

38



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA DE ESTRES DE 16 kDa (HSP16) DE *Entamoeba histolytica*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CELIA CABALLERO FRANCO



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECCION DE TESIS: DR. PEDRO OSTOA SALOMA

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Caracterización de una proteína de estrés de 16kDa (HSP16) de *Entamoeba histolytica*

realizado por Celia Caballero Franco

con número de cuenta 9314047-2, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Pedro Ostoa Saloma

Propietario

Dr. Juan Pedro Laclette San Román

Propietario

Dra. Luisa Alba Lois

Suplente

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Suplente

M.enC. Laura Vargas Parada

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U N. A. M.

DR. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**A mi mamá, con mucho cariño y admiración
porque siempre confiaste en que lo lograría, gracias por tu apoyo**

A mis hermanos: Mely y David, los quiero mucho

A mamá Mely gracias por tu cariño y tu apoyo incondicional

A mi papá, mi eterna inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Ofrezco de antemano una disculpa si por falta de espacio no menciono a todas las personas que de alguna manera han influido en mi formación personal y profesional.

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme hacer uso de sus instalaciones para poder realizar mis estudios en forma gratuita.

Agradezco al Dr. Pedro Ostoa Salama por tener la paciencia de guiarme en la realización de mi tesis, de igual forma agradezco al Dr. Julio César Carrero por brindarme su apoyo y experiencia para la realización de este trabajo. Al Dr. Juan Pedro Laclette por revisar mi tesis y también por integrarme a su grupo de trabajo y permitirme el uso del instrumental, reactivos y equipo de su laboratorio para realizar mi trabajo. A la técnica Patricia de la Torre por ayudarme a secuenciar el gen HSP16Eh. A Martín García Varela por ayudarme a hacer los alineamientos de la secuencia del gen y a Pavel Petrossian por sus acertadas observaciones que ayudaron a la clonación y expresión del gen.

Agradezco a Alfonso Olivos García y a Mario Nequiz Avendaño del Departamento de Medicina Experimental del Hospital General del Laboratorio del Dr. Ruy Pérez Tamayo, por proporcionarnos las ambas que se utilizaron en este estudio, de igual forma agradezco al técnico Augusto González Canto por ayudarme en los muchos intentos de purificación de la proteína expresada.

A mis compañeros de laboratorio: Anita (por sus consejos técnicos y compañía), Martín, Haydeé ☺ , Carlos, Dayanita, Pepe, Rimma, Paty, Fela, Margarita y no podían faltar los asociados Pedro y Julio por sus consejos y por hacer mi estancia muuuuy agradable.

A Laura Vargas por su clase que fue de gran ayuda e inspiración en el extraño camino de la Parasitología Molecular.

A la Dra. Luisa Alba Lois por su atenta disposición de revisar mi tesis.

Agradezco en forma especial al Dr. Armando Isibasi por permitirme trabajar en su laboratorio durante la realización de mi servicio social. A Rosita Salazar por enseñarme a trabajar en un laboratorio y enseñarme técnicas celulares que serán de gran ayuda en el futuro. A los compañeros que en ese tiempo compartieron su tiempo conmigo: Ismael, Genaro, Daniel, Gaby, Héctor, Manuel, Carmen, Wendy y Nora. Al Dr. Constantino Macías por su disposición de ayudarme con los trámites de la beca de CONACYT.

Al Dr. Edgardo Escamilla y a la Dra. Martha Contreras por enseñarme lo elemental del trabajo de laboratorio.

Al Programa de Becas de Tesis de Licenciatura (PROBETEL) por ayudarme económicamente durante el desarrollo de mi tesis.

A toda mi familia por su apoyo y confianza en mí ¡Gracias!, a mis hermanos Mely y David (los quiero mucho), a Gaby que aparte de ser prima, es cómplice y amiga. A mi mamá (sin ti no lo hubiera logrado) y a mamá Mely, gracias por su cariño y apoyo

A mis amigas incondicionales: Tisha, Jos e Itzel, y a todos, que por falta de espacio no puedo mencionar, han hecho mi vida millonaria.....¡¡¡los quiero muuuucho!!! y agradeceré en persona sus detalles.

CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE ESTRÉS DE 16 kDa (HSP16) DE *Entamoeba histolytica*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

<i>Entamoeba histolytica</i>	1
Clasificación taxonómica	1
Epidemiología	2
Morfología de <i>E. histolytica</i>	3
Ciclo de vida	5
Expresión de HSPs en parásitos.....	7
Proteínas de estrés (HSPs).....	8
Inmunología de las HSPs.....	9
Otras funciones no chaperonas de las HSPs	10

II. OBJETIVO.....	13
-------------------	----

III. HIPÓTESIS	13
----------------------	----

IV. MÉTODO

i) Obtención del gen HSP16Eh	14
ii) Preparación de células competentes.....	14

iii) Clonación del gen HSP16Eh en el vector pET23a	15
iv) Corrección del marco de lectura del plásmido pET/HSP16Eh.....	17
v) Transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL-21 competentes.....	18
vi) Expresión del producto del gen HSP16Eh.....	18
vii) Electroforesis del producto de la expresión del gen HSP16Eh.....	19
viii) Respuesta a estrés térmico en <i>E. histolytica</i>	20

V. RESULTADOS

Aislamiento y secuenciación del gen HSP16Eh	21
Alineamiento múltiple del gen HSP16Eh con otras secuencias de sHSP.....	23
Expresión del gen HSP16Eh en el vector de expresión pET.....	25
Electroforesis de las fracciones celulares.....	26
Inducción del gen HSP16Eh en <i>E. histolytica</i> por estrés calórico.....	27
Análisis de imágenes.....	28

VI. DISCUSIÓN.....	30
--------------------	----

VII. CONCLUSIONES	33
-------------------------	----

GLOSARIO	34
----------------	----

REFERENCIAS.....	37
------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica

Existen alrededor de 45,000 especies conocidas de protozoarios de las cuales 10,000 de estas son parásitas. Los protozoarios pueden separarse en cuatro grupos dependiendo de su modo de locomoción: protozoarios flagelados, amiboideos, ciliados y esporozoos.

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiasis. Se encuentra en el grupo de los protozoarios parásitos amiboideos cuya locomoción se lleva a cabo por medio de pseudopodios (41).

Clasificación taxonómica

La sistemática de los eucariontes amiboideos aún no esta totalmente definida. *E. histolytica* ha sido considerada por algunos autores como una rama temprana del linaje eucarionte ya que aparentemente no presentaba organelos como la mitocondria, peroxisomas, reticulo endoplásmico rugoso, y aparato de Golgi además de tener un metabolismo glicolítico. Muchas de estas características son compartidas con otros protistas amitocondriados denominados Archezoa (32).

Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *E. histolytica* tiene un organelo críptico que corresponde a una mitocondria rudimentaria (34), así como genes que están relacionados con el transporte vesicular de retículo endoplásmico y aparato de Golgi (4), lo que demuestra que *E. histolytica* posee dichos organelos, aunque con características particulares de un eucarionte de linaje temprano. En 1998 se revisó la posición filogenética de *E. histolytica* y se clasificó de la siguiente forma (32):

- Reino Protozoo
- Subreino Neozoa
- Infrareino Sarcocistidia
- Phylum Amoebozoa
- Subphylum Conosa
- Clase Lobosea
- Orden: Amoebida

Por mucho tiempo se pensó que existían dos cepas diferentes de *E. histolytica*. Una de ellas se presentaba como comensal habitando el intestino grueso sin causar daño aparente y sin provocar síntomas, mientras que la otra era más virulenta, provocaba disentería amibiana y podía migrar a otros órganos causando abscesos que finalmente podían llevar a la muerte del paciente. Se plantearon entonces dos hipótesis controvertidas que mantuvieron ocupados a los expertos por algún tiempo.

Una hipótesis explicaba que *E. histolytica* ingresaba al hospedero y colonizaba el intestino grueso sin causar daño, posteriormente (como lo hacen muchas otras especies de parásitos) aparecían cepas más virulentas que causaban disentería y abscesos. Otra hipótesis proponía que existían dos especies diferentes de amibas que eran indistinguibles morfológicamente; una de ellas era avirulenta mientras la otra era patógena (42). Después de muchas investigaciones en el año de 1997 en el XI Seminario Internacional de Amibiasis se llegó al consenso de que en realidad se trataba de dos especies diferentes. A la especie no patógena se denominó *Entamoeba dispar* y a la amiba patógena se denominó *E. histolytica* (57).

Epidemiología

La infección causada por *E. histolytica* tiene un alto índice de mortalidad y morbilidad en el mundo. Es considerada por la OMS como la tercera enfermedad parasitaria en importancia después de la malaria y la esquistosomiasis (57).

Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. dispar* o por *E. histolytica*, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100.000 muertes por año. La prevalencia de infección amibiana puede ser tan alta como 50% en ciertas áreas de los países en desarrollo. Esto depende de hábitos culturales, edad, nivel de saneamiento, hacinamiento y condición socioeconómica (46).

E. histolytica es cosmopolita pero las tasas más elevadas de infección amibiana ocurren en la India, África occidental, Lejano oriente y Centroamérica (46). En Nicaragua, estudios realizados en la ciudad de León mostraron una prevalencia de infección de 18.6% y de 23% de seropositividad. Los estudios serológicos realizados en la Ciudad de México indicaron que hasta el 9% de la población estaba infectada (46).

En general, la infección por *E. dispar* es 10 veces más común que la de *E. histolytica*. Así la amibiasis intestinal sintomática se desarrolla en un 10% de los individuos infectados, mientras que la

infección invasora extraintestinal como el absceso hepático amibiano se presenta en 1 de cada 100 pacientes que se infectan con *E. histolytica* (46).

Es importante señalar que entre los muchos miles de individuos estudiados no se ha reportado que *E. dispar* cause la enfermedad invasora. Por consiguiente *E. dispar* no induce la producción de anticuerpos serológicos, mientras que la generación de una respuesta inmune es una característica común de la infección asintomática y sintomática por *E. histolytica* (46). En áreas de endemidad, la prevalencia de individuos que son seropositivos es alta (a menudo el 25% de la población), debido aparentemente a casos de una remota infección por *E. histolytica*. Esta elevada frecuencia ha confundido el uso de la serología para diagnóstico de la amibiasis invasora en áreas de endemidad (46).

Morfología de *E. histolytica*

E. histolytica presenta dos estadios distintos en su ciclo de vida: trofozoito y quiste. Los trofozoitos habitan las criptas del colon ascendente en la luz del intestino grueso del hospedero. Esta se considera la forma móvil, mide de 9-30µm y puede presentar una forma ovoide o irregular. El trofozoito se divide por fisión binaria. Posee un núcleo redondo u ovalado caracterizado por un cariósoma central y cromatina periférica en forma de gránulos finos (figura 1); la membrana es muy delgada. El citoplasma tiene dos zonas: un ectoplasma externo transparente y un endosoma con un citoplasma granular lleno de vacuolas donde a menudo se observan eritrocitos endocitados en varios estados de desintegración. El citoesqueleto se caracteriza por microfilamentos que se encuentran inmediatamente después de la membrana plasmática. Los trofozoitos desarrollan movimientos del protoplasma con pseudopodios contráctiles que se componen principalmente de ectoplasma (41).

El prequiste es hialino, se caracteriza por la ausencia de materia ingerida en el citoplasma, contiene depósitos de glucógeno, ocasionalmente cuerpos cromatóides y aún no desarrolla la pared de quitina (figura 2) (32).

Los quistes son esféricos u ovals, con una fina pared refráctil. Contiene gránulos finos, cuerpos cromatóides y una masa difusa de glucógeno. Su diámetro promedio es de 12.5µm. Los quistes inmaduros tienen un solo núcleo, al madurar, replican su genoma dos veces dando lugar a un organismo tetranucleado (figura 3). Sólo los quistes maduros son infectivos. Los quistes liberados en

las heces son los responsables de la transmisión de la infección y pueden sobrevivir en materia fecal aproximadamente 8 días a una temperatura de 20-34°C y durante 40 días a 2-6°C (6).

Figura 1. Trofozoíto de *E. histolytica* donde se aprecia el núcleo con el cariosoma central y cromatina periférica característico de la especie.

(P.W.Pappas & S.M. Wardrop)

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/ehistolytica.html>



Figura 2. Quiste inmaduro de *E. histolytica* donde se puede observar una masa condensada de glucógeno y que el núcleo aún no se ha dividido.

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/ehistolytica.html>

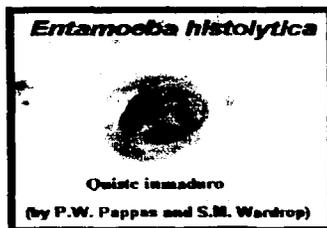
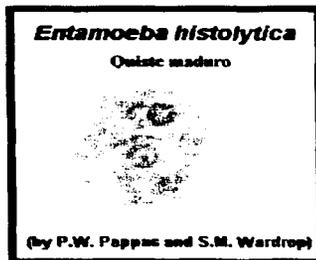


Figura 3. Quiste maduro de *E. histolytica* donde se aprecia que el núcleo se ha dividido dos veces y la pared del quiste ya está constituida.

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/ehistolytica.html>



Ciclo de vida de *E. histolytica*

E. histolytica comprende dos estadios para completar su ciclo de vida. La fase móvil llamada trofozoíto y el quiste la fase infectiva.

La infección inicia cuando el humano ingiere quistes maduros de *E. histolytica* en alimentos o agua contaminada con materia fecal humana. El quiste se debilita al pasar por el estómago liberando cuatro trofozoítos en el intestino delgado, los cuales migran al intestino grueso en donde se establecen. Los trofozoítos se alimentan de nutrientes contenidos en el intestino y eventualmente bacterias. Durante el desarrollo de la enfermedad los trofozoítos ingieren células epiteliales (coloncitos) y eritrocitos presentes por lesiones causadas por el parásito (42).

En ocasiones *E. histolytica*, migra vía torrente sanguíneo a otros órganos (principalmente el hígado) y se establece en ellos alimentándose de células del tejido provocando abscesos que pueden llevar a la muerte del paciente (41).

Los trofozoítos se dividen por fisión binaria y, por factores aún no muy entendidos, se enquistan y abandonan al hospedero con las heces. Una vez que el trofozoíto se enquista, divide su núcleo en dos ocasiones dando como resultado un quiste tetranucleado (5) maduro e infectivo (32).

El ciclo de vida se completa cuando el quiste es ingerido por otro o el mismo hospedero a través de la ingesta de alimentos o agua contaminada (figura 4). Se han identificado amibas de esta especie en reservorios como primates, perros y gatos (32).

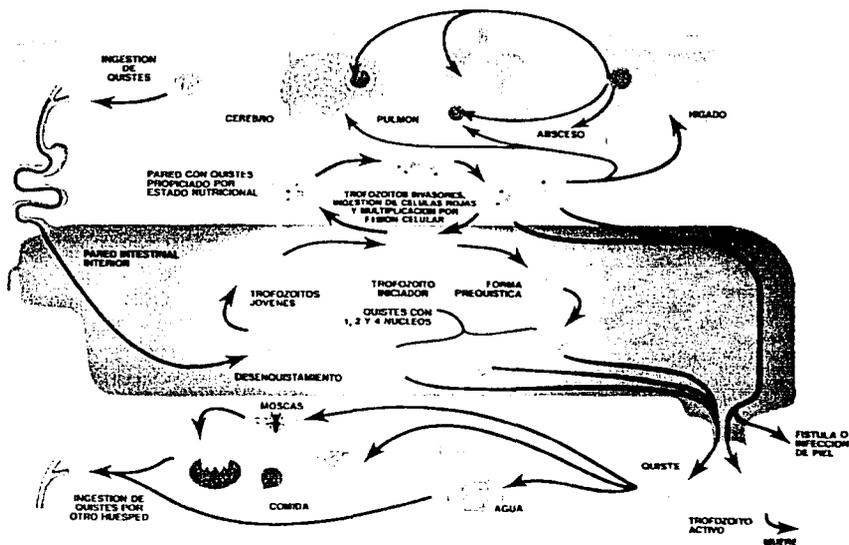


Figura 4. Ciclo de vida de *E. histolytica* (Laboratorio Liomont S.A de C.V. 1996)

Debido a la importancia del quiste en el control de la infección, se ha tratado de estudiar al quiste de *E. histolytica in vitro*, pero aún no se ha tenido éxito para obtenerlos en cultivo (3). Así, para tratar de entender el enquistamiento en *E. histolytica* se ha estudiado el enquistamiento de *Entamoeba invadens* que parasita el intestino de reptiles. Para inducir el enquistamiento de este parásito se utilizan medios hiposmóticos o medios axénicos (libres de bacterias) deficientes de glucosa (2).

El quiste, a diferencia del trofozoito, puede sobrevivir por largos periodos de tiempo fuera del hospedero gracias a su pared resistente que lo protege de ambientes desfavorables y de la desecación. El quiste confiere resistencia a la ameba para abandonar a un hospedero y sobrevivir al medio

ambiente externo antes de infectar otra vez. La pared del quiste esta compuesta principalmente de quitina que sólo se sintetiza en el quiste (7,8)

El quiste es parte fundamental del ciclo de vida de *E. histolytica* ya que, además de ser la fase infectiva del parásito, también representa el medio de diseminación de la amiba. Los mecanismos o señales que estimulan el enquistamiento aún no están bien entendidos.

Expresión de HSPs en parásitos

En parásitos, las proteínas de estrés (HSP) juegan un papel muy importante en los procesos de diferenciación y adaptación a sus hospederos. Los parásitos deben tolerar condiciones de estrés cuando pasan de un ambiente a otro, en donde no sólo se enfrentan a cambios físicos como la temperatura, sino también a cambios químicos como de pH y cambios fisicoquímicos como diferentes osmolaridades del ambiente (31,33).

Por ejemplo, se ha observado que el incremento en la temperatura en cultivos de promastigotes de *Leishmania* sp. induce la síntesis de diversas HSPs y también induce la diferenciación al estadio de amastigote (26).

Esto también se ha observado durante el enquistamiento de trofozoítos de *Giardia* sp., *Naegleria gruberi* y *Entamoeba invadens* (27,33). Durante el enquistamiento de *Giardia lamblia* se ha reportado la expresión de diversos antígenos, entre los que se encuentran algunas HSPs. Con anticuerpos se lograron identificar HSP de 65, 68, 82 y 92 kDa. Ninguna de estas proteínas se expresa en trofozoítos controles, lo que sugiere que puedan estar directamente relacionadas con el enquistamiento (33). En *E. invadens* se ha reportado que un grupo de proteínas denominadas BiP que están relacionadas con el enquistamiento y también con la expresión de HSP70 en condiciones de estrés térmico (27).

Se ha reportado que las proteínas de estrés están involucradas en la virulencia de los parásitos. En *Listeria* sp. se pueden distinguir especies virulentas con ayuda de las HSPs, las especies virulentas sintetizan cerca de siete HSPs adicionales con respecto a las especies no virulentas (33).

Proteínas de estrés (HSP)

Las proteínas consisten de una secuencia única de aminoácidos unidos por enlaces peptídico formados por la condensación del grupo carboxilo (COOH) de un aminoácido y el grupo amino (NH₂) del siguiente (44). Conforme el RNA es traducido, el producto se va plegando dependiendo de los residuos de aminoácidos de la cadena polipeptídica formando estructuras conocidas como α -hélice y β -plegada que se estabilizan con puentes de hidrógeno (43).

La transición de dichas estructuras a una proteína madura depende igualmente de la secuencia polipeptídica y están implicadas uniones covalentes como puentes disulfuro y uniones no covalentes como enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas (44).

Algunas proteínas son capaces de adquirir su conformación biológica activa espontáneamente *in vitro*, a lo que se conoce como autoplegamiento. Otras proteínas carecen de esta cualidad y pueden adquirir diferentes conformaciones que no son óptimas para su función. Para estos casos, la proteína requiere de asistentes de plegamiento conocidas como proteínas chaperonas. Estas proteínas intervienen únicamente durante el plegamiento y ensamblaje de las proteínas (43).

Cuando la proteína ha sido sintetizada y su estructura funcional ha sido modelada, puede enfrentarse a cambios físico-químicos que pueden desnaturalizarla. En estos casos existe un grupo de proteínas denominadas proteínas de estrés o choque térmico (HSPs) que impiden que la proteína se desnaturalice o bien ayudan a renaturalizarla. Muchas de estas proteínas actúan también como chaperonas (43).

Son conocidas como proteínas de estrés o choque térmico debido a que su expresión y función fueron determinadas en principio como una respuesta de la célula a estrés térmico. Su producción minimiza el daño causado a las proteínas debido a que les ayudan a plegarse y a mantener su conformación natural (43.20).

Las proteínas HSP se agrupan en cinco familias dependiendo de su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y las HSP pequeñas (sHSP) que van de 12-42 kDa (43). Estas últimas, que se caracterizan por formar grandes estructuras multiméricas, actúan como chaperonas *in vitro* e intervienen en termotolerancia *in vivo* (figura 5) (15).

D

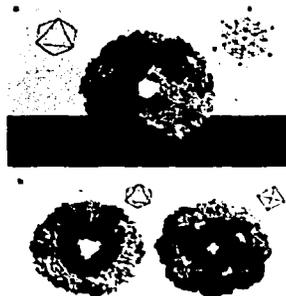


Figura 5. Modelo tridimensional de sHSP de *Methanococcus jannaschii* (Nature (1998) 394 509-604)

Algunas de las proteínas pequeñas de estrés (sHSP) poseen una secuencia altamente conservada de aproximadamente 90 aminoácidos homóloga a las proteínas HSP del cristalino de vertebrados (37). Esta región es conocida como "dominio α -cristalino" y a las proteínas que lo tienen se les llama proteínas de estrés α -cristalinas (HSP α -cristalinas). Este dominio es importante ya que está relacionado con la funcionalidad de estas proteínas a través de su participación en la formación de los complejos multiméricos que intervienen en conferir termotolerancia *in vivo* y actuar como chaperonas *in vitro* bajo condiciones de estrés (15).

Inmunología de las HSP.

Por algún tiempo se pensó que las HSPs, por ser intracelulares, no causaban ningún efecto extracelular; sin embargo se han encontrado este tipo de proteínas asociadas a la membrana citoplasmática de células eucariontes, por ejemplo, se ha localizado la hsp60 asociada a la membrana de ovario de hámster, en células tumorales como la línea CEM-SS (linfocitos humanos CD4+) (19) y en células de bazo de ratón infectadas con *Listeria monocytogenes* (48). También se han encontrado HSPs en forma extracelular pero aún se desconoce el mecanismo por el cual las células pueden secretar este tipo de proteínas (52).

Por otra parte, se sugirió que debido a la gran similitud entre las HSP de diferentes especies, su inmunogenicidad era muy baja, pero recientemente se han hecho estudios en los que se prueba la existencia de una respuesta inmune específica mayor a la que se esperaba.

Se ha reportado que en ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, más del 20% de las clonas reactivas de linfocitos T responden a la HSP de 60.2 kDa de esta bacteria y aunque muchas HSPs se liberan durante la infección, ya sea por la respuesta inmune y la lisis celular, la respuesta es específica contra la HSP60.2 de *Mycobacterium* (49).

Sin embargo, ahora se piensa que en la génesis de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso y enfermedad de Crohn está involucrada una reacción cruzada con HSPs humanas que se encuentran en la superficie del tejido (19).

Con datos como estos se abre un campo nuevo de investigación con las HSP. Se han realizado nuevas investigaciones que arrojan datos que sugieren la participación de estas proteínas en muchos otros eventos celulares y le confieren funciones distintas a las que se conocían (19).

Otras funciones no chaperonas de las HSP

Aparte de la función bien conocida de las HSPs como asistentes de plegamiento o chaperonas, ahora también se les han atribuido otras funciones.

En la bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se ha reportado que la HSP 60 asociada a membrana actúa como adhesina (19) y en *Mycobacterium* se ha encontrado que puede formar poros en membranas (50). Con esto se propone que las chaperoninas pueden ser otra clase de determinantes virulentos capaces de provocar patología tisular.

También se ha reportado que la chaperonina GroES de 10 kDa es un factor que se expresa en etapas tempranas del embarazo (es denominado EPF por sus siglas en inglés). Dicho factor inmunosuprime a las hembras de modelos murinos para evitar el rechazo o una respuesta inmune contra el feto. En suero de mujeres esta función aún no está bien esclarecida (19).

El factor neurotrófico activo-dependiente (ADNF por sus siglas en inglés) es una proteína humana de 14kDa que es homóloga a la HSP 60. Esta proteína inhibe la apoptosis neuronal *in vitro* en neuronas humanas (47).

En ratones se encontró que la HSP10 (perteneciente a la subfamilia de GroES) de *M. tuberculosis* es un factor de crecimiento de osteoclastos. El sitio activo de esta función radica en dos regiones proteicas que interactúan con la HSP60 (perteneciente a la subfamilia GroEL). Estas proteínas juntas son reportadas como un complejo con función de chaperona (51).

Tal vez la función que ha causado más interés es la que relaciona a las HSP con la respuesta inmune. Se ha sugerido que las HSPs pueden ser clasificadas como "antígenos múltiples" por la habilidad que tienen de interactuar y activar a diferentes tipos celulares (21).

Los péptidos derivados de chaperoninas pueden activar a células presentadoras de antígenos y amplificar la presentación de péptidos y la respuesta de linfocitos (21). Los primeros reportes se hicieron con la HSP 60 de *M. tuberculosis* (que también se ha referido como HSP 65). Esta proteína y otras HSPs pueden estimular la producción de citocinas proinflamatorias de monolitos, leucocitos y células epiteliales humanas (22,24).

También se han hecho estudios en modelos murinos que demuestran en diversos tipos de cáncer una reactividad serológica específica a ciertos antígenos entre los que se encuentran la HSP70 acoplada a ciertos péptidos. Esto podría representar una propuesta terapéutica en contra del cáncer (21) debido a la capacidad que tienen los péptidos acoplados a HSP de activar la respuesta inmune humoral y celular.

Cabe mencionar que las diversas funciones que ahora se les atribuyen a las HSP han sido descubiertas por estudios realizados en HSP de mayores pesos moleculares. Las proteínas pertenecientes a la familia de las sHSP y de las HSP α -cristalinas no han sido tan ampliamente caracterizadas en comparación con las demás familias de HSP. Esto sugiere que la falta de información al respecto se debe en gran medida a la falta de investigación en este ámbito.

Particularmente en *E. histolytica* son pocos los estudios que describen a las proteínas HSP y la respuesta de *E. histolytica* a estrés. Solamente se han caracterizado dos proteínas de la familia de las HSP: HSP60 y HSP70 en estudios no relacionados con la respuesta a estrés del parásito (18,25,38). Sólo existe un reporte referente a estrés realizado en *E. invadens* y *E. histolytica* que relaciona la expresión de genes relacionados con el enquistamiento y la respuesta a estrés de la amiba (27).

Tomando en cuenta que durante su ciclo de vida *E. histolytica* esta sometida a diferentes tipos de estrés, resulta interesante estudiar esta respuesta y la expresión de las sHSPs como parte de este proceso. Por otra parte, con las nuevas investigaciones que relacionan a las proteínas de mayores pesos moleculares con eventos inmunológicos y patológicos, resulta atractiva la idea de que las sHSP podrían también estar involucradas en otras funciones.

II. OBJETIVOS

Caracterizar el gen HSP16Eh de *Entamoeba histolytica*.

Expresar el producto del gen HSP16Eh mediante un vector de expresión.

Expresar el gen HSP16Eh en *E. histolytica* bajo condiciones de estrés térmico.

III. HIPÓTESIS

El gen HSP16Eh tiene alta homología con genes reportados como genes pertenecientes a la familia de las proteínas pequeñas de choque térmico (sHSP), por lo tanto, la expresión del gen se verá incrementada proporcionalmente al estrés térmico en los ensayos con *E. histolytica*.

IV. MÉTODO

i) Obtención del gen HSP16Eh

Se tamizó una librería de expresión, cortesía de la Dra. Esther Orozco, CINVESTAV IPN, de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS con anticuerpos IgA de saliva de pacientes con absceso hepático amibiano. Se obtuvo la clona Sla 54 que contenía un inserto de cDNA de 210pb que de acuerdo al análisis de secuencias del GeneBank mostraba una similitud con una familia de proteínas llamadas Ciclofilinas. El plásmido pBlueScript SK conteniendo el inserto fue liberado del fagémido usando el sistema SOLR-ExAssist (Stratagen,USA). Al plásmido resultante se le denominó SAHA 54 (35).

El inserto contenido en el plásmido SAHA 54 se usó como sonda para tamizar una librería genómica, cortesía del Dr. Abraham Landa, Facultad de Medicina UNAM, en λ ZAP II para obtener la secuencia completa del gen de la Ciclofilina de *E. histolytica*. De esta forma se obtuvo el plásmido p54G2 que contenía un inserto de 3,043 pb (36). Al secuenciar totalmente, por el método de término de la cadena por dideoxinueclótidos utilizando el secuenciador ABI PRISM™, se encontró otro gen 241 pb río arriba del gen de la ciclofilina. De acuerdo al GeneBank, correspondía al gen de una proteína perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular al que se denominó HSP16Eh.

Para determinar la identidad y homología del gen HSP16Eh con respecto a otros genes homólogos, la secuencia del gen HSP16Eh de *E. histolytica* fue alineada con otras 6 secuencias de sHSP obtenidas de la base de datos GenBank, usando el programa Multalin Protein Sequences (NPS@.2000, http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalin.html).

Posteriormente se procedió a clonar el gen en un vector de expresión con el fin de producir grandes cantidades de la proteína para su posterior purificación.

ii) Preparación de células competentes

Todo el proceso requiere de condiciones de esterilidad. Se crecieron bacterias *E.coli* BL21 a saturación en medio LB (10g Bacto-triptona, 5g Bacto-yeast extract y 5g de NaCl, aforar a 1L esterilizar 20min 15lb/sq). Se tomó 1ml del cultivo, se colocó en 100ml de medio LB y se incubó a 37°C por 3h a 250rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm por 20 min. Las células se resuspendieron en 7.3 ml de medio LB. Posteriormente se adicionó una mezcla de 2 ml de

polietilén glicol al 50%, 500µl de Dimetil sulfóxido y 200µl de Cloruro de Magnesio 1M. Se agitó suavemente y se incubó 10 min en hielo. La mezcla se separó en alícuotas de 300µl, se congelaron en hielo seco y posteriormente se guardaron a -70° C (58).

ii) Clonación de HSP16Eh en el vector de expresión pET23a

La secuencia completa del gen HSP16Eh se amplificó del plásmido p54G2 por PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando los primers HSPFTR (5'- GATCCGTTAATATCAAC-3') y HSPETF (5'- CATATGCACTCA AAGC-3') y el siguiente programa: Iniciación 94°C 3min, Desnaturalización 94°C 3min, Alineamiento 60°C 1.5min, 25 ciclos, Extensión 72°C 10min.

Posteriormente el producto de PCR se ligó en el vector pMOSblue (Amersham, UK) siguiendo el protocolo del fabricante (53). Con esta construcción se transformaron células competentes XL1-Blue mediante el siguiente protocolo:

En condiciones de esterilidad se tomaron 12µl resultantes de la ligación de vector pMOSblue y el producto de PCR. Se añadieron a 100µl de bacterias competentes XL1-Blue recién descongeladas. La mezcla se incubó por 30 min en hielo, pasado ese tiempo se calentó a 43°C por 3 min., se adicionó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C por 45 min; posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 min, se resuspendió el pellet en 40µl X-Gal (20mg/ml) + 10µl de IPTG 1M, se plaqueó una caja con medio LB-agar /ampicilina (200mg/ml) se dejó incubando toda la noche a 37°C. En la caja crecieron colonias azules (no transformadas) y blancas (transformadas), se procedió a tomar cinco colonias blancas para posteriormente comprobar por PCR la presencia del gen en estas bacterias. De las colonias positivas (blancas) se purificó el plásmido contenido en ellas (54) para secuenciarlo y así corroborar que el gen se encontraba sin alteraciones. A este plásmido purificado se le denominó pMB-HSP16Eh.

El gen HSP16Eh fue recuperado del plásmido pMB-HSP16Eh digiriéndolo con las enzimas de restricción BamHI y NdeI (10U). El vector de expresión pET23a fue digerido con las mismas enzimas de restricción. Se procedió a ligar el gen utilizando la enzima T4 DNA ligasa (10U) siguiendo el protocolo del fabricante (Figura 6). La construcción resultante se denominó pET/HSP16Eh. La clonación se confirmó por secuenciación automática con los primers T7 (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') y HSP16EhR (5'-GATCCGTTAATATCAAC-3'). Se localizó un desfase de 2 nucleótidos en la región donde se liga el gen insertado con la región terminal rica en histidinas contenida en el vector de expresión.

iii) Corrección del marco de lectura del plásmido HSP16Eh/pET

El plásmido pET-HSP16Eh fue digerido con la enzima de restricción HindIII que deja cuatro nucleótidos en cadena sencilla. Posteriormente se incubó la digestión con la enzima Klenow (10U) en presencia de los cuatro nucleótidos trifosfatados para sintetizar la hebra complementaria (Figura 7). Finalmente se circularizó el plásmido con ayuda de la enzima T4 ligasa (10U).

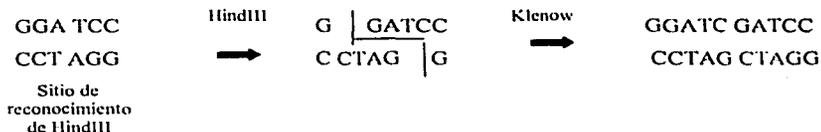


Figura 7

Con este paso se añadieron cuatro nucleótidos a la secuencia. La suma de estos cuatro nucleótidos con los dos nucleótidos que desfaseaban la lectura del gen, da como resultado la adición de dos tripletes que codifican para dos aminoácidos adicionales que no forman parte del gen HSP16Eh pero que son importantes porque corrigen el marco de lectura entre el gen HSP16Eh y la secuencia de histidinas que el vector aporta y que son necesarias para la posterior purificación por cromatografía de afinidad de la proteína expresada.

El inserto clonado se volvió a secuenciar y se constató que se encontraba completo, sin alteraciones en el gen HSP16Eh y que la porción terminal de histidinas se encontraba en el marco de lectura correcto. Así que se procedió a transformar células competentes para la expresión de la proteína.

v) Transformación de bacterias competentes *E. coli* BL-21.

En condiciones de esterilidad se incubaron 12µl del vector pET-23a ligado al inserto con 100µl de bacterias competentes recién descongeladas. La mezcla se incubó por 20 min a 4°C, pasado ese tiempo se calentó a 43°C por 3 min, se adicionó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C por 45 min; posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50µl. de medio LB, se plaqueó una caja con medio LB/ampicilina (200mg/ml), se dejó incubando toda la noche a 37°C, se picaron cinco colonias y se comprobó la presencia del inserto por PCR.

vi) Expresión del producto del gen HSP16Eh

La expresión de la proteína se llevó a cabo utilizando 0.2mM de Isopropil β-D-Tiogalactopyranosido (IPTG), como inductor. Para los primeros ensayos de inducción, se picaron cuatro colonias de las bacterias transformadas, se colocaron individualmente en 1ml de medio LB con 200mg/ml de ampicilina y se dejaron crecer por una hora en agitación. Posteriormente, se sembraron los cultivos en cajas con LB/ampicilina 200mg/ml y paralelamente en cajas con LB/amp/IPTG; las cajas se incubaron toda la noche a 37°C. Los cultivos a partir de los cuales crecieron colonias en las cajas LB/amp/IPTG fueron descartados.

Se tomó una de las colonias que creció en LB/amp pero que no creció en las cajas LG/amp/IPTG y se inoculó en 2ml de medio LB/amp (200mg/ml) se dejó crecer por cuatro horas (D.O⁶⁰⁰ 0.3) a 37°C con agitación constante (300 rpm) después de transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 2µl de IPTG 1M y se dejó incubando a diferentes tiempos (1,2,3,4 h y toda la noche) en las condiciones antes descritas.

Para determinar la localización de la proteína en las células (fracción soluble o insoluble), se tomaron 2 ml de bacterias inducidas toda la noche, se centrifugaron por 30 seg a 14,000 rpm. Las bacterias se resuspendieron en 500µl de buffer Tris 0.01M pH 8.8 con 5µl de N α -p-Tosyl-L-Lisina Clorometil Ketona (TLCK 50 mg/ml) como inhibidor de proteasas. Las bacterias se lisaron alternando en hielo seco y a 37°C tres veces por 3 min y por sonicación. Finalmente se separaron las fases centrifugando 10 min a 14,000 rpm.

vii) Electroforésis del producto de la expresión del gen HSP16Eh.

Se preparó un gel SDS-PAGE al 12% (2ml. de acrilamida 30%, 1.25ml. de tris 1.5M pH 8.8, 1.7ml. de agua, 50µl de SDS 10%, 31.5µl. de APS y 3.15µl. de TEMED) (45) en la cámara electroforética (BioRad, USA).

Las muestras de la expresión de bacterias con IPTG se procesaron de la siguiente forma: se tomaron 100µl de cada uno de los tiempos de evaluación de la expresión de las bacterias inducidas, se centrifugaron 30 seg a 14,000 rpm. El pellet se resuspendió en 30µl de buffer de muestra para geles de acrilamida (SDS 10%, Tris HCl 0.5M pH 6.8, 1ml. de glicerol, 5.4ml. de agua destilada y 2ml. de azul de bromofenol) y justo antes de cargarlas al gel, se hirvieron por 10 min. Se corrieron 10µl de cada muestra por carril, los geles se corrieron a 15mA por aproximadamente 40 min. Para determinar el peso molecular aproximado de las proteínas, se usó el marcador molecular de bajo rango (Roche, USA).

Para el corrimiento de las fracciones celulares se tomaron 20µl de la fracción soluble y se adicionaron 10µl de buffer de muestra. La fracción insoluble se resuspendió en 100µl de buffer de muestra de los que se tomaron 20 µl para correr en el gel. Todas las muestra se hirvieron por 10 min justo antes de ponerlas en el gel; como marcador molecular se usó el peso molecular de bajo rango (Bio-Rad, USA).

Los geles se tñeron con Azul brillante de Coomassie (0.25 g en 90 ml de metanol :H₂O-1:1, v/v y 10 ml de ácido acético glacial) y se destñeron con ácido acético glacial al 10%.

viii) Respuesta a estrés térmico en *E. histolytica*

De un cultivo de 72 horas de crecimiento se tomaron 2.5×10^6 amibas de la cepa HM-1:IMSS para cada lote. Las amibas contenidas en tubos de 1.5 ml (Eppendorf, USA) se incubaron a 37, 39, 41 y 43 °C por 20 y 40 min.

Una vez estresadas las amibas, se purificó el RNA total de las mismas con ayuda del High Pure RNA isolation kit (Roche, USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (55). Posteriormente se sintetizó cDNA a partir del RNA purificado con ayuda del 1st strand cDNA synthesis kit para RT-PCR (Roche, USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (56). Para comprobar que las muestras de RNA no estaban contaminadas con DNA se realizó un PCR con las muestras de RNA total.

Se llevó a cabo una reacción de PCR partiendo del cDNA sintetizado anteriormente utilizando los primers y el programa con el que anteriormente había amplificado el gen HSP16Eh. Como control positivo se amplificó un gen Sje1 (GenBank U66671) de *E. histolytica* obtenido en el laboratorio (35) con sus respectivos primers: JCPETF (5'-CATATGACTTATTTGGAG-3') y JCPETR (5'-GATCCCCAAAGAAATCATCAAAATC-3'). Los amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1%. El resultado se analizó con el programa RFLP scan versión 2.1 (Analytics, A Division of CSPI, MA USA 1994). Los datos obtenidos del analizador de imágenes se graficaron utilizando el programa Microsoft Excel 2000.

Posteriormente el producto de RT-PCR se clonó en el plásmido pCR 2.1 (Invitrogen, USA) para secuenciarlo y así corroborar que se trataba del gen HSP16Eh.

III: RESULTADOS

Aislamiento y secuenciación del gen HSP16Eh

Se tamizó una librería de expresión de cDNA de *E. histolytica* con anticuerpos IgA provenientes de saliva de pacientes con absceso hepático (35). Una de las clonas denominada SAHA54 se utilizó como sonda para tamizar una librería genómica λ ZAP de la que finalmente se obtuvo el plásmido p54G2 cuyo inserto se secuenció en su totalidad.

Además del gen completo de la ciclofilina (36), también se obtuvo 241pb río arriba el gen completo de una proteína que comparte un 10% de identidad y un 48.9% de similitud en sus aminoácidos con el dominio α -cristalino de las proteínas pequeñas de estrés.

Se trata de un gen de 417 pb que codifican 139 aminoácidos. El peso molecular esperado de esta proteína es de 16 kDa, aunque por la naturaleza de esta familia de HSP, se puede asociar con otros monómeros de la misma proteína para formar estructuras de mayor peso molecular. Los aminoácidos relacionados con el dominio α -cristalino están subrayados en la secuencia completa del gen HSP16Eh (Figura 8).

Cabe mencionar que en protozoarios no se había reportado alguna secuencia de proteínas de la familia sHSP. En este trabajo se presenta la primera secuencia de una proteína sHSP reportada para *E. histolytica* y para protozoarios en general. La secuencia del gen HSP16Eh se puede encontrar en el GenBank con el número de acceso AF498649

Secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del gen HSP16Eh

-ctaataaac
atgcactcacaagcacttgtaagaccaacaccatttaatccattttattcaacaa
M H S Q A L V R P T P F N P F I Q Q
caacgtaatcaaaaaatatttggttgatggaaaaggaacaggacattgggcacca
Q R N Q K I F V D G K G T G H W A P
gaaatttgggaaccaccatgtgaattacttgaagcagaacagattttatttatta
W E E I P P C E L L E A E Q I Y L L
aagttagaagttccaggtattgataaaaaaacattaagtgttaaatatgcaaat
K L E V P G I D K K T L S V K Y A N
aattgggttgttataacaggaactagacaagttgaaggtaaaatagaatttaca
N W V V I T G T R Q V E G K I E F T
gaatttttatatgggtacttttagaagagaaattcctcttccaactgatggtgat
E F L Y G T F R R E I P L P T D V D
ggagaaaaaattaaagctaagtatcaagatggaatacttgctggttgttattcca
G E K I K A K Y Q D G I L A V V I P
agaaatctccaatgggatgggtaaaagttgatattaactaa
K K S P M G W V K V D I N -

Figura 8. Secuencia completa del gen HSP16Eh. El dominio α -cristalino se encuentra subrayado.

La secuencia fue sometida a un análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El resultado indicó que el gen HSP16Eh tenía alta homología con proteínas sHSP. Se tomaron las siguientes secuencias del GeneBank porque corresponden a los genes más parecidos al gen HSP16Eh: *Thermotoga maritima* (No. de acceso GenBank D72385), *Bradyrhizobium japonicum* (CAA05837), *Aquifex aeolicus* (A70411), *Synechococcus vulcanus* (BAA32501), *Schizosaccharomyces pombe* (T41736), *Pyrococcus abyssi* (D75157) y el gen HSP16Eh de *Entamoeba histolytica* (AF498649) El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa Multalin Protein Sequences (NPS@.2000, http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalin.html) (figura 9).

Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del gen HSP16Eh con diversas secuencias homólogas referidas por BLAST como genes de proteínas de estrés de bajo peso molecular (sHSP)

```

Entamoeba      MHSQALVRP-----TF--FNFFIQQR-NOKIFVDGKGTGHWAPEIWE--FP
Synechococcus MAIVRWE-----P-FREIDAIQGMNRLDELILPTERRSDLSFLPA
Thermotoga    MLLGRREDI-----PFFRELRQREIDRLFDFFRTEVVRPAKEFFAPD
Aquifex      MDRRSMIVWR-----P-FEEVERLRDFERLLEEFVPR--RAEQETLVFP
Pyrococcus   MVRRRRWDIWDPFDIIREIQEEIDA-MFDEFFSRPLWTYRRWRREPEVYEESEVWRREDF
Bradyrhizobium MALRELIWNNGSRNLPARTEVDNPFSLIHRMNRLEFDVFRGVDIGQPAPPATMGWPS
Schizosaccharomyces M-L-----FDAFTNGFMNDIFEGDRSKFNR-----SAWLSCWG-PA

```

```

Entamoeba      CELLEAEQIYLLKLEVPDIDKKTLSVKYANNWVITGTRQVEGKIEF-----TEFLYGT
Synechococcus AELEETPEALLKVELPGMDPKDIDVQVTAEAVSTIGERKSETKTETEGMKR-TEFRYGK
Thermotoga    MDVYETDDEVVI EVELPGIDRRKDVKITVEENILKISGEKKLEREQGKNYNY--VERSAK
Aquifex      VEVYETDKVEVVIKMDLPGVKRKEIDIEITVKENAVHVRAERKEKEKEENTENIIR-AERETGV
Pyrococcus   VDI FDRGDEFVVI AELPGVRRKEDIKVRVTEDSVYI EATVRRKELEEEGAVR-IERYISG
Bradyrhizobium VEFNETDKVEKVI AELPGIEQRDVEVELADGVLTISGEKKSETKDKERRF---SERYISG
Schizosaccharomyces LELRTEEDTIEVDVVEFGIQRKQLKVDLHGSKLTI SGERKKPEPEKACGLIPWSEPCVGA

```

Dominio α -cristalino

```

Entamoeba      FRREIPLPTDVDGKIKAKYQDGI LAVVT PKSEPMGWVKVDIN----
Synechococcus FORVILPLVRIQNTSVKAEYKDGIIHLTLPKAEKRNRVVKVSLA--
Thermotoga    FERAIRLFDYVDVEKIKAEYKNGVLTIRVTKKEERKKKVI EVEVQE-
Aquifex      IERVILPLPEVTPKAEAKYENGVLEIRIPKRVHVEKKEKIKLA----
Pyrococcus   YRRVIRLPEEVIPEKAKAYNNGVLEIRIPKQPTKKEGEGFEVKEI
Bradyrhizobium FERRIPV- QDVDQDKVAASEKDGILTVLTPKSPTEQRKVKRIANGK
Schizosaccharomyces FSRITITLPPVDEKLIHASLWNGILSLVMKKNKPEFTTRIVEIQ---

```

Expresión del gen HSP16Eh en el vector de expresión pET.

El gen HSP16Eh se clonó en el plásmido de expresión pET23a. Las células que se usaron para la expresión son conocidas como BL21plys.

Después de la transformación de las bacterias se comprobó la presencia del gen HSP16Eh por PCR (figura 10).

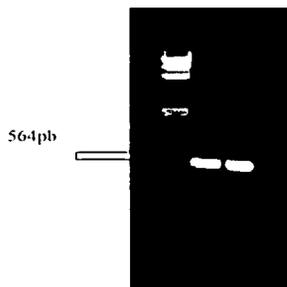


Figura 10. Gen HSP16Eh amplificado por PCR a partir del plásmido pET/HSP16Eh. De izquierda a derecha se encuentra el marcador molecular λ -HindIII, el amplificado de la colonia #1 y el amplificado de la colonia #2 (positivas). La flecha señala la banda correspondiente a 564 pb del marcador molecular

Posteriormente se indujo la expresión de la proteína adicionando 2mM de IPTG. Las células se incubaron con agitación constante a 37°C.

Durante la inducción hubo una expresión máxima entre las 2 y las 4 h después de haber adicionado IPTG. La inducción mostró una banda que se encuentra cercana a los 21.5 kDa que es relativamente cercana al peso molecular esperado de 20kDa debido a los aminoácidos adicionales que aporta el plásmido a la proteína para facilitar su purificación.

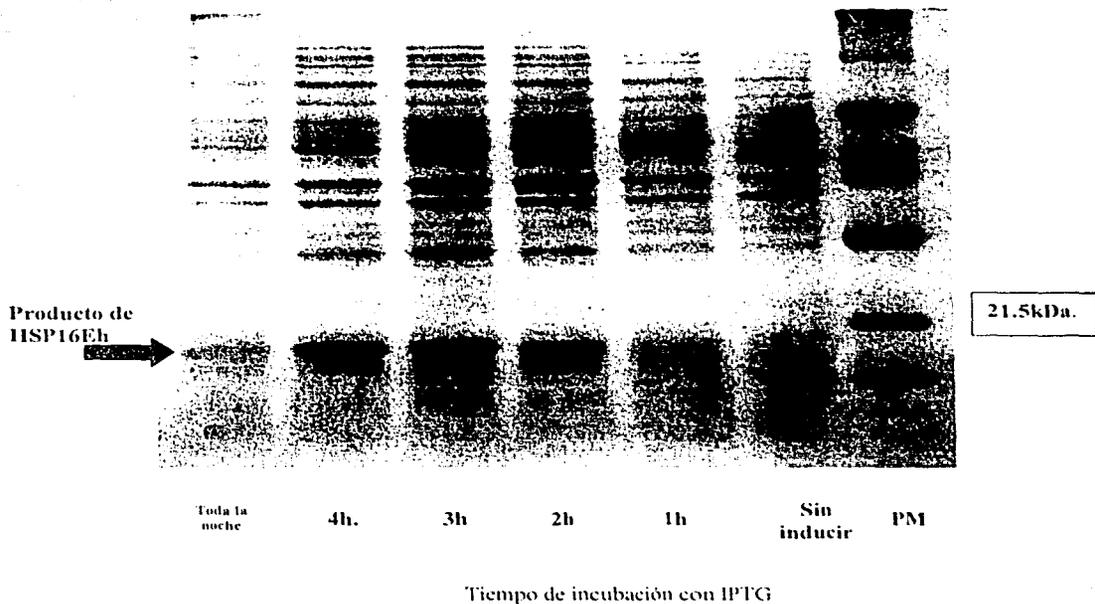


Figura 11. Sobre expresión del producto del gen HSP16Eh en bacterias BL-21 transformadas con pET/HSP16Eh. La figura muestra la banda correspondiente a la proteína inducida cercana a la banda de 21.5kDa del marcador molecular (PM). La inducción se llevó a cabo entre las 2 y las 4h posteriores a la adición de IPTG.

Para determinar en que fracción del lisado se encontraba la proteína, al terminar la inducción se lisaron las bacterias, se separó por centrifugación la fracción soluble (citoplasmática) de la fracción no soluble (membranas) y se corrió un gel SDS-PAGE al 12% (figura 8).

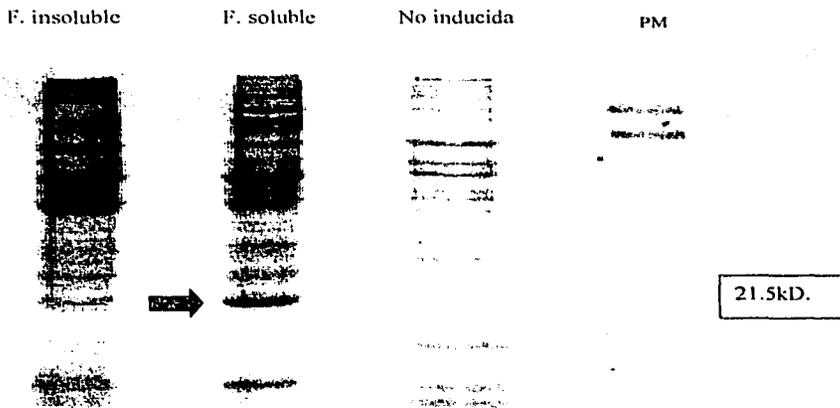


Figura 12. Electroforesis de las fracciones celulares. Como se puede observar en el gel, la proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble de las bacterias. Se puede notar una pequeña porción en la fracción no soluble (membranas) Se ha reportado que las HSP también pueden estar asociadas a la membrana pero en menor proporción.

Inducción del gen HSP16Eh en *Entamoeba histolytica* por estrés térmico

Se tomaron 5×10^6 amibas de 72 horas de crecimiento y se sometieron a diferentes temperaturas (37,39,41 y 43 °C). Posteriormente se extrajo el RNA total de las muestras. Se sintetizó cDNA a partir del RNA purificado y se realizó un PCR con los primers del gen HSP16Eh. También se realizó el PCR a partir de RNA para comprobar que las muestras no estaban contaminadas con DNA genómico (Figura 13).

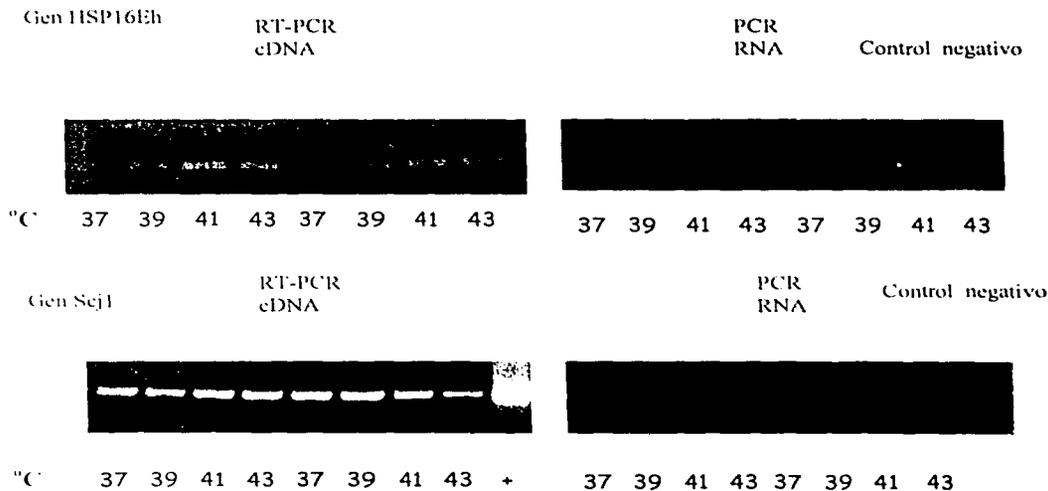


Figura 13. Inducción del gen HSP16Eh en *E. histolytica* por estrés térmico. Las intensidades de las bandas del RT-PCR se correlacionan directamente con la expresión del RNA mensajero de HSP16Eh a las diferentes temperaturas a las que fueron sometidas las amibas.

La fotografía anterior fue analizada por el programa RFLP scan versión 2.1 (Analytics, A Division of CSPI, MA USA 1994). Los resultados se presentan graficados a continuación.

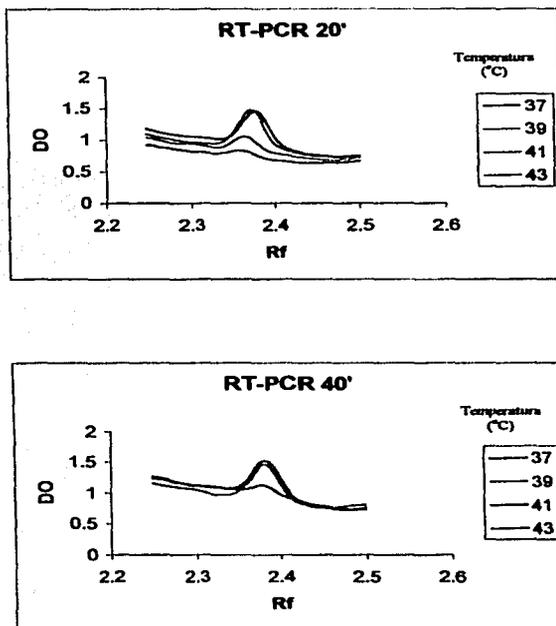


Figura 14. Gráfica de la densidad óptica (DO) de las bandas correspondientes al amplificado del gen HSP16Eh expresado por estrés calórico en trofozoitos de *E. histolytica*. La densidad óptica de las bandas incrementa conforme la temperaturas se eleva.

En la siguiente gráfica se observa que la densidad óptica de las bandas se incrementa conforme la temperatura se eleva (37-41°C). Esto también se relaciona directamente con el incremento de la expresión del RNA mensajero del gen HSP16Eh en condiciones de estrés térmico.

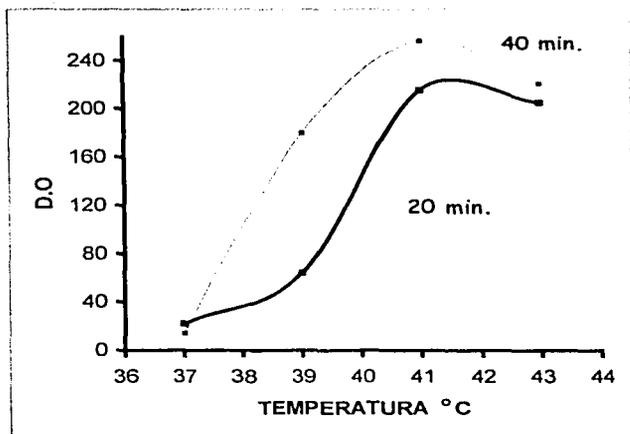


Figura 15. Gráfica del incremento de la densidad óptica de las bandas del amplificado del gen HSP16Eh con respecto a la temperatura a diferentes tiempos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró caracterizar el gen HSP16Eh que codifica para una proteína de 16 kDa en *E. histolytica*. Usando el programa ProtParam Tool (ExpAsy, 2002) se estimaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: el punto isoelectrico (Pi) de esta proteína es de 7.81, el coeficiente de extinción a 280nm es de 27880 M/cm lo que corresponde a una absorbancia de 1.753 y se estima que la vida media de esta proteína *in vivo* es de 10 horas. Al analizar la secuencia de aminoácidos de dicho gen se encontró que comparte en promedio un 48.9 % de similitud y un 10% de identidad con el dominio α -cristalino altamente conservado de proteínas de las sHSP(9,10).

El dominio α -cristalino es una porción homóloga conservada en proteínas pertenecientes a la familia de las sHSP. Se denomina dominio α -cristalino ya que fue caracterizado en células del cristalino ocular en mamíferos (15). Este dominio esta muy relacionado con la formación de oligómeros homogéneos estructuralmente funcionales. En dicho dominio se tienen aminoácidos conservados como: P76, G77, R122, A137, G142, L144 y K150 (respecto a la secuencia alineada de *B. japonicum*) que se encuentran presentes en el gen HSP16Eh de *E. histolytica*. Estos aminoácidos determinan la estabilidad de la proteína monomérica (10) y también intervienen para que la proteína forme complejos funcionales multiméricos funcionales en condiciones normales y de estrés (13). En estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, se ha reportado que mutaciones en esta región eliminan la capacidad de la proteína para proteger a la célula en condiciones de estrés (37).

La sHSPs son un grupo de proteínas que recientemente han empezado a ser estudiadas y entendidas. La estructura de estas proteínas así como nuevas funciones de las proteínas HSP en general han sido definidas en estudios relativamente recientes (9,10). Así se ha logrado comprobar la participación de HSP en eventos inmunológicos proinflamatorios (21), activación de células T (23,24) y la presentación de antígenos (22) por mencionar algunas funciones. Las HSP también se han asociado con factores de virulencia como en la bacteria *Listeria*, factores de diferenciación en protozoarios parásitos como *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei* (26,33) y en el enquistamiento de procariontes, eucariontes y artrópodos (1,17,27)

Las proteínas pequeñas de estrés se han caracterizado principalmente por evitar el agregamiento de proteínas desnaturalizadas y por conferir termotolerancia de bacterias *in vivo* (11,12). Sin embargo el conocimiento que se tiene de esta familia de HSP es aún escaso. Se ha reportado que las sHSP

evitan la degradación de RNAm durante la maduración de las semillas de tomates (37) y durante la maduración de embriones de alfalfa (37) así como también se ha relacionado la expresión de estas proteínas en arreglos citomorfológicos como la polimerización de actina (37). En protozoarios el conocimiento de la función de esta clase de proteínas es nulo. Como se mencionó anteriormente, este trabajo presenta la primera secuencia reportada para *E. histolytica* y protozoarios en general. No se han reportado estudios que relacionen a las proteínas pequeñas de estrés con las muchas otras funciones que ahora se les atribuyen a las HSP de mayores pesos moleculares porque aún no se han realizado los estudios necesarios.

Hasta ahora, en *E. histolytica* sólo se han reportado dos HSPs: HSP60 y HSP70. Con la HSP60 de *E. histolytica* se realizaron estudios evolutivos por la presencia del crypton (organelo relacionado con la mitocondria) en este organismo (38) y la relación de HSP 60 con este organelo. Respecto a la HSP70 además de estudios filogenéticos (18) y de reportes de una respuesta inmune específica en pacientes con absceso hepático (25), se ha hecho el único estudio que reporta una respuesta a estrés térmico en el género *Entamoeba* que relaciona al estrés térmico con el enquistamiento de *E. invadens* y sugiere una relación semejante en *E. histolytica*.(27)

No es de extrañar la participación de proteínas de estrés en eventos de diferenciación en protozoarios. Las proteínas HSP en general además de expresarse en condiciones de estrés también se expresan constitutivamente como asistentes de plegamiento o chaperonas (37) que además de ayudar a plegar a las proteínas recién sintetizadas también ayudan a transportarlas a donde sean requeridas. Se ha reportado que las HSP también interactúan con factores nucleares que intervienen en la diferenciación celular (28,29).

También hay que considerar que en ciclos de vida complejos como el de los parásitos, los organismos deben adaptarse rápidamente a cambios en las condiciones químicas, físicas o biológicas variantes ya que de eso depende la sobrevivencia del organismo y el éxito de la infección. Este proceso de adaptación debe ser rápido ya que, adicional al cambio ambiental que experimentan los organismos dentro de su hospedero, este también debe combatir o evitar al sistema inmunológico.

Al expresar el gen HSP16Eh en trofozoítos de *E. histolytica* por estrés térmico detallamos ligeramente la respuesta a estrés calórico en este organismo. Los trofozoítos se sometieron a

temperaturas similares a las que su hospedero podría experimentar en un evento inmunológico (Ej. fiebre). Como muestran los resultados, la expresión del mensajero se incrementa conforme se aumenta la temperatura llegando a un máximo a los 41°C aproximadamente (figuras 13,14 y 15).

Utilizamos altas temperaturas para inducir el producto del gen HSP16Eh *in vitro* ya que las proteínas de estrés han sido ampliamente caracterizadas bajo este parámetro (30,31). Sin embargo estas proteínas también pueden ser inducidas *in vivo* e *in vitro* con otros estímulos físicos o químicos (43). Sería interesante comprobar la inducción de esta proteína bajo otras condiciones como cambios osmóticos y oxidativos que son variantes que naturalmente se presentan en el colon.

El enquistamiento es una estrategia que algunos organismos utilizan para sobrevivir a ambientes hostiles. En el caso de *E. histolytica*, además de ser el medio por el cual sobrevive a la desecación también es una herramienta para invadir a otros organismos y diseminarse entre la población. Aunque todavía no se tiene claro el mecanismo que activa el enquistamiento en *E. histolytica*, ya que aún no se ha logrado obtener quistes en cultivo, se ha sugerido que la respuesta a estrés y el enquistamiento tienen alguna relación en organismos parásitos del mismo género (27).

La caracterización y purificación del producto del gen HSP16Eh nos proporcionará una herramienta para detallar la respuesta a estrés en *E. histolytica* de las proteínas pequeñas de estrés, que pueden arrojar resultados novedosos ya que a la fecha no se tiene reportes al respecto.

En este trabajo se obtuvo la construcción del plásmido pET/HSP16Eh con el que se logró transformar bacterias competentes BL-21. La inducción recombinante se obtuvo después de 3 horas de incubación con IPTG (figura 11). De las bacterias inducidas se separaron las fracciones celulares por centrifugación y se observaron en un gel SDS-PAGE (figura 12). En este gel se muestra que la proteína expresada se encuentra en la fracción citosólica (fracción soluble). Este ensayo se llevó a cabo para determinar que porción del lisado se iba a utilizar para proceder a la purificación por columna de afinidad. Este ensayo se llevó a cabo en bacterias inducidas, sin embargo, se esperaría un resultado similar en amibas por la naturaleza de las proteínas de estrés.

Por el momento ya se ha estandarizado la técnica para inducir al gen HSP16Eh. Se pretende obtener suficiente proteína para hacer ensayos de funcionalidad del producto del gen HSP16Eh.

CONCLUSIONES

De este trabajo se concluye que el gen HSP16Eh del genoma de *Entamoeba histolytica* codifica para una proteína que comparte un 48.9% de similitud y un 10% de identidad con el dominio α -cristalinas de las proteínas pequeñas de estrés. La secuencia de aminoácidos indica que el producto de este gen tiene una masa de 16 kDa, un punto isoeléctrico de 7.81 y un coeficiente de extinción molar a 280 nm de 27880 M/cm.

El alineamiento múltiple que se llevó a cabo con otras proteínas de la misma familia, indica que este gen se parece más al gen homólogo de la cianobacteria termófila *Synechococcus vulcanus* que a cualquier otra, incluyendo secuencias eucariontes.

Se obtuvo la construcción del plásmido pET/HSP16Eh con el que se transformaron bacterias BL-21 competentes. Se logró la expresión del producto del gen HSP16Eh clonado en BL-21 después de 2 horas de incubación con IPTG a 37°C y agitación constante a 300 rpm. La proteína expresada se localiza en la fracción citoplasmática de las células inducidas. La purificación del producto de la expresión está en proceso.

De los experimentos realizados *in vitro* en trofozoítos *E. histolytica* se concluye que el gen HSP16Eh se expresa en condiciones de estrés térmico, mostrando una máxima expresión de RNAm a los 41°C.

GLOSARIO

Abceso: Lesión localizada en tejidos u órganos caracterizada por inflamación

Adhesina: Proteína membranal que media la adhesión de una célula a una superficie o a otra célula.

Amastigote: Estadio del ciclo de vida de *Leishmania* spp. que se caracteriza por ser intracelular (célula blanco: macrófagos) y aflagelado.

Apoptosis: Muerte celular programada

Artritis reumatoide: Inflamación generalizada de arterias, arteriolas y articulaciones; causa fibrosis y constricción del tejido afectado.

Cariosoma: Cuerpo central en el núcleo celular que puede contener una masa de heterocromatina.

Citocina: Molécula soluble producida por células que orquestan la respuesta inmune

Coefficiente de extinción: Absorción relativa de un compuesto por unidad de concentración (1gr/ml)

Cosmopolita: De distribución mundial.

Cromatina: Red de fibras nucleares formadas de DNA y complejos proteicos

Endémico: Que está presente o usualmente prevalente en un área geográfica o población.

Enfermedades autoinmunes: Enfermedad causada cuando un individuo produce una reacción inmune contra sus propios tejidos.

Enfermedad de Crohn: Enfermedad inflamatoria crónica que afecta el intestino, comúnmente la parte terminal del ileum.

Enlaces iónicos: Ocurren entre grupos químicos que tienen cargas opuestas.

Enzimas de restricción: Enzimas que cortan en un sitio específico al DNA por el reconocimiento de una pequeña secuencia.

Fagémido: Fago que contiene un plásmido en su genoma el cual puede liberarse.

Fuerzas de Van der Waals: Se lleva a cabo a distancias muy reducidas. Intervienen fuerzas ligeras atrayentes entre átomos o moléculas.

Fuerzas hidrofóbicas: Atracción por la porción hidrofóbica o no polar de una molécula que provoca su agregación o confinamiento a sitios carentes de moléculas de agua.

GenBank: Base de datos computarizada de todos los genes reportados.

Klenow: Enzima que posee actividad de DNA polimerasa y de exonucleasa en sentido 3'-5'.

Leucocitos: Células sanguíneas nucleadas, sin color involucradas en procesos inmunológicos.

Librería de expresión: Grupo de fragmentos de DNA codificante clonados en vectores que juntos representan un genoma completo.

Librería genómica: Grupo de fragmentos de DNA genómico clonados en vectores que juntos representan un genoma completo.

Lupus eritematoso: Enfermedad autoinmune en la que se presenta inflamación crónica. Se caracteriza por manchas en la cara y otras partes del cuerpo. Se involucra tejido conectivo y vascular, acompañado de anomalías serológicas.

Monocitos: Leucocitos agranulados con núcleo ovoidal. Células precursoras de macrófagos (células inmunes fagocíticas)

Morbilidad: Se considera a este como el estado enfermo de un individuo. Rango de la enfermedad en proporción al número de personas enfermas en una comunidad con relación a un agente infeccioso.

Mortalidad: En Parasitología se considera como la proporción de muertes en una población específica a causa de un agente infeccioso.

Osteoclastos: Célula alargada multinucleada que reabsorbe activamente al tejido óseo. Macrófagos del tejido óseo.

PCR: (Polymerase Chain Reaction) Técnica en la cual con ciclos de desnaturalización, alineamiento de un primer y extensión con la enzima DNA polimerasa, se amplifica el número de copias de un segmento de DNA por $>10^6$ veces.

Plásmido: DNA circular extra-cromosomal con replicación independiente al genoma principal.

Prevalencia: Proporción de la población infectada (referente a datos de infecciones presentes o pasadas) en un tiempo determinado.

Primer (iniciador): Pequeña secuencia de DNA o RNA que se alinea con una hebra del DNA. Provee el 3'-OH libre que reconoce la enzima DNA polimerasa para iniciar la síntesis de la cadena de deoxinucleótidos.

Promastigote: Estadio extracelular flagelado del ciclo de vida de *Leishmania* spp. que se encuentra dentro del insecto vector.

Proteína chaperona: Proteína requerida para el ensamblaje y el plegamiento correcto de una proteína recién sintetizada.

Puente de hidrógeno: Unión electrostática débil que se forma entre un átomo de hidrógeno parcialmente cargado negativamente con otro átomo de hidrógeno parcialmente positivo.

Puente disulfuro: unión entre dos átomos de azufre como resultado de la oxidación del grupo sulfhidrilo (SH) de dos cisteínas.

Punto isoelectrico: Condición en la cual una sustancia tiene una carga neutra.

Pseudopodio: Extensión citoplasmática contráctil.

Quitina: Polímero lineal muy resistente formado a partir del monómero N-Acetilglucosamida (GlcNAc)

RT-PCR: (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) Técnica que convierte RNA mensajero en DNA codificante con ayuda de la enzima reversa transcriptasa para después poder amplificarlo por PCR.

Sonda marcada: Fragmento de DNA marcado con radioactividad (p^{32}) o con grupos químicos que ayudan a localizar un gen o secuencia en el genoma completo.

Sonicación: Proceso por el cual una solución (moléculas, células, virus, etc.) es separada o lisada por la exposición de ondas sónicas de alta frecuencia.

T4 DNA ligasa: Enzima proveniente del bacteriófago T4 requerida para formar enlaces fosfodiéster que une a dos bases adyacentes en una secuencia de nucleótidos.

REFERENCIAS

- 1.-Osmond, B.C, Specht, C.A., Robbins P.W. (1999) Chitin synthase III: Synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc.Natl .Acad.Sci.USA* Vol.96: 11206-11210.
- 2.-Das, S., Gillin D. (1991) Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*. *Biochem.J* 280: 641-647.
- 3.-De la Vega, H., Specht, C.A., Samuelson J. Et.al. (1997) Cloning and expression of chitinases of *Entamoebae*. *Mol.Bioch.Parasit.* 85: 143-147.
- 4.-Ghosh, S., Samuelson, J.,et.al. (1999) Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, Endoplasmic Reticulum, and Golgi apparatus. *Infect.Immun.* 67(6) :3073-3081.
- 5.-Makioka, A., Takeuchi ,T.,et.al. (1999) DNA polymerase activity in encysting *Entamoeba invadens*. *Parasitology Res.* 85: 604-606.
- 6.- López-Romero, E., Villagómez-Castro, J.C. (1993) Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Today.* 9 (6): 225-227.
- 7.- Sánchez, L.B., Enea, V.,Eichinger, D. (1994) Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67: 125-135.
- 8.- Chayen, A., Avron, B., Mirelman, D. (1984) Amoebiasis: Changes in cell surface proteins and glycoproteins during encystation of *Entamoeba invadens*. *Wiley Medical Press, USA*: 83-93.
- 9.- MacRae, T.H. (2000) Structure and function of small heat shock proteins α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *CMLS. Cel.Mol.Life.Sci* 57 :899-913.
- 10.- Farnsworth, P., Singh, K.(2000) Self-complementary motifs (SCM) in α -crystallin small heat shock proteins. *FEBS* 482 :175-179.
- 11.-Ussel, P., Norman, D., Quinlan, R. (1999) Molecular chaperones: Small heat shock protein in the limelight. *Curr.Biol* 9 (3) : R103-R105
- 12.-Wang, K., Spector, A., (2000) α -crystallin prevents irreversible protein denaturation and acts cooperatively with other heat shock proteins to denature the stabilized partially denatured protein in an ATP-dependent manner. *Eur.J.Biochem* 267: 4705-4712.
- 13.-Lee, G., Vierling, E. et.al.(1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in folding-competent state. *EMBO. J.* 16 (3): 659-671

- 14.-Jong, WW., Caspers, G.J., Leunissen, JA.(1998) Genealogy of the a-crystallin--small heat shock protein superfamily. *Int. J. Biomol.Macromol* 22(3-4):151-162.
- 15.- Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H., (1998) Crystal structure of a small heat shock protein.*Nature* 394 : 595-599.
- 16.- Roy, S.K., Hiyama, T., Nakamoto, H.(1999) Purification and characterization of the 16-kDa heat shock responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an a-crystallin-related, small heat shock protein.*Eur.J. Biochem.* 262: 406-416.
- 17.-Liang, P., MacRae, H. Et.al. (1997) Molecular characterization of a small heat shock protein/ a- crystallin protein in encysted *Artemia* embryos. *J. Biol. Chem.*272 (30):19051-10958.
- 18.-Karlin, S.,Brocchieri, L. (1998) Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J. Mol. Evol.* 47 : 565-577.
- 19.-Ranford, J.C., Coates, A.R.M.,Henderson, B. (2000) Chaperonins are cell-signaling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Cambridge University Press* :1-17. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
- 20.-Hartl, U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 381: 571-580.
- 21.- Pramod, K., McQuade, L.et.al. (1998) Heat shock proteins come of age: primitive function acquire new roles in adaptive world. *Immunity.* 8 :657-665.
- 22.-Zihai, L., Menoret, A. Srivastava, P. (2002) Roles of heat shock proteins in antigen presentation and cross-presentation.*Curr.Opinion in Immunology.* 14: 45-51.
- 23.- Roman, E., Moreno, MCR. (1997) Delayed-type hypersensitivity elicited by synthetic peptides complexed with *Mycobacterium tuberculosis* hsp70.*Immunology.* 90:52-56.
- 24.-Roman,E., Moreno,MCR. (1996) Synthetic peptides non-covalently bound to bacterial hsp70 elicit peptide-specific T-cell responses *in vivo*.*Immunology.*88:487-492.
- 25.-Ortner, S., Duchene,M. (1992) Humoral immune response against a 70-kilodalton heat shock protein of *Entamoeba histolytica* in a group of patients with invasive amoebiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 175-184.
- 26.-Ploeg, L.,Giannini,S.H.,Cantor, C.R.(1985) Heat shock genes:regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science.*228:1443-1445.
- 27.-Field, J.,Samuelson,J. Et.al. (2000) Responses of *Entamoeba invadens* to heat shock and encystation are related. *J. Eukariot. Microbiol.* 47(5):511-514.
- 28.-Malhotra, V., Wong, HR. (2002) Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Crit.Care.Med* 30(1 Suppl) : S89-S95

- 29.-Crevel, G., Bates, H., Huikeshoven, H., Cotterill S.(2001) The *Drosophila* Dpit47 protein is a nuclear HSP90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *J.Cell.Sci* 114:2015-2025.
- 30.-Caper, S.W., Duffy, J.J., Gerner, E.W. (1987) Heat shock proteins in termotolerance and other cellular processes.*Cancer Res.*47 (20): 5249-5255.
- 31.-Morano, K.A.,Thiele, D.J. (1999) Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals.*Gene Expr.*7 (4-6):271-282.
- 32.-Cevallos, A.M (2002) Manson's Tropical Diseases. *Saunders*. 21st Edition. London. U.K.(in press)
- 33.-Cevallos, A.M (1995) Tesis doctoral. Chapter 3: Heat shock protein of *Giardia lamblia*. University of London. U.K.
- 34.-Tovar, J., Fischer, A., Clark, C.G. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol.Microbiol.* 32 (5): 1013-1021.
- 35.-Carrero, J.C.,Laclette, J.P.et.al.(2000) Cloning and characterization of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by human secretory IgA antibodies. *Parasitol. Res.*86:330-334.
- 36.-Ostoa-Saloma, P.,Laclette, J.P. et.al. (2000) Cloning, characterization and functional expression of a cyclophilin of *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biochem.Parasitol.*107:219-225.
- 37.-Caspers, G.J., Leunissen, J.A.M., Jong, W.W. (1995) The expanding small heat shock protein family, and structure predictions of the conserved "α-crystallin domain" *J.Mol.Evol.* 40:238-248.
- 38.-Mai, Z.,Samuelson, J.,et.al. (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.
- 39.-Wen-Hsiung.(1997) Molecular Evolution. *Sinauer Ass.,Inc.Publishers*.MA. USA:366-377.
- 40.-Patthy, L. (1999) Protein Evolution. *Blackwell Science Press*. Budapest. Hungary.:184-215.
- 41.- Vargás-Parada, L (1998) "Parásitos de importancia médica" manual de curso. Facultad de Ciencias UNAM. México.
- 42.-Radvin, J.I. (1988) Amebiasis *Wiley Medical Press* ,USA.p.p.833.
- 43.- Lewin, B (1997) Genes VI. *Oxford University Press*. NY.USA: 246-254
- 44.-Stryer, L. (1975) Biochemistry. *Freeman Press*. USA:645-678

- 45.-Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F. (1989) Molecular cloning. *Cold Spring Lab. Press*.USA: 6.3-6.58
- 46.- Morales W. (1999). Seminario de amibiasis. Dpto de Microbiología y Parasitología. Fac. de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. México
- 47.- Gozes, I., Brenneman, D.E..(1996) Activity- dependent neurotrophic factor (ADNF) an extracellular neuroprotective chaperonin?
- 48.-Belles C, Kuhl A, Nosheny R, Carding SR.(1999)Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection. *Infect Immun* 67(8):4191-200
- 49.- Friedland JS, Shattock R, Remick DG, Griffin GE.(1993) Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. *Clin Exp Immunol*. 191(1):58-62
- 50.- Alder GM, Austen BM, Bashford CL, Mehlert A, Pasternak CA (1990) Heat shock proteins induce pores in membranes. *Biosci Rep* ;10(6):509-18
- 51.- Meghji S, White PA, Roberts MM, Coates AR. Et.al. (1997) Mycobacterium tuberculosis chaperonin 10 stimulates bone resorption: a potential contributory factor in Pott's disease. *J Exp Med* 186(8):1241 -6
- 52.- Vanet A, Labigne A. (1998) Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some Helicobacter pylori proteins. *Infect Immun* 66(3):1023-7
- 53.-Additional Information pMOSblue vector kit.(2001)Amersham Pharmacia Biotech.UK.
- 54.-Instructions for use of products, Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System.(1999) Promega USA
- 55.-Instruction for use of products, High Pure RNA Isolation kit.(2000). Roche. USA
- 56.- Instruction for use of products, 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV). (1999) Roche.USA
- 57.- WHO Weekly epidemiology record (Abril 1997) No. 14 :97-99
- 58.- Chung, C.T.,Miller, H.R.(1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent cells. *Nucleic Acids Research*. 16 (8) :3580