the protein mobility and, with or without 5% β -mercaptoethanol, a doublet was detected at \approx 142–157 kDa, which could be the 112 kDa

adhesin with the processed EhCP112 and the unprocessed EhCP112 peptides. The bands could also correspond to different degrees of glycosylation of the adhesin. However, even in over-exposed filters, the EhCP112 and EhADH112 were not detected as separated peptides (Fig. 10B, lane 1).

The 112 kDa adhesin was purified by affinity columns using mAbAdh (Fig. 10C) or PAb112 (not shown). Elution of the proteins bound to the antibody was carried out by 0.05 M diethylamine (pH 11.5). Eluted proteins were separated by PAGE and silver stained (Fig. 10D). Samples were electrophoresed without (not shown) or with 5% β -mercaptoethanol (Fig. 10D) and analysed by Western blot assays using mAbAdh (Fig. 10E) or PAb112 (data not shown). In the silver-stained gels, we observed a 112 kDa band, corresponding to the unbroken adhesin, and two others bands of \approx 75 kDa and 50 kDa, corresponding to the EhCP112 and EhADH112 peptides (Fig. 10D). Below 50 kDa, several bands of \approx 42 kDa, 37 kDa and 22 kDa appeared, probably corresponding to the processed EhCP112 or to degraded proteins, because all were recognized by mAbAdh (Fig. 10E). Another 90 kDa protein recognized by mAbAdh appeared in almost all experiments. It could be a degradation product. If EhCP112 and EhADH112 are covalently bound or strong electrostatic

forces are mediating between them; this is a question to be resolved

To investigate whether the peptides forming the adhesin were separated during phagocytosis, we carried out ligand assays using glutaraldehyde-fixed RBCs. After 20 min phagocytosis, the trophozoites were lysed by NP-40 detergent, and the ingested fixed RBCs were recovered and washed extensively. The amoeba proteins adhered to them were separated and detected by Western blot assays using pAb112 and a serum against total proteins. The pAb112 revealed a single 112 kDa band (Fig. 10F). The polyclonal antibodies against total proteins detected 160 kDa and 112 kDa bands and other minor products (Fig. 10F). Our results indicate that the EhCP112 and EhADH112 peptides function as a complex during phagocytosis.

Discussion

In this paper, we report that the *E. histolytica* 112 kDa adhesin is formed by 49 kDa and 75 kDa polypeptides, encoded by two different genes separated by 188 bp. Characterization of the genes and recombinant proteins demonstrated that the 49 kDa polypeptide is a cysteine protease (EhCP112), whereas the 75 kDa protein (EhADH112) has a domain involved in the adherence of trophozoites to target cells. The putative molecular weight of the mature protease is about 34 kDa. Both proteins (EhCP112 and EhADH112) give an estimated molecular weight of 109–124 kDa, depending on whether the EhCP112 has or has not been processed. The 112 kDa adhesin is a glycoprotein (our unpublished data), and carbohydrates may also influence its molecular size.

According to the immunofluorescence experiments, the 112 kDa adhesin is translocated during phagocytosis from the plasma membrane to phagocytic vacuoles. After 30 min interaction, the adhesin comes back to the plasma membrane. These results show that the 112 kDa adhesin is directly involved in the ingestion of the target cell by the trophozoites. Then, the adhesin is also a phagosin, i.e. a protein involved in phagocytosis.

There is a possibility that mAbAdh could recognize two independent proteins in the immunoelectron microscopy and immunofluorescence experiments. However, we show here experimental evidence supporting the hypothesis that the 112 kDa adhesin is a complex formed by the EhCP112 and EhADH112 peptides, which are not separated during phagocytosis. The complex remained in the presence of 8 M urea and β -mercaptoethanol, but was broken by extreme acid (not shown) or basic pHs. Based on these results, we hypothesize that EhCP112 and EhADH112 could be covalently joined, or strong electrostatic forces may be maintaining the complex, but this assumption needs to be proved. Experiments supporting the hypothesis that 112 kDa adhesin is formed by

EhCP112 and EhADH112 are as follows. (i) The polyclonal (pAb112) (Rodríguez *et al.*, 1989) and monoclonal antibodies (our unpublished data) against the 112 kDa adhesin detect only 112 kDa spots in two-dimensional PAGE. (ii) The pAb112 (data not shown) and the mAbAdh recognize the recombinant EhCP112 and EhADH112 polypeptides and the 112 kDa adhesin in *E. histolytica* total extracts. (iii) Polyclonal antibodies generated against a fragment of the recombinant EhADH112 protein react with a single 112 kDa band in total *E. histolytica* proteins (data not shown). (iv) Under extreme pH conditions, the 112 kDa adhesin is broken into two peptides with an estimated molecular weight of 70–72 kDa and 50–56 kDa (Rigothier *et al.*, 1992), which may correspond to EhADH112 and EhCP112 (Fig. 10C–E) respectively. (v) The purification of the 112 kDa adhesin by affinity chromatography using mAbAdh (Fig. 10C) or pAb112 (Rigothier *et al.*, 1992) gave three bands with estimated molecular weights of 112 kDa, 75 kDa and 50 kDa, which may also correspond to the 112 kDa adhesin complex and the EhCP112 and EhADH112 peptides. (vi) Ligand assays using fixed RBCs and live trophozoites or trophozoite extracts demonstrated the presence of an *E. histolytica* 112 kDa protein adhered to RBCs and recognized by pAb112 (Fig. 10F).

mAbAdh inhibited the adherence, phagocytosis and destruction of cell culture monolayers. Phagocytosis and cytopathic effect of trophozoites are two adherence-dependent functions, and the adhesin is directly involved in phagocytosis. However, the destruction of cell culture monolayers by the trophozoite extracts has no direct relationship with adherence. EhCP112 and EhADH112 peptides share an epitope with 50% identity, which could be recognized by mAbAdh in both peptides. This epitope was not found in other *E. histolytica* cysteine proteases, explaining why the mAbAdh gives a single band in Western blot experiments using total trophozoite extracts. The multiple function of surface proteins as adhesins and proteases have been reported in bacteria, such as *Staphylococcus saprophyticus* (Hell *et al.*, 1998) and *Porphyromonas gingivalis* (Pike *et al.*, 1996; Bhogal *et al.*, 1997), and in protozoan, such as *Trichomonas vaginalis* (Arroyo and Alderete, 1989). Only partial inhibition of phagocytosis and adherence was obtained with mAbAdh or with the recombinant EhADH112 peptide. The *N*-acetylgalactosamine-inhibitable lectin (Ravdin and Guerrant, 1981), which is also formed by two peptides (Petri *et al.*, 1989), participates in adherence, and a serine-rich membrane protein (Stanley *et al.*, 1990) has also been involved in the trophozoite–target cell contact. The 112 kDa adhesin and these proteins could interact with the target cell to make a more specific contact. Other cysteine proteases, in addition to EhCP112, may also be involved in cell destruction.

Northern blot and primer extension experiments showed the presence of two independent transcripts in the *Eh112*

DNA fragment, discarding the theory that the 188 bp between *Ehcp112* and *Ehadh112* could be an intron. RT-PCR experiments confirmed this, and Southern blot assay showed that the *Ehcp112* and *Ehadh112* genes are joined in the DNA. The short distance between the two genes suggests that their expression could be co-regulated. According to the promoter size of other *E. histolytica* genes (Bruchhaus *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1998), a fragment of the *Ehadh112* promoter may be inside the *Ehcp112* gene. Our transfection experiment in progress using upstream regions of both genes supports this assumption. Long UTRs were present in both genes, and no TATA boxes were located in any of them (data not shown). These similar characteristics could also be related to the expression regulation of both genes. In Northern blot assays, we always detected the *Ehcp112* or *Ehadh112* as independent transcripts, including in over-exposed and over-loaded gels, supporting the fact that both genes are independently transcribed to produce the EhCP112 and EhADH112 peptides, which form the 112 kDa adhesin.

Experimental procedures

E. histolytica cultures

Trophozoites of clone A strain HM1:IMSS (Orozco *et al.*, 1983) were cultured axenically in TYI-S-33 medium and harvested during the logarithmic growth phase (Diamond *et al.*, 1978).

Immunolocalization of the adhesin by TEM and fluorescence microscopy

Trophozoites were fixed for 30 min at 37°C with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer and washed with phosphate-buffered saline (PBS). Permeabilized (0.5% Triton X-100) or non-permeabilized trophozoites were incubated for 60 min at 37°C with mAbAdh (titre 1:400), obtained as described previously (Arroyo and Orozco, 1987). Then, cells were incubated for 5 min at room temperature with 5% goat normal serum in PBS, for 30 min with goat anti-mouse biotinylated IgGs (BRL, USA) (titre 1:200) and for 30 min with the streptavidin-colloidal gold complexes (BRL, USA) diluted 1:10 in 20 mM Tris, pH 8.2, 0.15 M NaCl and 1% BSA (Sigma Chemicals). Trophozoites were post-fixed with 1% OsO₄, dehydrated through a graded series of ethanols and propylene oxide and embedded in Epon 812. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a JEOL-100-SX EM. Preimmune and a non-related serum were used as controls in all experiments.

For immunofluorescence assays, the trophozoites were incubated with RBCs (1:100) for different times. In some experiments, non-ingested RBCs were hypotonically lysed, and samples were fixed with 3% paraformaldehyde for 2 h. Cells were embedded in 5% gelatin in PBS, post-fixed with paraformaldehyde for 2 h at room temperature, blocked by

glycine, incubated for 15 min in a graded series of PBS/2.3 M saccharose and cryosectioned (Tokuyasu, 1973). Samples were stained with 0.0025% Evans blue in 0.1 M PBS for 30 min, incubated with mAbAdh for 1 h at 37°C, for 5 min with 3% goat normal serum and for 30 min at 37°C with a fluorescein-labelled anti-mouse second antibody (1:100). Preparations from three independent experiments were observed through a fluorescence microscope (Polyvar).

Adherence, erythrophagocytosis, cytopathic and cytotoxic assays

Adherence, phagocytosis, cytopathic effect and cytotoxic assays were carried out as described previously (Orozco *et al.*, 1983; Bracha and Mirelman, 1984). For inhibition assays, trophozoites or target cells were preincubated at 4°C for 20 min with mAbAdh or with recently obtained recombinant protein respectively. All experiments were carried out in duplicate at least five independent times.

Cloning and sequencing of the 112 kDa adhesin

An 800 bp insert encoding for a peptide recognized by mAb5 against the 112 kDa adhesin (García-Rivera *et al.*, 1997b) was random primer labelled with [α -³²P]-dATP (Boehringer Mannheim) and used as a probe on a λ ZapII cDNA library (Sánchez *et al.*, 1994). Then, a 600 bp DNA fragment was PCR amplified from a positive cDNA clone and used as a probe to obtain a 5.6 kb clone from a λ ZapII genomic library (Descoteaux *et al.*, 1992). Sequencing was performed with overlapping oligonucleotides by the dideoxynucleotide chain-termination method (Sanger *et al.*, 1977) using Sequenase kit, version 2.0 (US Biochemicals) (these sequences have been submitted to the DDJ/EMBL/GenBank databases under accession number AF127375). Sequence data analysis and sequence alignments were performed with the FASTA algorithm (Pearson and Lipman, 1988) in the EMBL and GenBank databases. The localization of consensus sequences was performed with the software package of the University of Wisconsin Genetics Computer Group (Devereux *et al.*, 1984) and the TM base computer program (Hofman and Stoffel, 1993).

Northern blot, primer extension, Southern blot and PCR assays

For Northern blot assays, poly(A⁺) RNA was purified from total RNA through a poly(U)-Sephadex column (Gibco BRL). Five micrograms were electrophoresed on 1% formaldehyde (w/v) agarose gels and transferred to nylon membranes (Sambrook *et al.*, 1989). *Ehcp112* (242–665 bp) and *Ehadh112* (239–839 bp) probes were α -³²P-labelled using a random-primed DNA labelling kit (Sambrook *et al.*, 1989) and used for hybridization. Hybridization was performed at 42°C, and filters were washed at 42°C, 0.1% SDS and 0.1 \times SSC.

Primer extension assays were carried out using a reverse transcriptase sequencing kit (Promega) (Sambrook *et al.*, 1989). Ten micrograms of total RNA were hybridized to a γ end-labelled 17 bp primer (5'-CCGTAGACAAATTGTTT-3') complementary to nucleotides +80 to +97 of the *Ehcp112* gene or to a 17 bp primer (5'-TCTAACACACAGTTCTG-3')

complementary to nucleotides +89 to +106 of the *Ehadh112* gene. Annealing was carried out at 42°C for 25 min and extension at 42°C for 30 min with 15 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega). Nucleic acids were separated by electrophoresis on 8% urea–polyacrylamide gels. The product lengths were determined by comparison with DNA sequences obtained with the same primer.

PCR assays were performed using primers flanking the 188 bp non-coding region and genomic *E. histolytica* DNA as template. As a sense primer, we used an oligonucleotide complementary to the +991 to +1008 bp of the *Ehcp112* (5'-TAGTATTGATGGATGGG-3') and as an antisense primer an oligonucleotide complementary to the +106 to +89 bp of *Ehadh112* (5'-TCTAACACACAGTTCTG-3'). PCR was carried out at 94°C, 47°C and 72°C, 1 min each for 30 cycles. For RT–PCR assays, 2 µg of total RNA was used to synthesize the cDNA using a reverse transcriptase sequencing kit (Sambrook *et al.*, 1989). Then, PCR was performed with the same primers and under the same conditions. Positive controls were performed using actin primers and internal primers for the coding regions of the *Ehcp112* and *Ehadh112* genes. For Southern blot assays, 3 µg of *E. histolytica* DNA was digested with *AccI*, *EcoRI* and *HindIII*, and the products were separated on 1% agarose gels, transferred to nylon membrane and hybridized with *Ehcp112* (242–667 bp) and *Ehadh112* (239–839 bp) probes, α -³²P-labelled by the random-primed DNA labelling kit.

Cloning and expression of EhCP112 and EhADH112 peptides in the pRSET vector

The whole *Ehcp112* gene and different DNA fragments of the *Ehadh112* gene were cloned in the pRSET expression vector. *E. coli* strain BL21(DE3) (Novagen) was transformed with the plasmids, and recombinant proteins were expressed by induction with 1 mM IPTG for 3 h at 37°C (Sambrook *et al.*, 1989). Proteins were separated by SDS–PAGE with or without 5% β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970) and transferred to nitrocellulose membranes for mAbAdh recognition by Western blot assays (Towbin *et al.*, 1979). Recombinant proteins were purified under denaturing conditions through a Ni²⁺-NTA affinity column (Qiagen).

Proteolytic activity

For proteolytic activity assays, total *E. histolytica* proteins without protease inhibitors were separated on a 10% SDS–PAGE with 5% β-mercaptoethanol. The adhesin was identified by Western blot assays (Towbin *et al.*, 1979) and purified from the preparative gels. All procedures were carried out at 4°C. The purified adhesin or extracts from *E. coli* containing the pRSET-*Ehcp112* plasmid were electrophoresed in 10% SDS–PAGE co-polymerized with 0.1% gelatin as described previously (Rigotherier *et al.*, 1992). Proteolytic activity was located as a clear band against the Coomassie blue-stained background.

SDS–PAGE and Western blot

Trophozoites were washed twice in PBS at 4°C and lysed by

freeze–thawing in the presence of 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 20 mM *p*-hydroxymercuribenzoic acid (PHMB). The samples were boiled with or without 5% β-mercaptoethanol in Laemmli buffer, with or without 8 M urea. Samples were electrophoresed on 10% SDS–PAGE or 8 M urea SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with the mAbAdh overnight at 4°C, then with goat anti-mouse peroxidase for 4 h at room temperature and, finally, with 4-chloro-1-naphthol and 0.04% H₂O₂ (Towbin *et al.*, 1979).

Purification of the 112 kDa adhesin by immunoaffinity chromatography

Total proteins (20 µg) with protease inhibitors (100 mM PHMB and 100 mM *N*-ethylmaleimide) were purified in an affinity column prepared with mAbAdh according to March *et al.* (1974). After passing the amoeba extracts through the column, it was exhaustively washed with buffer (0.02 M Tris–HCl, pH 8.3, 0.15 M NaCl and 0.2% DOC) to removed unbound proteins. The proteins bound to the Sepharose–mAbAdh were eluted with a buffer containing 0.05 M diethylamine, pH 11.5, and 0.2% DOC (Williams and Barclay, 1984). Protein concentration was monitored at 280 nm, and eluant peaks were electrophoresed on 7.5% SDS–PAGE with or without 5% β-mercaptoethanol. Gels were silver stained, and proteins were transferred to nitrocellulose and incubated with mAbAdh for Western blot assays.

Ligand assays

These experiments were carried out as described previously (Rodríguez *et al.*, 1989). Briefly, trophozoites were incubated for 20 min at 37°C with 2.5% glutaraldehyde-fixed human RBCs in the presence of 1 mg ml⁻¹ BSA. Then, trophozoites were lysed by 0.1% NP-40; RBCs were recovered and washed exhaustively. RBCs were boiled in Laemmli buffer with 5% β-mercaptoethanol and centrifuged; supernatants containing amoebic proteins released from the RBC surface were subjected to 10% SDS–PAGE. Gels were transferred to nitrocellulose and incubated with mAbAdh or with a serum against total amoebic proteins.

Acknowledgements

Dr E. Orozco is an International Fellow of the Howard Hughes Medical Institute (USA). This work was also supported by CONACyT (México) and INSERM (France). We are also grateful for the excellent technical assistance of Mr Alfredo Padilla-Barberi for the photographic work.

References

- Ankri, S., Stolarsky, T., and Mirelman, D. (1998) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* **28**: 777–785.
- Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F., and Mirelman, D. (1999) Antisense inhibition of expression of

- cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun* **67**: 421–422.
- Arroyo, R., and Alderete, F. (1989) *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* **57**: 2991–2997.
- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 151–158.
- Berti, P.J., and Storer, A.C. (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol* **246**: 273–283.
- Bhagal, S.P., Sialeski, N., and Reynolds, C.E. (1997) A cell-associated protein complex of *Porphyromonas gingivalis* W50 composed of Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. *Microbiology* **143**: 2485–2495.
- Bracha, R., and Mirelman, D. (1984) *Entamoeba histolytica* trophozoites: effects of bacteria, microaerobic conditions and metronidazole. *J Exp Med* **160**: 353–368.
- Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C., and Tannich, E. (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol* **12**: 925–933.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., and Tannich, E. (1996) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* **22**: 255–263.
- Cohen, L.W., Coghlan, V.M., and Dihel, L.C. (1986) Cloning and sequencing of papain encoding cDNA. *Gene* **48**: 219–227.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Samuelson, J., and Orozco, E. (1992) Primary sequences of two P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **54**: 200–202.
- Devereux, J., Haerberli, P., and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387–395.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., and 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.
- Gadasi, H., and Kessler, E. (1983) Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **39**: 528–531.
- García-Rivera, G., Arroyo, R., Mena, R., Luna, J., and Orozco, E. (1997a) Involvement of the 112 kDa adhesin in *Entamoeba histolytica* phagocytosis. *Arch Med Res* **28S**: 166–167.
- García-Rivera, G., Avila, A., Ayala, P., Arroyo, R., Rigotherier, M.C., and Orozco, E. (1997b) Identification and location of the cell-binding domain in the 112 kDa adhesin gene of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **28S**: 164–165.
- Gómez, C., Pérez, D.G., López-Bayghen, E., and Orozco, E. (1998) Transcriptional analysis of the *EhPgp1* promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem* **273**: 7277–7284.
- Hell, W., Meyer, W.H., and Gaterman, S.G. (1998) Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol Microbiol* **29**: 871–881.
- Hidalgo, M.E., and Orozco, E. (1997) Structural characterization of the *Entamoeba histolytica* enolase gene promoter. *Arch Med Res* **28**: 46–48.
- Hofman, K., and Stoffel, W. (1993) TM base-A data base of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **347**: 166.
- Horwitz, A.F. (1997) Integrins and health. *Sci Am* **May**: 46–53.
- Karrer, K.M., Pfeiffer, S.L., and DiTomas, M.E. (1993) Two distinct subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3063–3067.
- Keene, W.E., Hidalgo, M.E., Orozco, E., and McKerrow, J.H. (1990) *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine protease. *Exp Parasitol* **71**: 199–206.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- McKerrow, J.H. (1989) Parasite proteases. *Exp Parasitol* **68**: 111–115.
- March, S.C., Parikh, I., and Cuatrecasas, P. (1974) A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem* **60**: 149.
- Montfort, I., Olivos, A., and Pérez-Tamayo, R. (1993) Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* **79**: 160–162.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., and Sánchez, T. (1983) *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158**: 1511–1521.
- Orozco, E., Suárez, M.E., and Sánchez, T. (1985) Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *Int J Parasitol* **15**: 655–660.
- Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444–2448.
- Pérez, D.G., Gómez, C., López-Bayghen, E., Tannich, E., and Orozco, E. (1998) Transcriptional analysis of the *EhPgp5* promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem* **273**: 7285–7292.
- Petri, W.A., Smith, R.D., Schlesinger, P.H., and Ravdin, J.I. (1987) Isolation of the galactose binding lectin which mediates the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* **80**: 1238–1244.
- Petri, W.A., Chapman, M.D., Snodgrass, T., Mann, B.J., and 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.
- Pike, N.R., Potempa, J., McGraw, W., Coetzer, H.T., and Travis, J. (1996) Characterization of the binding activities of proteinase–adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **178**: 2876–2882.
- Purdy, J.E., Pho, L.T., Mann, B.J., and Petri, W.A. (1996) Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 91–97.
- Ravdin, J.I., and Guerrant, R.L. (1981) Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* **68**: 1305–1313.
- Reed, S., Bouvier, J., Hirata, K., Que, X., Pollack, A.S., Engel, J.C., et al. (1992) A unique proteinase gene of pathogenic *Entamoeba histolytica* correlates with virulence. *Arch Med Res* **23**: 181–182.

- Rigothier, M.C., García-Rivera, G., Guaderrama, M., and Orozco, E. (1992) Purification and functional characterization of the 112 kDa adhesin. *Arch Med Res* **23**: 239–241.
- Rodríguez, M.A., Hernández, F., Santos, L., Valdéz, A., and Orozco, E. (1989) *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell–parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol* **37**: 87–100.
- Rosales-Encinas, J.L., Meza, I., de López León, A., Talamás-Rohana, P., and 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, M.A., Peattie, D.A., Wirth, D., and Orozco, E. (1994) Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* α -tubulin-encoding gene. *Gene* **146**: 239–244.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463–5467.
- Scholze, H., and Schulte, W. (1988) On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed Biochim Acta* **47**: 115–123.
- Spice, W.M., and Ackers, J.P. (1992) The effect of axenic versus xenic culture conditions on the total and secreted proteolytic activity of *Entamoeba histolytica* strains. *Arch Invest Med* **23**: 91–93.
- Stanley, S.L., Becker, A., Kunz-Jenkin, C., and Foster, L. (1990) Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4976–4980.
- Tannich, E., Nickel, R., Buss, H., and Horstman, R.D. (1992) Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **54**: 109–112.
- Tokuyasu, K.T. (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* **57**: 551–565.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350–4356.
- Vinayak, V.K., and Shandil, R.K. (1990) Recognition of 29 kDa surface-associated adhesive molecule of *Entamoeba histolytica* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Immunol* **64**: 169–178.
- Vohra, H., Kaur, S., Wangoo, A., Ganguly, N.K., and Mahajan, R.C. (1992) Inhibition of adhesion by monoclonal antibody to 66 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **23**: 235–237.
- WHO (1997) Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiol Record* **72**: 97–100.
- Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1984) Glycoproteins antigens of the lymphocyte surface and their purification by antibody affinity chromatography. In *Handbook of Experimental Immunology*. Weir, D.M. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific.

EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence

Ramón Ocádiz,¹ Esther Orozco,² Eduardo Carrillo,² Laura Itzel Quintas,³ Jaime Ortega-López,³ Rosa María García-Pérez,² Tomas Sánchez,² Beatriz A. Castillo-Juárez,² Guillermina García-Rivera² and Mario A. Rodríguez^{2*}

¹Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN, Guillermo Massieu Helguera #239, México, DF, 07320.

²Departamento de Patología Experimental and

³Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, AP 14-740 México, DF, 07000.

Summary

EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* protease that together with the EhADH112 protein forms the EhCPADH complex involved in trophozoite virulence. Here, we produced the recombinant EhCP112 and studied its relationships with extracellular matrix components and with target cells. A DNA fragment containing the pro-peptide and the mature enzyme was expressed in bacteria as an active enzyme (rEhCP112), whereas the full gene containing the signal peptide, the pro-peptide and the mature enzyme expressed a non-active protein. The fragment only with the mature enzyme was not expressed. rEhCP112 purified by affinity columns digested azocasein and had a strong autoproteolytic activity. Four hours after purification the protein appeared degraded. Anti-tag antibodies, monoclonal antibodies against the EhCP112 and sera for human patients with amoebiasis recognized rEhCP112. rEhCP112 digested gelatin, collagen type I, fibronectin and haemoglobin; it destroyed MDCK cell monolayers and bound to red blood cells. The native EhCP112 was poorly expressed in a virulence-deficient mutant, and in the wild-type clone it was located in secreted vesicles, forming the EhCPADH complex. Altogether these results show that EhCP112 is a molecule able to disrupt cell monolayers and digest proteins of the extracellular matrix and haemoglobin, and it is secreted by the trophozoites.

Introduction

Cysteine proteinases (CPs) have been associated in protozoan parasites to cytoadherence, haemolysis, cytotoxicity, degradation of extracellular matrix components, evasion of the immune response and nutrient acquisition (McKerrow *et al.*, 1993; Alderete and Provenzano, 1997; Alvarez-Sanchez *et al.*, 2000; Mendoza-Lopez *et al.*, 2000; Klemba and Goldberg, 2002; Sajid and McKerrow, 2002). All these functions are related to tissue colonization and invasion by the parasites; and characterization of CPs genes and their products have confirmed their relevance in host tissue invasion and colonization (Rosenthal *et al.*, 1994; Bruchhaus *et al.*, 1996; Bart *et al.*, 1997; Omara-Opyene and Gedamu, 1997; Tomas *et al.*, 1997; Hellberg *et al.*, 2002; Joshi *et al.*, 2002; Que *et al.*, 2002; Mottram *et al.*, 2003; Skelly *et al.*, 2003).

Since 1986 that Keene *et al.* identified the first CP in *Entamoeba histolytica*, the protozoan responsible for human amoebiasis, 20 different CPs belonging to the clan CA have been found (Bruchhaus *et al.*, 2003). However, only few are expressed in cultured trophozoites (Bruchhaus *et al.*, 2003) and few *E. histolytica* CPs genes have been cloned and characterized (Bruchhaus *et al.*, 1996; Hellberg *et al.*, 2002; Que *et al.*, 2002). *E. histolytica* CPs disrupt cell culture monolayers (Feingold *et al.*, 1985; Jacobs *et al.*, 1998), and virulence of the strains correlates with the CP activity showed by the trophozoite extracts (Gadasi and Kobiler, 1983; Lushbaugh *et al.*, 1984; Reed *et al.*, 1989a; Keene *et al.*, 1990; Benitez-Bribiesca *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1998; Carpeniseanu *et al.*, 2000). In experimental amoebiasis, liver abscesses formation is abolished by specific CPs inhibitors (Li *et al.*, 1995). Moreover, the inhibition of CPs expression by specific antisense RNAs induces a low rate of phagocytosis in trophozoites (Ankri *et al.*, 1998), reduces the liver abscesses production (Ankri *et al.*, 1999) and prevents intestinal inflammation in animal models resulting from the IL-1 β converting activity displayed by *E. histolytica* (Zhang *et al.* 2000).

Using monoclonal antibodies and adherence-deficient mutants, we identified an *E. histolytica* adhesin with a molecular weight estimated by SDS-PAGE in 112 kDa (Arroyo and Orozco, 1987). The isolation of the DNA encoding for this molecule revealed that it is a two polypeptides complex (EhCPADH) formed by an adhesin

Received 16 June, 2004; revised 22 July, 2004; accepted 9 August, 2004. *For correspondence. E-mail marodri@mail.cinvestav.mx; Tel. (+52) 55 50613800, ext. 5653; Fax (+52) 55 50613800.

(EhADH112) and a CP (EhCP112), and according with the amino acid sequences of both polypeptides, the molecular weight of this complex is 124.6 kDa (Garcia-Rivera *et al.*, 1999). EhCPADH binds to target cells and it is internalized with them during phagocytosis (Rodriguez *et al.*, 1989; Garcia-Rivera *et al.*, 1999). Antibodies against the EhCPADH complex inhibit trophozoites adherence and phagocytosis and reduce the cell cultures destruction produced by live trophozoites and their extracts (Arroyo and Orozco, 1987; Rodriguez *et al.*, 1989; Garcia-Rivera *et al.*, 1999). Two adjacent genes separated only by 188 bp encode EhCP112 and EhADH112 polypeptides. In addition, the *Ehcp112* gene is separated by 332 bp of the *EhRabB* gene, involved also in phagocytosis (Rodriguez *et al.*, 2000), whose open reading frame is in the complementary DNA strand. The transcriptional regulatory regions of these three genes are inside the open reading frame of one of the other two genes (our unpublished results) forming a cluster of genes involved in virulence functions, suggesting that their expression might be co-regulated.

EhCP112 is a 446 aa polypeptide, that, according to the TMpred programme (Hofmann and Stoffel, 1993), has a putative transmembranal segment. It also contains a RGD domain that may interact with cellular integrins (Garcia-Rivera *et al.*, 1999). Remarkably, immunization of hamsters with the recombinant EhADH112 protein or with a mixture of *Ehadh112* and *Ehcp112* cDNA inhibits liver abscesses formation by virulent trophozoites (Madriz *et al.*, 2004; Martinez-Lopez *et al.*, 2004). Here, we studied the biological characteristics of EhCP112 as well as its role in virulence using the recombinant active rEhCP112 produced in *Escherichia coli* and showed that EhCP112 is secreted by live trophozoites.

Results

Expression of an active recombinant EhCP112

The *Ehcp112* gene (Fig. 1A) has two characteristics that make it an interesting molecule to be studied: (i) It has the RDG domain. Among the 20 *E. histolytica* CPs described, only the EhCP5, EhCP18 and EhCP112 present this domain, but the *EhCP5* RDG is out of the mature CP (Bruchhaus *et al.*, 2003), suggesting that it may not be functional and EhCP18 gene has been poorly studied. (ii) The EhCPADH complex, formed by EhCP112 and EhADH112, is located in cytoplasmic vesicles and in the plasma membrane of the trophozoites and it is involved in the parasite virulence (Garcia-Rivera *et al.*, 1999). To study the biological characteristics of the EhCP112 protein, separated of the EhCPADH complex, we produced the recombinant EhCP112 (rEhCP112). We generated three distinct constructs containing different fragments of

the *Ehcp112* gene to select the construct that produced an active enzyme. The 1338 bp full-length *Ehcp112* gene was expressed in bacteria as a 54 kDa polypeptide (Fig. 1B) containing the signal peptide, the pro-peptide, the mature enzyme and the poly-histidine tag (4.8 kDa) encoded by the pTrcHis C vector. This protein has no activity on polyacrylamide-gelatin gels (Fig. 1B), but it presented proteolytic activity after limited digestion with pepsin, which produced an approximately 34 kDa active peptide (Garcia-Rivera *et al.*, 1999). The 1278 bp gene fragment expressed a 52 kDa polypeptide (46.9 kDa of the CP) with the pro-peptide and the mature enzyme (Fig. 1C). This polypeptide displayed protease activity, demonstrated by the presence of a 52 kDa clear band on polyacrylamide-gelatin gels (Fig. 1C). rEhCP112 activity was inhibited by E64, TLCK and N-ethyl maleimide (NEM), which are CPs inhibitors, whereas PMSF and EDTA have no effect on its activity (data not shown). The 984 bp gene fragment was not expressed in bacteria, probably because of the toxicity of the mature protease (Fig. 1D). The 52 kDa rEhCP112 polypeptide was used in all experiments reported here.

Purification of rEhCP112

The 52 kDa rEhCP112 polypeptide was purified through Ni²⁺-NTA affinity columns using extracts from induced bacteria (Fig. 2A). rEhCP112 was detected at 280 nm of absorbance in a single fraction of the column elute. In SDS-PAGE, carried out immediately after the purification, this fraction presented at least two bands, the upper one (52 kDa) appeared enriched in comparison with proteins of the same migration detected in other fractions (Fig. 2A, inset). Figure 2B exhibits a representative experiment on the enzyme activity on azocasein immediately after its purification. Using 6 µg of the enzyme, the substrate digestion was lineal but low, whereas with 60 µg of rEhCP112, azocasein digestion was higher and also lineal. Both graphics presented a slope of 0.0002 units of absorbance µg⁻¹ min⁻¹, indicating that the specific velocity of rEhCP112 is the same in both concentrations with a specific activity of 0.99 U µg⁻¹ of rEhCP112. When we performed the experiments 24 h after purification, the enzyme showed very low activity (data not shown). By Western blot experiments, we evaluated the proteolysis of the enzyme after different times of purification. The rEhCP112 protein was electrophoresed immediately after purification or incubated at 4°C for 2 and 4 h after its elution from the column. In the elution fraction analysed immediately or before 2 h purification, the anti-tag antibodies recognized the 52 kDa band (Fig. 2C, lane 1) and in some experiments they also reacted with other bands of lower molecular weight. Four hours after purification, this band, probably corresponding to the active enzyme,

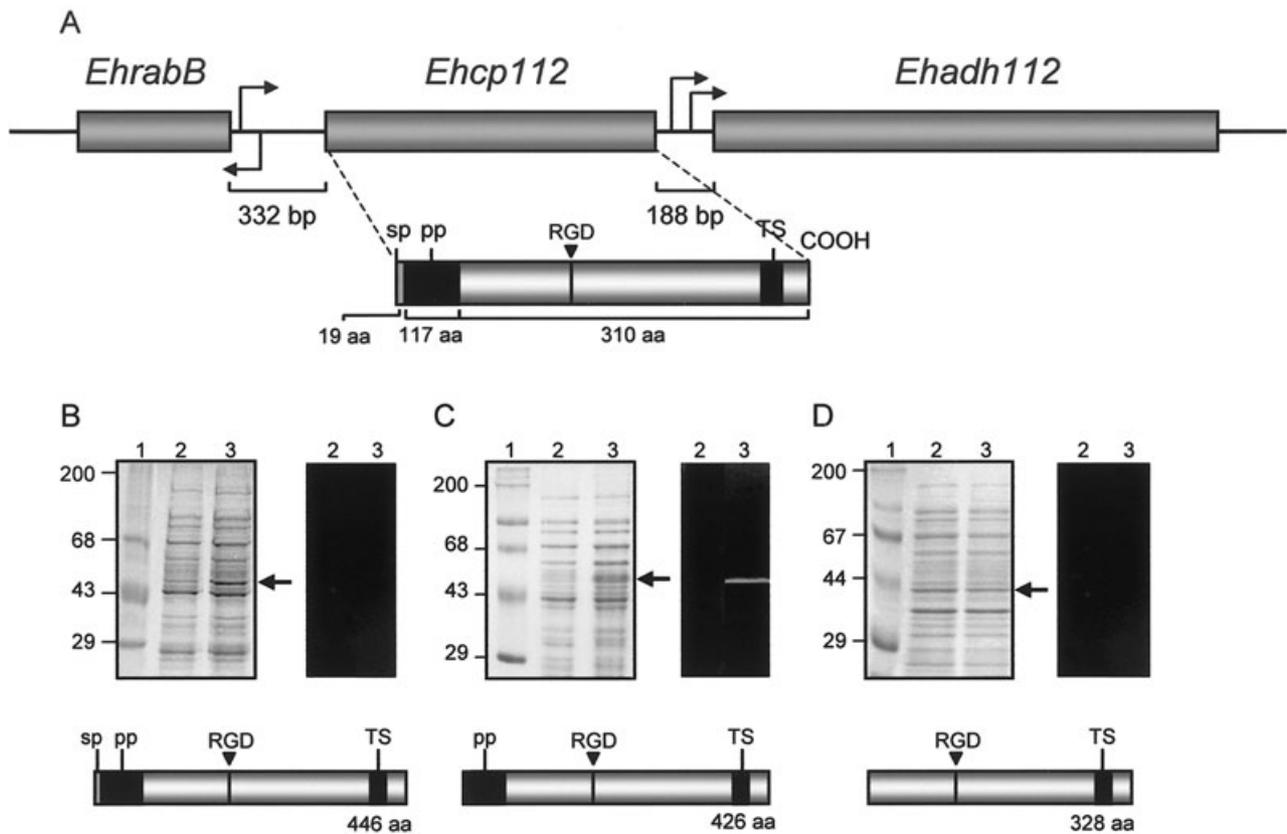


Fig. 1. Cloning and expression of different Ehcp112 gene fragments.

A. Diagram of the *Ehcp112* gene located in the *E. histolytica* genome between *Ehadh112* and *EhrabB* genes. Numbers below show the bp of the non-coding regions between genes. Arrows indicate the transcription initiation sites and transcription sense. Below the diagram is the putative EhCP112 protein encoded by *Ehcp112* with 19 aa of the signal peptide, 117 aa of the pro-peptide and 310 aa of the mature enzyme.

B–D. Proteins of bacteria transformed with different fragments of *Ehcp112* gene (below each gel is the diagram of the corresponding polypeptide encoded by each gene fragment). Lane 1, molecular weight markers; lane 2, non-induced bacteria; lane 3, IPTG-induced bacteria. Black squares at the right of each gel show the polyacrylamide-gelatin gels with the bacteria proteins. Arrows in the gels indicate the recombinant EhCP112 protein. In the bottom of the gels are represented the rEhCP112 polypeptides encoded by each construction. sp, signal peptide; pp, pro-peptide; RGD, integrin-attachment domain; TS, transmembranal sequence.

diminished (Fig. 2C, lane 2). In nitrocellulose membranes containing rEhCP112 electrophoresed 4 h after its purification, the polyclonal antibodies against EhCP112 revealed a smear from the upper band to the bottom of the gel, showing the enzyme degradation (Fig. 2C, lane 4). Controls omitting the first antibodies gave no reaction with the anti-tag or with the anti-EhCP112 antibodies (Fig. 2C, lanes 3,5). These results suggested that rEhCP112 may be degraded by autoproteolysis or by a contaminating bacterial protease. According with these results, further analyses were always performed using fresh enzyme preparations.

EhCP112 is immunogenic in human patients

In Western blot assays anti-histidine tag antibodies recognized two 52 and 40 kDa bands in extracts from induced bacteria (Fig. 3A, lane 2), but not in non-induced bacteria (Fig. 3A, lanes 1), demonstrating that they reacted specif-

ically with rEhCP112. Then, we purified the enzyme as above and performed a preparative gel with the purified protein that was transferred to nitrocellulose. Several strips were cut and incubated with different antibodies. The identity and integrity of the purified enzyme was corroborated by Western blot assays using the anti-EhCPADH mAb (Fig. 3B, lane 1). This mAb recognizes a common epitope in the EhCP112 and EhADH112 polypeptides and reacts with a single 124.6 kDa band in total *E. histolytica* proteins, which corresponds to the EhCPADH complex (Garcia-Rivera *et al.*, 1999; Madriz *et al.*, 2004). The mAb recognized the two 52 and 40 kDa bands.

The immunogenicity of the enzyme *in vivo* was investigated using human sera of patients with amoebiasis and strips of the preparative gel. All sera tested ($n = 10$) reacted with the same two bands of 52 and 40 kDa. Representative results are shown in Fig. 3B, lanes 2–4. The sera of healthy persons ($n = 5$) did not react with the

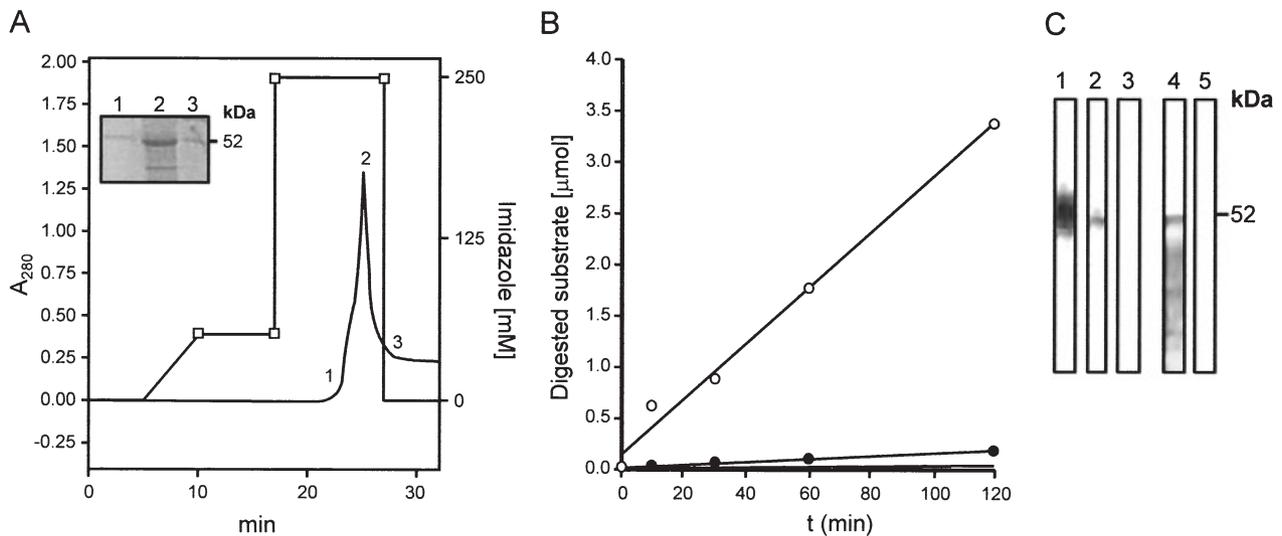


Fig. 2. Purification of the active rEhCP112 protein.

A. rEhCP112 was purified from induced bacteria extracts using Ni²⁺-NTA resin. Continuous line indicates the A₂₈₀ of the fractions eluted from the column. Numbers indicate the three fractions that are in the gel in the inset. (□-□) imidazole concentration.

B. Activity on azocasein of 6 (●-●) and 60 (○-○) µg of the rEhCP112 obtained from fraction 2 in A.

C. Western blot of gels containing rEhCP112 2 h (lanes 1,3,5) and 4 h (lanes 2,4) after its purification. Lanes 1-3, anti-tag antibodies; lanes 4-5, anti-rEhCP112 antibodies; lanes 3 and 5, controls in which the primary antibody was omitted.

rEhCP112 enzyme (Fig. 3B, lane 5), neither with the controls in which primary antibodies were omitted (data not shown). Our results suggest that the EhCP112 enzyme is immunogenic in patients with human amoebiasis. Although these experiments showed that human sera recognize EhCP112, they do not discard that this recognition could be due to cross-reactivity of the antibodies against other *E. histolytica* CPs. However, the similar patterns seen with human sera and with the monoclonal antibodies could also suggest that all antibodies are recognizing the same protein.

rEhCP112 degrades collagen type I, fibronectin and destroys cell monolayers

In general, CPs participate in invasion of tissues by *E. histolytica* trophozoites (Reed *et al.*, 1989b; Bruchhaus *et al.*, 1996; Ankri *et al.*, 1999). During invasion, CPs face different substrates in the host, mainly those forming the extracellular matrix, which may be degraded to allow the trophozoite invasion. We investigated the activity of rEhCP112 on collagen type I and fibronectin. As control, we used total *E. histolytica* extracts on polyacrylamide-collagen and -fibronectin gels. rEhCP112 degraded both collagen type I and fibronectin (Fig 4A and B). Migration of the protease in the gels and degradation patterns were different for both substrates. While on collagen type I we observed a smear and a 52 kDa band (Fig. 4A), on fibronectin a single band with an atypical migration was reproducibly detected (Fig. 4B). The trophozoite extracts

showed a smear from the origin to the bottom of the gel on both substrates, but activity on collagen type I was much stronger (Fig 4A and B).

Cell monolayers destruction by trophozoites extracts begins with the rounding of the cells, followed by their release from the substrate suggesting that trophozoites proteases produce cell detachment (Ravdin *et al.*, 1980). To determine whether EhCP112 participates in this event, MDCK cell monolayers were incubated with distinct amount of rEhCP112. After 1-2 h interaction, trophozoites

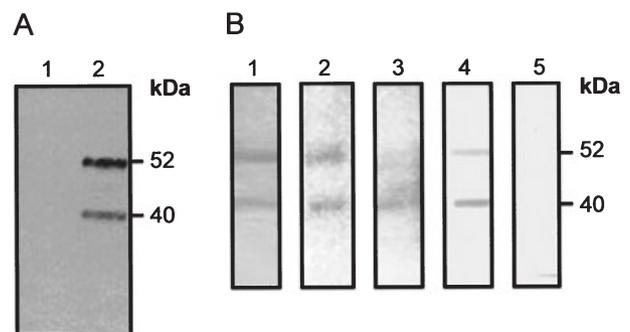


Fig. 3. Immunogenicity of EhCP112. rEhCP112 was expressed in IPTG-induced bacteria, purified by Ni²⁺-affinity columns and analysed by Western blot.

A. Extracts from non-induced (lane 1) and IPTG-induced (lane 2) bacteria detected by anti-tag antibodies.

B. Strips of nitrocellulose membrane in which the purified rEhCP112 was transferred from a preparative gel revealed by: lane 1, anti-EhCPADH mAb; lanes 2-4, human sera from patients with amoebiasis; lane 5, human serum from a healthy person.

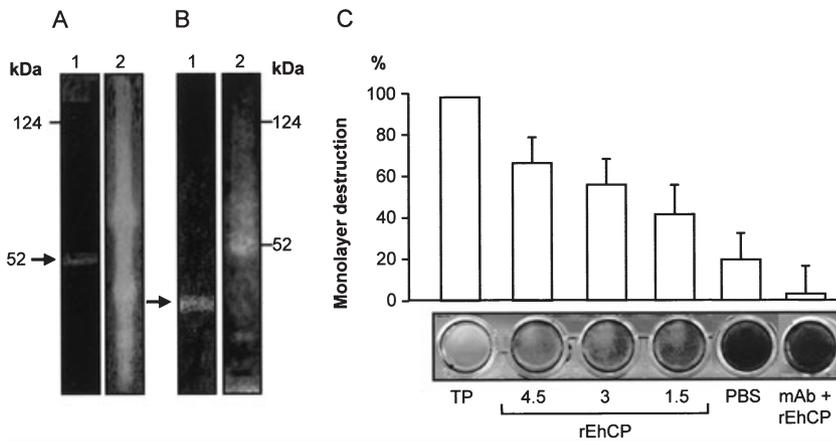


Fig. 4. rEhCP112 has activity on collagen type I, fibronectin and MDCK monolayers. A. Polyacrylamide-collagen gels. B. Polyacrylamide-fibronectin gels. Lane 1, purified rEhCP112; lane 2, total trophozoite extracts. Arrows indicate the 52 kDa recombinant EhCP112 polypeptide. C. MDCK monolayer destruction using: TP, extracts from 1×10^6 trophozoites; 4.5, 3 and 1.5 μg of the purified rEhCP112; PBS, monolayer incubated only with PBS; mAb + rEhCP112, 4.5 μg of the enzyme plus 1 μg of anti-EhCPADH mAb.

extracts destroyed 100% of MDCK cells (Fig. 4C), while 4.5, 3 and 1.5 μg of rEhCP112 damaged the monolayers in $65\% \pm 13\%$, $55\% \pm 10\%$ and $40\% \pm 15\%$, respectively (Fig. 4C). The addition of 1 μg of anti-EhCPADH mAb to a well containing 4.5 μg of rEhCP112 inhibited cell destruction (Fig. 4C). These results showed that EhCP112 is able to degrade collagen type I and fibronectin and to produce cell monolayer disruption.

rEhCP112 binds to red blood cells (RBCs) and digests human haemoglobin

RBCs are also target cells of *E. histolytica* trophozoites. We performed ligand assays to investigate whether

rEhCP112 binds to RBCs (Rodriguez *et al.*, 1989), using the rEhCP112 protein. RBCs were incubated with the purified rEhCP112 or with rEhRabB (Rodriguez *et al.*, 2000), as a control. Then, they were incubated with the corresponding anti-EhCPADH mAb or with anti-EhRabB rabbit antibodies. The binding of the recombinant proteins to RBCs was revealed with fluoresceinated secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies, respectively. Fluorescence was detected only around the RBCs incubated with the rEhCP112 and anti-EhCPADH mAb (Fig. 5B). No signal was observed when RBCs were incubated with rEhRabB, followed by incubation with specific antibodies against EhRabB (Fig. 5A) or when rEhCP112 was omitted (Fig. 5C).

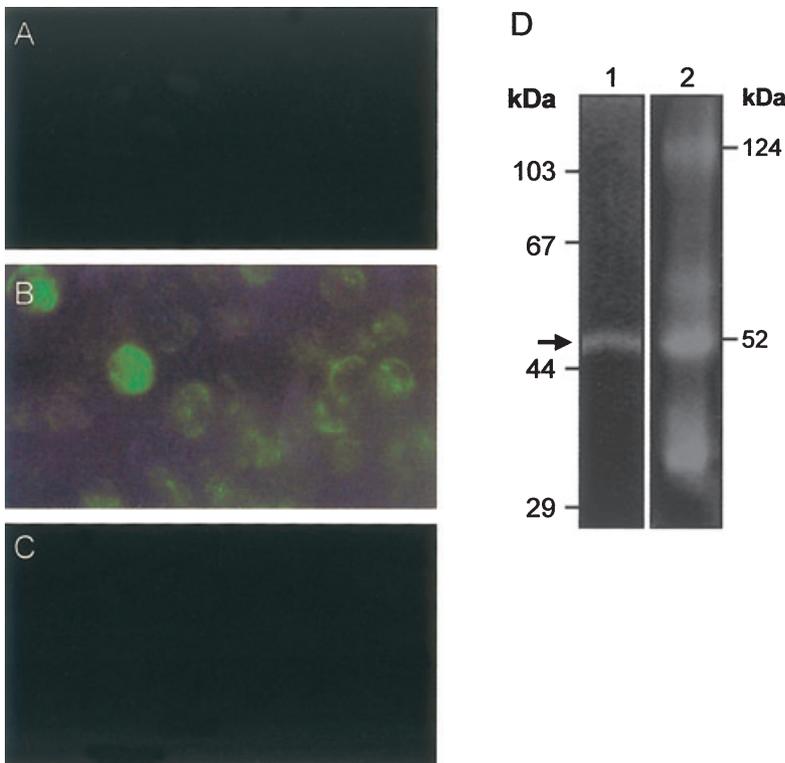


Fig. 5. rEhCP112 adheres to RBCs and digests haemoglobin. (A–C) Immunofluorescence of RBCs coated with: A. rEhRabB and revealed with anti-EhRabB and anti-rabbit fluoresceinated secondary antibody. B. rEhCP112 and revealed with anti-EhCPADH mAb and anti-mouse fluoresceinated secondary antibody. C. BSA and revealed with anti-EhCPADH mAb and anti-mouse fluoresceinated secondary antibody. D. Polyacrylamide-haemoglobin gel. Lane 1, purified rEhCP112; lane 2, total *E. histolytica* proteins. Arrow indicates the 52 kDa recombinant EhCP112 polypeptide.

Immunofluorescence assays using cryosections of trophozoites that had ingested RBCs located the EhCPADH complex on the surface of the trophozoites and on and inside the ingested RBCs (Garcia-Rivera *et al.*, 1999). This suggested that EhCPADH complex has affinity not only for the RBCs surface, but also for haemoglobin. Based on this, we examined the ability of rEhCP112 to degrade haemoglobin using polyacrylamide-haemoglobin gels. A clear band appeared in the polyacrylamide-haemoglobin gels, showing that rEhCP112 digests haemoglobin (Fig. 5D, lane 1). Total extracts of trophozoites gave four strong clear bands, one of them co-migrated with the 124 kDa EhCPADH complex and another co-migrated with the pure 52 kDa rEhCP112 (Fig. 5D, lane 2); however, several EhCPs have similar molecular weight (Bruchhaus *et al.*, 2003). Thus, we cannot be sure that this band corresponds to the 52 kDa clear band produced by rEhCP112.

EhCP112 is poorly expressed in a virulence-deficient mutant

The L-6 clone, a virulence-deficient mutant isolated from strain HM1:IMSS (Orozco *et al.*, 1983), releases less proteinase activity than the wild-type strain (Keene *et al.*, 1990). Thus, we investigated here whether the expression of EhCP112 in this clone correlates with its virulence. We performed Western blot assays using the anti-EhCPADH mAb to determine the expression of EhCP112 in this mutant. The antibody reacted with a 124 kDa band in extracts from the wild-type clone A, but it detected poorly this band in extracts from the clone L-6 (Fig. 6A). In contrast, antibodies against actin detected a 43 kDa band in almost the same intensity in both clones using the same membrane (Fig. 6B), suggesting that the mutant expresses less EhCPADH complex. Then, we analysed the *in vitro* virulence of clone L-6 in the same batch of trophozoites. The mutant adhered to RBCs efficiently

(88% ± 1.5%, compared with the wild-type clone), but it was deficient in phagocytosis (33% ± 3%) and in epithelial cells destruction by live trophozoites (57% ± 6.5%) or by its extracts (10% ± 3%) (Fig. 6C). These results showed a correlation between the deficiency of *in vitro* virulence of L-6 trophozoites and the diminished expression of EhCP112. However, other factors that may be affected in this mutant, in addition to EhCP112, could be involved in the parasite virulence.

EhCPADH is secreted

One of the CPs functions during the trophozoites attack to the target tissues is the digestion of the extracellular matrix. Thus, molecules involved in tissue penetration might be secreted or located in the plasma membrane to perform their function. We examined the presence of EhCPADH112 complex or EhCP112 among the proteins secreted by live trophozoites. We used 24 h culture medium of healthy cultures in logarithmic growing phase, with 95–99% viability, measured by trypan blue exclusion. Cultures were centrifuged first to obtain supernatants that were then filtered (0.22 µm) and ultracentrifugated. Microscopy observation of this pellets revealed the presence of vesicles (data not shown). The proteins of these vesicles were submitted to SDS-PAGE and gels were Coomassie blue stained. About nine bands with molecular weights from 25 to >200 kDa reproducibly appeared in these gels, including a 124 kDa protein (Fig. 7A, lane 2, arrow). We also analysed the proteolytic activity of these proteins in polyacrylamide-gelatin gels. A 124 kDa clear band appeared in the lane containing proteins of the secreted vesicles (Fig. 7B, line 2), that was also observed in the lane with total extracts of the trophozoites (Fig. 7B, lane 1). Additionally to the 124 kDa band, other proteolytic bands were detected in the proteins of the vesicles, suggesting the presence of more than one protease in the secreted vesicles. In Western blot assays, the anti-

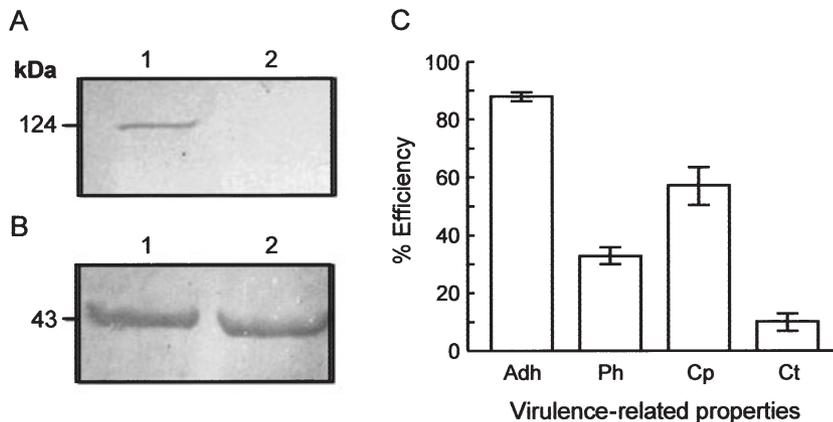


Fig. 6. EhCP112 is poorly detected in a virulence-deficient mutant.

A. Total extracts from *E. histolytica* trophozoites were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters and revealed with anti-EhCPADH mAb.

B. The same filters were revealed with antibodies against actin. Lane 1, extracts from the wild-type clone A; lane 2, extracts from the virulence-deficient mutant L-6.

C. Virulence-related properties of the clone L-6. Adh, adherence; Ph, phagocytosis; Cp, destruction of cell monolayers by live trophozoites; Ct, destruction of cell monolayers by trophozoite extracts. Virulence-related properties of the wild-type clone A were taken as 100% efficiency. The data represent the mean of three independent experiments performed in triplicate. Lines indicate standard deviation.

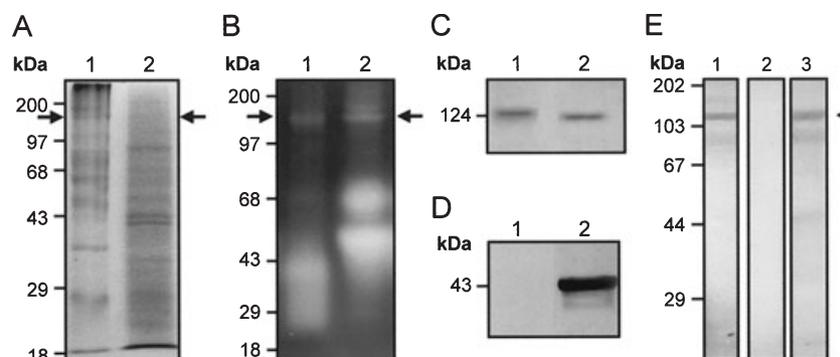


Fig. 7. The EhCPADH complex is in vacuoles secreted by the trophozoites to the medium. Secreted proteins were obtained from 24 h culture medium of healthy trophozoites with 95–99% viability.

A. 10% SDS-PAGE of proteins obtained from secreted vesicles (lane 1) and of total *E. histolytica* proteins (lane 2).

B. Polyacrylamide-gelatin gel with protease activity of secreted vesicles (lane 1) and of trophozoite extracts (lane 2). Arrows show the place where the EhCPADH complex migrates in the gels.

C. Western blot of A using the anti-EhCPADH mAb.

D. The same membrane that in C, but revealed with anti-actin antibody.

E. Western blot of total *E. histolytica* proteins developed with: lane 1, polyclonal antibodies from hamsters immunized with *Ehcp112* cDNA; lane 2, pre-immune sera of the hamsters; lane 3, anti-EhCPADH mAb.

EhCPADH mAb detected on proteins of secreted vesicles a single 124.6 kDa band that co-migrated with the 124.6 kDa band with proteolytic activity (Fig. 7C, lane 1), strengthening the assumption that the EhCPADH complex, and consequently the EhCP112, is secreted. No free EhCP112 was detected by the antibodies, suggesting that, shortly after synthesis, the majority of this protein forms part of the EhCPADH complex. As an internal control to discard the presence of EhCPADH in the secreted material resulting from the lysis of trophozoites, we used anti-actin antibodies in the same membranes. These antibodies did not detect actin in the secretion products (Fig. 7D, lane 1), but they reacted strongly with a 43 kDa band on total *E. histolytica* proteins, indicating that the identification of the EhCPADH complex in the medium is not a consequence of the trophozoites lysis, but it's due to its presence in the secreted vesicles and that these vesicles contain the EhCPADH complex.

To obtain a direct evidence on the presence of EhCP112 in the EhCPADH complex, we immunized hamsters with the *Ehcp112* cDNA as described (Madriz *et al.*, 2004). The sera from these animals were pooled and used in Western blot assays on total *E. histolytica* proteins. The sera of the immunized animals recognized a 124 kDa band (Fig. 7E, lane 1), that co-migrated with the band detected by the anti-EhCPADH mAb (Fig. 7E, lane 3), whereas the pre-immune sera of the same animals did not recognize any band on total proteins (Fig. 7F, lane 2).

rEhCP112 is active in a broad range of pHs

As the EhCPADH complex is secreted, EhCP112 might be active at the extracellular environment conditions. We

evaluated the proteolytic activity of rEhCP112 under different pH ranges. For this purpose, strips of polyacrylamide-gelatin gels were incubated with the purified rEhCP112, then, the protein in the gels was incubated at different pHs (3.0–9.0) and at 37°C. After that, gels were Coomassie blue stained and de-stained, and colour was registered in the strips by densitometry (Fig. 8). The recombinant protein was active at pHs from 3.0 to 9.0, with the highest activity at pH 5.0 (Fig. 8), which was taken as 100% for relative quantification. The enzyme showed between 70% and 80% activity at physiological pH (Fig. 8), with the maximum activity at 37°C (data not

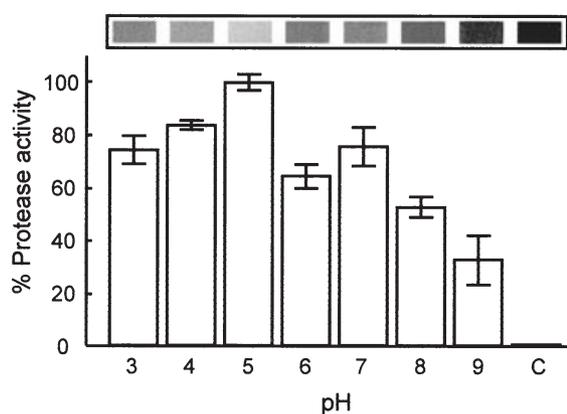


Fig. 8. rEhCP112 has activity at different pHs. Polyacrylamide-gelatin strips were incubated for 1 h with 10 µg of purified rEhCP112 at 37°C and different pHs. The relative activity was measured after Coomassie blue staining and de-staining of the gels and densitometry of the dye in each strip. Upper of each one of the graphs is the corresponding strip. C, control of gel strip without protease.

shown). These results suggest that EhCP112 could be active at the extracellular environment.

Discussion

The role of several CPs in the virulence of protozoan parasites, such as *Trichomonas vaginalis* (Alvarez-Sanchez *et al.*, 2000), *Leishmania major* (Joshi *et al.*, 2002), *Trypanosoma cruzi* (Tomas *et al.*, 1997), *Plasmodium vivax* (Rosenthal *et al.*, 1994) or *E. histolytica* (Ankri *et al.*, 1999) has been conclusively demonstrated. Additionally, the functional versatility of CPs and the relevant role that they play in virulence make these molecules promising chemotherapeutic or vaccine targets (McKerrow, 1999). In particular in *E. histolytica*, a cell with 20 different CPs of the clan CA (Bruchhaus *et al.*, 2003), the majority of these molecules have not been fully studied. Previous report suggested that the majority of the *E. histolytica* CPs genes, including *Ehcp112*, are not expressed in *E. histolytica* during *in vitro* cultivation (Bruchhaus *et al.*, 2003). However, Northern blot and reverse transcription polymerase chain reaction assays performed by us and by others indicate that the *Ehcp112* gene is expressed in the trophozoites (Garcia-Rivera *et al.*, 1999; Carpeniseanu *et al.*, 2000). Different culture conditions or different pathogenicity of trophozoites could be responsible for the distinct results.

The main obstacle for study the proteases is the difficulty to obtain large amount of active enzymes. Here, we obtained the purified EhCP112 active enzyme from bacteria transformed with a plasmid lacking the signal peptide, but carrying the pro-peptide. CPs are encoded as pre-proenzymes that require to be processed to generate the mature enzyme. Bacteria do not possess most of the post-translational processing mechanisms of eukaryotic cells. Thus, we explored the expression of different *Ehcp112* gene fragments. Only the complete pre-proenzyme and the proenzyme were expressed, but the mature enzyme was not detected (Fig. 1), suggesting that it is toxic for bacteria and that the pro-peptide is necessary to control the enzymatic activity. Pro-peptide could be also necessary for the correct folding of the enzyme, because the EhCP2 and EhCP3 mature enzymes expressed in a baculovirus system are inactive, while the pre-proenzymes show protease activity (Que *et al.*, 2002). Moreover, it is known for several different proteases that the pro-peptide is necessary for correct folding of the mature enzymes (Hellberg *et al.*, 2002).

The protease activity of rEhCP112 in substrate gels was observed in a 52 kDa band (Fig. 1B), the molecular weight expected for a polypeptide containing the pro-peptide and the mature enzyme. This result is very surprising because CPs are processed by cleavage of the pro-domain before they are active. However, it is generally accepted that in

substrate gel analysis the proteins do not migrate according to their molecular weight, and probably the activity displayed in our experiments was due to the processed enzyme with anomalous migration.

rEhCP112 was expressed in its active form and it was able to digest different substrates, suggesting that it was processed by bacterial proteases or by autocatalysis inside the bacteria or shortly after its isolation, producing the mature enzyme. Indeed, the purified rEhCP112 was extremely labile and it was degraded in less than 24 h at 4°C. Four hours after purification, the polyclonal antibodies revealed the different degradation products of the enzyme, and the anti-tag antibody detected two bands, the upper band was disappearing on the time. Only the 52 kDa band was active, because a single 52 kDa white band appeared in the polyacrylamide-gelatin gels. In contrast, the enzyme conserved its activity for longer time inside the secreted vesicles, as it was shown in Fig. 7A–C. Currently, we have not yet a molecular explanation for this.

Recently, it was suggested that *E. histolytica* CPs have redundant biochemical properties, because several CPs with different location are translocated to phagocytic vacuoles during the ingestion of target cells (Que *et al.*, 2002), including the EhCPADH complex (Garcia-Rivera *et al.*, 1999). This implies that the main function of *E. histolytica* CPs could be nutrient acquisition. However, EhCP2, EhCP5 and EhCP112 are located on the trophozoites surface (Jacobs *et al.*, 1998; Garcia-Rivera *et al.*, 1999; Que *et al.*, 2002) and at least EhCP112 is secreted. In addition, EhCP1 and EhCP5 are absent in the non-pathogenic amoeba *E. dispar* (Bruchhaus *et al.*, 1996), and EhCP112 was not detected in an avirulent strain obtained from an asymptomatic carrier (Vargas *et al.*, 1990), and it is poorly expressed in the clone L-6 (Fig. 6), an *E. histolytica* mutant that is deficient in phagocytosis and in damage epithelial cells. Moreover, this clone does not produce liver abscesses when it is inoculated in newborn hamsters (Orozco *et al.*, 1983). These results could suggest that certain CPs could be involved in tissues invasion. However, the role of these proteases in the *E. histolytica* virulence needs to be proved in an animal model using trophozoites in which these molecules are absent. These experiments are not performed yet because of lack of technology to knock out *Entamoeba* genes effectively and the lack of a suitable animal model that could reproduce the complete infection cycle of this parasite.

As mAb against the EhCPADH complex recognized a single 124.6 kDa band, it is discarded that it cross-reacts with other EhCPs. This was confirmed when we injected hamsters with the *Ehcpadh112* cDNA, as previously reported (Madriz *et al.*, 2004), and the sera of the animals presented antibodies against the EhCPADH complex

showing no cross-reaction with other *E. histolytica* CPs, whose molecular weight ranges from 32.6 to 71.4 kDa (Bruchhaus *et al.*, 2003).

Finally, we propose that EhCP112 could be involved in the virulence of *E. histolytica* because: (i) EhCP112 forms part of the virulence complex EhCPADH. (ii) It binds and destroys collagen, fibronectin and MDCK cell monolayers. However, the degradation of these proteins is a characteristic of many proteases and does not mean they are substrates *in vivo*. (iii) EhCP112 also binds and destroys RBCs and haemoglobin. (iv) It is poorly expressed in a virulence-deficient mutant. (v) It is secreted in an active form by live trophozoites. (vi) It contains the RGD domain, suggesting that EhCP112 binds to cellular integrins. However, assays with mutated EhCP112 to alter or delete the RGD motive might be done to prove its functionality.

Experimental procedures

E. histolytica cultures

We used trophozoites of clones A and L-6 (Orozco *et al.*, 1983), strain HM1:IMSS, axenically cultured in TYI-S-33 medium and harvested during the logarithmic growth phase (Diamond *et al.*, 1978). All experiments reported here were performed at last three times by duplicate.

Cloning and expression of EhCP112

The full-length *Ehcp112* gene (1338 bp) encoding for the signal peptide, the pro-peptide and the mature enzyme or gene fragments lacking 59 or 353 bp at its 5' end, which encode the pro-peptide plus the mature enzyme or only the mature enzyme, respectively, were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from a plasmid with the full *Ehcp112* gene (Garcia-Rivera *et al.*, 1999) as template. As sense primers we used oligonucleotides containing the sequences located in: (i) position 1–21 (5'-ATGA CAGCGATTGTTGTCGCT-3'), (ii) position 60–81 (5'-GCGTT TAATCTAGAACTCCCG-3'), and (iii) position 354–374 (5'-CCATGGAATGAAGTACCGCCA-3'). The antisense primer for the three reactions has the sequence located in positions 1314–1338 (5'-GATTGTATGATTGTAGAATTGGAC-3'). PCR products were cloned in frame with a poly-histidine tag in the pTrcHis C expression vector (Invitrogen). Recombinant plasmids were used to transform bacteria *E. coli*, strain BL21 (Lys E), which were incubated with 1 mM IPTG for 3 h at 37°C (Sambrook and Russell, 2001) to induce the production of the recombinant proteins. Recombinant proteins, containing a poly-histidine tag from the vectors, were purified through Ni²⁺-affinity columns (Qiagen). The chromatography was performed in the BioLogic HR Workstation (Bio-Rad) using 3 ml of Ni²⁺-NTA resin (Quiagen). The bacteria extracts, resuspended in binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0), were delivered to the column. Then, five volumes of washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) were added and the recombinant protein was eluted using 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0.

Western blot assays

Bacteria extracts, or the purified recombinant proteins, or trophozoite extracts were separated by 10% SDS-PAGE, and gels were stained with Coomassie blue, or transferred to nitrocellulose membranes. Filters were incubated with antibodies against the poly-histidine tag (Invitrogen) (1:2000), or with the monoclonal antibody against the EhCPADH complex (anti-EhCPADH mAb) (1:100), which recognizes EhCP112 (Garcia-Rivera *et al.*, 1999), or with sera (1:500) from patients with amoebic hepatic abscesses, or from healthy individuals (1:500) without antibodies against *E. histolytica*. Then, membranes were incubated with peroxidase-coupled goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies, and the reaction was developed with 4-chloro-1-naftol and 0.04% H₂O₂. In other experiments, filters with total *E. histolytica* extracts from the wild-type clone A and from the virulence-deficient mutant L-6 were revealed with the anti-EhCPADH mAb, and then, the same filters were revealed with antibodies against actin (1:500). To test the specificity of antibodies against the rEhCP112, Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) (male, 4 weeks old) were intradermally injected three times with 200 µg of the plasmid containing the full-length *Ehcp112* cDNA (Madriz *et al.*, 2004). One week after the last immunization, animals were bled. Serum titers were determined by ELISA and their specificity was analysed by Western blot on total *E. histolytica* extracts.

Protease activity

The activity assays were performed in reactions of 500 µl using 0.3% azocasein in 2 mM phosphate buffer, 2 µl 2-mercaptoethanol and 6 µg or 60 µg of rEhCP112. The mixtures were incubated at 37°C during 10, 30, 60 and 120 min and reactions were stopped by addition of one volume of 20% TCA and incubating at 4°C during 15 min. Then, samples were centrifuged at 8000 *g* during 5 min and the absorbance of the supernatants was determined at 366 nm. The purified rEhCP112 was used immediately after the last step of purification.

The rEhCP112 activity was also analysed in polyacrylamide-0.2% gelatin gels as described (Rigothier *et al.*, 1992). After electrophoresis, gels were incubated in 2.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature (RT). The enzyme was activated by incubation in Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, CaCl₂ 10 mM and 0.02% 2-mercaptoethanol (activation buffer) for 12–16 h at 37°C (Keene *et al.*, 1986). Gels were stained with 0.25% Coomassie blue R-250 and clear bands were indicative of proteolytic activity. To analyse the effect of pH on protease activity, sections of 1 × 2 cm of polyacrylamide-gelatin gels were incubated 1 h at RT with 10 µg of purified rEhCP112. Then, gel fragments were incubated 12–16 h in the activation buffer at pHs from 3 to 9 and 37°C. Fragments were Coomassie blue stained, de-stained and the images were registered. The protease activity was quantified by densitometry of the images.

The rEhCP112 activity was also determined in polyacrylamide gels copolymerized with 0.1% collagen type I, 0.1% fibronectin, 0.2% haemoglobin and developed as above.

Destruction of epithelial cells by rEhCP112

MDCK monolayers (1 × 10⁵ cells) were incubated with total extracts from 1 × 10⁶ trophozoites or with 1.5, 3 and 4.5 µg

of rEhCP112 in PBS in the presence of 0.02% of 2-mercaptoethanol during 1–2 h at 37°C. In some experiments, 1 µg of the anti-EhCPADH mAb was added to the monolayers together with the rEhCP122 protein. The remaining monolayers were washed three times with PBS, fixed with 2.5% glutaraldehyde, and cellular destruction was evaluated as previously described (Bracha and Mirelman, 1984). Briefly, cells were stained with 1% methylene blue, washed extensively and the dye captured by the rest of the monolayers was extracted with 0.1 N HCl and read in a spectrophotometer at 660 nm.

rEhCP112 binding to RBCs (ligand assays)

The purified rEhCP112, or rEhRabB protein (40 µg), used as an internal control, were incubated for 30 min at 4°C with 1×10^5 paraformaldehyde-fixed RBCs in the presence of 1% BSA. As another control, RBCs were incubated only with 1% BSA. Samples were exhaustively washed with PBS, pH 6.8, incubated 1 h at 37°C with the anti-EhCPADH mAb. Then, cells were incubated with fluoresceinated secondary antibodies and washed with PBS. Samples were analysed through a Nikon Diaphot 200 microscope attached to a laser confocal scanning system MRC 1024 (Bio-Rad).

Adherence, phagocytosis and cell monolayer destruction

For adherence and phagocytosis experiments, trophozoites were incubated with fresh RBCs (1:100) for 10 min at 4°C for adherence, or at 37°C for phagocytosis. RBCs adhered to, or ingested by 100 trophozoites were counted and the mean of RBCs per trophozoite was obtained as described (Orozco *et al.*, 1983). For the destruction of cell monolayers by live trophozoites, MDCK monolayers (1×10^5 cells) were incubated during 1 h at 37°C with 1×10^5 trophozoites. Then, trophozoites were eliminated and the destruction of the cell monolayers was determined as above. Assays were done in three independent experiments by triplicate.

Analysis of E. histolytica secretions

Trophozoites were centrifuged 7 min at 360 g. Supernatants were subsequently filtered through 0.45 and 0.22 µm cellulose acetate membranes (Millipore) and centrifuged during 2 h at 150 000 g at 4°C. Pellets were resuspended in 3 ml of PBS, pH 6.8 in the presence of 10 mM NEM and centrifuged at 120 000 g during 30 min at 4°C. Pellets were resuspended in 1 ml of PBS in the presence of 10 mM NEM and 3 mM EDTA, and proteins were separated by 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and transferred to nitrocellulose membranes (Towbin *et al.*, 1979). Membranes were incubated with the anti-EhCPADH mAb, or with an anti-actin antibody, used as an internal control. Then, filters were incubated with anti-mouse peroxidated secondary antibodies and developed with 4-chloro-1-naftol and 0.04% H₂O₂. Secretion products were also obtained in the absence of protease inhibitors and separated by SDS-PAGE copolymerized with gelatin as described above.

Acknowledgements

This work was supported by the European Community, by a Howard Hughes Medical Institute Grant awarded to Dr E. Orozco,

and by CONACyT (Mexico). We thank Dr Iris Bruchhaus for her helpful comments on the manuscript. The authors are deeply grateful for the excellent technical assistance of Mr Alfredo Padilla-Barberi during the photographic work.

References

- Alderete, J.F., and Provenzano, D. (1997) The vagina has reducing environment sufficient for activation of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases. *Genitourin Med* **73**: 291–296.
- Alvarez-Sanchez, M.E., Avila-Gonzalez, L., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L.V., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* **28**: 193–202.
- Ankri, S., Stolarsky, T., and Mirelman, D. (1998) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* **28**: 777–785.
- Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F., and Mirelman, D. (1999) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun* **67**: 421–422.
- Arroyo, R., and Orozco, E. (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* **23**: 151–158.
- Bart, G., Frame, M.J., Carter, R., Coombs, G.H., and Mottram, J.C. (1997) Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **88**: 53–61.
- Benitez-Bribiesca, L., Orozco, E., Martinez, G., and Garcia-Rivera, G. (1992) Neutral proteinase activities in different strains and clones of *Entamoeba histolytica*. Correlation with virulence. *Arch Med Res* **23**: 231–233.
- Bracha, R., and Mirelman, D. (1984) Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J Exp Med* **160**: 353–368.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., and Tannich, E. (1996) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* **22**: 255–263.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N., and Tannich, E. (2003) The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryot Cell* **2**: 501–509.
- Carpeniseanu, S., Hirata, K., Que, X., Orozco, E., and Reed, S.L. (2000) L6: a proteinase- and phagocytosis-deficient mutant of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **31**: S237–S238.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., and 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.
- Feingold, C., Bracha, R., Wexler, A., and Mirelman, D. (1985) Isolation, purification, and partial characterization of an enterotoxin from extracts of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun* **48**: 211–218.
- Gadasi, H., and Kobiler, D. (1983) *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp Parasitol* **55**: 105–110.

- Garcia-Rivera, G., Rodriguez, M.A., Ocadiz, R., Martinez-Lopez, M.C., Arroyo, R., Gonzalez-Robles, A., and Orozco, E. (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* **33**: 556–568.
- Gupta, S., Ghosh, P., Naik, S., and Naik, S.R. (1998) Proteinase activity & virulence of *Entamoeba histolytica* on passage through hamster liver. *Indian J Med Res* **107**: 173–177.
- Hellberg, A., Nowak, N., Leippe, M., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2002) Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif* **24**: 131–137.
- Hofmann, K., and Stoffel, W. (1993) TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem H-S* **374**: 166.
- Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E., and Leippe, M. (1998) Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **27**: 269–276.
- Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., and McMaster, W.R. (2002) Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 33–40.
- Keene, W.E., Pettit, M.G., Allen, S., and McKerrow, J.H. (1986) The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **163**: 536–549.
- Keene, W.E., Hidalgo, M.E., Orozco, E., and 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.
- Klemba, M., and Goldberg, D.E. (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* **71**: 275–305.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Li, E., Yang, W.G., Zhang, T., and Stanley, S.L., Jr (1995) Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. *Infect Immun* **63**: 4150–4153.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Kairalla, A.A., Cantey, J.R., and Pittman, F.E. (1984) Relationship of cytotoxins of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* to virulence. *Gastroenterology* **86**: 1488–1495.
- McKerrow, J.H. (1999) Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int J Parasitol* **29**: 833–837.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J. (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **47**: 821–853.
- Madriz, X., Martinez, M.B., Rodriguez, M.A., Sierra, G., Martinez-Lopez, C., Riveron, A.M., et al. (2004) Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiology* **150**: 1251–1260.
- Martinez-Lopez, C., Orozco, E., Sanchez, T., Garcia-Perez, R.M., Hernandez-Hernandez, F., and Rodriguez, M.A. (2004) The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol* **6**: 367–376.
- Mendoza-Lopez, M.R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L.V., Avila-Gonzalez, L., Ruiz-Tachiquin, M.E., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2000) CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* **68**: 4907–4912.
- Mottram, J.C., Helms, M.J., Coombs, G.H., and Sajid, M. (2003) Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol* **19**: 182–187.
- Omara-Opyene, A.L., and Gedamu, L. (1997) Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* **90**: 247–267.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., and Sanchez, T. (1983) *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158**: 1511–1521.
- Que, X., Brinen, L.S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B.E., et al. (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **119**: 23–32.
- Ravdin, J.I., Croft, B.Y., and Guerrant, R.L. (1980) Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **152**: 377–390.
- Reed, S.L., Keene, W.E., and McKerrow, J.H. (1989a) Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* **27**: 2772–2777.
- Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H., and Gigli, I. (1989b) Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* **143**: 189–195.
- Rigothier, M.C., Garcia-Rivera, G., Guaderrama, M., and Orozco, E. (1992) Purification and functional characterization of the 112 kDa adhesin of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **23**: 239–241.
- Rodriguez, M.A., Hernandez, F., Santos, L., Valdez, A., and Orozco, E. (1989) *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell–parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol* **37**: 87–99.
- Rodriguez, M.A., Garcia-Perez, R.M., Garcia-Rivera, G., Lopez-Reyes, I., Mendoza, L., Ortiz-Navarrete, V., and Orozco, E. (2000) An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem Parasitol* **108**: 199–206.
- Rosenthal, P.J., Ring, C.S., Chen, X., and Cohen, F.E. (1994) Characterization of a *Plasmodium vivax* cysteine proteinase gene identifies uniquely conserved amino acids that may mediate the substrate specificity of malarial hemoglobins. *J Mol Biol* **241**: 312–316.
- Sajid, M., and McKerrow, J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* **120**: 1–21.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Skelly, P.J., Da'dara, A., and Harn, D.A. (2003) Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int J Parasitol* **33**: 363–369.
- Tomas, A.M., Miles, M.A., and Kelly, J.M. (1997) Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem* **244**: 596–603.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350–4354.
- Vargas, M.A., Isibasi, A., Kumate, J., and Orozco, E. (1990) Non-pathogenic *Entamoeba histolytica*: functional and bio-

chemical characterization of a monoxenic strain. *Mol Biochem Parasitol* **40**: 193–201.

Zhang, Z., Wang, L., Seydel, K.B., Li, E., Ankri, S., Mirelman, D., and Stanley, S.L., Jr (2000) *Entamoeba his-*

tolytica cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol* **37**: 542–548.