

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

“DETERMINACIÓN DE LA (S) VÍA (S) DE SEÑALIZACIÓN DE
Entamoeba histolytica, EN RESPUESTA AL ESTRÉS
TÉRMICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
PRESENTA

BIOL. ABRIL NAVARRETE MENA

Director de tesis: **Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma**

MÉXICO, D. F.



2005

m 341249



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de septiembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Navarrete Mena Abril** con número de cuenta **92116104**, con la tesis titulada: **"Determinación de las vías de señalización de Entamoeba histolytica en estado de estrés térmico"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma**.

Presidente:	Dra. Lilia Yépez Mulia
Vocal:	Dra. Martha Robles
Secretario:	Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma
Suplente:	Dr. Eduardo A. García Zepeda
Suplente:	Dra. Cecilia Teresa Ximenes García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a, 4 de febrero del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Miembros del Comité Tutorial:

Dra. Marina Macias Silva. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Dr. Roberto Coria Ortega. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Este trabajo fue apoyado por CONACyT, bajo el número de becario 172724.

Que hay aquí para no ser tan solo
Polvo en el camino de la vida,
Que si se barre causa nubarrones,
Y si se pisa quedan huellas del alma.
Que si son canales van ríos...
Si son huecos algo queda inconcluso...
De la parte infinita entre el cielo y la tierra.

A. N. M.

IN MEMORIAM

JOSÉ NAVARRETE RODRÍGUEZ:

Mi padre, por la eterna falta que hace aquí, el legado invaluable de lucha y el gran ejemplo de vivir intensamente.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por mi formación académica.

Al **Dr. Pedro Ostoá Saloma** por su paciencia y excelente asesoría en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Marina Macías Silva** y el **Dr. Roberto Coria Ortega** quienes formaron parte de mi comité tutorial ayudando con sus valiosos comentarios en mi formación académica.

Al **Dr. Juan Pedro Laclette San Román** por permitir que la realización experimental de éste trabajo fuera llevado a cabo en su laboratorio y así formar parte de su grupo de trabajo durante un pequeño lapso de tiempo.

A la **Dra. Lilian Yépez Mulia**, **Dra. Martha Robles**, **Dra. Cecilia Ximenes García** y al **Dr. Eduardo García Zepeda** por sus excelentes comentarios que permitieron mejorar y enriquecer este trabajo.

A la **M. en C. Patricia de la Torre** y al **Dr. Pavel Petrossyan** por su asesoría técnica en la realización de los experimentos.

Al **Biol. Mario Néquiz Avendaño** y el **M. en C. Alfonso Olivos** quienes proporcionaron la cepa HM-1: IMSS de *Entamoeba histolytica* utilizada en este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi madre:

Celia Mena de Navarrete por su inmenso apoyo y cariño incondicionales que me dan la fortaleza.

A mis queridos hermanos:

Natalia por su rara forma de demostrar su cariño y su forma de ser tan "*sui generis*".

Germán por su alegría y buen sentido del humor con los que me ayuda siempre, así como su gran cariño.

A ti **José** por ser mi gran compañero, por todo tu cariño y apoyo en todo, de forma tan incondicionales, que me alientan a ser cada vez mejor, o al menos a intentarlo. Por la fortuna de contar contigo, gracias.

A toda mi familia por ser tan grandiosa.

A mis buenos amigos:

Mariana Pérez Escobar y **Julio Carrasco Vallejo** por compartir desde momentos buenos y no tan buenos hasta el gusto por la ciencia a la que siempre le debemos aportar algo.

A mis compañeros de laboratorio **Claudia, Cesar, Julio** y **Paty** por haber hecho más agradable el trabajo.

ÍNDICE

RESÚMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
<i>Entamoeba histolytica</i>	
Ciclo de vida.....	11
Proteínas de choque térmico (HSP).....	13
Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP).....	13
Importancia de las proteínas de choque térmico en parásitos.....	15
Proteína de choque térmico de 16 kDa de <i>E. histolytica</i>	16
Regulación de la respuesta al estrés térmico.....	16
Proteínas cinasas.....	17
Vías de señalización analizadas mediante diferentes inhibidores específicos	
Proteína cinasa C.....	17
Cinasas activadas por mitógeno (MAPK).....	19
Importancia de las proteínas cinasas en <i>Entamoeba</i>	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO.....	22
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
Análisis de secuencias.....	22

Obtención de parásitos.....	22
Conteo de parásitos.....	22
Condiciones de choque térmico.....	23
Extracción de RNA.....	24
Reacción de transcriptasa reversa.....	25
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
Análisis densitométricos.....	26
RESULTADOS.....	27
Análisis de la región intergénica entre HSP y ciclofilina.....	27
Condiciones experimentales de los análisis de respuesta transcripcional.....	29
Análisis de cinasas activadas por mitógeno (MAPKS).....	30
Análisis de proteína cinasa C (PKC).....	42
Análisis global de efecto transcripcional.....	47
Resumen de resultados.....	49
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS.....	57

RESÚMEN

Las proteínas de choque térmico, de bajo peso molecular son susceptibles de ser sobreexpresadas bajo condiciones de estrés celular, presentando actividad de chaperona. Estas proteínas previenen la agregación y desnaturalización irreversible de proteínas recién sintetizadas, que en condiciones de estrés térmico se ven afectadas. *Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario del humano, que en su ciclo de vida presenta dos formas celulares, el trofozoíto y el quiste, siendo este último la forma infectiva. Se ha reportado que el proceso de enquistamiento se da en respuesta a condiciones de estrés. En modelos de enquistamiento en *Entamoeba invadens*, se ha reportado que se produce un incremento en la expresión de las proteínas de choque térmico.

Realizar estudios en *E. histolytica* sobre las vías de señalización que actúan en respuesta a un choque térmico puede ayudar a entender el mecanismo empleado por la amiba para censar el ambiente en el que prolifera, así como el papel de HSP16 en este proceso.

En este trabajo se describe y caracteriza la expresión del gene de HSP16 de *E. histolytica* bajo condiciones de estrés térmico. Se emplearon inhibidores selectivos para determinar el papel de diferentes proteínas cinasas importantes para el metabolismo de la amiba, entre las que se encuentran proteína cinasa C (PKC) y la superfamilia de proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPKs).

Se presentó un incremento significativo en la expresión transcripcional del gene de HSP16 de *E. histolytica* a una temperatura de crecimiento celular de 43° C, en comparación a la temperatura de 37° C a la cual se desarrolla normalmente la amiba y que consideramos como control. Las amibas fueron cultivadas en ausencia y presencia de los inhibidores durante 30 minutos y después a la temperatura de 43° C, durante 40 minutos. Posteriormente se aisló el RNA total para analizar la expresión de mRNA de la HSP16 mediante ensayos de RT-PCR. Los resultados sugieren que la vía de p38 (MAPKs), interviene en la respuesta a estrés térmico.

ABSTRACT

The proteins of heat shock of under molecular weight they are susceptible of being over expressed under conditions of cellular stress, presenting chaperoning activity. These proteins prevent the aggregation and irreversible denaturation of recently synthesized proteins that are affected under conditions of heat shock. *Entamoeba histolytica* is the human's parasite protozoan that presents two cellular forms, the trophozoite and the cyst in his life cycle, being this last one the infective form. It has been reported that the cysting process is given in answer to stress conditions. In cysting models in *Entamoeba invadens*, it has been reported that an increment takes place in the expression of the proteins of heat shock.

To carry out studies in *E. histolytica* on the signaling pathways that act in heat shock response can help to understand the mechanism used by the amoeba to sense changes in the environment in which proliferates, as well as the paper of HSP16 in this process.

In this work will describe and characterize the expression of the gene of HSP16 of *E. histolytica* under conditions of heat shock. Selective inhibitors were used to determine the paper of different important proteins kinases for the metabolism of the amoeba, among those that are protein kinase C (PKC) and the superfamily of mitogen activated protein kinases (MAPKs).

A significant increment was presented in transcriptional expression of the gene HSP16 of *E. histolytica* at cellular growth temperature of 43° C, in comparison to the temperature of 37° C to which is usually developed the amoeba and that we consider as control. The amoebas were cultivated in absence and he/she witnesses of the inhibitors during 30 minutes and later to the temperature of 43° C, during 40 minutes. Later on the total RNA was isolated to analyze the expression of mRNA of the HSP16 by means of rehearsals of RT-PCR. The results suggest that p38 pathway (MAPKs), modulate the heat shock response.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica

Ciclo de vida

Entamoeba histolytica es un protozooario parásito que en su ciclo de vida presenta dos formas de vida, la proliferativa, que es el trofozoíto y la forma infectiva que es el quiste. Cuando se ingiere el quiste, éste pasa a través del estómago al duodeno, donde ocurre el desenquistamiento. El ambiente ligeramente alcalino o neutro es un requisito para que inicie el desenquistamiento, durante el cual emergen cuatro amébulas del quiste, que se dividen por fisión binaria dando lugar a ocho trofozoítos metaquísticos, que pasan al intestino grueso donde se alimentan y reproducen. En una ruta alternativa, los trofozoítos pasan vía sanguínea a varios tejidos ocasionando necrosis, principalmente a hígado y pulmones (Figura 1) (Bogitsh y Cheng, 1998)

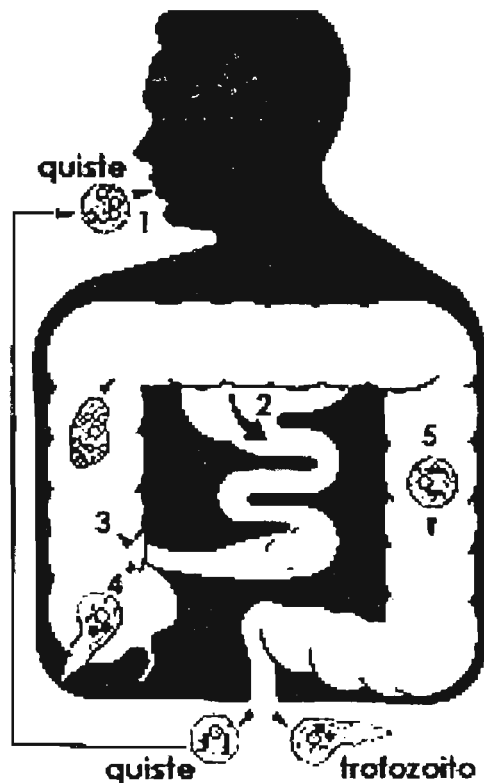


Figura 1: Esquema simplificado del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica es un parásito del humano causante de la disentería amibiana, que en el proceso de lisis celular, la amiba debe acceder a la célula blanco mediante su

interacción con la matriz extracelular. Se ha estudiado la cascada de reacciones intracelulares de la amiba en respuesta a su interacción con la matriz extracelular. Sin embargo, la respuesta de *E. histolytica* a otros estímulos ambientales (temperatura, pH, condiciones osmóticas, oxígeno etc.) no ha sido profundamente estudiado.

En el estado de estrés térmico, se da una degradación de proteínas y se sobre expresan otro tipo de proteínas que le confieren capacidad de resistencia y sobrevivida a las células, a este tipo de proteínas se les llama proteínas de choque térmico, las cuales son activadas también en condiciones de estrés ambiental (Lewin, 2000).

En reportes anteriores, se ha relacionado al estrés térmico con la capacidad de secreción y síntesis de quitina, en el parásito *E. invadens*. Esto hace posible relacionar que un aumento en la temperatura en el trofozoíto pueda ser una de las causas que dan lugar al enquistamiento (Field et al, 2000).

En *E. histolytica* no existen modelos *in vitro* de enquistamiento, esto debido a que el parásito sólo enquista en el hombre y en primates, por lo que se toma como modelo los procesos de enquistamiento reportados en *E. invadens*. Este organismo es parásito de reptiles y presenta el mismo ciclo de vida de *E. histolytica*.

E. invadens puede enquistar fácilmente *in vitro* en condiciones de privación de fuentes de carbono, shock hipoosmótico, o bien, una combinación de ambos estímulos. En el proceso de enquistamiento, es determinante la capacidad de agregación de los trofozoítos, lo cual se distingue con un aumento en la presencia de galactosa en el medio de cultivo. En trabajos anteriores, se ha reportado que *E. invadens* puede enquistar en respuesta a presencia de catecolaminas vía receptores β_1 adrenérgicos en la superficie del trofozoíto (Coppi et al, 2002)

Entamoeba almacena grandes cantidades de glucosa en forma de glucógeno, dichas reservas son disminuídas, de forma sustancial durante el enquistamiento, las cuales proveen energía metabólica durante el proceso de diferenciación y son el aporte de azúcares que toman como sustrato para la síntesis de UDP-N-acetilglucosamina, que al polimerizarse es formadora de quitina, la cual es una proteína de secreción y es principal componente de la pared del quiste.

Proteínas de choque térmico (HSP)

Las proteínas de choque térmico, conocidas como HSP, son las que se sintetizan cuando se somete a la célula a condiciones de estrés fisiológico, ayudando a su recuperación (Beere, 2001).

Cuando una proteína ha sido sintetizada, plegada y su estructura funcional ha sido modelada, puede enfrentarse a cambios fisicoquímicos que pueden desnaturalizarla. En estos casos, las HSP impiden que la proteína se desnaturalice o bien ayudan a renaturalizarla, ya que muchas de estas proteínas actúan también como chaperonas (Lewin, 2000). 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 (Lewin, 2000). Estas últimas, que se caracterizan por formar grandes estructuras multiméricas, lo que las hace más eficiente debido a la capacidad de unir una molécula de sustrato por monómero, actuando como chaperonas *in vitro* e intervienen en termotolerancia *in vivo* (Kim et al, 1998; Stromer et al, 2003). Además de conferir termotolerancia, las HSPs, son activadas en otro tipo de condiciones de estrés como es: el estrés alcohólico, la presencia de metales pesados, el estrés oxidativo y la elevación del factor de necrosis tumoral (Gabai y Sherman, 2002).

Una variedad de estímulos extracelulares tales como suero, factores de crecimiento, citocinas, agentes citotóxicos y oncogénicos dan como resultado las fosforilaciones de las sHSP en células de mamíferos. Esta fosforilación está involucrada en la organización de los microfilamentos de actina de la célula (Benndorf et al., 1994; Huot et al, 1995; Hayess y Benndorf, 1997). La fosforilación es catalizada por un nuevo tipo de serina/treonina cinasa llamada HSP25 cinasa específica para proteínas pequeñas de estrés. En estudios recientes se ha elucidado la intervención de las sHSP en eventos apoptóticos (Beere, 2001).

Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP)

Las sHSP son proteínas inducibles bajo estrés celular con actividad de chaperona. Presentan monómeros de menos de 30 kDa que se caracterizan por su tendencia a formar grandes agregados oligoméricos *in vitro* de 400 – 800 kDa o más, por su alta capacidad de llevar a cabo interacciones no específicas con proteínas no

nativas tanto *in vitro* como *in vivo* para prevenir la agregación de proteínas. Cada oligómero tiene la capacidad de unir múltiples proteínas sustrato y dicha unión es independiente de ATP (adenosin trifosfato) (Figura 2).

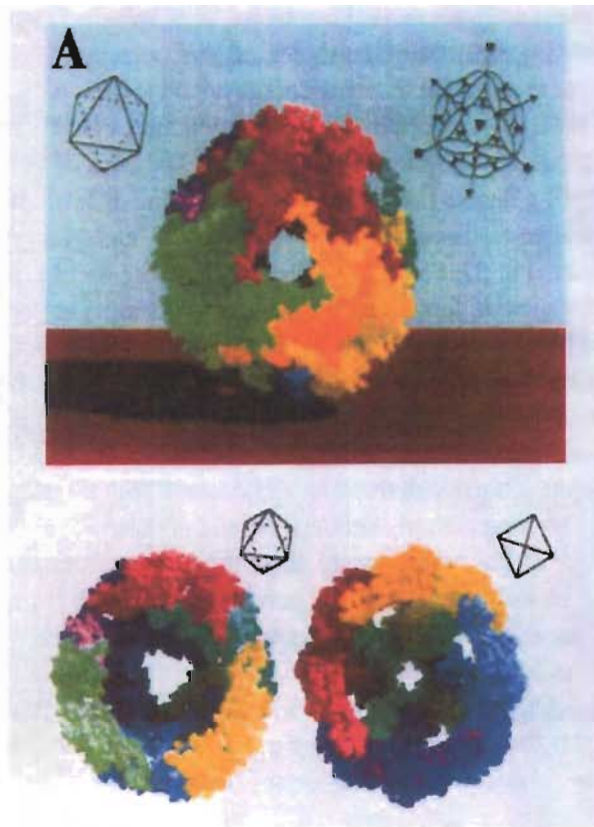


Figura 2. Estructura tridimensional de la proteína HSP16, de *Metanococcus janaschi*, cada color representa un monómero.

Las sHSP presentan en su extremo carboxilo terminal una secuencia de 100 aminoácidos conocido como dominio α -cristalino, que junto con la capacidad de formar grandes agregados oligoméricos les confiere la capacidad de funcionar como chaperona, debido a que inhibe la agregación de proteínas inducida por estrés celular y presenta la capacidad de conferir resistencia a estrés térmico en cultivos celulares (Sun et al., 2002). Este dominio es similar a una proteína presente en el cristalino de vertebrados, que presenta un tamaño de 10 kDa (Cobb y Petrash, 2002). En trabajos realizados con anterioridad, se ha sugerido que las cinasas responsables de llevar a cabo la fosforilación *in vivo* de α -cristalino son las MAPK p44/42 (proteínas cinasas activadas por mitógeno) y MAPKAP proteína activada tipo2 (Moroni y Garland, 2001).

Importancia de las proteínas de choque térmico 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 (temperatura), sino también a cambios químicos como de pH y cambios fisicoquímicos como diferentes osmolaridades del ambiente (Cevallos, 1995; Morano y Thiele, 1999). Por ejemplo, se ha observado que el incremento en la temperatura en cultivos de promastigotes (estadio en el que se encuentra el parásito en el vector) de *Leishmania* induce la síntesis de diversas HSPs y también induce la diferenciación al estadio de amastigote (la forma en la que se encuentra dentro de su hospedero mamífero) (Ploeg et al., 1985).

Esto también se ha observado durante el enquistamiento de trofozoítos de *Giardia* sp., *Naegleria gruberi* y *E. invadens* (Cevallos, 1995; Field et al., 2000). Durante el enquistamiento de *Giardia lamblia* se ha reportado la expresión de diversos antígenos, entre ellos HSPs. Con anticuerpos se lograron identificar HSP de 65, 68, 82 y 92 kDa. Ninguna de estas proteínas se expresa en trofozoítos controles (incubados en condiciones de no enquistamiento), lo que sugiere que puedan estar directamente relacionadas con el enquistamiento (Cevallos, 1995). En *E. invadens* se ha reportado que un grupo de proteínas denominadas BiP que están relacionadas con el proceso de enquistamiento y también con la expresión de HSP70 en condiciones de estrés térmico, esto al observarse un incremento del mRNA de la quitinasa y de una proteína denominada Jacob ambos componentes del quiste (Field et al., 2000).

Se ha reportado que las HSP están involucradas en la virulencia de los parásitos. En *Leishmania* se ha observado un incremento en la infectividad después de haber inducido su diferenciación por estrés calórico. 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 (Cevallos, 1995).

Particularmente en *E. histolytica* sólo existe un reporte referente a estrés y 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 (Ortner y Duchene, 1992; Karlin y Brocchieri, 1998; Mai et al., 1999; Field et al., 2000 Akbar et al., 2004). En éste parásito, no existen receptores conocidos al estrés térmico, por lo que la forma de responder a ésta clase de estímulos es, aparentemente mediante un reacomodo de la membrana celular, lo que provocaría el desencadenamiento de vías de señalización mediadas por segundos mensajeros.

Proteína de choque térmico de 16 kDa de *E. histolytica*

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado el gene de una proteína de estrés de bajo peso molecular HSP16Eh (Caballero, 2002). El mRNA de esta proteína aumenta cuando los trofozoítos de *E. histolytica* son sometidos a choque térmico. La sobreexpresión de dicho gene se obtiene a los 43° C. Por lo tanto tenemos un modelo estímulo-respuesta que nos puede permitir estudiar el sistema de señalización de *E. histolytica* que regula su reacción ante un medio ambiente que aumenta su temperatura.

El estudio de diferentes vías de señalización en el parásito, puede ayudar a descifrar los procesos moleculares que llevan al enquistamiento, teniendo el previo antecedente de la relación de las HSP y su actividad en la secreción de quitina, un componente de la pared del quiste lo cual se ha estudiado ampliamente en *E. invadens*. De igual manera, se ha estudiado en este parásito que, el enquistamiento se da como respuesta a la unión de catecolaminas, como dopamina, epinefrina y norepinefrina presentes en el parásito. El recambio de epinefrina se lleva a cabo en el trofozoíto, cuando se somete a éste a un medio de enquistamiento que contiene el ligando de superficie para galactosa. Por lo tanto, se ha demostrado que *E. invadens* une este tipo de catecolaminas mediante recetores β 1 adrenérgico presentes en la superficie del trofozoíto (Coppi et al., 2002).

Regulación de la respuesta al estrés térmico

La expresión de los genes de choque térmico es regulada a nivel transcripcional por factores de transcripción específicos al estrés térmico (HSTF), que se localizan en el núcleo, los cuales una vez al ser activados se unen al elemento de respuesta al choque térmico (HSE), presente en la región promotora del gen. Dichos factores

transcripcionales requieren ser fosforilados para estar en forma activa, en algunos casos se presentan uno o varios sitios de fosforilación (Holmberg et al., 1998, Lewin, 2000).

Cuando el HSTF no se encuentra unido a DNA, se presenta en forma monomérica en células no estresadas, siendo éste activado por condiciones de estrés para formar un trímero que puede unir promotores de genes HSP. El elemento de respuesta al choque térmico, es un elemento tipo *cis*, que activa al HSTF y esta formado por secuencias invertidas repetidas del tipo nGAAn, donde "n" puede ser un nucleótido arbitrario (Morimoto y Nollen, 2004).

Proteínas cinasas

Las vías de señalización llevan a la activación de enzimas cinasas, que mediante una cascada de fosforilaciones, llevan a la activación de factores de transcripción, responsables de la regulación génica.

En los sistemas de regulación génica, la fosforilación de factores de transcripción es una estrategia, ya sea para activar o inactivar determinados genes. Este tipo de modificación es reversible y esta acompañada por la adición de un grupo fosfato a un aminoácido específico. El grupo fosfato es transferido a partir de moléculas de ATP por proteínas cinasas, proceso que es revertido por proteínas de tipo fosfatasa. Dependiendo del residuo que se fosforila las proteínas cinasas son llamadas serina treonina cinasas, o bien, tirosinas cinasas (Ramos et al., 2002).

Vías de señalización analizadas mediante diferentes inhibidores específicos.

Proteína cinasa C

La proteína cinasa tipo C (PKC) es una familia de serina treonina cinasas sensibles a los lípidos, que presenta diferentes isoformas cada una con diferentes propiedades reguladoras y sustratos. Las isoenzimas de PKC, consisten de una sola cadena polipeptídica que contiene una región regulatoria amino terminal (de 20 a 70 kDa) y un dominio de cinasa carboxilo terminal (de aproximadamente 45 kDa) (Newton, 1997). En la actualidad se han reportado 11 isoformas de PKC en células de mamífero codificadas

por 10 genes, las cuales se clasifican en tres grupos por su estructura y manera de regulación.

- Convencional (PKC ϵ): Este grupo requiere de fosfatidilserina, diacilglicerol y Ca^{2+} para su activación y son PKC α , $\beta 1$, $\beta 2$ y γ .
- Nuevas (PKC δ): Para su activación también requieren fosfatidilserina, diacilglicerol pero no de Ca^{2+} . A este grupo lo conforman la PKC δ , ϵ , η , θ y μ .
- Atípicas PKC (PKC ζ): su regulación aun no es del todo establecida pero se ha demostrado que requieren de fosfatidilserina para su activación, y son la PKC ξ y λ . (Tsao y Wang, 1997; Newton, 1997; Maizels et al., 1998). (Figura 3).

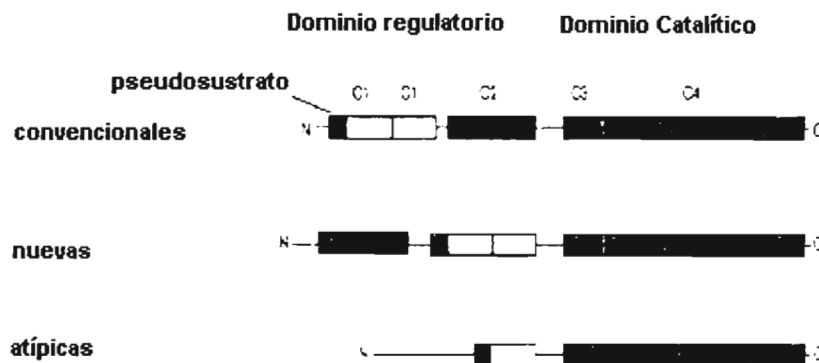


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes isoformas de PKC. (Newton, 1997).

Entre los inhibidores específicos para PKC se tiene al 1 – o – hexadecil – 2 – o metil rac – glicerol, que es un competidor análogo del diacilglicerol (Syrovets et al., 1997). Como activador farmacológico de la PKC, se tiene al tetradecanoil forbol acetato (TPA) que mimetiza los efectos del diacilglicerol (Louise et al., 1997).

La vía clásica de señalización de PKC, se activa mediante cambios conformacionales en los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR): Una vez que un receptor es activado, el complejo ligando receptor cataliza el cambio de GTP (trifosfato de guanosina) a GDP (bifosfato de guanosina), en la subunidad α de la proteína G, esta proteína α -Gp activada (fosforilada), fosforila a su vez a la fosfolipasa C (PLC) en la membrana plasmática, la cual produce dos segundos mensajeros por hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP $_2$) como son el

diacilglicerol (DAG) y el fosftidilinositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ es liberado al citosol donde es capturado por su receptor que está ubicado en el retículo endoplásmico, regulándose así la liberación de Ca²⁺ intracelular. El DAG activa directamente a la proteína cinasa C (PKC) uniéndose a estructuras conocidas como dedos de zinc. El aumento de Ca²⁺ en el citosol, junto con DAG y la interacción de PKC con fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina (PS) hacen que la PKC se encuentre completamente activa para fosforilar factores de transcripción (Nishizuka, 1986; Alberts et al., 2002).

MAP cinasas

Las MAPK son serin/treonin cinasas. Es una familia de cinasas activadas por mitógeno, entre las que se encuentran las cinasas tipo ERK o cinasas de respuesta a estrés ambiental, cuya actividad es modulada por estímulos mitogénicos y es activada para mediar eventos de proliferación celular y sobrevivencia.

Existen tres familias de MAPKs, las ERK p42 y p66, las JNK (cinasa amino terminal c-Jun o SAPK) y p38 MAPK, cada una con su propia vía de transducción, como se señala en la figura 4 (Kogut et al., 2003). Las proteínas ERK translocan al núcleo después de su activación, para regular la actividad de varios factores de transcripción (*c-myc*, *c-fos* y *c-jun*, *tcf*, *srf*, *elf-1*, *apl*, *atfn*) (Lujan et al., 1996).

La JNK y p38 MAPK son activadas en respuesta a estrés celular y presentan funciones de protección celular e intervienen en procesos apoptóticos. JNK es incluida en la regulación, estabilización, traducción y producción de citocinas, vía la activación del factor de transcripción AP-1, activada por señales de estrés celular como el choque térmico, irradiación, estrés oxidativo, citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento (Kogut et al., 2003). Asimismo JNK fosforila a Jun que es un factor de transcripción que regula el crecimiento celular (Helmreich, 2001). Un sustrato de la proteína activadora de la cinasa activada por mitógeno tipo 2 (MAPKAP-2) es p38 (Boldt et al., 2002). JNK interviene activando a factores de transcripción activadores de genes de respuesta inmediata (Alberts et al., 2002).

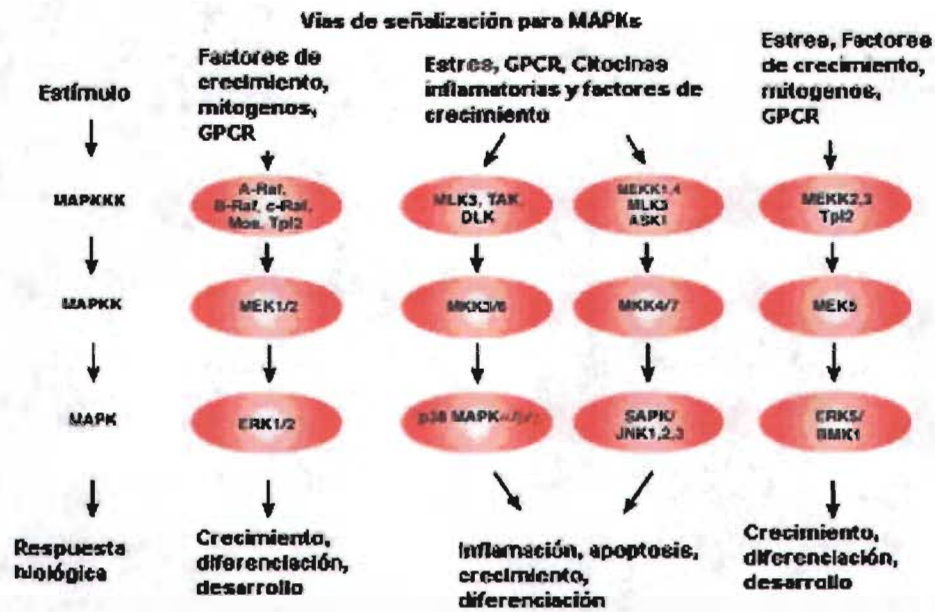


Figura 4. Vías de señalización de los diferentes tipos de MAPKs (tomado de www.cellsignal.com).

Algunas de las vías de señalización pueden tener puntos de entrecruzamiento. Esto puede ser a diferentes niveles, tanto de condiciones de estrés celular, a nivel de receptores, de proteínas G, de segundos mensajeros, o bien una misma proteína cinasa puede activar diferentes factores de transcripción.

Importancia de las proteínas cinasas en *Entamoeba*

Las vías de señalización en *E. histolytica* empiezan a ser dilucidadas. Se ha reportado una cascada de tirosina cinasa aumentada por la unión de colágena o fibronectina (Pérez et al., 1996; 1998; Hernández et al., 2000). La fibronectina interviene también en un aumento del calcio intracelular, con la subsiguiente activación de una proteína cinasa de tipo C (PKC) dependiente de diacilglicerol y proteína cinasa dependiente de calmodulina (Carbajal et al., 1996; Paveto et al., 1999). La activación de PKC se ha asociado con un incremento en la virulencia y en el crecimiento del parásito en cultivo (Santiago et al., 1994; Weikel et al., 1988; Chaudhuri y Raha, 2000).

Incrementos en la concentración de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) en los trofozoitos que interaccionan con fibronectina y la reorganización de actina sugiere la

presencia de receptores acoplados a proteínas G (Said et al., 1998; Franco et al., 2000; Cobb y Petrash, 2002). Asimismo, *E. histolytica* presenta una cinasa de adhesión focal (FAK), cuyo sistema de regulación es mediante una vía dependiente de integrinas, que interviene en el mantenimiento de la polaridad de la célula, lo cual es importante para el proceso de invasión tisular, debido a que ayuda a que el parásito se adhiera a la matriz extracelular de las mucosas. La inhibición endógena de esta cinasa resulta en un decremento de la motilidad celular y en algunos casos de la muerte celular. FAK también se encuentra interviniendo en la transmisión de señales de supervivencia que permitan la degradación de la matriz extracelular del hospedero en el proceso invasivo. La fosforilación de esta cinasa en un residuo específico (tirosina), lleva a la activación de la vía de MAPK y a su vez la adhesión dependiente de integrinas lleva a la activación de la vía de JNK, la cual es independiente de la fosforilación en tirosina (Schaller, 2001; Labruyère et al., 2003).

La fagocitosis amibiana es inhibida por wortmanina, una toxina fúngica que bloquea a la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) cuyos productos son lípidos (fosfatidil inositol fosfatos, PIP2) los cuales actúan como segundos mensajeros (Field et al., 2000).

En 1993, Lohia y Samuelson, identificaron al gen de *Rho* en Entamoeba, al que llamaron, Ehrho1, que codifica para una proteína que presenta alta similitud con *Rho* y *Rac*, pertenecientes a la familia *Ras* de GTPasas pequeñas. EhRho1 participa en vías que controlan el crecimiento, la citólisis y la fagocitosis (Godbold y Mann, 2000).

HIPÓTESIS

La amiba reacciona ante su medio ambiente activando vías de señalización; mediante la inhibición de forma específica de las mismas, se podrá saber como se modulan genes de respuesta inmediata como los de choque térmico.

presencia de receptores acoplados a proteínas G (Said et al., 1998; Franco et al., 2000; Cobb y Petrash, 2002). Asimismo, *E. histolytica* presenta una cinasa de adhesión focal (FAK), cuyo sistema de regulación es mediante una vía dependiente de integrinas, que interviene en el mantenimiento de la polaridad de la célula, lo cual es importante para el proceso de invasión tisular, debido a que ayuda a que el parásito se adhiera a la matriz extracelular de las mucosas. La inhibición endógena de esta cinasa resulta en un decremento de la motilidad celular y en algunos casos de la muerte celular. FAK también se encuentra interviniendo en la transmisión de señales de supervivencia que permitan la degradación de la matriz extracelular del hospedero en el proceso invasivo. La fosforilación de esta cinasa en un residuo específico (tirosina), lleva a la activación de la vía de MAPK y a su vez la adhesión dependiente de integrinas lleva a la activación de la vía de JNK, la cual es independiente de la fosforilación en tirosina (Schaller, 2001; Labruyère et al., 2003).

La fagocitosis amibiana es inhibida por wortmanina, una toxina fúngica que bloquea a la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) cuyos productos son lípidos (fosfatidil inositol fosfatos, PIP2) los cuales actúan como segundos mensajeros (Field et al., 2000).

En 1993, Lohia y Samuelson, identificaron al gen de *Rho* en Entamoeba, al que llamaron, Ehrho1, que codifica para una proteína que presenta alta similitud con *Rho* y *Rac*, pertenecientes a la familia *Ras* de GTPasas pequeñas. EhRho1 participa en vías que controlan el crecimiento, la citólisis y la fagocitosis (Godbold y Mann, 2000).

HIPÓTESIS

La amiba reacciona ante su medio ambiente activando vías de señalización; mediante la inhibición de forma específica de las mismas, se podrá saber como se modulan genes de respuesta inmediata como los de choque térmico.

OBJETIVO

Identificar la vía de señalización, encargada de la activación del gene de la proteína de choque térmico de 16 kDa de *Entamoeba histolytica* (HSP16Eh), mediante el empleo de inhibidores específicos de proteínas cinasas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Análisis de secuencias

Se realizó el análisis de la región intergénica comprendida entre el gen de HSP16 y el gen de la ciclofilina, mediante el empleo del programa Genomatix, para identificar posibles sitios para el factor de transcripción al choque térmico (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html).

Obtención de parásitos

Trofozoitos de *E. histolytica* de la cepa HM-1: IMSS de humano, los cuales se mantuvieron en abscesos hepático amibiano de hámsteres, para conservar la virulencia, cultivándose en cultivo en 50 ml de medio TYI-S-33 estéril suplementado con 15% de suero bovino adulto, 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina a 37° C (Diamond et al., 1978, Akbar et al., 2004).

Conteo de parásitos

Los trofozoítos, a las 72 horas de crecimiento (cultivo en fase de crecimiento logarítmica), fueron desprendidos de las paredes de la caja de cultivo, mediante agitación muy suave.

Se centrifugaron a 2040 x g (5000 rpm) durante 15 minutos, posteriormente se eliminó el medio de cultivo, resuspendiéndose la pastilla en 750 µl de medio de cultivo estéril.

Se determinó el número de trofozoitos, mediante tinción con azul de tripano en una dilución 1/10, tomándose 5 µl del medio donde se resuspendieron los trofozoitos, los cuales se agregaron a 45 µl del colorante vital.

Se contaron en un hemocitómetro y se ajustó el número de células para utilizar 1×10^6 amibas en cultivo axénico en presencia de suero, que fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml. Utilizándose un mismo lote de amibas por cada inhibidor.

Condiciones de choque térmico

Por cada uno de los inhibidores que fueron analizados (Tabla 1), se utilizaron cuatro muestras, las cuales fueron etiquetadas como 37° C, 43° C, en ausencia y en presencia del inhibidor.

Por cada inhibidor utilizado se determinó la concentración óptima, la cual permitiera un 95% de viabilidad celular, mediante tinción con azul de tripano, tomándose como referencia la CI_{50} del inhibidor, para la realización de una curva de concentración.

Una vez determinada la concentración óptima, se incubaron las muestras (cuatro tubos, denominados como 37, 43 en ausencia del inhibidor y 37i, 43i en presencia del inhibidor), a una temperatura constante de 37° C, durante 30 minutos. Después, dos muestras se incubaron a la temperatura de 43° C, una muestra en ausencia del inhibidor y otra en presencia del mismo, durante un intervalo de 40 minutos. Dos minutos antes de culminar el período de choque térmico, de la muestra a 43° en presencia del inhibidor, se tomaron 5 µl para determinar viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano.

Inhibidor	Vía de señal. Afectada	Concentración exp.
SB203580	p38MAPK y HSP27K	300 nM
SB202190	p38MAPK	100 nM
PD98059	ERK 1 / 2 cinasas	1 μ M
1 - O - Hexadecyl - rac - glicerol	PKC	80 μ M
TPA (activador)	PKC	0.5 nM

Tabla 1. Inhibidores utilizados, las vías de señalización en las que intervienen y la concentración experimental utilizada para el caso de amiba.

Extracción de RNA

Después del choque térmico, se realizó la extracción del RNA, en donde, se agregó al tubo sin sacarlo del termoblock, tanto a 37° C, como a 43° C, 400 μ l del amortiguador de lisis (4.5 M guanidina HCl, 50 mM Tris HCl, 30% Triton X-100 pH 6.6 en presencia de inhibidores de RNAsas), después se agitó suavemente durante 10 segundos.

Después se combinaron la columna High Pure y el tubo colector, (Kit de aislamiento de RNA total, de Roche, ver figura 5) y se pasó el lisado celular a través de la columna centrifugándose durante 15 segundos a 8 000 x g.



Figura 5. Columna High Pure y tubo colector.

Se desechó el contenido del tubo colector y se agregaron a la columna 100 μ l de DNAsa (10 μ l de DNAsa I a una concentración stock de 10 kU + 90 μ l de amortiguador

de incubación -1 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0-) y se dejó incubando durante 15 minutos.

Se agregó a la columna 500 µl de amortiguador de lavado I (5 M de guanidina HCl, 20 mM Tris HCl, 10 mM MnCl₂, Etanol, pH 6.6) y se centrifugó durante 15 segundos a 8 000 x g.

Se desechó el contenido del tubo colector y se agregó a la columna 500 µl de amortiguador de lavado II (20 mM NaCl, 2 mM Tris HCl, Etanol, pH 7.5) y se centrifugó durante 15 segundos a 8 000 x g.

Se desechó el contenido del tubo colector y se agregaron 200 µl de amortiguador de lavado II y se centrifugó durante 2 minutos a 13 000 x g.

Posterior a esto, se cambió el tubo colector por un tubo de 1.5 ml estéril y se realizó la elución con 50 µl del amortiguador de elución (agua estéril bidestilada libre de RNAsas) y se centrifugó durante un minuto a 8 000 x g.

Se cuantificó el RNA espectrofotométricamente y se verificó la calidad de RNA mediante gel de agarosa esteril al 1.5%.

Reacción de transcriptasa reversa

Para convertir el RNA a DNA complementario, se llevó a cabo la siguiente reacción:

En un volumen de 20 µl, se agregó el volumen correspondiente a 5 µg de RNA, a los cuales se agregaron 1 µl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ a una concentración de 500 µg/ml, 1 µl de dNTP mix 10 mM y se agregó agua estéril a un volumen de 12 µl.

Se incubó la reacción durante 5 minutos a 65° C. Al término de éstos, se agregó a la reacción 4 µl de amortiguador de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 µl de 0.1 M de DTT y 1 µl de inhibidor de RNAsa (40 unidades/µl) y se incubó la reacción a 42° C, durante 2 minutos. Posteriormente se agregó 1 µl (200 U) de la enzima reverso transcriptasa SuperScript II RT y se continuó la incubación durante 50 minutos a 42° C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el cDNA, se utilizaron 3 μ l para la reacción de amplificación, esta reacción presentó los siguientes elementos. En un volumen de reacción de 50 μ l se agregaron 5 μ l del amortiguador 10X PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 1.5 μ l de 50 mM MgCl₂, 1 μ l de dNTP mix 10 mM, 1 μ l del iniciador HSPF sentido 10 μ M (5'-CAT ATG CAC TCA CAA GC-3'), 1 μ l del iniciador HSPR anti-sentido 10 mM (5'-GAT CCG TTA ATA TCA AC-3'), 1 μ l de *Taq* DNA polimerasa (5U/ μ l) y agua estéril a un volumen de 50 μ l. Ambos iniciadores van a amplificar el gene completo obteniéndose así un segmento de 420 pares de bases.

También se utilizaron primers para amplificar la subunidad pequeña ribosomal de *E. histolytica*, denominados JLR9 sentido (5'-GAA ACT TAA AGG AAT TCA CGG-3') y JLR4 anti sentido (5'-CGG GCG GTG TGT ACA AAC-3') los cuales se consideraron como gen constitutivo. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf a 95° C durante 5 minutos, con 30 ciclos de amplificación a 95° C durante 1 minuto, 50° C durante 1 minuto y 72° C durante 1 minuto, con un ciclo final de 72° C durante 10 minutos.

Al término del termociclaje, se verificaron los productos amplificados obtenidos en gel de agarosa 1%. Se obtuvieron amplificados para el gen HSP16, para el gen control de la subunidad pequeña ribosomal y como control negativo de reacción se utilizó RNA amplificado, sin llevar a cabo el paso de conversión a cDNA.

Análisis densitométricos

Se realizaron análisis densitométricos mediante la cuantificación de los amplificados obtenidos para el gen de la subunidad pequeña ribosomal y para el gen de HSP16Eh, con la utilización del Quantity One FS (Bio Rad).

Una vez obtenidos los valores cuantitativos, se utilizó la siguiente fórmula para obtener porcentajes con respecto al control:

$$\text{HSP/RIBOS} \times 100 = A; \quad A/\text{HSP37} = \% \text{ DEL CONTROL}$$

En donde, se dividen los valores cuantitativos de cada amplificado de HSP16, con su control respectivo, ya sean subunidades ribosomales o amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal de *E. histolytica*. A este valor se multiplica por cien y se denomina como A en la fórmula. Para la obtención del % del control, se toma como referencia a HSP37, que se considera como el valor de expresión basal del gene. Cada uno de los valores A, se dividen entre el valor obtenido para la muestra de HSP37, obteniéndose así el por ciento del control (recomendación de la Dra. Tzipe Goverenzky, Departamento de Biología Teórica, IIB)

RESULTADOS

Análisis de la región intergénica entre HSP16 y ciclofilina

La región promotora del gen HSP70 humano, contiene múltiples elementos de respuesta al choque térmico, HSE, que son secuencias pentaméricas repetidas del tipo nGAAn. Tal es el caso, en la posible región promotora del gen en cuestión HSP16Eh, en donde se presenta una secuencia pentamérica del tipo HSE (Morimoto et al 1992).

Analizando el genoma de la amiba, encontramos que el gene de la HSP16Eh, se encuentra flanqueada por los genes 309 y 359. El gen 309 que la precede es una proteína cinasa hipotética y el gen 359 es una peptidil – prolil – cis – trans isomerasa, también conocida como ciclofilina (www.tigr.org). El mapa se presenta a continuación.

```

TTTTAGTGAATTTATATTATTCATTTCAATCAGCTACTCATGTTTGTTTTTAAATAAAAT
TCTATAAAAAAAGTAATAATTAATTTAGTTACATTATGTTATTGATTATTGTCCTGGA
GGAGAATTATATTATCGTTTAATTC AAGAAAAATCATT TGTGAAAGTAGAACACAATTT
TATATTAGTCAAGTTATTTTAGCATTAGAAATGTCTTCATCAAATGAATATAATTTATAGA
GACGTTAAATTAGAAAAATGTATTAATTTGTGAAGATGGATATCTTAGACTTACAGATTTT
GGTTTATCTAAAGAAAAACGTTTCTGGAAATGAAACAACAGCTACATTTTGTGGTACTCCT
GAATATCTCTCTCCTGAAGTTGTTT TAGCAGAGCCTTATACTAATGTAATTGACTGGTGG
GGAGTAGGAATTATGACATATGAAATGATGCATGGACAAGCACCATTTATTAGCGATAAT
ATCCAACAAC TTTATCAAAAAATTTTATATTCTCCTGTAATCTTTCCAACAACATCTCCA
GTTTCTGCTGTATGTAAAGATTTTATAACTAAAAATGTTAGAAAAAAAAAATTTGTGATCGT
TTAAGTACACCAGAGAAAGATTTAAACACATCCATGGTGGAACAGTTTCGACTGGGATGCT
CTTTATCAAAAAGAAAAATTCCTGCCCATTTAAACCAGATATGTCACAAGATGGAAAAACA
AACTTTGGAGAAGAATTTATTAATGAAAAATTCGACCTTAATGAAGAAATAACAATTCT
ACTTCTAATGGCATAAGACAAGACATTTTGGAGAATTCAC TTTCACTAGAGATGAACCA
AAATAA

```

En donde, se dividen los valores cuantitativos de cada amplificado de HSP16, con su control respectivo, ya sean subunidades ribosomales o amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal de *E. histolytica*. A este valor se multiplica por cien y se denomina como A en la fórmula. Para la obtención del % del control, se toma como referencia a HSP37, que se considera como el valor de expresión basal del gene. Cada uno de los valores A, se dividen entre el valor obtenido para la muestra de HSP37, obteniéndose así el por ciento del control (recomendación de la Dra. Tzipe Goverenzky, Departamento de Biología Teórica, IIB)

RESULTADOS

Análisis de la región intergénica entre HSP16 y ciclofilina

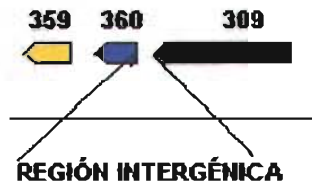
La región promotora del gen HSP70 humano, contiene múltiples elementos de respuesta al choque térmico, HSE, que son secuencias pentaméricas repetidas del tipo nGAA n. Tal es el caso, en la posible región promotora del gen en cuestión HSP16Eh, en donde se presenta una secuencia pentamérica del tipo HSE (Morimoto et al 1992).

Analizando el genoma de la amiba, encontramos que el gene de la HSP16Eh, se encuentra flanqueada por los genes 309 y 359. El gen 309 que la precede es una proteína cinasa hipotética y el gen 359 es una peptidil – prolil – cis – trans isomerasa, también conocida como ciclofilina (www.tigr.org). El mapa se presenta a continuación.

```

TTTTAGTGAATTTATATTATTCATTTCAATCAGCTACTCATGTTTGTTTTTAAATAAAAT
TCTATAAAAAAAGTAATAATTAATTTAGTTACATTATGTTATTGATTATTGTCCTGGA
GGAGAATTATATTATCGTTTAATTCAGAAAAATCATTTTGTGAAAGTAGAACACAATTT
TATATTAGTCAAGTTATTTTAGCATTAGAATGTCTTCATCAAATGAATATAATTTATAGA
GACGTTAAATTAGAAAATGTATTAATTTGTGAAGATGGATATCTTAGACTTACAGATTTT
GGTTTATCTAAAGAAAACGTTTCTGGAAATGAAACAACAGCTACATTTTGTGGTACTCCT
GAATATCTCTCTCTGAAAGTTGTTTTAGCAGAGCCTTATACTAATGTAATGACTGGTGG
GGAGTAGGAATTTATGACATATGAAATGATGCATGGACAAGCACCATTTATTAGCGATAAT
ATCCAACHACTTTATCAAAAAATTTTATATCTCTGTAATCTTTCCAACAACATCTCCA
GTTTCTGCTGTATGTAAAGATTTTATAACTAAAAATGTTAGAAAAAAAATTTGTGATCGT
TTAAGTACACCAGAGAAGATTA AACACATCCATGGTGGAAACAGTTTCGACTGGGATGCT
CTTTATCAAAAAGAAAATTCCTGCCCATTTAAACCAGATATGTCACAAGATGGAAAAACA
AACTTTGGAGAAGAATTTATTAATGAAAAATTCGACCTTAATGAAGAAATAACAATTC
ACTTCTAATGGCATAAGACAAGACATTTTTGGAGAATTCACCTTCACTAGAGATGAACCA
AATTAA

```

-200 TTATATTTGTTATATAAAACGTTTATATATTATTTTGAAAGAATAATCCACGTA
 ATCATAATGAAAACGTCGATCTCAAAATTACGAAGAAATGACGTGGAATTCATTTATTATT
 ATAATCATCATTACGTCAAAGAGATTACACTATAAAAAAGAACTAATCTAAAATTATCAT
 TTAATAGTTTAGCTAAATAAAC -1

360 HSP16

ATGCACTCACAAAGCACTTGTAAGACCAACACCATTAA
 TCCATTTATTCAACAACAACGTAATCAAAAAATATTTGTTGATGGAAAAGGAACAGGACA
 TTGGGCACCAGAAATTTGGGAACCACCATGTGAATTACTTGAAGCAGAACAGATTTATTT
 ATTAAAGTTAGAAGTTCAGGTATTGATAAAAAAACATTAAGTGTTAAATATGCAAATAA
 TTGGGTGTTATAACAGGAACTAGACAAGTTGAAGGTAAAAATAGAAATTCAGAAATTTTT
 ATATGGTACTTTTAGAAGAGAAATTCCTCTTCCAACCTGATGTTGATGGAGAAAAAATTAA
 AGCTAAGTATCAAGATGGAATACTTGCTGTTGTTATTCCAAAGAAAATCTCCAATGGGATG
 GGTAAAAGTTGATATTAATAATATTCAATAACAAAATTCAGGTATTGTATTTTCATATTAT
 TTTTATTGTTTTCTTTTTATTTTGTAAAAAATTTGTTATTTTTTTTATAACTTAGTAATT
 GATAAAATTATATTTAAGATCTTTTTTTTGTTTTATCTTTTTTAAGATTTTTTATATTTCTA
 AAAATGACAAAAATGAAACACGTCATGCCACGGAGAGAGATGTATTAAGGATCTTTGA
 AGAAATGATAAAATATTGATAAAATGGCAAGACCAAAGGTATTCCTTTGATATTACTATTG
 GAGGTGAAAAAGCTGGTAGAATTGTTATGGAACCTTTTAACGATATFTGCCCAAAGACAG
 CTGAAAACCTTCAGATGCCTTTGCACTGGTGAAAAGGGTAATGGACTTACCTATAAGGGTT
 GTGGATTCCATAGAGTTATTAAGGATTTTCATGATTCAAGGAGGTGATTTCACTAGACATA
 ATGGAACCTGGAGGAAAATCAATTTATGGTACTAAGTTTGCTGATGAAGCTTTCCTGTTA
 AACACACTAAACCAGGAATGTTATCTATGGCTAATGCTGGACCAAATACTAATGGTTCCAC

Figura 6. Secuencia y mapa genómico de HSP (marcada en azul) y la proteína cinasa hipotética que la precede (marcada en negro), entre éstas se localiza la región intergénica (marcada en rojo).

Con base en la región intergénica (marcada en rojo) y que va del nucleótido -200 al nucleótido -1, se realizó un análisis de la secuencia, con el fin de encontrar los posibles sitios para identificar factores de transcripción.

Se encontraron varios elementos, pero el que queremos resaltar es el siguiente:

Familia/matriz	Información adicional	Opt.	Posición		Sentido.	Core sim.	Matriz sim.	Secuencia
			de - a	anchor				
V\$HEAT/HSF1.01	Heat shock factor 1	0.93	40 - 50	45	(+)	1.000	0.926	AGAAaatcca

En donde, se presenta similitud del 0.926%, con el factor de transcripción al choque térmico de vertebrados, marcado en amarillo en la secuencia, así como dos sitios de unión a la familia de proteínas activadoras tipo 1, mejor conocidas como AP-1, cuya secuencia es CTCA, también conocidos como elementos de respuesta a TPA por una variedad de señales extracelulares.

Dentro de la secuencia del posible HSF, se encuentra subrayada la secuencia consenso de elemento del HSE, cuya secuencia es nGAAn. Cuando este elemento se presenta repetido, encontrándose de forma cabeza-cabeza, se da una mayor afinidad en la unión de factor de transcripción (Caruccio et al., 1997).

En el análisis de la región intergénica, se encontró que el factor de transcripción que presenta similitud con dicha región, está localizado entre los nucleótidos -160 a -150. Este factor corresponde al HSF1 de vertebrados y pertenece a la familia de factores transcripcionales tipo AP-1. Además de interactuar con secuencias palindrómicas de DNA (Risse et al., 1989).

Así mismo, se encontró entre los nucleótidos -160 a -156 la secuencia consenso del elemento de respuesta al Choque térmico (HSE), "nGAAn" y dos sitios de unión a AP-1, "CTCA", el primero entre los nucleótidos -79 a -76 y el segundo del nucleótido -122 al -119, lo que nos da la pauta de la influencia de las MAPK en la regulación génica, debido a que éstas son cinasa reguladoras de sitios AP-1 (Angel, 2004). Por lo tanto, se puede especular que es en esa región, donde probablemente se une el HSF al gen de HSP16Eh (Pirkkala et al., 2001).

Condiciones experimentales de los análisis de respuesta transcripcional

Para determinar la respuesta transcripcional de HSP y mediante el empleo de inhibidores específicos para diferentes vías de señalización presentes en el parásito, se realizaron ensayos de RT-PCR, que permitiera determinar la expresión del mRNA para el gene de HSP16.

En estos ensayos se llevó a cabo la amplificación de mensajeros de proteínas ribosomales del parásito, como controles negativos, así como la verificación de las subunidades ribosomales que determinan la calidad del RNA y como controles experimentales negativos, se realizó la amplificación del RNA sin haber pasado por la conversión a cDNA. Como un control positivo de reacción de PCR, se amplificó el gene previamente clonado en un plásmido bacteriano.

Se obtuvieron resultados para cuatro inhibidores (SB202190, SB203580, PD98059, 1 – O – hexadecil – 2 – O - metil rac-glicerol) y un activador (TPA) de PKC.

En cada uno de los ensayos se analizaron dos variables diferentes, la presencia del inhibidor y la influencia del estrés térmico en ausencia y presencia del mismo.

Análisis de MAPKs.

En el siguiente esquema se representa la ruta de MAPK, así como los puntos de acción de los inhibidores empleados, marcados por unas flechas.

Para p38MAPK se utilizó el inhibidor SB202190 el cual impide la activación de p38, ésta una vez activada se dirige al núcleo para fosforilar diferentes factores de transcripción.

Para p38MAPK y HSP27K se utilizó el SB203580, el cual impide que HSP27K utilice a p38MAPK como sustrato y fosforile factores de transcripción.

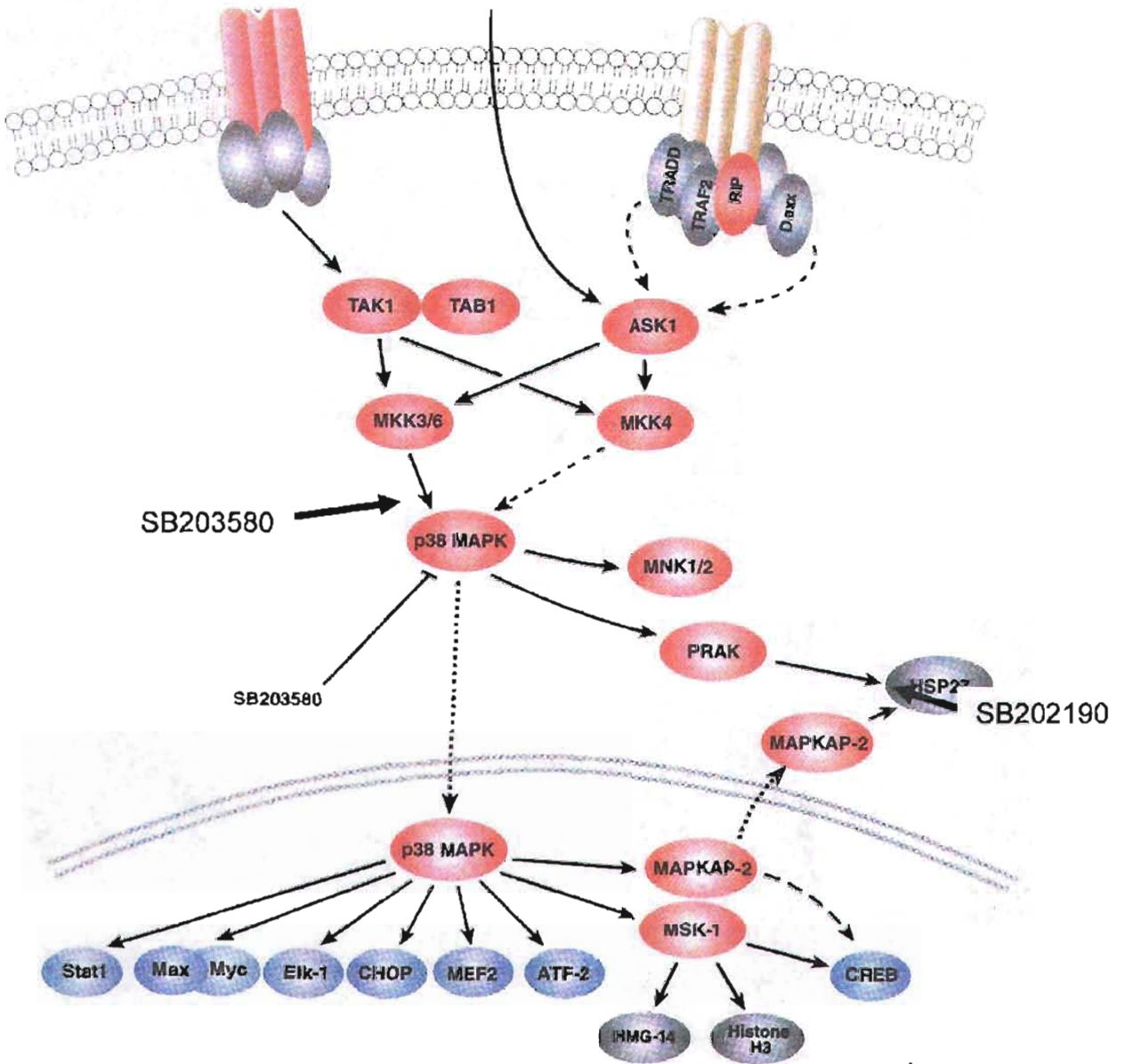


Figura 7. Esquema general de señalizaciones para MAPK. Tomado de www.cellsignal.com

Estos dos inhibidores a altas concentraciones (más de 500 nM) provocan muerte celular.

Con el inhibidor SB202190, se obtuvieron los resultados siguientes:

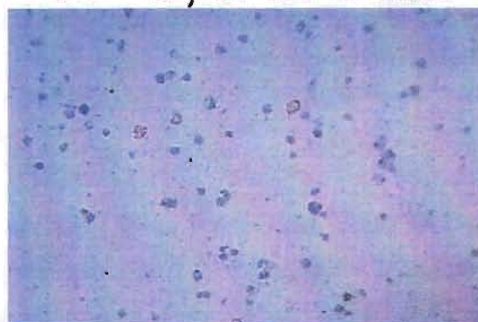
- Viabilidad celular.

37° C, sin inhibidor



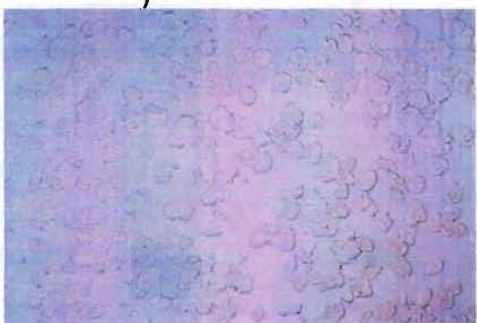
100% viab. cel.

37° C, a 350 nM



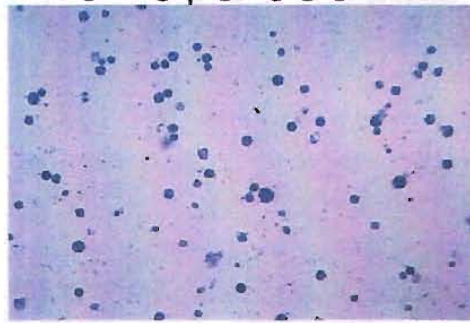
90% muerte cel.

43° C, sin inhibidor



100% viab. cel.

43° C, a 350 nM



100% muerte cel.

Figura 8. Aquí se muestra la viabilidad celular a las diferentes condiciones, 37 y 43° C en ausencia y presencia del inhibidor.

En líneas celulares de mamífero, Sing et al., en 1999 y Davies et al., en el 2000, utilizaron concentraciones de 10 μ M, además de que la CI_{50} recomendada por Calbiochem para células en cultivo es de 350 nM. Tomándose ésta concentración como referencia, se realizó una curva de viabilidad celular empleándose las concentraciones de 50 nM hasta 500 nM, determinándose la concentración en donde

se obtiene tanto el 100 % de viabilidad celular, como presencia de RNA mensajero, la cuál correspondió a 100 nM, la cual esta alejada 250 veces de la CI_{50} recomendada

- Inhibición de RNA mensajeros:

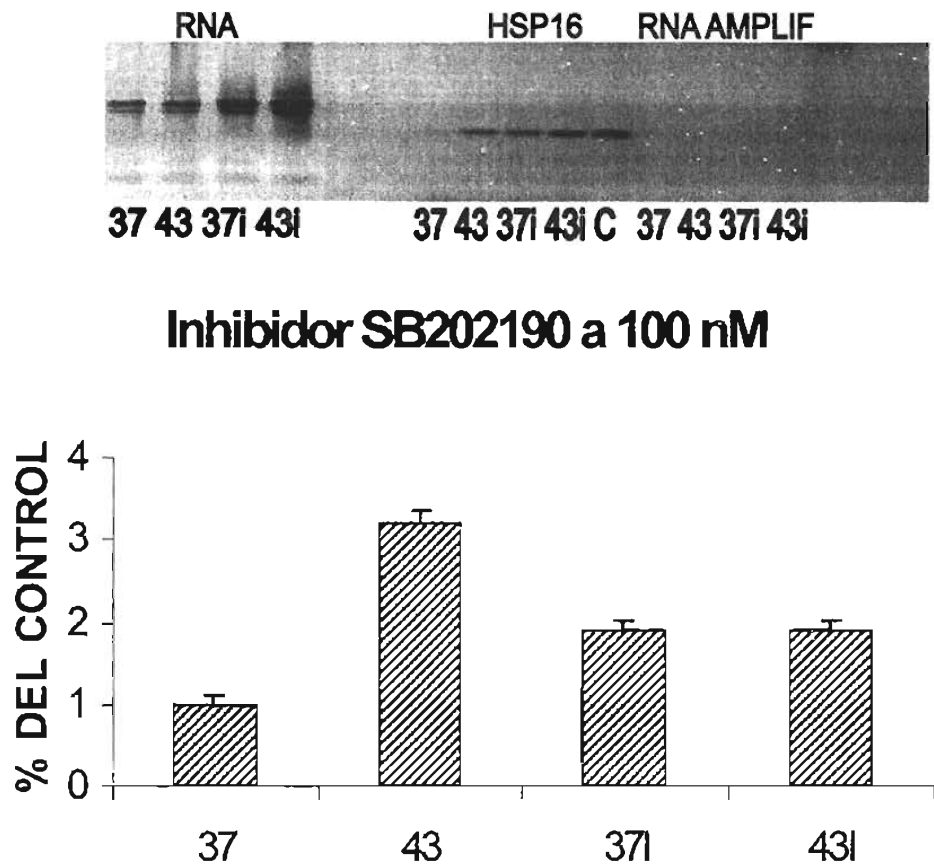


Figura 9. En el gel se muestran los grupos experimentales HSP16, RNA amplificado. En donde 37 y 43 se refieren a la temperatura de incubación. La i significa presencia de inhibidor específico para p38MAPK (SB202190). El HSP16 responde a la presencia de inhibidores. En la gráfica se muestra la respuesta de HSP16 tomando como patrón de referencia a las subunidades ribosomales. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y el gel es representativo.

En este caso, para realizar los análisis estadísticos, se utilizó como patrón de referencia a las subunidades ribosomales, que en el gel se marcan como RNA. En el gel, se puede observar que a 37°, la expresión es basal, misma que se induce a 43°. Se observa un quinto carril en los amplificadores correspondientes a HSP16, en el cual es un control positivo de reacción de PCR. Los amplificadores denominados como RNA amplif, corresponden a los controles negativos.

En lo que respecta a la expresión del RNA mensajero del gene de la sHSP16Eh, a 37° en presencia del inhibidor, se obtuvo un efecto de activación con respecto a su control del 80% y a la temperatura de 43° se obtuvo una inhibición del 56%, con respecto a su control en presencia del inhibidor.

Con el empleo del inhibidor SB203580, se obtuvieron los siguientes resultados:

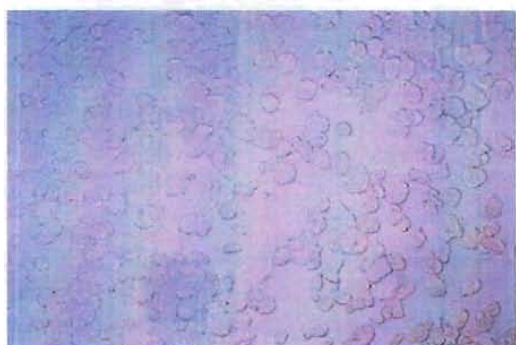
- Viabilidad Celular

37° C, sin inhibidor



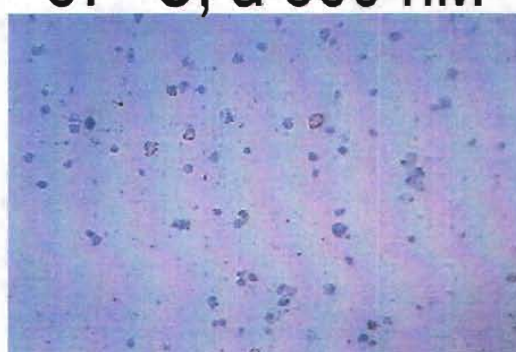
100% viab. cel.

43° C, sin inhibidor



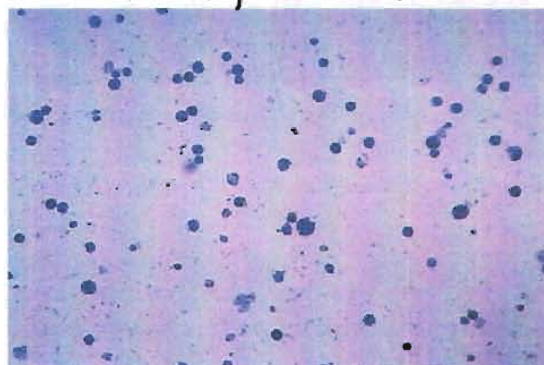
100% viab. cel.

37° C, a 600 nM



90% muerte cel.

43° C, a 600 nM



100% muerte cel.

Figura 10. En donde se muestra la viabilidad celular tanto a 37, temperatura fisiológica como a 43°, en ausencia y presencia del inhibidor.

En este caso, tanto a 37°, como a 43°, se presenta un 100% de viabilidad celular. Calbiochem recomienda una CI_{50} de 600 nM para células en cultivo, por lo que se tomó a esta concentración como referencia para determinar viabilidad celular en presencia del inhibidor, obteniéndose muerte celular en ambas temperaturas, además de desintegración celular completa a 43° C. Por esta razón, se procedió a realizar una curva de concentraciones que permitiera la viabilidad celular de más del 95% a 43° así

como la obtención del RNA mensajero. Dicha concentración fue de 300 nM, la cual se aleja de la recomendada.

- Inhibición de RNA mensajeros:

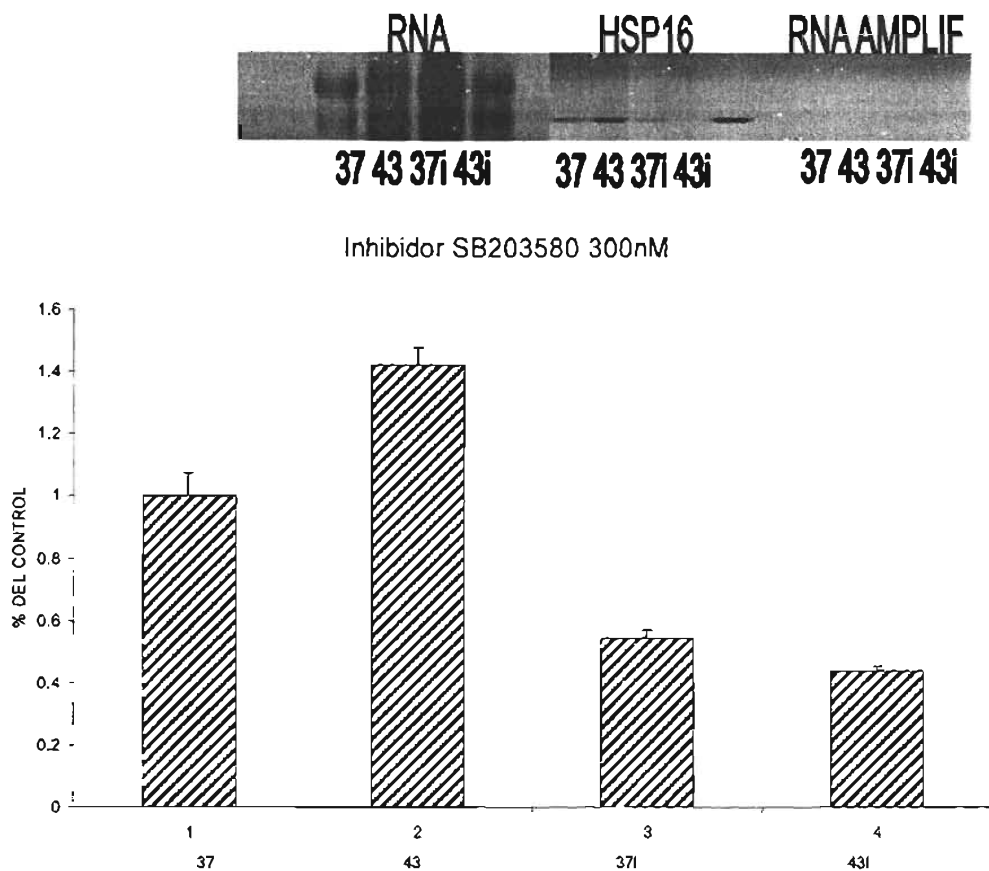


Figura 11. En el gel se muestran los tres grupos experimentales HSP16, RNA amplificado y las subunidades ribosomales. En donde 37 y 43 se refieren a la temperatura de incubación. La i significa presencia de inhibidor SB203580. El gene de HSP16 responde a la presencia de inhibidores. En la gráfica se muestra la respuesta de HSP16 tomando como patrón de referencia las subunidades ribosomales.

En este caso, para realizar los análisis estadísticos, se utilizó como patrón de referencia a las subunidades ribosomales, que en el gel se marcan como RNA. En el gel, se puede observar que a 37°, la expresión es basal, misma que se induce a 43°. Se observa un quinto carril en los amplificadores correspondientes a HSP16, en cual es un control positivo de reacción de PCR. Los amplificadores denominados como RNA amplif, corresponden a los controles negativos.

En lo que respecta a la expresión del RNA mensajero del gene de la sHSP16Eh, a 37° en presencia del inhibidor, se obtuvo un efecto de inhibición con respecto a su control del 55% y a la temperatura de 43° en presencia del inhibidor se obtuvo una inhibición del 69%, con respecto a su control.

En el caso de líneas celulares de mamíferos, se tiene conocimiento de la participación de p38MAPK en la regulación de la expresión de sHSPs. (Cowan y Storey, 2003). En este caso, ambos inhibidores utilizados convergen en p38MAPK, antes y después de su entrada al núcleo en forma activa fosforilada, lo que en los resultados se denota como una inhibición en la expresión del mensajero, nos puede indicar el posible papel regulatorio de esta vía de señalización en la expresión de la HSP16Eh.

Para determinar la participación de la ruta clásica de MAPK, se utilizó el inhibidor PD98059.

La siguiente figura esquematiza la cascada de MAPK/ERK y el punto donde actúa el inhibidor.

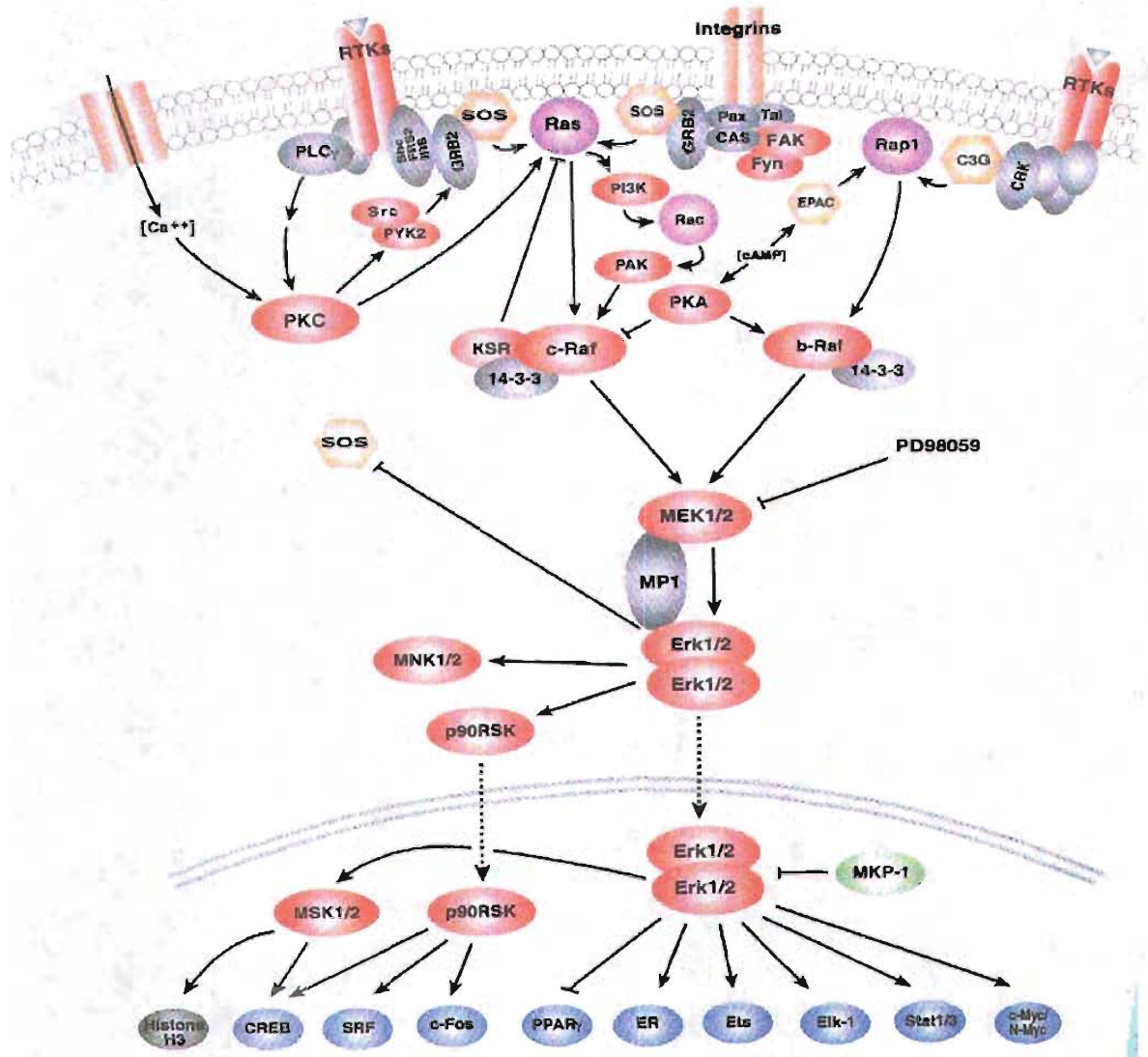


Figura 12. Esquema general para la ruta de señalización de ERKs, en donde PD98059, inhibe la activación de éstas. Tomado de www.cellsignal.com

Aquí, el inhibidor evita la activación de las cinasas tipo ERK 1 y 2, las cuales, una vez activadas se dirigen al núcleo para llevar a cabo la fosforilación de factores de transcripción.

Para el inhibidor PD98059, se obtuvieron los siguientes resultados:

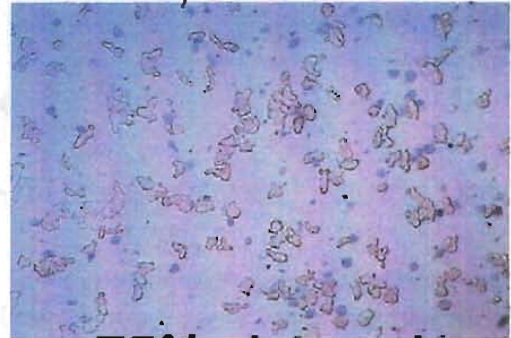
- Viabilidad celular.

37° C, sin inhibidor



100% viab. cel.

37° C, a 10 microM



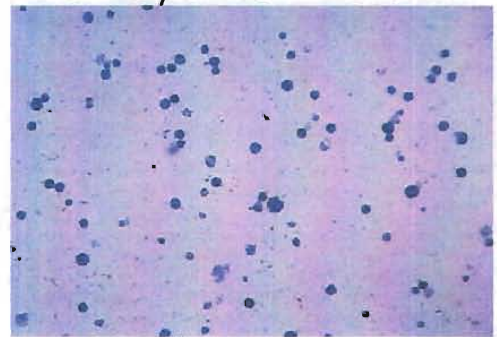
75% viab. cel.

43° C, sin inhibidor



100% viab. cel.

43° C, a 10 microM



100% muerte cel.

Figura 13. En donde se muestra, la tinción de viabilidad celular, con azul de tripano. A 37° y 43°, en ausencia y presencia del inhibidor.

Para este inhibidor, Dudley et al., en 1995, determinaron su actividad a 10 μM , en líneas celulares de mamífero, por lo que se utilizó esta concentración para realizar ensayos de viabilidad en amiba. En donde se da una muerte celular a 37° y a 43°, disgregación celular, por lo que se dice que es dependiente de la concentración y de la presencia del estrés térmico. Mediante la realización de una curva de

concentraciones desde 1 a 10 μM y determinándose la toxicidad de las mismas, por medio de ensayos de viabilidad celular, se encontró que, este inhibidor a altas concentraciones (más de 5 μM), provoca muerte celular, por lo que se disminuyó la concentración del inhibidor, para obtener RNA mensajero. La concentración final empleada fue de 1 μM . Dicha concentración se encuentra cercana a la CI_{50} reportada por Calbiochem para este inhibidor, la cuál es de 2 μM para células en cultivo.

- Inhibición de RNA mensajero.

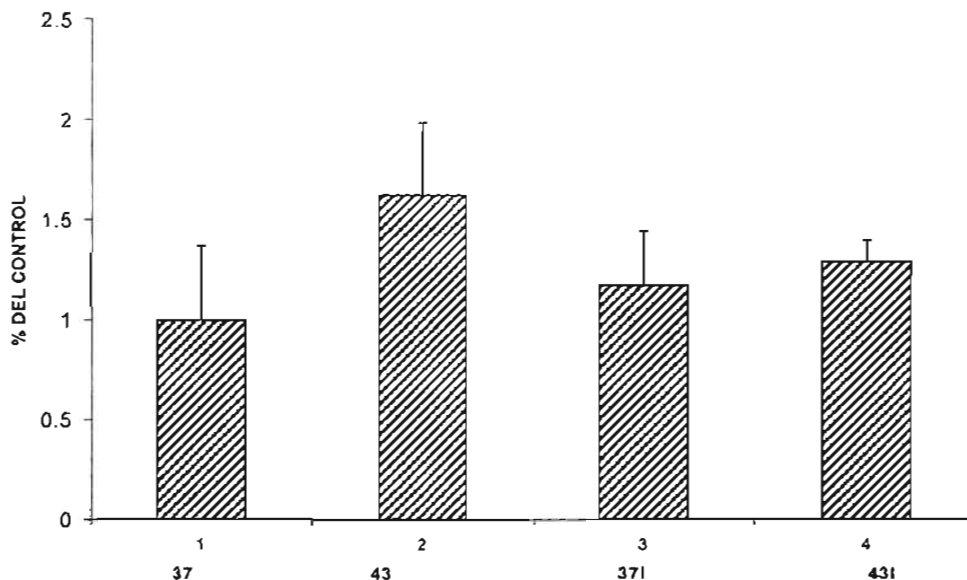


Figura 14. En el gel se muestran los tres grupos experimentales HSP16, RNA amplificado y ARN ribosomal. En donde 37 y 43 se refieren a la temperatura de incubación. La i significa presencia de inhibidor específico para MEK (PD98059). El HSP16 responde a la presencia de inhibidores. Los Ribosomales no lo hacen. En la gráfica se muestra la respuesta de HSP16 tomando como patrón de referencia Ribosomales (control negativo).

Para el análisis de la ruta clásica de MAPKs se empleó el inhibidor PD98059. Las proteínas de esta ruta están presente en *E. histolytica* y se les denomina p42 y p44MAPK, respectivamente (Pérez et al., 1996).

En este caso, en el gel se observan las subunidades ribosomales, los amplificadores del gene de HSP16, un quinto carril del amplificado de HSP16 el cual corresponde a un control experimental de PCR, lo que se denomina como RNA amplif corresponde al RNA amplificado sin pasar por la conversión a cDNA, a estas muestras se le consideraron controles negativos y los amplificadores de la subunidad pequeña ribosomal de *E. histolytica* el cual se considera como un constitutivo.

Para el análisis estadístico se normalizaron los valores densitométricos de HSP16, tomándose como referencia a la amplificación de la subunidad pequeña 18S, a 37° se observo una activación del 20% con respecto a su control y a la temperatura de 43° en presencia del inhibidor se observó un efecto de inhibición del 19% con respecto a su control.

Análisis de PKC

Para la vía de señalización de PKC, la cual se representa en la figura 15, el esquema posterior, se utilizó el inhibidor 1 – O – hexadecil – 2 – O - metil rac-glicerol, el cual es un análogo del diacilglicerol.

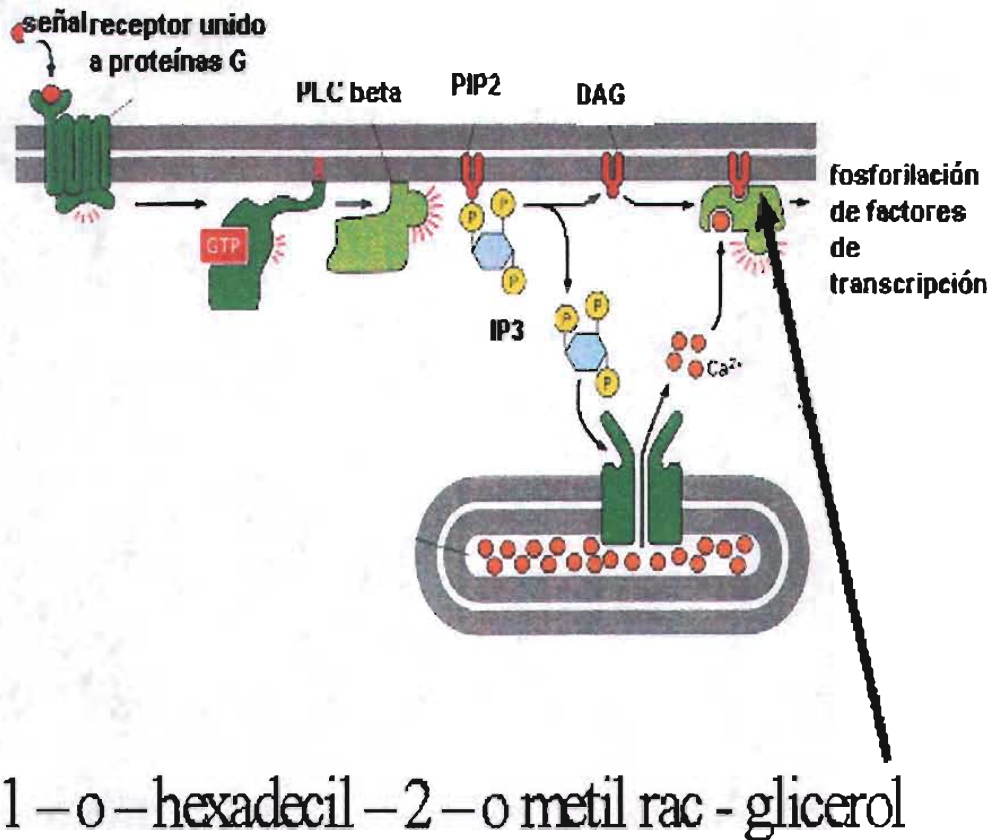


Figura 15. Esquema general de señalizaciones para PKC, en donde, el inhibidor actúa impidiendo su unión a membrana y posterior activación.

Para el inhibidor de PKC, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Inhibición de RNA mensajero.

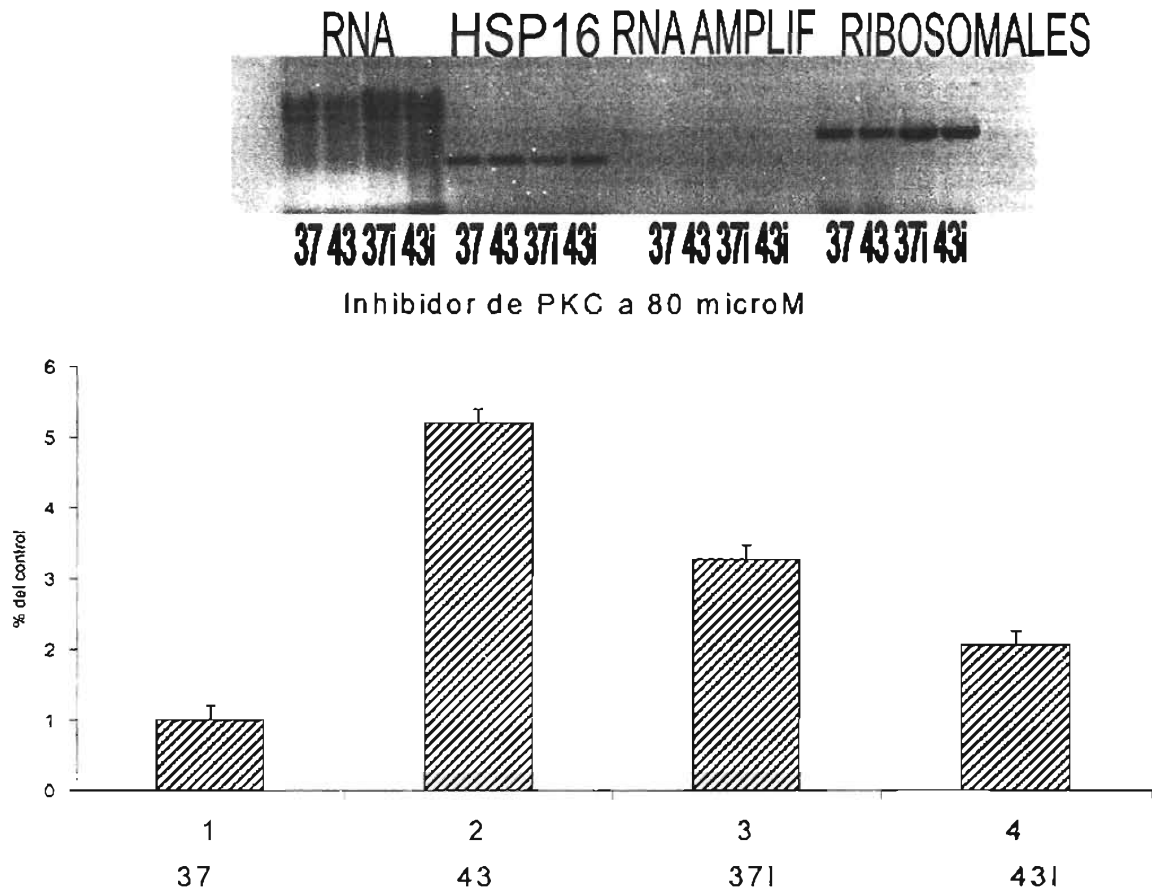


Figura 16: En el gel se muestran los tres grupos experimentales HSP16, RNA amplificado y ARN ribosomal. En donde 37 y 43 se refieren a la temperatura de incubación. La i significa presencia de inhibidor específico para PKC (1 – O – hexadecil – 2 – 0 - metil rac-glicerol). El HSP16 responde a la presencia de inhibidores. Los Ribosomales no lo hacen. En la gráfica se muestra la respuesta de HSP16 tomando como patrón de referencia el amplificado de la subunidad pequeña ribosomal de *Entamoeba*.

En este caso, para determinar la concentración óptima, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para esto se tomó como referencia y a la vez como concentración intermedia de una curva de concentraciones, a la CI_{50} para éste inhibidor, según Calbiochem, la cual es de 80 μ M. Como concentración final obtenida experimentalmente se utilizó 80 μ M, siendo la misma que la IC_{50} reportada.

En el gel se muestra la calidad del RNA determinada por las subunidades ribosomales, el amplificado del gene de HSP16, el RNA amplificado el cual consiste en RNA sin ser convertido a cDNA, considerándose a éstos como controles negativos y la amplificación de la subunidad pequeña ribosomal de *Entamoeba*, lo cual se considera como un constitutivo.

Una vez obtenidos los valores densitométricos de los amplificados, se normalizaron los datos tomándose como referencia a los amplificados de la subunidad pequeña ribosomal, en el gen de nominados como "Ribosom" para la posterior obtención de la gráfica en base al por ciento del control, el gel y la gráfica se presentan en la Figura 16.

Para el caso de inhibidor de PKC, el cual es un análogo del diacilglicerol e impide la unión de PKC a la membrana para su posterior activación. A la temperatura de 37° C se da una expresión basal, la cual se induce a la temperatura de 43° en ausencia del inhibidor. A la temperatura de 37° C en presencia del inhibidor, se da una activación del 320% con respecto a su control. En lo que respecta a los resultados obtenidos a la temperatura de 43° C, se da una inhibición del 60%, con respecto a su control.

De igual manera, para el análisis del efecto de PKC sobre la transcripción del gen, se utilizó TPA, que es un activador general.

Además el análisis de TPA, nos permitirá especular sobre la posible presencia de elementos reguladores de la respuesta transcripcional, como es el elemento de respuesta a TPA (TRE) (Angel, 2004).

Para el activador TPA, se tienen los siguientes resultados:

- Inhibición de RNA mensajero.

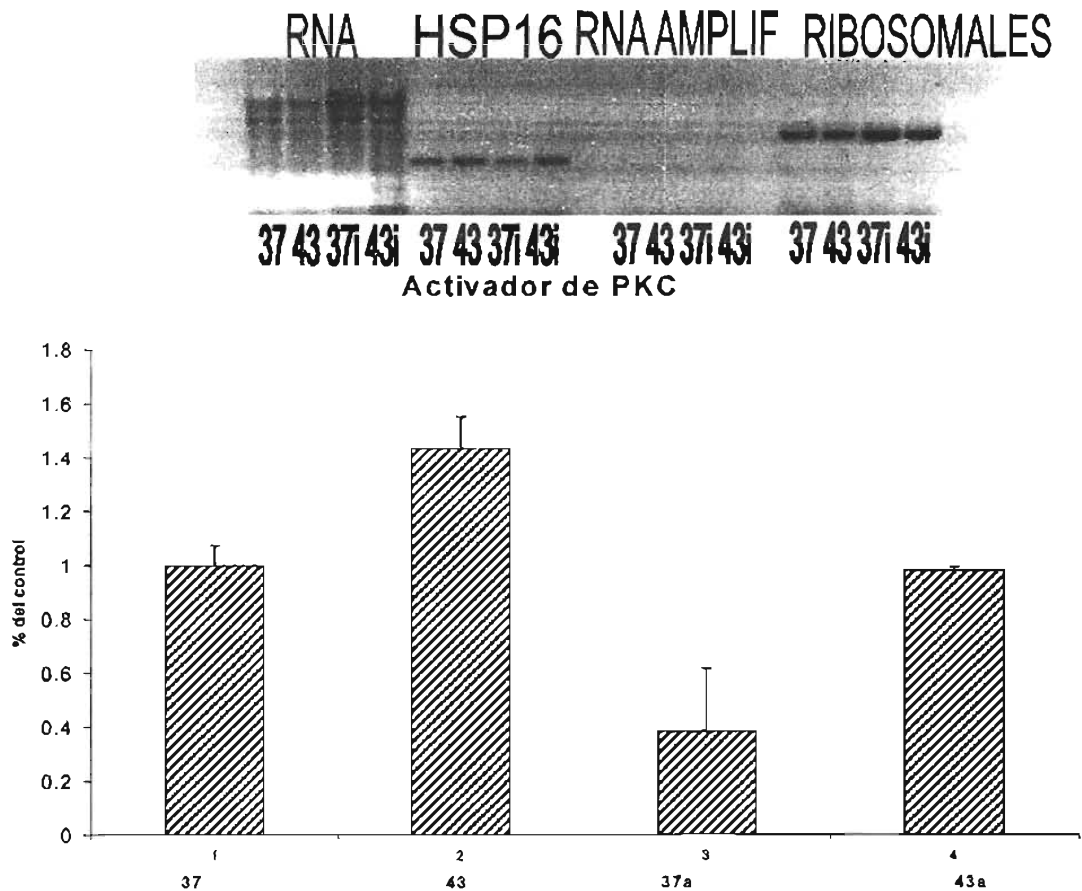


Figura 17: En el gel se muestran los grupos experimentales HSP16, RNA amplificado y ARN ribosomal. En donde 37 y 43 se refieren a la temperatura de incubación. La a significa presencia de activador para PKC (TPA). El HSP16 responde a la presencia de inhibidores. Los Ribosomales no lo hacen. En la gráfica se muestra la respuesta de HSP16 tomando como patrón de referencia Ribosomales.

Para el caso del activador general de PKC denominado TPA el cual es un derivado de ésteres de forbol, se realizó una curva de viabilidad a diferentes concentraciones 1nM, 10nM 100nM y 1µM (sugeridas por la Dra. Marina Macias, IFC, UNAM), obteniéndose muerte celular a todas estas concentraciones por lo que se disminuyeron las concentraciones a 0.5nM 5nM 50nM y 500nM presentándose viabilidad celular del 100% únicamente a la concentración de 0.5nm.

En el gel se muestra la calidad del RNA determinada por las subunidades ribosomales, el amplificado del gene de HSP16, el RNA amplificado el cual consiste en RNA sin ser convertido a cDNA, considerándose a éstos como controles negativos y la amplificación de la subunidad pequeña ribosomal de *Entamoeba*, lo cual se considera como un constitutivo.

Una vez obtenidos los valores densitométricos para los amplificados de HSP16, se normalizaron los datos tomándose como patrón de referencia a los amplificados de la subunidad pequeña ribosomal, denominados en el gel como "Ribosom". La gráfica que se presenta en la Figura 17 se realizó en base al por ciento del control de los datos normalizados.

En el caso de TPA se observa una inhibición a 37° C del 60%, cuando está en presencia del activador, con respecto del control. En estado de estrés a 43° C en presencia del activador, se observa una inhibición del 31% con respecto al control. En este caso se esperaba un resultado donde se presentara un efecto activador a 43° C, lo que se correlacionaría con el resultado anteriormente obtenido de inhibición para la ruta de PKC.

Análisis global del efecto transcripcional

De forma alternativa y con el fin de evitar la variabilidad en la expresión del mRNA de HSP16Eh provocada por la variabilidad de un cultivo a otro, se realizó un experimento en el que se utilizó un mismo lote de amibas y en él se probaron todos los inhibidores.

Al momento de cuantificar los valores densitométricos, se fijaron los valores a 37° y 43°. Obteniéndose la gráfica de la Figura 17. En esta figura, se presenta una muestra a 37° en ausencia de inhibidores, que se considera como control, una muestra a 37° en presencia de DMSO al 100%, el cual es el diluyente de los inhibidores, esto para verificar que el resultado de inhibición sea debido al compuesto y no al diluyente y una muestra a 43° en ausencia del inhibidor a la cual se considera como control de estrés térmico, además de cada uno de los inhibidores empleados tanto a la temperatura de 37° como a 43°.

Efecto transcripcional sobre HSP16 de inhibidores de proteínas cinasas

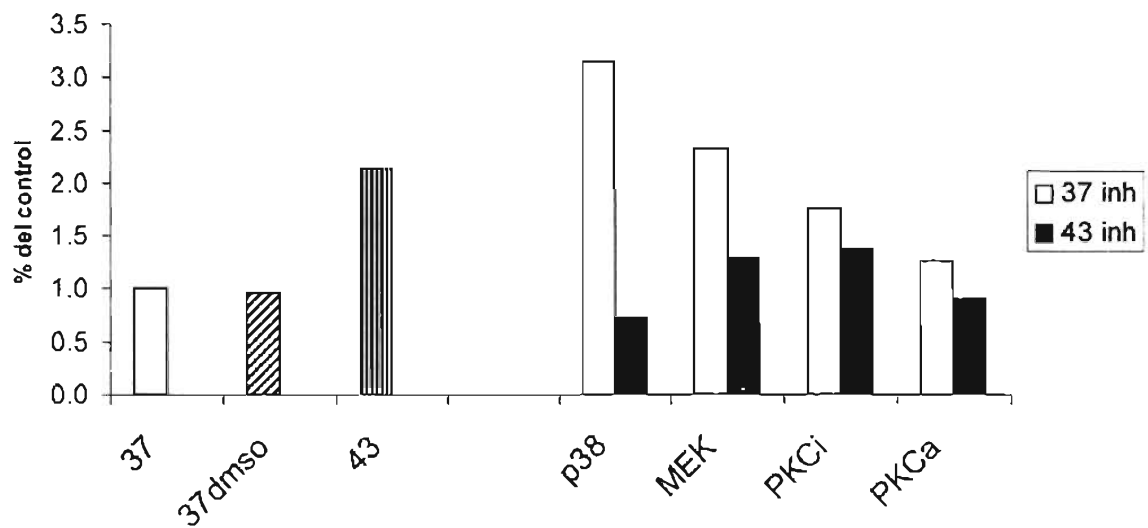


Figura 18. Gráfica en la que se analizan todos los inhibidores, en un mismo lote de amibas para evitar variabilidad de datos dados por el parásito. En éste caso, el experimento fue realizado por duplicado y la gráfica representa el promedio de los datos normalizados en por ciento del control

Resumen de resultados.

Inhibidor	Via de señal. Afectada	Concentración experimental	37°, act o inh (%)	43° % inhibición	37° global act	43° global inh	
SB203580	p38MAPK y HSP27K	300 nM	55 inh	69 inh	216 act	66 inh	§
SB202190	p38MAPK	100 nM	80 act	56 inh			
PD98059	ERK 1/2 cinasas	1 µM	20 act	19 inh	133 act	39 inh	
1-o-Hexadecyl-rac-glycerol	PKC	80 µM	320 act	60 inh	0.76	35 inh	
TPA (act)	PKC	0.5 nM	60 inh	31 inh	0.26	57 inh	

Tabla 2. Análisis comparativo de los diferentes ensayos, tanto global como de forma individual, empleando los inhibidores de proteínas cinasas.

Al comparar el porcentaje de inhibición en la expresión del mRNA, durante el estrés térmico, en los ensayos individuales para cada inhibidor empleado y en el ensayo global, se tiene que los resultados más consistentes se presentan en lo que respecta a la vía de p38MAPK.

DISCUSIÓN

La respuesta al choque térmico, provocada por un incremento en la temperatura, es ampliamente usado como un sistema modelo para estudiar el impacto del estrés en sistemas biológicos.

Dicha respuesta, no sólo permite conocer la manera de activación transcripcional de los genes HSP, sino que a su vez ofrece una manera ideal para entender el comportamiento molecular que llevan a cabo las células, cuando se les expone a diferentes tipos de estrés. De igual manera, es una herramienta para entender los procesos moleculares que se dan en las respuestas genómicas inducibles, siendo ésta altamente conservada a nivel filogenético.

Los genes que codifican para HSPs, se encuentran entre los más altamente conservados, con representantes de distintas especies, tanto procariontes como eucariontes, presentando una identidad del 50% (Morimoto et al., 1992).

En este trabajo, se intentó delimitar los procesos moleculares de activación transcripcional y regulación génica para HSP16Eh.

Entamoeba es un organismo con características similares a organismos como *Saccharomyces* en el cual se tienen mejor documentados los procesos de regulación génica y se puede tomar como referencia.

En *Saccharomyces cerevisiae*, HSF se une al DNA cuando éste es fosforilado en respuesta al estrés térmico con un incremento en la actividad transcripcional (Hashikawa y Sakurai, 2004). Los resultados obtenidos sugieren que en el caso de la amiba pueda ocurrir lo mismo. El estrés térmico es censado por la membrana celular, la cual cambia su fluidez, Estos cambios provocan una cascada de reacciones encabezadas por segundos mensajeros, entre los que se encuentran el fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) y el diacilglicerol (Jenkins 2003). Las cascadas de reacciones culminan en la activación de proteínas cinasas, las cuales van a activar al factor de transcripción al choque térmico (HSF), que se va a unir a secuencias tipo HSE, que son elementos de respuesta al

choque térmico, de la HSP correspondiente, en nuestro caso, a la HSP16Eh, para llevar a cabo su activación transcripcional.

Desde el punto de vista evolutivo, no se esperaría encontrar una similitud entre el HSF1 de vertebrados y el posible de amiba, dada la lejanía filogenética, sin embargo, en este trabajo esto fue observado, lo que indica que la respuesta al choque térmico y algunos elementos reguladores involucrados en la misma son altamente conservados entre los diferentes organismos.

Entre las proteínas cinasas que son activadas por diversos tipos de estrés fisiológico, están las MAPK, las cuales presenta diferentes tipos, como son: ERK, p38 y JNK. En levaduras, se presenta un tipo de MAPK, la cual es regulada por PKC y activada cuando se presentan condiciones de estrés en la pared celular, como es el choque térmico. Esta vía es equivalente a p38MAPK de mamíferos (Ellion, 2004).

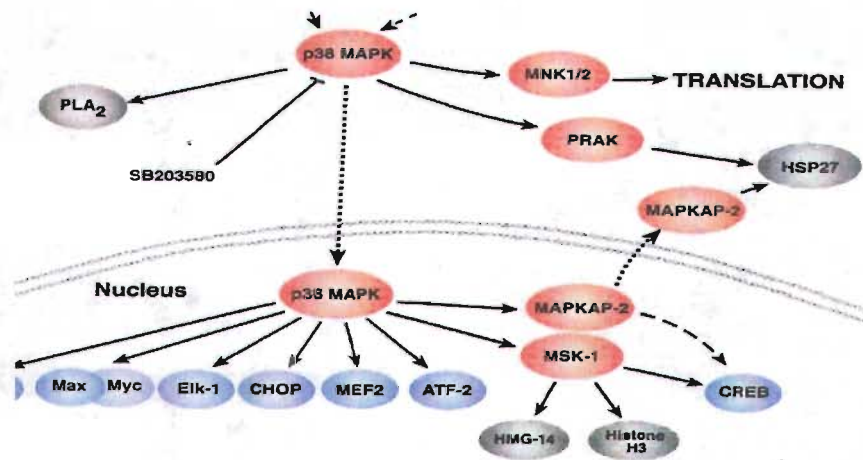


Figura 19. En donde se esquematiza la vía de p38 y el paso de translocación al núcleo, donde fosforila diversos factores de transcripción. Tomado de www.cellsignal.com

La ruta de p38MAPK es activada por citocinas inflamatorias y por exposición a estrés ambiental, en donde, miembros de la familia de GTPasas pequeñas, del tipo Rho son mediadores críticos de la actividad de dicha cinasas (Davis, 2004). En *Entamoeba*, existe una GTPasa pequeña tipo *Rho*, la cual forma parte de la superfamilia *Ras*, debido a que su nombre se deriva de “*Ras* homología” la cual es una GTPasa unida a membrana mediante una cola de lípidos isoprenoides (Lohia y Samuelson,

1993; Sitaramaya, 1999). Rho, en la amiba, interviene en procesos como la regulación de vías de señalización necesarias en la patogeneicidad, los cuáles incluyen citólisis, destrucción de monocapas y regulación del crecimiento (Godbold y Mann, 2000). Nuestros resultados sugieren que la vía de p38MAPK influye en la activación del gen de la HSP16Eh.

En nuestros resultados, se observa una disminución en la expresión del mRNA de HSP16Eh en presencia de TPA. A su vez, en la región intergénica, se presentan dos sitios de unión a factores tipo AP-1 y a estas regiones también se les llama elementos de respuesta a TPA (Angel 2004). En este caso cabe mencionar que existen diferentes isoformas de PKC y realizando una revisión en el genoma de *Entamoeba*, no se ha encontrado cuales de ellas se presentan en *E. histolytica* (www.tigr.org). No obstante, *E. histolytica*, presenta una PKC que fosforila a la Histona I en presencia de calcio, fosfolípidos y diacilglicerol, misma que en este trabajo y mediante el empleo del inhibidor correspondiente presenta un efecto de disminución en la expresión del mRNA de HSP16 (De Meester et al., 1990). El TPA es un competidor que presenta estructura similar al diacilglicerol, por lo que estaría tomando funciones de co-represor, que al unirse a la PKC, evita que ésta lleve a cabo la fosforilación del HSF regulando la expresión del gene de forma negativa.

La actividad de HSF es regulada por fosforilación reversible en múltiples sitios. Algunas cinasas son incluídas en esta regulación, incluyendo Akt, ERK y JNK (Gabai y Sherman, 2002). En este caso, los resultados sugieren que las cinasas tipo ERK pueden estar entre las responsables de la fosforilación. Como se puede observar, al utilizarse el inhibidor PD98059, el cual es específico para cinasa del tipo ERK. En presencia del mismo y al aplicarse un choque térmico a las células en incubación, se observa una disminución en la expresión del mRNA de HSP16Eh.

De igual manera, la cinasa ERK interacciona río arriba de la cascada con Raf1, que es la cinasa activadora de ERK. Raf es activada de dos maneras, tanto Ras dependiente como Ras independiente (Sasaki et al., 2003). Esta proteína cinasa, Raf1, es regulada a través de la interacción de Ras-GTP asociado a membrana. Entre los mecanismos de activación, se presentan PKC – dependientes y PKC – independientes.

Existe evidencia de la intervención de PKC en la activación de Raf, al emplearse en ello a activadores tumorales del tipo ésteres de forbol. Un tratamiento prolongado con estas sustancias, lleva a una rápida activación de p42 MAPK, en muchos tipos celulares. También existe la evidencia de que PKC ϵ y PKC α pueden activar a Raf (Schonwasser et al., 1998, Nollen y Morimoto, 2002).

En este trabajo, los resultados sugieren dos tipos de activación para el HSF. Esto debido a que los resultados consistentes en cuanto a inhibición en la expresión del mRNA de HSP16Eh, se presenta en las vías de señalización de p38MAPK y ERK. Por lo que se tomaron en cuenta estas dos vías para la formulación de posibles cascadas de señalización.

Por un lado el HSF está siendo fosforilado por MAPK del tipo p38, esto debido al empleo del inhibidor específico para esta cinasa, SB203580 o SB202190, en presencia de estrés térmico. Ésta, a su vez puede estar siendo activada por la presencia de una GTPasa pequeña, *Rho* o *Ras*, la cual tiene tres proteínas efectoras entre las que se encuentra la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), la cual puede activar a *Rac*, éste a su vez, activa a p21 proteína cinasa activada (PAK) que fosforila a p38MAPK (Bornfeldt, 2000).

Por otro lado, el HSF está siendo activado por cinasas del tipo ERK, las cuales son activadas por Raf. De igual manera, y de acuerdo a los resultados obtenidos con el inhibidor de PKC, se puede especular que, la activación de Raf esta siendo PKC dependiente. Como el inhibidor empleado actúa sobre las isoformas dependientes de diacil glicerol y existe evidencia en reportes anteriores que PKC ϵ y PKC α son activadoras de Raf, se puede especular que una de estas dos isoformas está actuando en la cascada que lleva a la activación de las ERK y estas a su vez a la fosforilación de HSF. Aún no se puede elucidar si Ras se esta uniendo a Raf para formar el complejo activador de ERKs.

Lo que nos lleva a la formulación del siguiente esquema de señalizaciones para el gen de HSP16Eh, en donde se da una activación dual, mediante la activación de ERK cinasas y p38MAPKs. Donde el HSF, requiere estar en forma de tetrámero para unirse a la secuencia nGAAn del elemento de respuesta a estrés térmico.

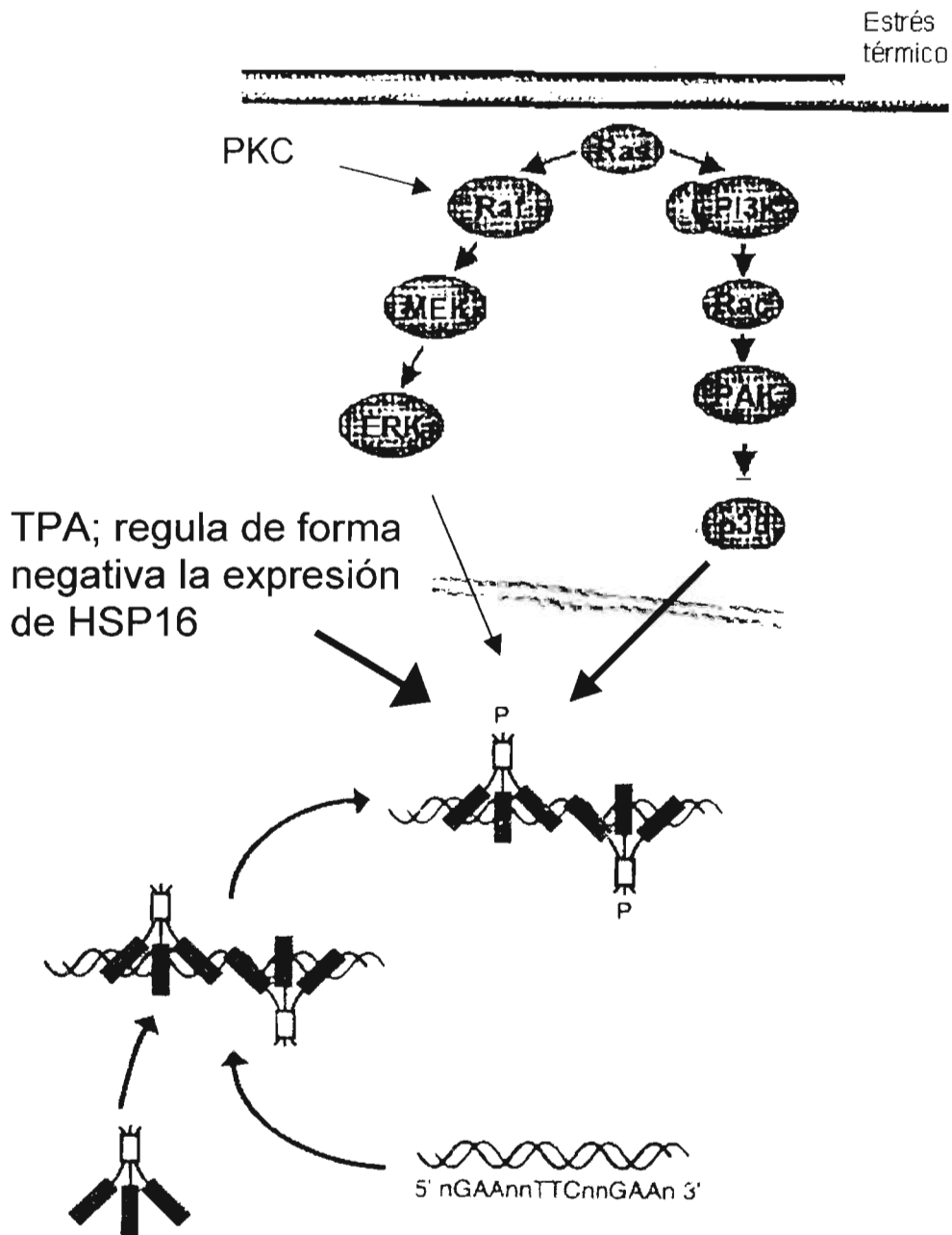


Figura 20. Esquema propuesto para la activación de HSP16Eh, mediante fosforilación del HSF por parte de p38MAPK y ERK

No se han encontrado reportes de estudio realizados en parásitos donde se correlacione la regulación génica de HSP con el análisis molecular de MAPK, sin embargo Su y Wellems, 1994, Garlapati et al., 1999 consideran que MAPKs intervienen

en procesos de modulación del estrés térmico lo que se corrobora con los resultados obtenidos en el presente estudio. Así mismo, MAPKs intervienen en la regulación de la interacción parásito-hospedero, en el caso de *Toxoplasma gondii* (Roissin et al., 2000). Esto nos da lugar a especular con la posibilidad, de que en el caso de *E. histolytica*, estas vías intervengan en la regulación de HSP, al cambiar el parásito de micro hábitats durante su ciclo de vida dentro del hospedero.

Así mismo, en este trabajo, se determinó que el parásito identifica un estrés químico y activar los genes de respuesta inmediata como los HSP, lo cual se observa al presentarse una activación de la expresión del mRNA de HSP16Eh, en ausencia del estrés térmico (37°C) pero en presencia de inhibidores de proteínas cinasas. No podemos decir de manera certera a que se deba esta activación, la cual, no se da en todos los casos de inhibición de proteínas cinasas al utilizar diferentes lotes de amibas y se da en todos los casos cuando se utilizó un mismo lote de amibas para el análisis simultáneo de los inhibidores.

HSP16 es importante en *E. histolytica*, porque para completar su ciclo de vida tiene que pasar por diferentes circunstancias, como lo es el paso por diferentes órganos dentro del hospedero, la formación del quiste y la sobrevivencia del mismo en ambientes hostiles. Es muy difícil que se den de manera fisiológica las temperaturas utilizadas en este trabajo (43° C), sin embargo, el estrés celular no sólo puede ser térmico y este gen puede ser activado por otras maneras, como el cambio de pH al paso por el estómago, o bien, en la ruta invasiva para la formación del absceso hepático amibiano.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que:

- La activación de la expresión génica de HSP16Eh, pueda estar siendo llevada a cabo de forma dual por MAPK del tipo p38 y ERK.
- La activación de la vía de PKC regula de forma negativa la expresión génica de HSP16Eh.

PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de pH y presencia de sales biliares en el medio, sobre el crecimiento de *E. histolytica* y la expresión del gene de HSP16.
- Bloquear la actividad génica de HSP16 en amibas transfectadas, para determinar otro tipo de funciones de ésta proteína en el metabolismo del parásito.
- Determinar la presencia de copias génicas de HSP16.
- Determinar la presencia de isoformas de HSP16 a nivel de proteína, mediante electroforesis bidimensional.

REFERENCIAS

- Akbar et al., 2004. Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biochemical Parasitology*. 133 (2):187 - 96.
- Alberts et al., 2002. *Molecular Biology of the cell*. 4^a Ed. Garland Science, USA; pp 1463.
- Angel, 2004. Multigene family of Transcription Factor AP-1. In *Handbook of Cell Signaling*; vol 3, pag 99 – 105
- Beere, 2001. Stressed to Death: Regulation of Apoptotic Signaling Pathways by the Heat Shock Proteins. *Science*; 1 - 6.
- Benndorf et al., 1994. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (32): 20780 - 4.
- Bogitsh and Cheng; 1998; *Human Parasitology*; U .S. A.; Academic Press.
- Boldt et al., 2002. The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis*. 233 (11); pp 1831 - 1838.
- Caballero Franco C. 2002. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM.
- Carbajal et al., 1996. Fibronectin - induced intracellular calcium rise in *Entamoeba histolytica* trophozoites: effect on adhesion and the actin cytoskeleton. *Experimental Parasitology*. 82 (1): 11 - 20
- Caruccio et al., 1997. The heat-shock transcription factor HSF1 is rapidly activated by either hyper- or hypo - osmotic stress in mammalian cells. *Biochemical Journal*. Oct 15; 327 (Pt 2): 341 - 7
- Cevallos, 1995. Chapter 3: Heat shock protein of *Giardia lamblia*. Tesis doctoral. University of London. U.K
- Chaudhuri and Raha, 2000. Inhibition and stimulation of growth of *Entamoeba histolytica* in culture: association with PKC activity and protein phosphorylation. *Experimental Parasitology*. 95 (1): 28 - 35.
- Cobb and Petrash, 2002. α -Crystallin Chaperone-like Activity and Membrane Binding in Age-Related Cataracts. *Biochemistry*. 41; pp 483 - 490.
- Coppi et al., 2002. The Enteric Parasite *Entamoeba* Uses an Autocrine Catecholamine System during Differentiation into the Cyst Stage. *The Journal of Biochemical Chemistry*. VOL. 277 (10), 8083 - 8090.
- Cowan and Storey, 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*. Apr; 206 (Pt 7): 1107 - 15
- Cuenda et al., 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letter*. May 8; 364 (2): 229 - 33
- Davies et al., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*. Oct 1; 351 (Pt 1): 95 - 105

- De Meester et al., 1990. Identification of protein kinase C and its potential substrate in *Entamoeba histolytica*. *Comp Biochemical Physiological Biological*. 97 (4): 707 - 11.
- Diamond et al., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 72: 431 - 32.
- Dudley et al., 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade; *Proceedings National of Academical Science. U S A*. Aug 15; 92 (17): 7686 - 9
- Field et al., 2000. An *Entamoeba histolytica* inositol 1, 3, 4-trisphosphate 5/6-kinase has a novel 3-kinase activity. *Molecular Biochemical Parasitology*. 108 (1): 119 - 23.
- Field et al., 2000. Responses of *Entamoeba invadens* to heat shock and encystation are related; *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47 (5): 511 - 514.
- Franco et al., 2000. Signal transduction pathways in *Entamoeba histolytica*: PKA activity and translocation during the interaction of trophozoites with FN. *Archives of Medical Research*. 31 (4 Suppl): S126 - 7.
- Gabai and Sherman, 2002. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock, *Journal of Applied Physiological*. Apr; 92 (4): 1743 - 8.
- Garlapati et al., 1999. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Molecular of Biochemical Parasitology*. May 15; 100 (1): 95 - 101
- Godbold and Mann, 2000. Cell killing by the human parasite *Entamoeba histolytica* is inhibited by the rho-inactivating C3 exoenzyme. *Molecular Biochemical Parasitology*. Apr 30; 108 (1): 147 - 51
- Hashikawa and Sakurai, 2004. Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element; *Molecular Cell Biology*. May; 24 (9): 3648 - 59.
- Hayess and Benndorf, 1997. Effect of protein kinase inhibitors on activity of mammalian small heat-shock protein (HSP25) kinase. *Biochemical Pharmacology*. May 9; 53 (9): 1239 - 47.
- Helmreich, 2001. *The Biochemistry of Cell Signaling*. 1st Ed. Oxford University Press; USA; pp 328.
- Hernandez Ramirez et al., 2000. *Entamoeba histolytica*: tyrosine kinase activity induced by fibronectin through the beta1-integrin-like molecule. *Experimental Parasitology*. 95 (2): 85 - 95.
- Holmberg et al., 1997. The phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate enhances the heat-induced stress response. *Journal of Biological Chemistry*. Mar 7; 272 (10): 6792 - 8
- Holmberg et al., 1998. Conventional and novel PKC isoenzymes modify the heat-induced stress response but are not activated by heat shock. *Journal of Cell Science*. Nov; 111 (Pt 22): 3357 - 65.
- Huot et al., 1995. Characterization of 45 - kDa/54 - kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27 - kDa heat-shock protein HSP27; *European Journal Biochemistry*. 227 (1 - 2): 416 - 27.

- Karlin and Brocchieri, 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 47: 565 - 577
- Kim et al., 1998. Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature* 394: 595 - 599.
- Kogut et al., 2003. The use of selective pharmacological inhibitors to delineate signal transduction pathways activated during complement receptor - mediated degranulation in chicken heterophils. *International Immunopharmacology*. 3, pp 693 - 706.
- Labruyère et al., 2003. EhPAK, a member of the p21-activated kinases family, is involved in the control of *Entamoeba histolytica* migration and phagocytosis. *Journal of Cell Science*. 116; 61 - 71.
- Lewin, 2000. *Genes VII*. Oxford University Press. NY. USA: 246 - 254
- Lohia and Samuelson, 1993. Molecular cloning of a rho family gene of *Entamoeba histolytica*. *Molecular of Biochemical Parasitology*. Mar; 58 (1): 177 - 80.
- Louise et al., 1997. Sensitization of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin: involvement of protein kinase C and NF-kappaB; *Infection and Immunity*. Aug; 65 (8): 3337 - 44.
- Lujan et al., 1996. Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biological Cell*. 1996; 86 (1): 11 - 8.
- Mai et al., 1999. HSP60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Cell Biology*. 19 (3): 2198 - 2205.
- Maizels et al., 1998. Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the δ isoform of protein kinases C. *Biochemical Journal*. 332; pp 703 - 712.
- Morano and Thiele, 1999. Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expression*. 7 (4 - 6): 271 - 282.
- Morimoto and Nollen, 2004. The Heat Shock Response: Sensing the Stress of Misfolded Proteins. In *Handbook of Cell Signaling*; vol 3, pag 269 – 275
- Moroni and Garland, 2001. In vitro dephosphorylation of α -crystallin is dependent on the state of oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1546. pp 282 - 290.
- Newton, 1997. Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology*. 9: 161 – 167.
- Nishizuka, 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305 - 312.
- Nollen and Morimoto, 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*. Jul 15; 115 (Pt 14): 2809 - 16
- Ortiz et al., 2000. Actin induction during PMA and cAMP-dependent signal pathway activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiology*. Oct; 2 (5): 391 - 400

- Ortner and Duchene, 1992. Humoral immune response against a 70-kilodalton heat shock protein of *Entamoeba histolytica* in a group of patients with invasive amoebiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54: 175 - 184
- Paveto et al., 1999. *Entamoeba histolytica*: signaling through G proteins. *Experimental Parasitology*. 91 (2): 170 - 5.
- Pérez et al., 1996. *Entamoeba histolytica*: involvement of pp125FAK in collagen-induced signal transduction. *Experimental Parasitology*. 82 (2): 164 - 70.
- Pérez et al., 1998. *Entamoeba histolytica*: collagen-induced AP-1 DNA binding activity. *FEMS Microbiology Letters*. 159 (2): 187 - 92.
- Pirkkala et al., 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal*. May; 15 (7): 1118 - 31
- Ploeg et al., 1985. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science*. 228: 1443 - 1445.
- Ramos et al., 2002. *Entamoeba histolytica* genomic organization: identification, structure, and phylogenetic relationship of two serin-treonine protein kinases. *Experimental Parasitology*. 100: pp135 - 139.
- Roissin et al., 2000. Biochemical characterization of mitogen-activated protein (MAP) kinase activity in *Toxoplasma gondii*. *Parasitological Research*. Jul; 86 (7): 588 - 98.
- Santiago et al., 1994. *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Experimental Parasitology*. 79 (3): 436 - 44.
- Sasaki et al., 2003. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nature Cell Biology*. May; 5 (5): 427 - 32.
- Schaller, 2001. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinases; *Biochimica et Biophysica Acta*. 1540; pp 1 - 21.
- Schonwasser et al., 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Molecular Cell Biology*. Feb; 18 (2): 790 - 8
- Sitaranaya, 1999. *Introduction to Cellular Signal Transduction*. Birkhäuser, Boston; pp 311
- Soid - Raggi et al., 1998. *Entamoeba histolytica*: identification of functional Gs and Gi proteins as possible signal transduction elements in the interaction of trophozoites with fibronectin. *Experimental Parasitology*. 90 (3): 262 - 9.
- Stromer et al., 2003. Analysis of the interaction of Small Heat Shock Proteins with Unfolding Proteins. *The Journal of Biochemical Chemistry*. 278 (16); pp 18015 - 18021.
- Sun et al., 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577; pp 1 - 9.
- Su and Wellem, 1994. Sequence, transcript characterization and polymorphisms of a *Plasmodium falciparum* gene belonging to the heat-shock protein (HSP) 90 family. *Gene*. Dec 30; 151 (1 - 2). 225 - 30.

Syrovets et al., 1997. Plasmin is a potent and specific chemoattractant for human peripheral monocytes acting via a cyclic guanosine monophosphate-dependent pathway. *Blood*. Jun 15; 89 (12): 4574 - 83

Tanabe et al., 1998. Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO Journal*. Mar 16; 17 (6): 1750 - 8

Tsao and Wang, 1997. Translocation of protein Kinase C isoform in rat neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 234: 412 - 418

Van Der Ploeg, 1985. Heat Shock Genes: Regulatory Role for Differentiation in Parasitic Protozoa. *Science*. 228 pp 1443 - 1446.

Weikel et al., 1988. Phorbol esters specifically enhance the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 56 (6): 1485 - 91.

www.cbric.jp/research/db/TFSEARCH.html

www.cellsignal.com

www.tigr.org

Yipp et al., 2003. Src-family kinases signaling modulate the adhesion of *Plasmodium falciparum* on human microvascular endothelium under flow. *Blood*. 101 (7); pp 2850 - 2856.

Zhang et al., 2001. Heat shock factor-4 (HSF-4a) is a repressor of HSF-1 mediated transcription. *Journal of Cell Biochemistry*; 82 (4): 692 - 703