



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“EXPRESIÓN DE COX-2 EN *Entamoeba histolytica* DURANTE LA
INTERACCIÓN TROFOZOÍTO-FIBRONECTINA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

LUILLI ANTONIO LÓPEZ CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. DONACIANO FLORES ROBLES

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA TALAMÁS ROHANA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio de dos mil nueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Expresión de COX-2 en *Entamoeba histolytica* durante la interacción trofozoito-fibronectina", presentada por el alumno Luilli Antonio López Contreras, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Donaciano Flores Robles
Dirección de tesis

Dra. Patricia Talamás Rohana
Codirección de tesis

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Alejandro Millán Vega

Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en la Ciudad de México D.F.

Bajo la dirección de

Dr. Donaciano Flores Robles

y codirección de

Dra. Patricia Talamás Rohana

Con la asesoría de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Alejandro Millán Vega

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez

Durante el período que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Luilli Antonio López Contreras, recibió beca del CONACYT.

ÍNDICE

| | Página |
|--------------------|--------|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| Introducción | 3 |
| Material y métodos | 7 |
| Resultados | 12 |
| Discusión | 26 |
| Conclusiones | 29 |
| Perspectivas | 29 |
| Anexos | 30 |
| Referencias | 35 |

Resumen

Recientemente se ha demostrado que *Entamoeba histolytica* sintetiza el RNAm y la proteína tipo COX-2 durante la formación de abscesos hepáticos en hámster. También se ha reportado que la síntesis de la PGE₂ en los trofozoítos actúa como un importante factor de virulencia que modula la respuesta inmune del huésped. Otro factor de virulencia amibiano es la adhesión a proteínas de la matriz extracelular mediada por proteínas de la membrana de trofozoíto, una de ellas es una molécula de 140 kDa con habilidad de unirse a fibronectina, y con similitud a las β 1 integrinas (β 1EhFNR), esta molécula es capaz de activar vías de señalización similares a las inducida por FN a través de integrinas en células de mamíferos. Por otro lado, se ha descrito en células endoteliales que la FN a través de la integrina α 5 β 1 regula la expresión de la COX-2 y la síntesis de prostaglandinas mediante la activación de Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPKs). En este trabajo se analizó el papel de la FN en la modulación de la expresión de la enzima COX-2 y la producción de la PGE₂ a través de la activación de la vía de las MAPKs en *E. histolytica*. Se realizaron ensayos de adhesión a FN a diferentes tiempos, y se determinó la expresión de la COX-2 y la activación de las MAPKs mediante Western Blot y microscopía confocal; la producción de PGE₂ se determinó por ELISA. Se detectó que la FN no influye de manera específica en la expresión de la enzima tipo COX-2, ni en la producción de la PGE₂, así como tampoco en la activación de MAPKs. Sin embargo, encontramos que la expresión de la COX-2, la producción de PGE₂ y la activación de las MAPKs se incrementa durante el proceso de adhesión sugiriendo que la activación de las MAPKs y la producción de PGE₂ podrían estar participando de manera importante en el proceso de adhesión, aunque en forma independiente.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, Fibronectina, MAPKs, COX-2, PGE₂

Abstract

Recently it has been demonstrated that *Entamoeba histolytica* synthesizes mRNA and COX-2 like protein during the production of liver abscesses in hamsters. Also, PGE₂ synthesis in the trophozoites has been reported as an important virulence factor that modulates the host immune response, particularly the inflammation process. Another important virulence factor is amebic adherence to extracellular matrix (ECM) proteins through cell surface molecules. One of them, a 140 kDa molecule, with ability to bind fibronectin (FN), and with functional and antigenic similarities with β 1 integrins (β 1*Eh*FNR), is able to induce the formation of a signaling complex similar to those present in mammalian cells. It has been described in endothelial cells (EC) that FN, through α 5 β 1 integrin, may cause up-regulation of COX-2 and prostaglandins (PGs) production by activation of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) pathways. The present study was carried out to analyze the influence of FN in modulating COX-2 enzyme expression and production of PGE₂ in trophozoites of *E. histolytica* through MAPKs pathway activation. We detected COX-2 expression and activation of MAPKs by Western Blot and confocal microscopy, the production of PGE₂ was measured by ELISA. We found that FN did not specifically influence the expression of the enzyme COX-2, or the production of PGE₂ and, even the activation of MAPKs. However, we found that the expression of COX-2, PGE₂ production, and activation of MAPKs increased during the adhesion process suggesting that PGE₂ and MAPKs pathways might be important in the adhesion process, although independently of each other.

Keys Words: *Entamoeba histolytica*, Fibronectin, MAPKs, COX-2, PGE₂.

INTRODUCCIÓN

Entamoeba histolytica es el agente causante de la amibiasis, la cual representa un problema de salud pública en todo el mundo. Existen entre 40 y 50 millones de individuos infectados y cerca de 100,000 personas afectadas por este parásito mueren anualmente. *E. histolytica* es capaz de invadir la mucosa intestinal y causar colitis amibiana, ulceración severa y además tiene la capacidad de diseminarse a otros órganos como el hígado, el cerebro o el pulmón y causar abscesos (1-4).

Los estudios sobre la respuesta inflamatoria durante la amibiasis intestinal y hepática han revelado un importante papel regulador de las quimiocinas y las citocinas, así mismo se ha demostrado que el reclutamiento y la activación de las células involucradas en el proceso inflamatorio pueden ser modulados por factores secretados por *E. histolytica*. Uno de los productos inmunomoduladores secretados por *E. histolytica* es la prostaglandina E₂ (PGE₂), un mediador lipídico cuya producción incrementa de manera importante durante la colitis amibiana y la formación del absceso hepático amibiano (AHA) (3-14).

Las prostaglandinas en general son sintetizadas por la acción catalítica de enzimas conocidas como ciclooxigenasas (COX) o prostaglandin endoperóxido sintetasas. En vertebrados existen por lo menos dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa. COX-1 y COX-2, que catalizan la conversión del ácido araquidónico a endoperóxidos de prostaglandinas PGG₂ y PGH₂ (15).

La COX-1 es una enzima glicoproteica que se expresa en forma diferencial en las diversas células y tejidos de los mamíferos y su regulación obedece principalmente a la actividad hormonal, y participa en el mantenimiento de las condiciones fisiológicas homeostáticas; la COX-2 es una forma inducible que parece estar limitada a unos cuantos tipos celulares como los macrófagos, los fibroblastos, las células endoteliales, las células de Kupffer y bajo ciertos estímulos, los polimorfonucleares y los linfocitos T. Entre COX-1 y COX-2 existe una homología aproximada del 60% de acuerdo con la secuencia de aminoácidos. Las principales diferencias se localizan en los extremos amino y carboxilo terminal, sin embargo, los sitios de acetilación para la

hCOX1 (ser 529) y hCOX2 (ser 516) que se encuentran cercanos al extremo carboxilo terminal, son sitios altamente conservados. Ambas enzimas son susceptibles a la inhibición por agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) como la aspirina, la indometacina y el flurbiprofeno. Existen diferentes enzimas sintetizadas de prostaglandinas acopladas a cada enzima COX, por ejemplo, la enzima prostaglandina E sintetasa microsomal, es una enzima perinuclear que posee una marcada preferencia por COX-2 y es la principal enzima responsable de la síntesis de PGE₂ (15-17).

El incremento en la actividad de la enzima COX-2 durante la infección amibiana, se puede explicar en base a que el parásito induce su expresión en las células de la respuesta inmune mediante sus antígenos o bien mediante la inducción de ciertas citocinas proinflamatorias que a su vez provocan una inducción en la expresión de la COX-2. Esto podría explicar los síntomas y el estado de modulación inmune que ocurren durante la amibiasis invasiva (8-10, 18).

La PGE₂ es la principal prostaglandina producida durante la infección amibiana, posee una potente actividad como agente inmunomodulador al estimular la producción de interleucinas del tipo Th2 (principalmente IL-4 e IL-5) y suprimir la producción de interleucinas del tipo Th1 (principalmente IL-2 e IFN- γ). Esto provoca la inactivación de macrófagos, lo cual es un evento crítico en el desarrollo de la respuesta inmune efectiva contra *E. histolytica*. La PGE₂ bloquea los macrófagos a través de la disminución de IFN- γ , además inhibe la producción de IL-12 evitando la actividad citolítica de los macrófagos y de las células NK (18-21).

Los efectos inmunomoduladores de la PGE₂ en la amibiasis también pueden explicarse debido a que regula la actividad de los linfocitos inhibiendo la proliferación mediante la disminución de IL-2 e IFN- γ . La PGE₂ también disminuye la expresión de moléculas de MHC-II y sinergiza con la IL-4 para inducir el cambio de IgG a IgE, aunque se desconoce el papel de la IgE en la respuesta contra *E. histolytica* (18).

En el 2003 Dey y col., identificaron y caracterizaron en *E. histolytica* una enzima parecida a COX. Esta proteína es capaz de catalizar la conversión del ácido

araquidónico a PGE₂ aunque posee una estructura no típica de las COX conocidas en las diversas especies (8).

En el 2006 Gutiérrez y col., reportaron que *E. histolytica* produce una proteína que es reconocida por anticuerpos policlonales anti-COX-2 de conejo y se identificó el mRNA que codifica para esta proteína usando iniciadores para detectar COX-2. (22).

Además de modular la respuesta inmune del huésped otro factor de virulencia importante en *E. histolytica* es la capacidad que posee de adherirse a proteínas de la matriz extracelular, en especial la FN. Se ha reportado que la FN a través de receptores que el parásito posee en su membrana activa vías de señalización similares a las que ocurren en organismos eucariontes superiores. En *E. histolytica* se ha sugerido que la FN, al igual que lo hace en otros sistemas eucariontes, regula la expresión de genes relacionados con una mayor capacidad de invadir tejidos (23-31).

Al igual que en células eucariontes que interactúan con la FN, en los trofozoítos que están en contacto con la FN se activa la fosfolipasa C (PLC) a través de receptores acoplados a proteína G, lo cual induce la producción de fosfatidil inositol difosfato [PtdIns(4,5)P₂] a partir del cual se produce inositol 3 fosfato [Ins(1,3,4)P₃] y diacilglicerol (DAG). El Ins(1,3,4)P₃ provoca un incremento en los niveles del calcio intracelular, lo cual a su vez activa a la proteína Ca⁺-calmodulina (CaM). La CaM al igual que el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC). La PKC activada se trasloca a la fracción membrana-citoesqueleto donde fosforila varias proteínas entre ellas las MAPKs. Esta vía de señalización es muy importante en la adhesión del trofozoíto a la célula blanco debido a que se encarga de regular la dinámica del citoesqueleto y también es importante en la destrucción de la célula blanco al activar la liberación de proteasas (23, 32-33).

La expresión de la enzima COX-2 puede ser inducida por diversos estímulos tales como la IL-1, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la PGE₂, los lipopolisacáridos (LPS), y la fibronectina (FN), entre otros. Estudios recientes han demostrado que la adhesión celular mediada por integrinas así como también

ligandos solubles de integrinas contribuyen a mantener los niveles de COX-2 en células endoteliales mediante la activación de diversas vías de señalización tales como las MAP cinasas y la PI3-K-PKB/Akt que además de inducir la expresión de la enzima COX-2 previenen su degradación (34-40).

Con base en lo descrito anteriormente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la FN en la modulación de la *Eh*COX-2 a través de la activación de la vía de las MAPKs. El conocer las vías de señalización que regulan la *Eh*COX-2 puede contribuir al diseño de fármacos que podrían evitar la invasión por *E. histolytica* y contrarrestar los síntomas patofisiológicos producidos por el incremento de la PGE₂ durante la amibiasis.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo axénico de *E. histolytica*.

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM-1:IMSS se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 con 15% de suero bovino inactivado por calor a 37 °C.

Cosecha de trofozoítos de *E. histolytica*.

A partir de un cultivo confluyente de trofozoítos se realizó la cosecha de los parásitos, después de enfriar las botellas durante 10 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 1, 200 rpm en una centrífuga Beckman Accuspin FR por 5 min a 4 °C. Los trofozoítos se lavaron con PBS frío para eliminar el exceso de medio de cultivo, volviéndose a centrifugar a la velocidad antes mencionada. Los trofozoítos se incubaron en medio TYI-S-33 sin suero durante 2 h. Después, se contaron utilizando un hemocitómetro y se usaron para los experimentos de interacción con fibronectina.

Purificación de fibronectina (FN).

La sangre total de humano se centrifugó a 3 000 rpm por 15 min, se separó el plasma y se le agregó PMSF a una concentración final de 1 mM. Posteriormente, el plasma se guardó a -70 °C en alícuotas de 300 ml.

Para realizar la purificación de FN, la resina de Sepharosa-4B acoplada a gelatina (Pharmacia) se equilibró con Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4. El plasma previamente descongelado se centrifugó a 11, 000 rpm durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se utilizó para la cromatografía de afinidad. El plasma se pasó lentamente por la columna, y lo que no se unió se colectó para volverlo a pasar. Posteriormente, la resina se lavó con 100 ml de los siguientes amortiguadores:

- 1) Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, NaCl 0.5 M
- 2) Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, NaCl 1.0 M
- 3) Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, Urea 1.0 M.

La FN se eluyó con el siguiente amortiguador, Tris-HCl 0.05 M, urea 4.0 M.

Cabe mencionar que a todas las soluciones se les agregó PMSF a una concentración final de 1 mM al momento de utilizarlos. Posteriormente, se colectaron 20 fracciones de 40 gotas cada una, las cuales se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm para determinar la posición del pico de elución en el cual se encuentra concentrada la FN. La cantidad de proteína se determinó usando el coeficiente de extinción molar = 1.28 D.O. el cual equivale a 1 mg de proteína por ml.

Las diferentes fracciones se corrieron en SDS-PAGE para determinar el grado de pureza de la FN. Las fracciones conteniendo a la FN se juntaron y el volumen total se dializó toda la noche a 4 °C en el amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M. Finalmente la FN se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

Interacción de los trofozoítos con la fibronectina y preparación de extractos totales.

Los trofozoítos de 48 h de cultivo se cosecharon como se mencionó anteriormente y se resuspendieron a 1×10^6 trofozoítos/ml en medio sin suero a 37 °C.

La suspensión de trofozoítos (5 ml) previamente homogeneizada, se colocó en cajas de Petri previamente recubiertas con FN a una concentración de 100 µg/ml. Los trofozoítos se incubaron a 37 °C durante 0, 30, 60 min y 4, 8 y 12 h. Enseguida, los trofozoítos no adheridos se desecharon mediante un lavado con PBS. Los trofozoítos adheridos se lisaron con el siguiente amortiguador: Tris-HCl 10 Mm (pH 7.5), EDTA 2 mM, NEM 3 mM, 0.5 µg/ml de Leupeptina, 0.5 µg/ml de Apoprotinina y Benzamida 1 mM. Finalmente, el lisado obtenido se centrifugó a 5, 000 rpm a 4 °C durante 5 min y se realizó la cuantificación con el método de Bio-Rad de acuerdo a las instrucciones de fabricante y se procedió a guardar alícuotas de 50 µl a -70 °C hasta su uso posterior.

Cultivo y obtención de extractos totales de macrófagos.

Se empleó la línea celular de macrófagos J774A.1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Se mantuvo en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente

descomplementado, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina y glucosa, en cajas de cultivo a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad y acondicionada con CO₂ al 5%.

Los macrófagos se incubaron con 10 µg/ml de LPS durante 4h, posteriormente se cosecharon en un amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, leupeptina, 0.5 µg/ml, Apoprotinina 0.5 µg/ml, Benzamida 1 mM). Por último los macrófagos se sonicaron con 4 ciclos al máximo poder y la lisis completa se verificó al microscopio.

Expresión del gen de COX-2 por RT-PCR

Se extrajo el RNA total amibiano con TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de fabricante. RNA total (10 µg) se sometió a retrotranscripción usando 0.5 µg de oligo (dT), 0.5 mM de dNTPs, 40 unidades de inhibidores de RNasa, 0.01 mM de DTT y 200 U de enzima-MuLV RT plus (todos de Invitrogen). La reacción se incubó a 37° C durante 1 h.

El cDNA se usó como molde para PCR usando primer's para COX-2: sentido 5´CTGTATCCCGCCCTGCTGGTG3´, antisentido 5ACTTGCGTTGATGGTGGCTGTCTT-3´. Los iniciadores de GADPH fueron utilizados como control de carga. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

SDS-PAGE y Western Blot .

Las proteínas del lisado se sometieron a SDS-PAGE 10%, posteriormente las proteínas se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa y se bloquearon con leche al 5% en TBS Tween 20 al 0.05% (TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min por lavado. Posteriormente, el papel de nitrocelulosa se incubó toda la noche a 4° C en agitación constante con los anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal anti-COX-2 humano (1:1000), anticuerpo policlonal anti-ERK1 de ratón (1:1000), anticuerpo monoclonal anti-pERK de ratón (1:100), anticuerpo policlonal anti-p38α de conejo (1:50), anticuerpo monoclonal anti-

p-p38 de ratón (1:1000), anticuerpo monoclonal anti-JNK1 de ratón (1:1000) y anticuerpo monoclonal anti-pJNK de ratón (1:1000), todos ellos adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, CA. Los anticuerpos se diluyeron en TBS-T leche al 5%; posteriormente, se lavó el papel de nitrocelulosa 3 veces con TBS-T 10 min por lavado. En seguida se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-IgG de conejo ó anti-IgG de ratón) acoplado a peroxidasa (1:1000) en TBS-T leche al 5% durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Finalmente, el papel de nitrocelulosa se lavó 10 veces con TBS-T durante 10 min por lavado y se reveló por quimioluminiscencia.

Ensayo de fosforilación de MAPKs.

Los trofozoítos estimulados con FN a los distintos intervalos de tiempo se trataron durante 1 h previamente con o sin 0.01 mM de $C_{18}H_{13}N_7$ (inhibidor de ERK) ó SB 203580 (inhibidor de p38) ó SP 600125 (inhibidor de JNK). La determinación de los niveles de pERK, pJNK y pp38 se realizó por análisis de Western Blot y microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de las enzimas correspondientes (Santa Cruz Biotechnology, CA) como se describió antes.

Microscopía confocal.

Los ensayos de adhesión antes mencionados se realizaron sobre cubreobjetos; una vez cubierto el tiempo de interacción, los trofozoítos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 h y posteriormente se lavaron con PBS. Los trofozoítos fijados se permeabilizaron con Tritón X 100 a 0.2% durante 15 min, posteriormente se lavaron y bloquearon con suero fetal bovino al 10% durante 1 h a 37° C. Luego, estos trofozoítos bloqueados se incubaron durante toda la noche a 4° C con un anticuerpo policlonal de conejo anti COX-2, con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ERK1, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-pERK, un anticuerpo policlonal de conejo anti-p38, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-p-p38, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-JNK1 y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-pJNK (todos utilizados en una dilución 1:50). Se realizaron lavados y posteriormente los trofozoítos se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes

acoplados a distintos fluorocromos. Se realizaron lavados y los trofozoítos se incubaron con faloidina rodaminada por 30 min a 37° C, y finalmente se realizaron lavados con PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Vectashield para el análisis por Microscopía Confocal (TSCNT Leica Kasertechnik GMB).

ELISA.

Se utilizó el kit PGE₂ EIA (Assay Desing, Inc. Cat.: 900-001) para detectar la producción de PGE₂ en el medio TYI-S-33 de acuerdo a las instrucciones de fabricante.

Ensayo de actividad COX.

Los ensayos de actividad COX se realizaron en placas de 96 pozos en un volumen final de 250 µl; formados por 50 µl de amortiguador Tris 100 mM y fenol 0.3 mM a pH 7.3, 50 µl de solución de hematina porcina 0.12 µM en amortiguador de fosfato de sodio 100 mM a pH 7.5, 50 µl de la solución de enzima COX de extractos totales de *E. histolytica* obtenidos como se mencionó anteriormente, 50 µl de sustrato quimioluminiscente (Assay Designs, Inc. Cat.: 907-003) a 4 °C y 50 µl de ácido araquidónico (AA) 100 µM. La reacción se leyó inmediatamente después de agregar el AA en un Fluoroskan Ascent FL Thermo Labsystems a tiempos de integración de 30 ms y la señal luminescente se midió en Unidades de Luz Relativa (ULR). En todos los ensayos de actividad COX se preparó un blanco de reacción, el cual consistió en una mezcla de reacción con todos los reactivos excepto el extracto total de *E. histolytica*.

Análisis estadístico.

Los datos fueron capturados en el programa spss versión 13 para Windows y transferidos al paquete estadístico STATA versión 9 .0 para su análisis. Se empleó la prueba estadística t-Student para la comparación de las medias. Se consideró un valor de p <0.05 como significativo.

RESULTADOS

1. El proceso de adhesión induce la activación de COX-2 y la producción de PGE₂ en trofozoítos de *E. histolytica*.

Estudios recientes han demostrado que *E. histolytica* expresa una enzima COX-2 durante el desarrollo del absceso hepático (22), sin embargo, se desconoce el mecanismo de regulación de dicha proteína en *E. histolytica*. Por otra parte, trabajos previos han demostrado que la FN induce en *E. histolytica* un complejo de señalización similar al de eucariontes superiores (27-28). En eucariontes superiores la FN regula la expresión de COX-2 (37). Por lo anterior se decidió evaluar en los trofozoítos de *E. histolytica* el papel de la FN en la expresión de la proteína COX-2 y en la producción de la PGE₂. Para ello se realizaron ensayos de adhesión de trofozoítos a FN a diferentes tiempos. Ensayos de Western blot mostraron un incremento de la proteína COX-2 dependiente del tiempo de adhesión, observándose un pico máximo de inducción a las 4 h post-adhesión, el cual comenzó a disminuir a partir de las 8 h post-adhesión (Fig. 1A).

Réplica de estos ensayos fueron observados por microscopía confocal. Se detectó que en los trofozoítos en suspensión no todas las células expresan la proteína tipo COX-2, sin embargo a las 4 h post-adhesión, la totalidad de los trofozoítos presentó una señal intensa de COX-2 la cual disminuyó a las 8 h post-adhesión (Fig. 1D). Para corroborar que la expresión era dependiente del proceso de adhesión a FN, los ensayos de adhesión también se realizaron sólo en sustrato inerte (vidrio), en el cual se detectó que a 4 h también incrementa la expresión de COX-2, y a 8 h post-adhesión la expresión disminuye de forma similar a los resultados encontrados en los ensayos de adhesión a FN (anexo I). Lo anterior comprueba que la expresión de la *EhCOX-2* es regulada durante el proceso de adhesión de manera independiente de sustrato. Además se observaron cambios en la localización subcelular de la *EhCOX-2*. A las 4 h post-adhesión la *EhCOX-2* tiene una localización citoplasmática mientras que a las 8 h post-adhesión ésta se

encuentra localizada hacia la membrana plasmática (Fig. 1D). Así mismo se realizaron ensayos de colocalización con actina, utilizando faloidina rodaminada, una droga que se une específicamente a la actina polimerizada. Se encontró que a las 4 h de adhesión a la FN, la faloidina detectó una estructuración cortical de la actina, la cual no se encuentra asociada a la *EhCOX-2* en comparación con tiempos prolongados de adhesión (8 h) donde se observa una colocalización parcial de la enzima *EhCOX-2* con la actina, principalmente en la zona central de la mayoría de las células; sin embargo, la mayor parte de la *EhCOX-2* presente en las células a las 8 h post-adhesión presentó una localización independiente de la actina localizada en la periferia celular. Este experimento también se llevó a cabo adhiriendo los trofozoítos a vidrio encontrando que la adhesión a un sustrato inerte también induce la expresión de *COX-2*, aun cuando la estructuración de actina es diferente (Anexo I)

El análisis de los trofozoítos en suspensión mostró que la poca *EhCOX-2* no colocaliza con estructuras de actina (Fig.1 D, Anexo I). Estos resultados sugieren que la expresión de la enzima *EhCOX-2* es dependiente del proceso de adhesión. Cabe mencionar que por lo general los trofozoítos en suspensión no presentan estructuración de actina en comparación con las células que se encuentran adheridas a algún sustrato.

Enseguida se procedió a determinar los niveles de la PGE_2 para confirmar que la adhesión a FN induce la expresión y la funcionalidad de la enzima *EhCOX-2*; los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de la FN. En la figura 2 se muestra un incremento de la producción de la PGE_2 a partir de 4 h post-adhesión. Este resultado sugiere que el incremento de la expresión de la *EhCOX-2* a las 4 h post-adhesión (Fig. 1A, 1D) es responsable de los niveles de PGE_2 producidos a este tiempo de adhesión. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre la producción de la PGE_2

en los trofozoítos adheridos a la FN o al plástico lo cual sugiere que la FN no es un factor determinante en la activación de la *Eh*COX-2.

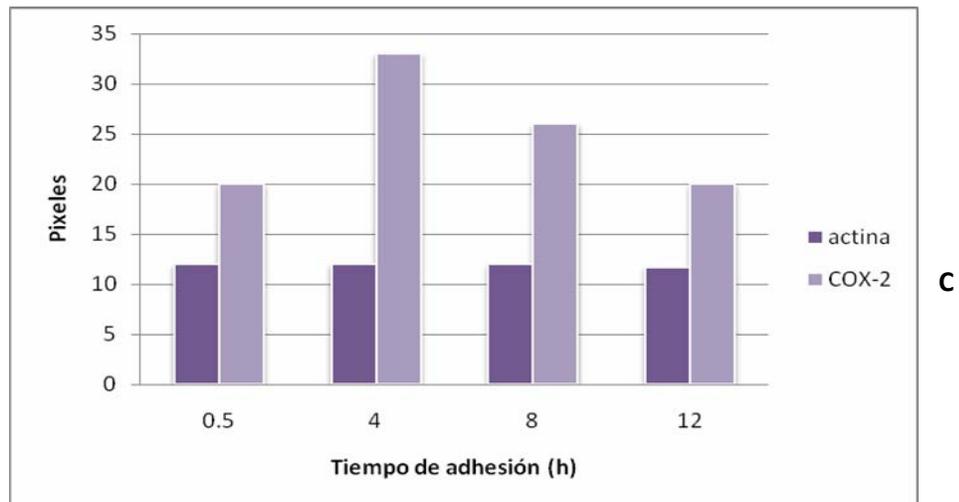
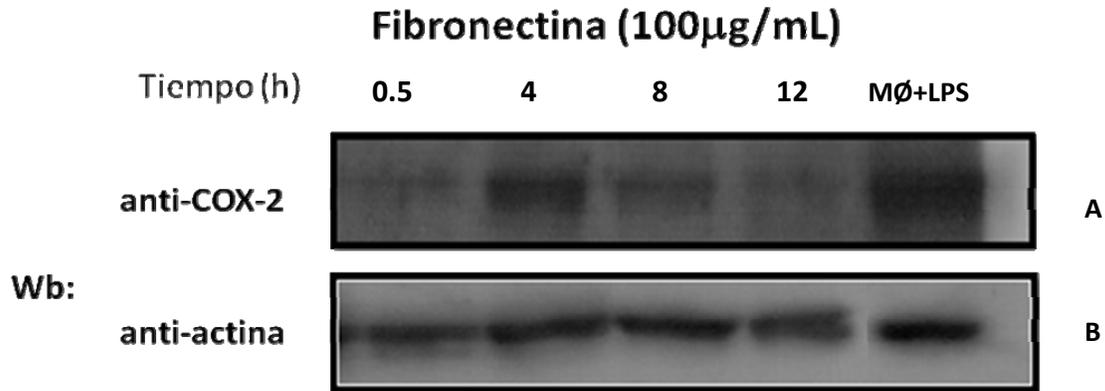


Figura 1. **El proceso de adhesión induce la expresión de COX-2 en *E. histolytica*.** Los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente durante 48 h fueron adheridos a la FN (100 µg/mL) y fueron lisados a los tiempos indicados. El extracto total se resolvió en SDS-PAGE al 10% y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en donde las bandas fueron detectadas con anticuerpos anti-COX-2 (A) y anti-actina (B). (C), análisis densitométrico. (D) Fotomicrografías de trofozoítos adheridos a la FN analizados mediante microscopía confocal utilizando anti-COX-2 (panel izquierdo) y faloidina rodaminada (panel central); Empalme de imágenes (panel derecho).

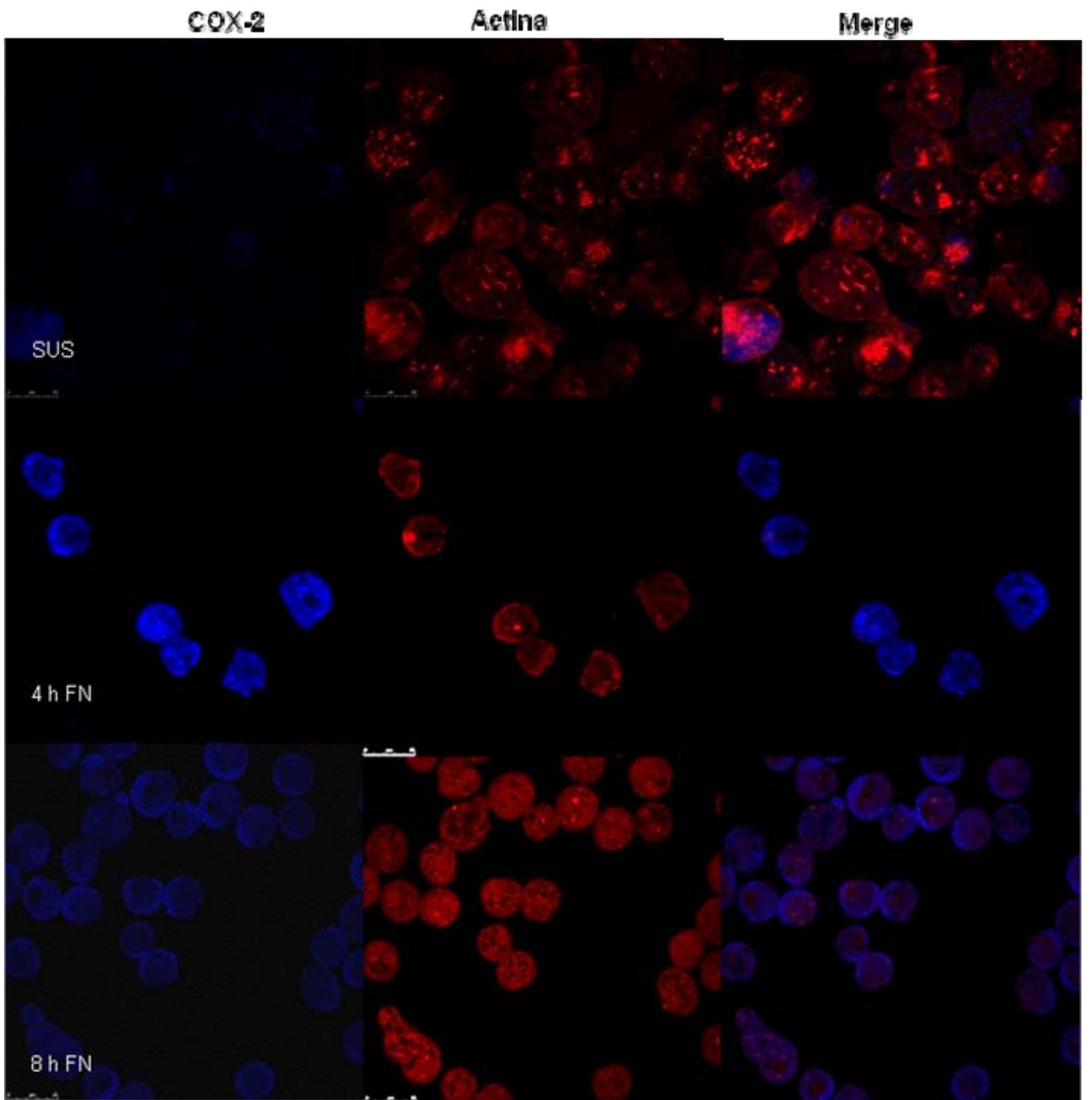


Figura 1 (continuación). (Aumento1X)

Producción de PGE₂ en *Entamoeba histolytica* durante el proceso de adhesión

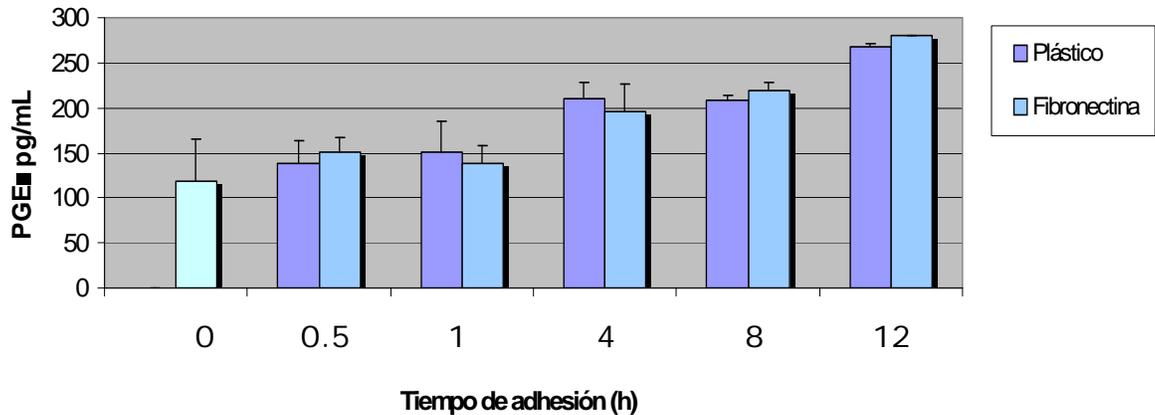


Figura 2. Producción de PGE₂ por trofozoítos de *E. histolytica* durante el proceso de adhesión. Los trofozoítos se hicieron crecer axénicamente y se cosecharon durante la fase exponencial. Posteriormente se colocaron en medio TYI-S-33 sin suero y se adhirieron a fibronectina o a plástico a diferentes tiempos y finalmente se recolectó el medio para determinar los niveles de PGE₂ por ELISA. Los resultados representan las medias de dos experimentos independientes realizados por triplicado; $p > 0.05$.

2. El proceso de adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica* activa a las MAPKs (ERK, JNK y p38).

En mamíferos la FN regula la expresión de la COX-2 (37) a través de la activación de las MAPKs: ERK, JNK y p38 (34). Por tal motivo se decidió estudiar la vía de las MAPKs en *E. histolytica*, en donde se ha identificado y caracterizado una proteína de la familia de las MAPKs cuya homología estructural indica que pertenece a la familia de las ERKs (41). Mediante ensayos de Western blot se determinó la activación de ERK durante la adhesión de los trofozoítos a FN. Los resultados muestran que a las 4 h post-adhesión a FN se presenta un máximo pico de activación de ERK (Fig. 3A) la cual comienza a disminuir a partir de las 8 h. Además, se exploró la activación de JNK usando un anticuerpo dirigido contra la forma fosforilada de JNK y sorprendentemente al igual que ERK se detectó una señal que incrementa a las 4 h post-adhesión y disminuye a las 8 h (Fig. 3B). Sin embargo, no se logró detectar la activación de la MAPK p38 por este método.

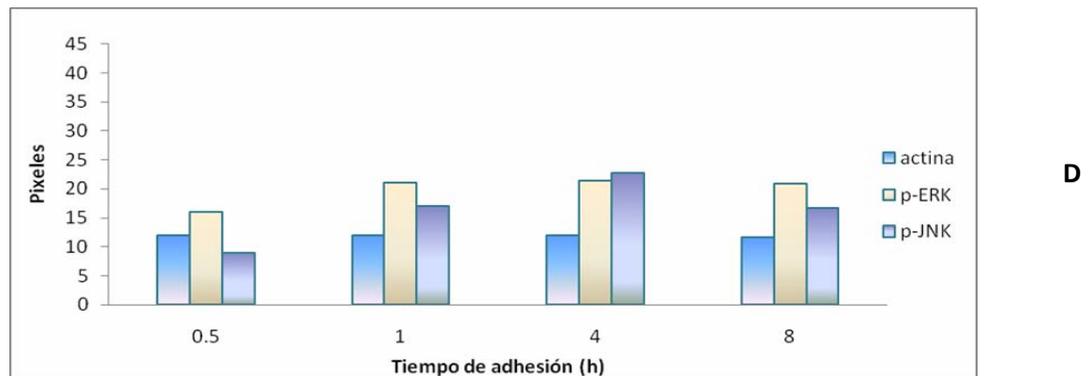
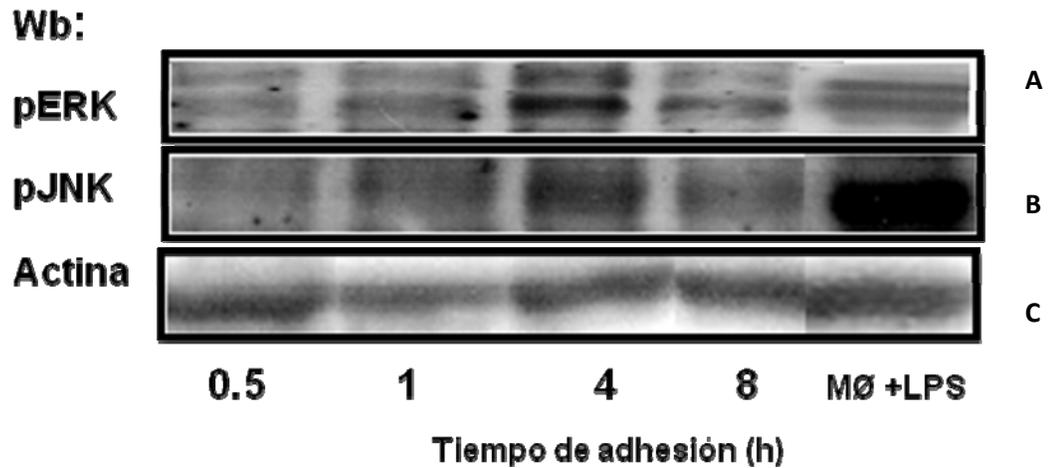


Figura 3. El proceso de adhesión induce la activación de MAPKs ERK y JNK. Cultivos de trofozoítos de *E. histolytica* crecidos durante 48 h fueron adheridos a FN (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fueron lisados a los tiempos indicados. El extracto total se resolvió en SDS-PAGE al 10% y posteriormente se transfirió a membranas de nitrocelulosa en donde las bandas fueron detectadas con anticuerpos anti-pERK (A), anti-pJNK (B) y (C) anti-actina. (D), Análisis densitométrico.

Los resultados de activación de ERK fueron corroborados por microscopía confocal en donde se observó una máxima señal de fosforilación de ERK a las 4 h post-adhesión la cual comenzó a disminuir a la 8h post-adhesión (Fig. 4A), además fue posible observar un cambio en la localización subcelular de ERK durante el proceso de adhesión. En trofozoítos en suspensión ERK fosforilado se encuentra bien localizada en forma de puntos en el citoplasma, mientras que a las 4 y 8 h post-adhesión ERK fosforilado se encuentra principalmente

en membrana citoplásmica (Fig. 4A) sobre todo a las 5 h post-adhesión (Fig. 4B). Dado que la estructuración del citoesqueleto de actina es un fenómeno que también puede ser regulado por la vía de las MAPKs (42-43), se analizó la co-localización de las MAPKs con la actina polimerizada. En el panel derecho de la figura 4 se puede observar la co-localización de estructuras de actina con ERK no fosforilada tanto a 4 y 8 h post-adhesión, no obstante pERK colocaliza discretamente con la actina a partir de las 4 h post-adhesión. En comparación, el análisis de adhesión por 5 h mostró un incremento en la co-localización de ERK total y pERK con actina cortical (Fig. 4B).

Con la finalidad de explorar la activación de JNK se realizaron análisis por microscopía confocal, en los cuales se detectó un incremento en la forma fosforilada de esta cinasa a las 4 h post-adhesión a FN comparado con células en suspensión o con las adheridas 8 h a FN (Fig. 5). Este hallazgo es comparable a los niveles detectados por ensayos de Western blot (Fig. 3B). Así mismo los ensayos de co-localización de actina y de pJNK mostraron una asociación entre ambas proteínas a las 8 h post-adhesión, donde se muestra que pJNK colocaliza principalmente con puntos de actina (Fig. 5).

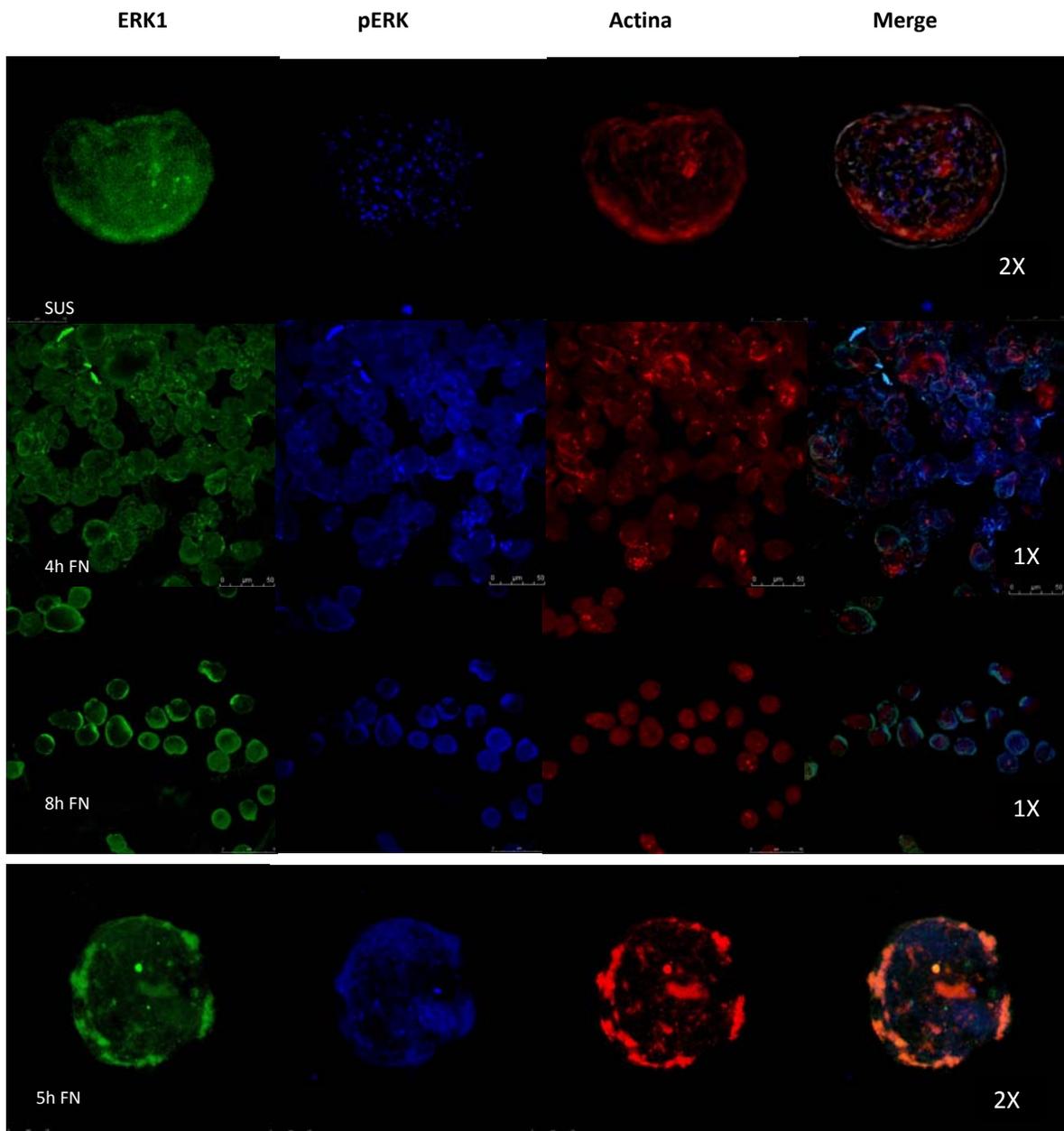


Figura 4. El proceso de adhesión induce la activación y translocación de ERK. Trofozoítos de 48 h de cultivo axénico fueron adheridos a FN durante los tiempos indicados, en ausencia de suero. A y B, las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-ERK1 (verde), anti-pERK (azul) y faloidina rodaminada (rojo).

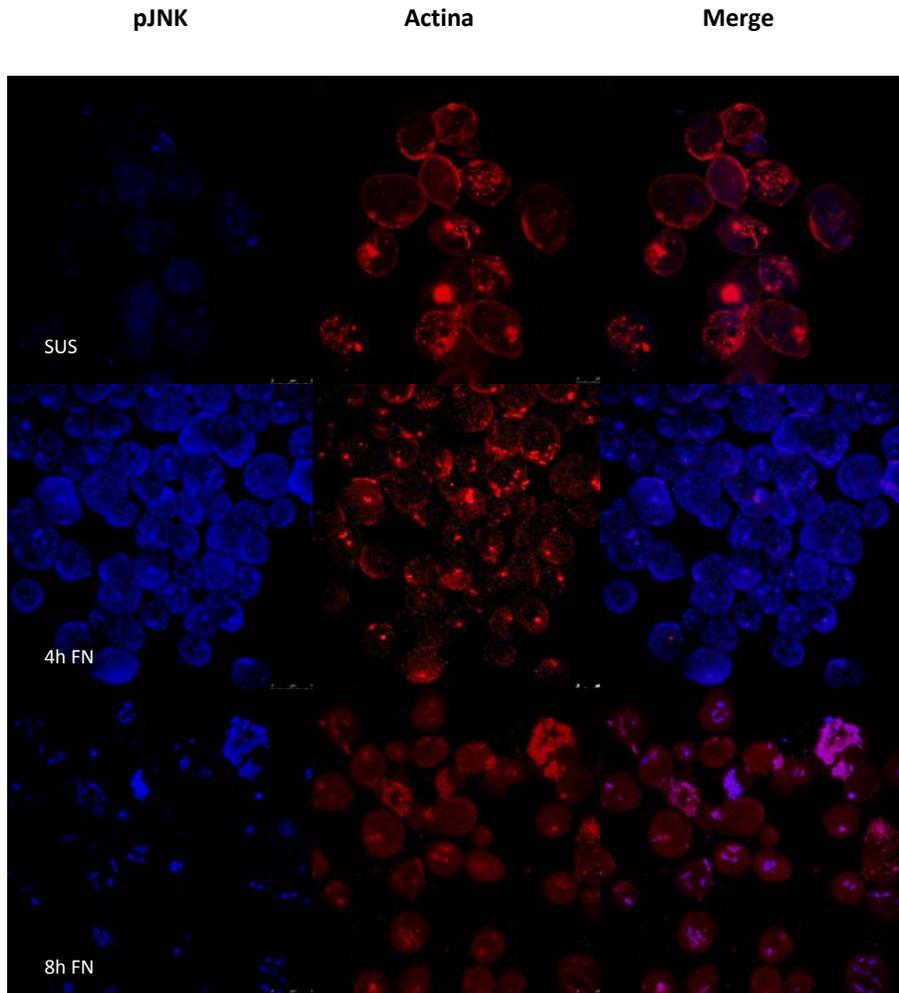


Figura 5. El proceso de adhesión induce la activación y la translocación de JNK. Trofozoítos de 48 h de crecimiento axénico fueron adheridos a FN durante los tiempos indicados en ausencia de suero. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-pJNK (azul) y faloidina rodaminada (rojo). (Aumento 1X).

La cinasa p38 no pudo ser detectada por western blot, sin embargo, mediante microscopía confocal se observó la presencia de esta proteína y su localización subcelular en su forma total y fosforilada. Similar a lo que ocurre con ERK y JNK, se detectó un incremento en la señal de p38 a las 4 h post-adhesión, además se observó la translocación de la enzima activa hacia el núcleo a partir de las 4 h post adhesión (Fig. 6). A las 8 h post-adhesión p38 se relocaliza hacia el citoplasma. En el ensayo de colocalización se muestra que a las 8 h post-adhesión p38 α colocaliza preferentemente con puntos de actina sugiriendo una participación importante para esta cinasa durante el proceso de estructuración de actina y probablemente en el proceso de adhesión (Fig. 6).

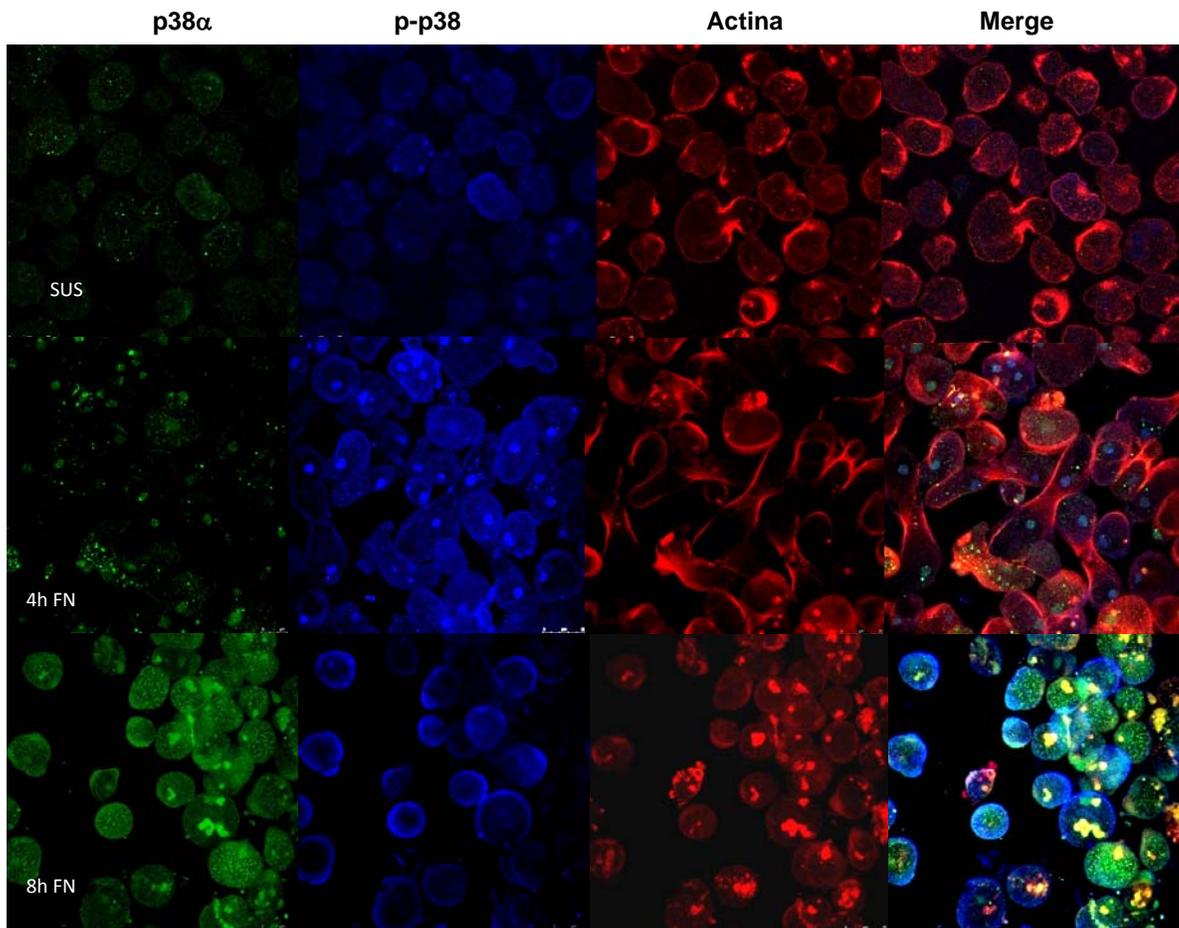


Figura 6. El proceso de adhesión induce la activación y la translocación de p38. Trofozoítos de 48 h de cultivo axénico fueron adheridos a FN durante los tiempos indicados en ausencia de suero. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-p38 α (verde), anti-p-p38 (azul) y faloidina rodamina (rojo). (Aumento 1X).

En resumen, se detectó un incremento en la activación de las MAPKs durante el proceso de adhesión de manera independiente de sustrato (anexo II, III y IV) de *E. histolytica*, así mismo se observó una relocalización subcelular de esta familia de cinasas (ERK, JNK y p38) lo cual podría estar regulando la función de estas enzimas como ocurre en otros eucariontes.

3. LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS MAPKs NO AFECTA LA ACTIVIDAD COX NI LA PRODUCCIÓN DE PGE₂ EN *E. histolytica* DURANTE EL PROCESO DE ADHESIÓN.

Con base en los resultados obtenidos anteriormente, es posible sugerir la participación de las MAPKs en la regulación de *EhCOX-2*. Para corroborar o descartar la participación de estas cinasas en el proceso de inducción de la *EhCOX-2*, se realizaron ensayos de adhesión a plástico o FN usando inhibidores farmacológicos de ERK (C₁₉H₁₃N₇), JNK (SP 600125) y de p38 (SB 203580). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de ERK, en la figura 7B se muestra el efecto inhibitorio de C₁₉H₁₃N₇ sobre la actividad de esta cinasa tanto en trofozoítos adheridos a FN o a plástico. Mediante microscopía confocal se logró detectar la inhibición de la fosforilación de ERK usando el inhibidor C₁₉H₁₃N₇, en donde también se muestra que la expresión de *EhCOX-2* no se afecta al inhibir la fosforilación de ERK (Fig. 7C).

De manera similar, mediante microscopía confocal se logró determinar que JNK y p38 son inhibidas de forma eficiente mediante el uso de los inhibidores específicos SP 600125 y SB 203580, respectivamente (Figs. 8A y 8B). Sin embargo, la expresión de *EhCOX-2* no parece ser afectada al inhibir la activación de estas MAP cinasas.

La confirmación de que la activación de COX-2 procede en forma independiente a la activación de las MAPKs, se realizó utilizando un kit comercial (Chemiluminiscent COX activity kit, Assay desing) para la determinación de actividad de COX. En la figura 9 se muestra el gráfico de la actividad de esta enzima en extractos de trofozoítos adheridos a plástico o FN bajo la influencia de los inhibidores de las MAPKs. Los resultados indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad COX de trofozoítos adheridos a FN o plástico con o sin inhibidores.

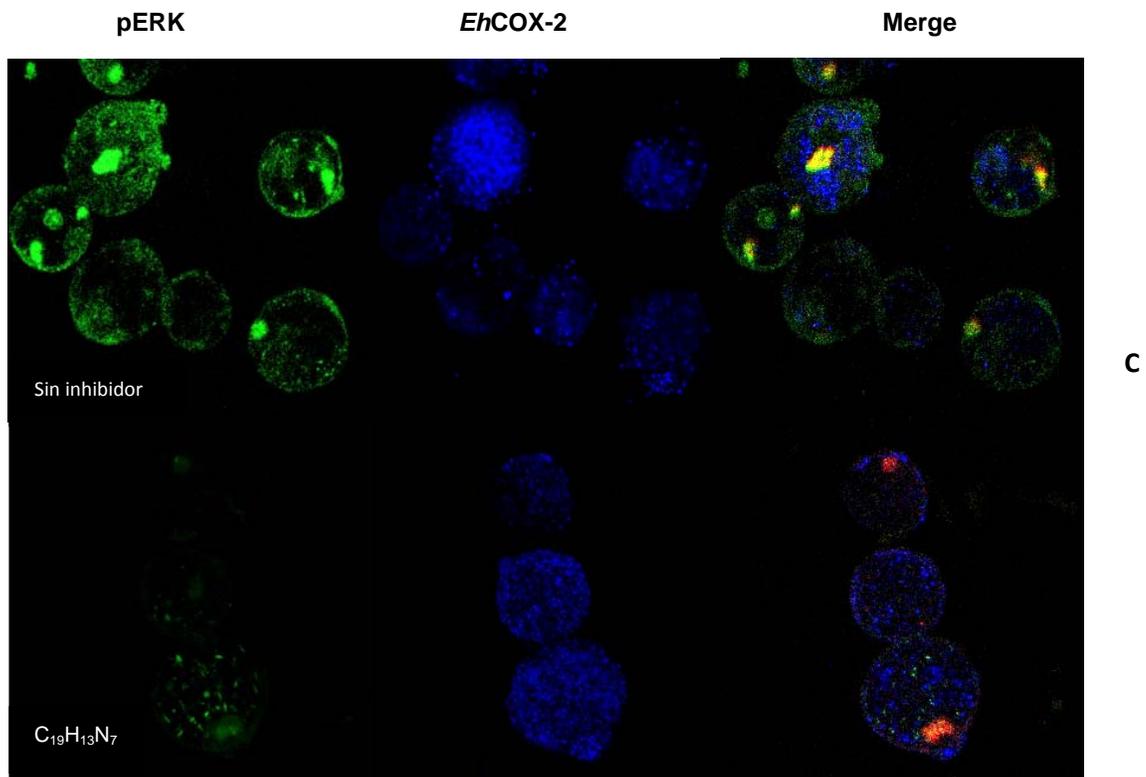
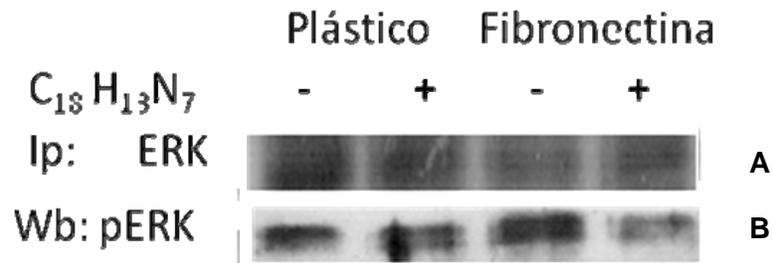


Figura 7. Efecto de $C_{18}H_{13}N_7$ en la activación de ERK y en la expresión de *EhCOX-2*. A) Los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente durante 48 h, se pretrataron con $C_{19}H_{13}N_7$ (0.01 mM) y posteriormente se adhirieron a FN (100 μ g/mL) o a plástico y se lisaron 4 h post-adhesión. El extracto total fue sometido a inmunoprecipitación con anti-ERK (A), posteriormente se resolvió en SDS-PAGE al 10% y se transfirió a membranas de nitrocelulosa en donde las bandas fueron detectadas con un anticuerpo anti-pERK (B). C, fotomicrografía de trofozoítos adheridos a FN durante 4 h con o sin $C_{19}H_{13}N_7$ que posteriormente fueron fijados, permeabilizados y analizados por microscopía confocal con anticuerpo anti-pERK (verde), anti-COX-2 (azul) y faloidina rodaminada (rojo).

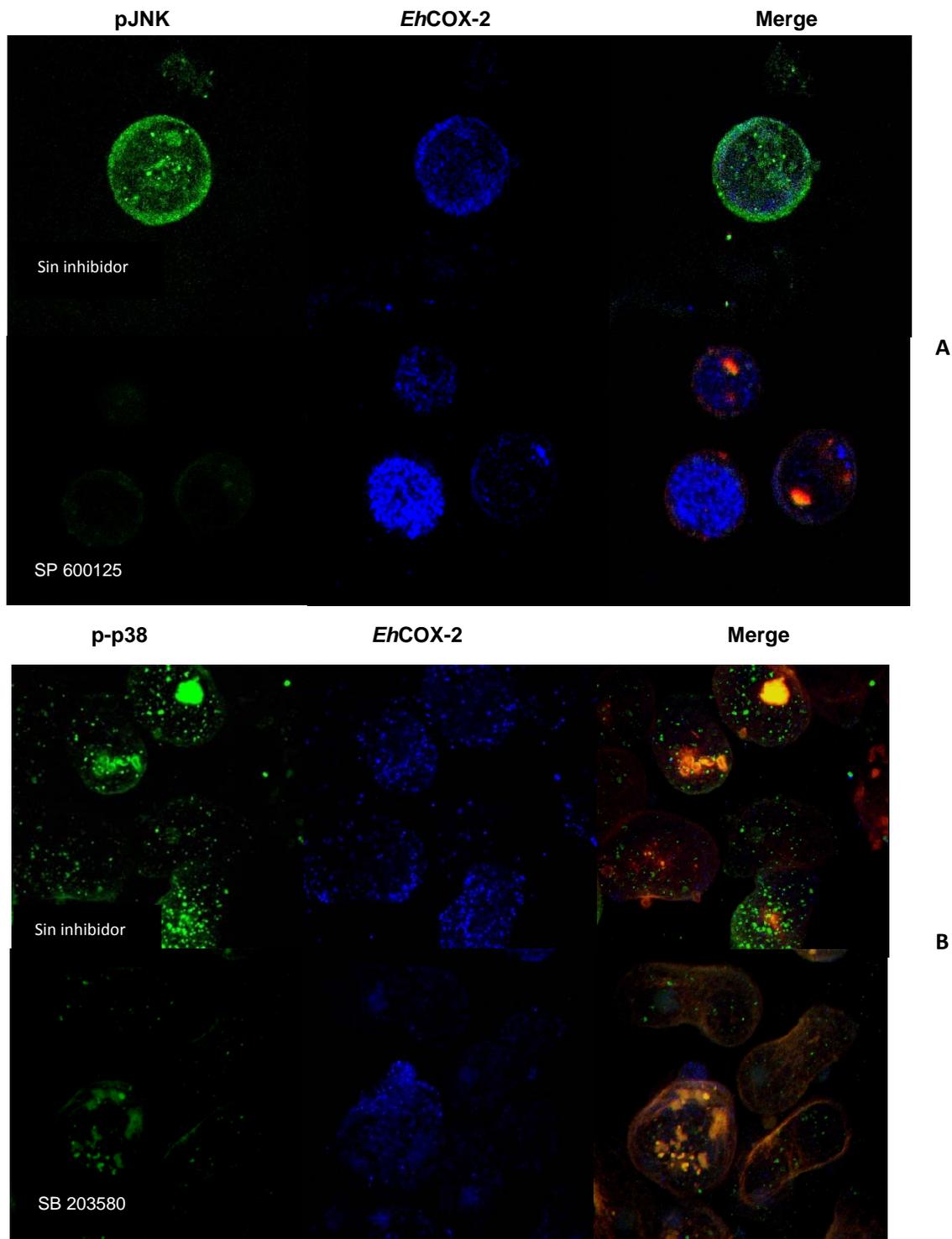


Figura 8. Efecto de SP 600125 y SB 203580 en la activación de JNK y p38, y el impacto en la expresión de *EhCOX-2*. A) Los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente durante 48 h, se pretrataron con los inhibidores SP 600125 y SB 203580 (0.01 mM) y posteriormente se adhirieron a FN (100 μ g/mL) por 4 h. (A) fotomicrografía de trofozoítos adheridos a FN durante 4 h con o sin SP 600125 que posteriormente fueron fijados, permeabilizados y analizados por microscopía confocal con anticuerpo anti-pJNK (verde), anti-COX-2 (azul) y faloidina rodaminada (rojo). (B) Fotomicrografía de trofozoítos adheridos a FN durante 4 h con o sin SB 203580 que posteriormente fueron fijados, permeabilizados y analizados por microscopía confocal con anticuerpo anti-pp38(verde), anti-COX-2 (azul) y faloidina

rodaminada (rojo). fueron fijados, permeabilizados y analizados por microscopia confocal con anticuerpo anti-pJNK (verde), anti-COX-2 (azul) y faloidina rodaminada (rojo). (B) Fotomicrografía de trofozoítos adheridos a FN durante 4 h con o sin SB 203580 que posteriormente fueron fijados, permeabilizados y analizados por microscopia confocal con anticuerpo anti-pp38(verde), anti-COX-2 (azul) y faloidina rodaminada (rojo).

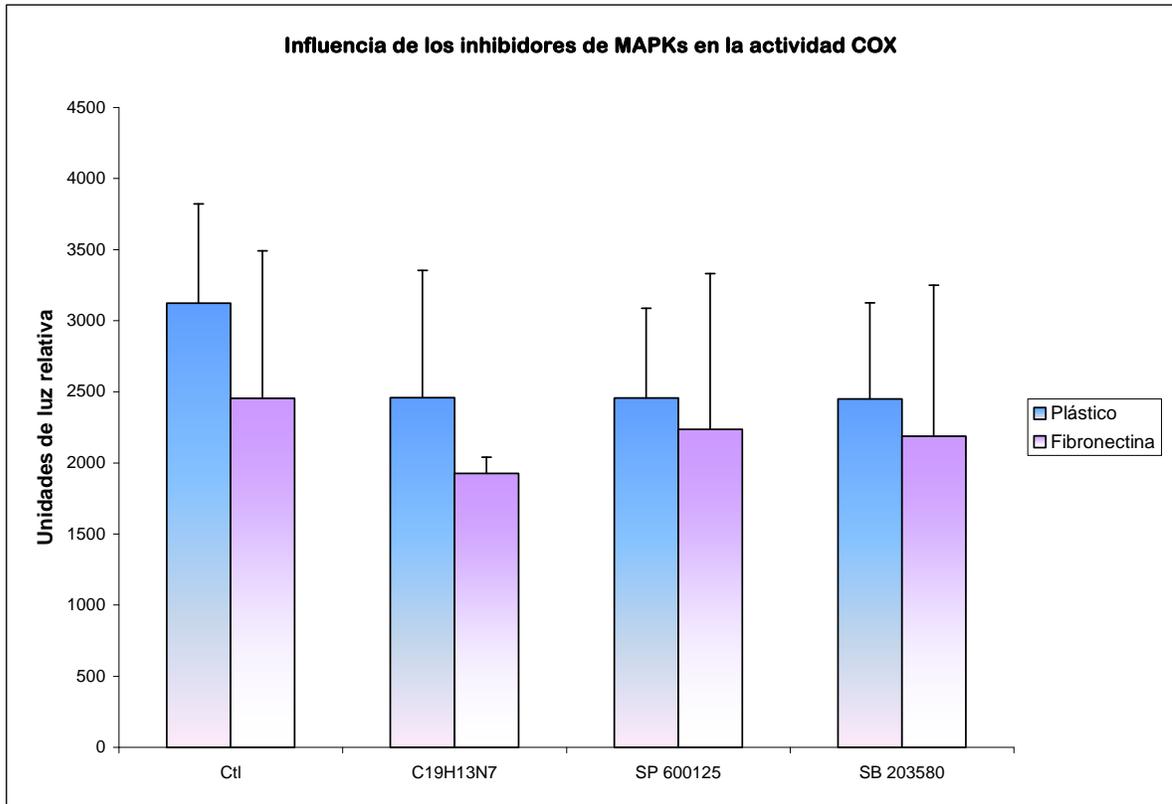


Figura 9. Influencia de los inhibidores de MAPKs en la actividad COX en trofozoítos de *E. histolytica* durante el proceso de adhesión. Los trofozoítos de *E. histolytica* pretratados o no con los inhibidores de las MAPKs; ERK, JNK y p38 (C₁₉H₁₃N₇, SP600125 y SB 203580) fueron adheridos a plástico o FN durante 4 h; posteriormente los trofozoítos adheridos fueron lisados y el extracto total fue utilizado para determinar actividad COX utilizando el kit Chemiluminiscent COX activity de acuerdo a las instrucciones de fabricante.

En resumen se determinó que las MAPKs no participan en la regulación de *Eh*COX-2 ni en la producción de PGE₂ (anexo V) o probablemente no sean las únicas enzimas involucradas en la regulación de COX-2 en trofozoítos de *E. histolytica* durante el proceso de adhesión.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la FN sobre la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ a través de la activación de la vía de las MAPKs en trofozoítos de *E. histolytica*.

El proceso de invasión de *E. histolytica* hacia la mucosa u otros tejidos es facilitada por varios factores, uno de ellos es la capacidad que el parásito posee de adherirse a proteínas de la matriz extracelular. Se ha demostrado que *E. histolytica* posee receptores tipo integrinas mediante los cuales puede adherirse a proteínas como colágeno o FN (25-26). Además se ha descrito que la interacción trofozoíto-FN induce en el parásito vías de señalización similares a las que la FN activa en células de eucariontes superiores (28) en donde es capaz de regular la sobre expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ (37).

Además del proceso de adhesión, la modulación de la respuesta inmune mediada por el parásito juega un papel crítico en determinar el resultado de la infección (3-7). Estudios recientes han descrito que una de las moléculas claves capaces de modular la respuesta inmune durante la amibiasis es la PGE₂ (12-13). Este mediador lipídico es producido en condiciones fisiológicas en las células del hospedero por la acción de las enzimas COX. Sin embargo, durante la amibiasis se incrementa la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ en las células del hospedero debido a la presencia de antígenos amibianos (9,18). Además se ha caracterizado que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de producir PGE₂ (8,13). Una de las proteínas involucradas en la producción de PGE₂ posee una estructura muy diferente a la estructura típica de otras COX descritas (8). Sin embargo, durante el desarrollo del absceso hepático en hámster también se ha demostrado que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de producir una proteína que es reconocida por anticuerpos policlonales anti-COX-2 y un RNAm codificante para la misma (22). Lo anterior sugiere que al igual que como en eucariontes superiores, en *E. histolytica* se produce una enzima COX-2 y que ésta puede ser regulada durante el desarrollo de la infección por *E. histolytica*.

En este trabajo se determinó una proteína que es reconocida por un anticuerpo policlonal anti-COX-2 de manera similar a lo reportado por Gutiérrez y col., (2006). Además se detectó que esta proteína al igual que la COX-2 de organismos eucariontes superiores puede ser regulada. Sin embargo, se estableció que la modulación de *Eh*COX-2 no es regulada de forma específica por FN como se ha reportado en células de eucariontes superiores (37) sino que la enzima responde al proceso de adhesión, independiente del sustrato (anexo I). Además se determinó que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en la producción de PGE₂ en trofozoítos adheridos a FN o a plástico. Lo anterior podría sugerir que al igual que como ocurre en otros tipos celulares los propios metabolitos de prostaglandinas podrían estar regulando por retroalimentación positiva la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ (39-40).

En *E. histolytica* se ha reportado la fosforilación de homólogos de ERK e incremento en la actividad transcripcional 1 h post-adhesión a colágeno tipo I (44-45). En concordancia con lo anterior, en este trabajo se detectó que la fosforilación de ERK ocurre a 4 h post-adhesión tanto a plástico como a FN (Fig. 7A). Además en los ensayos de colocalización de ERK con actina polimerizada mostramos que a 5 h post-adhesión (Fig. 4B) ocurre un máximo nivel de colocalización lo cual podría estar indicando que ERK puede regular la adhesión a través del citoesqueleto de actina como se ha reportado en otros tipos de células (42-43).

A la fecha no se han descrito otras MAPKs además de ERK en *E. histolytica*. Sin embargo, en este trabajo se logró detectar una señal positiva tanto por Western blot, así como por microscopia confocal de la forma fosforilada de JNK. Mostrando una cinética de activación similar a la de ERK. Los ensayos de colocalización de pJNK con actina polimerizada sugieren que JNK podría estar regulando la adhesión a través del citoesqueleto de actina como ocurre en células de embriones de *Drosophila melanogaster* en donde JNK regula la dinámica del citoesqueleto de actina, la formación de lamelopodios y la generación de protrusiones de actina (46-48).

De igual manera la cinasa p38 es un miembro más de la familia de las MAPKs que no ha sido reportado en *E. histolytica*. Sin embargo, en este trabajo se detectó

mediante microscopía confocal una señal positiva para la isoforma p38 α y las isoformas fosforiladas de p38. La cinética de activación de esta cinasa mostró similitudes con JNK. No obstante, se detectó que esta cinasa se transloca del citoplasma hacia el núcleo en células adheridas a FN. Estos datos son consistentes con lo reportado en las líneas celulares HeLa y COS-1 (49-50). La translocación de p38 del citoplasma hacia el núcleo sugiere que esta cinasa podría estar regulando la expresión de genes tal como ocurre en eucariontes superiores donde p38 es responsable de regular la expresión de citocinas, de factores de transcripción, de receptores de membrana y de proteínas que regulan la vida media de RNAm, entre ellos el RNAm de la COX-2 (51-53). Además en los ensayos de colocación se detectó co-localización con actina polimerizada lo cual sugiere que p38 podría estar participando en la regulación del remodelamiento del citoesqueleto de forma similar como ha sido reportado en células de eucariontes superiores (54)

El uso de inhibidores farmacológicos de las MAPKs se ha empleado de forma exitosa en diversos estudios de señalización que han demostrado la participación de las MAPKs en la regulación de la COX-2 (34). En este trabajo se utilizaron los inhibidores de ERK, JNK y p38 y se demostró que los inhibidores no afectan la actividad de la COX en trofozoítos de *E. histolytica* durante el proceso de adhesión ni la producción de la PGE₂. Lo anterior sugiere que las MAPKs no regulan en su totalidad la expresión de *EhCOX-2* o que existen vías de señalización alternas que podría compensar la regulación de la *EhCOX-2* cuando las MAPKs son inhibidas como se ha descrito para eucariontes superiores donde se ha determinado que existen otras vías como c-Src, PI3K y PKC que participan en el complejo mecanismo de regulación de la COX-2 (34).

En resumen, en este trabajo se determinó que la expresión de la *EhCOX-2*, la producción de PGE₂ y la activación de la vía de señalización de las MAPKs, son fenómenos regulados durante el proceso de adhesión de *E. histolytica* en forma independiente al sustrato utilizado. Esta investigación propone que la producción de la PGE₂ producida por la *EhCOX-2* podría estar participando de manera importante en el proceso de adhesión, en conjunto con la activación de ERK, JNK y p38.

Además que la vía de las MAPKs no está regulando a la *EhCOX-2* o que existen vías de señalización que compensan la regulación de la *EhCOX-2* cuando las MAPKs no son funcionales.

El poder comprender las vías de señalización en la regulación de la *EhCOX-2* puede contribuir al diseño de fármacos que podrían evitar la invasión por *E. histolytica* y/o evitar el estado de inmunosupresión provocado durante la infección amibiana además de contrarrestar los síntomas patofisiológicos producidos por el incremento de la PGE₂ durante la amibiasis.

CONCLUSIONES

El proceso de adhesión de *E. histolytica* es un evento crítico que determina la patología de la amibiasis. En el presente trabajo se logró determinar que durante el proceso de adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica*, independientemente del sustrato, ocurre una modulación a varios niveles como son:

- a. La expresión de la *EhCOX-2* y la producción de PGE₂,
- b. La activación de la vía de las MAPKs.

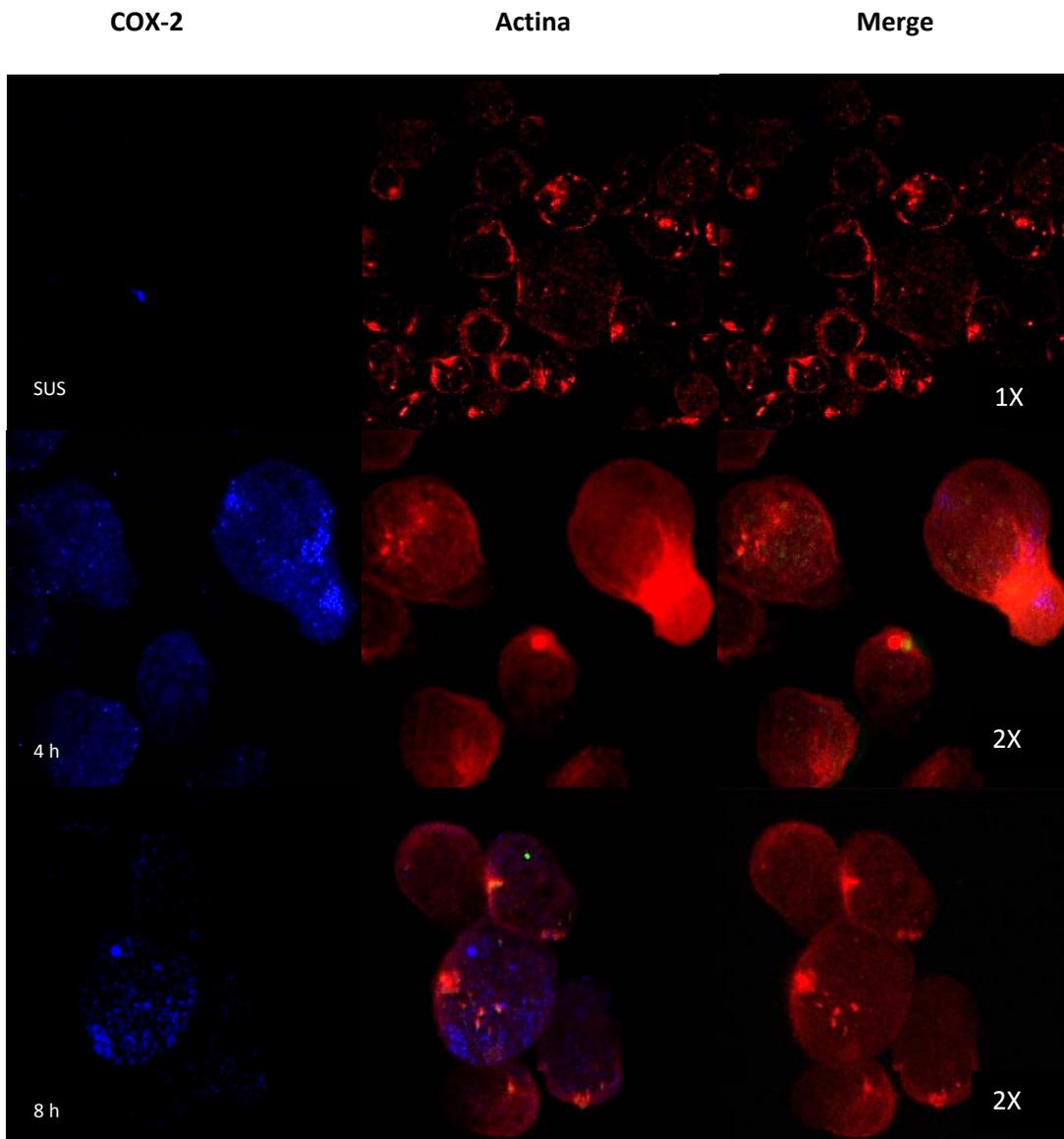
Lo anterior podría sugerir que la PGE₂ y las MAPKs pueden estar participando en la regulación del proceso adhesivo del parásito tal como ocurre en otros organismos.

PERSPECTIVAS

Investigar el papel preciso de la PGE₂ y de la vía de las MAPKs durante el proceso de adhesión de *E. histolytica*, así como identificar la ruta de señalización que modula la *EhCOX-2* podría ofrecer blancos terapéuticos contra la amibiasis.

ANEXO I.

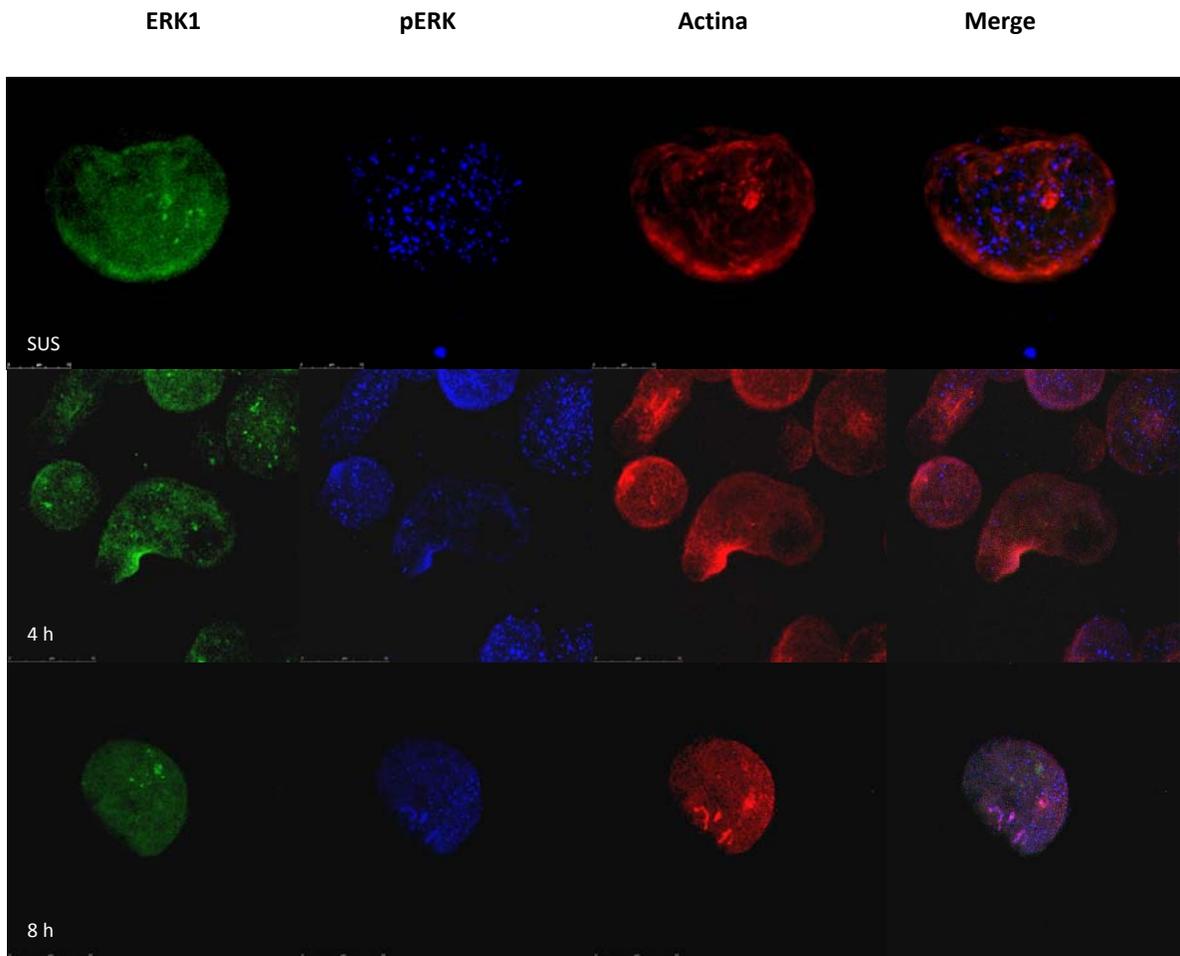
Expresión de COX-2 en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* adheridos a vidrio.



El proceso de adhesión induce la expresión de COX-2. Trofozoítos de 48 h de cultivo axénico fueron adheridos a vidrio durante los tiempos indicados, en ausencia de suero. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-COX-2 (azul) y faloidina rodamina (rojo).

Anexo II

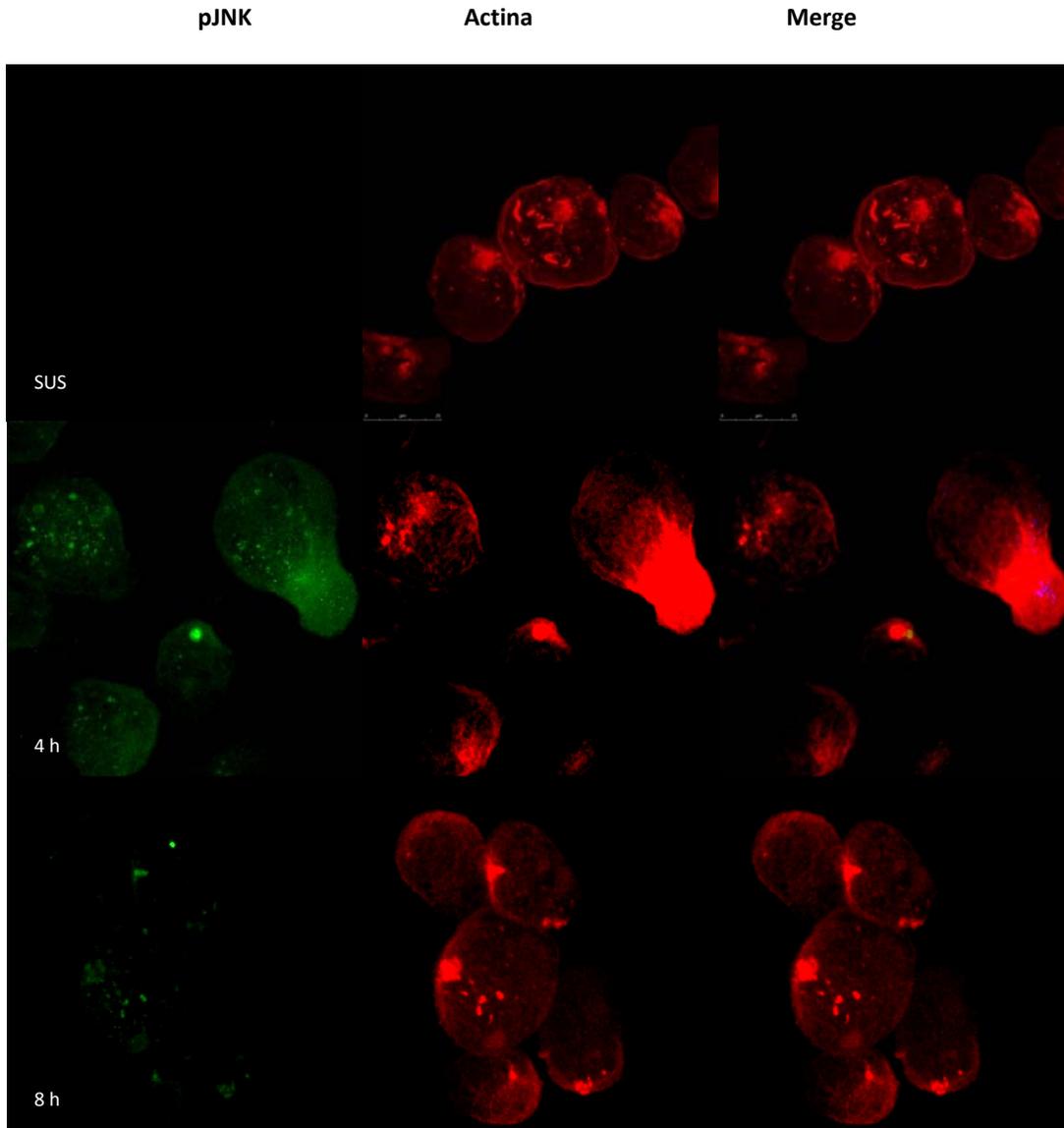
Activación de ERK en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* adheridos a vidrio



El proceso de adhesión induce la activación y translocación de ERK. Trofozoítos de 48 h de cultivo axénico fueron adheridos a vidrio durante los tiempos indicados, en ausencia de suero. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-ERK1 (verde), anti-pERK (azul) y faloidina rodaminada (rojo). (Aumento 2X)

Anexo III

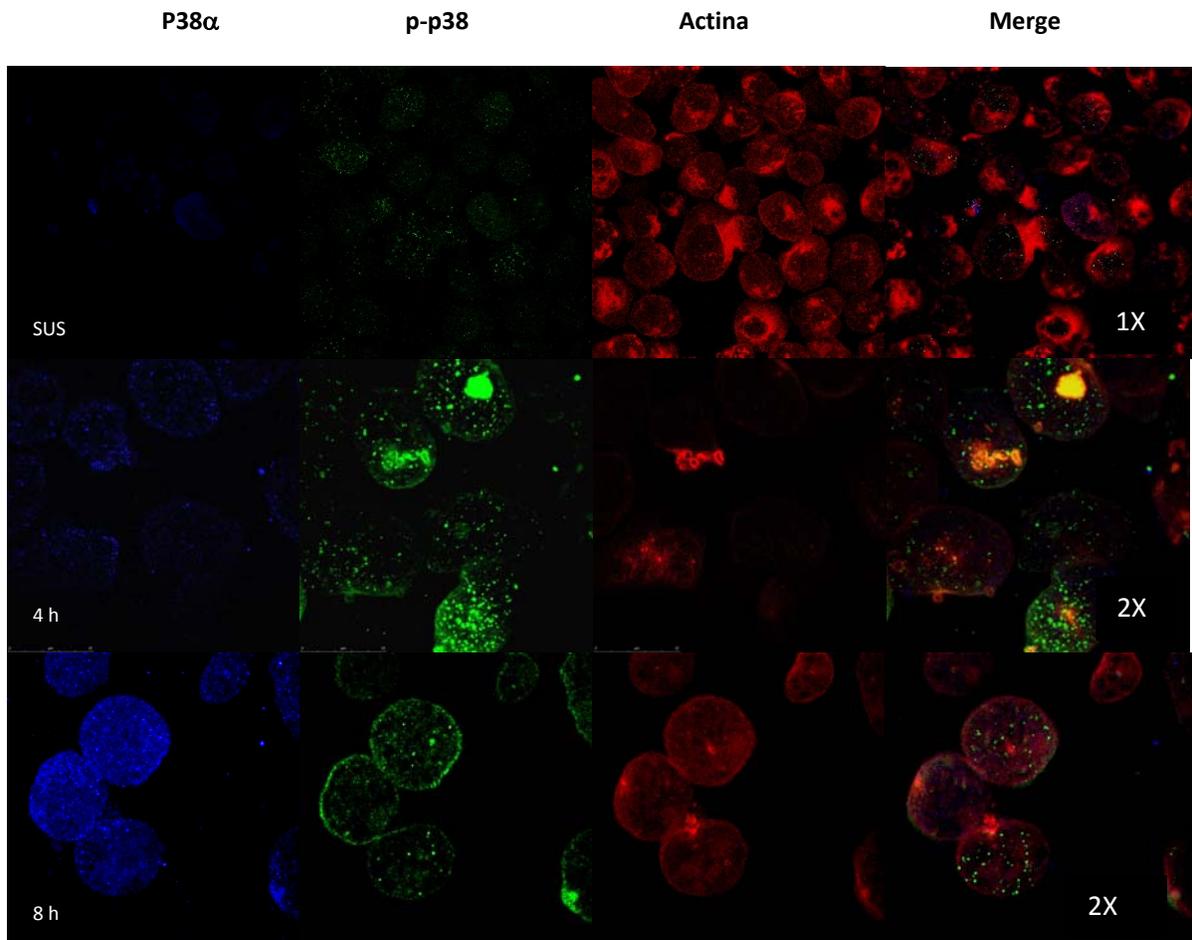
Activación de JNK en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* adheridos a vidrio



El proceso de adhesión induce la activación y la translocación de JNK. Trofozoítos de 48 h de crecimiento axénico fueron adheridos a vidrio durante los tiempos indicados en ausencia de suero. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-pJNK (verde) y faloidina rodaminada (rojo). (Aumento 2X)

Anexo IV

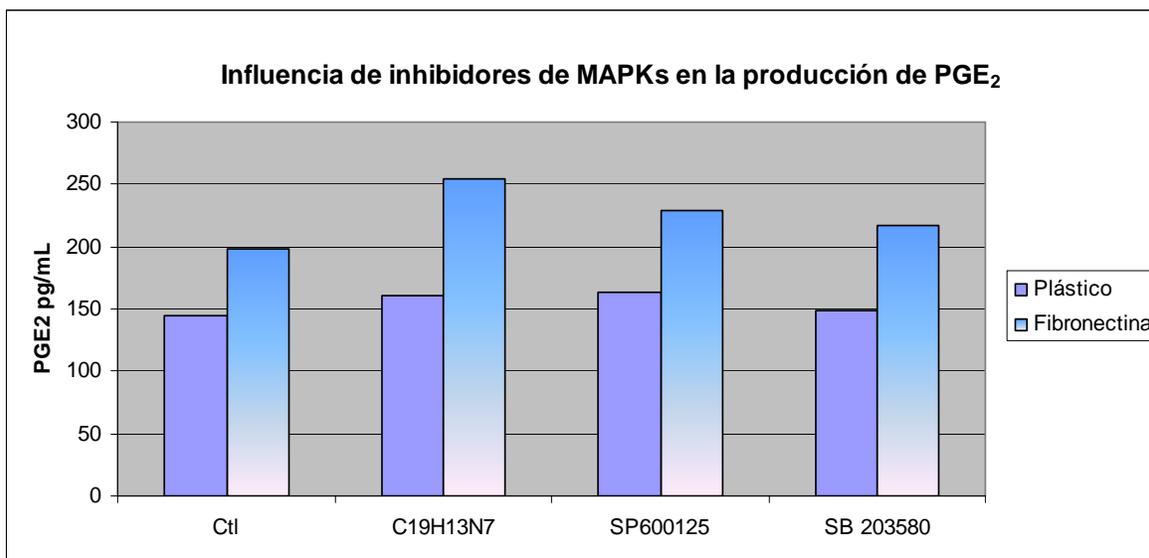
Activación de p38 en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* adheridos a vidrio



El proceso de adhesión induce la activación y la translocación de p38. Trofozoítos de 48 h de cultivo axénico fueron adheridos a vidrio durante los tiempos indicados en ausencia de suero. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con anti-p38 α (azul), anti-p-p38 (verde) y faloidina rodaminada (rojo).

Anexo V

Efecto de los inhibidores farmacológicos de MAPKs en la producción de PGE₂ en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* durante el proceso de adhesión



Influencia de los inhibidores C₁₉H₁₃N₇ (inhibidor de ERK), SP600125 (inhibidor de JNK) y SB203580 (inhibidor de p38) en la producción de PGE₂ en *E. histolytica* durante la adhesión a fibronectina o plástico. Trofozoítos de *E. histolytica* se hicieron crecer axénicamente en medio TYI-S-33 y se cosecharon en la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente los trofozoítos fueron lavados y colocados en medio sin suero en presencia o ausencia de cada uno de los inhibidores específicos y se realizaron ensayos de adhesión a plástico o fibronectina durante 4 h. El medio utilizado en los ensayos de adhesión fue colectado para medir la producción de PGE₂ mediante ensayo de ELISA.

REFERENCIAS

1. Ali, I.K., C.G. Clark, and W.A. Petri, Jr., Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect. Genet. Evol.*, 2008; 8(5): p. 698-707.
2. WHO. Report of a consultation of expert in amoebiasis. *Wkly. Epidemiol. Rep.* 72:97-100.
3. Garcia-Zepeda EA, Rojas-Lopez A, Esquivel-Velazquez M, Ostoa-Saloma P. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasit. Immun.*, 2007; (12):679-84.
4. Sharma M, Vohra H, Bhasin D. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitol.* 2005; 131(6):783-96.
5. Lejeune M., Rybicka J. M., Chadee K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Fut Med.*, 2009; 4(1):105-16.
6. Kubata BK, Duszenko M, Martin KS, Urade Y. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trend. Parasit.*, 2007; 23(7):325-31.
7. Belley A, Chadee K. Eicosanoid production by parasites: From pathogenesis to immunomodulation? *Parasitol. Today.*, 1995; 11(9):327-34.
8. Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2003; 11; 100(23):13561-6.
9. Stenson WF, Zhang Z, Riehl T, Stanley SL, Jr. Amebic infection in the human colon induces cyclooxygenase-2. *Infect. Immun.*, 2001; 69(5):3382-8.
10. Sánchez-Ramírez BE, Ramírez-Gil M, Ramos-Martínez E, Talamás Rohana P. *Entamoeba histolytica* induces cyclooxygenase-2 expression in macrophages during amebic liver abscess formation. *Arch. Med. Res.*, 2000; 31(4):S122-3.
11. Sánchez-Ramírez B, Ramirez-Gil M, Vázquez-Moctezuma I, Ramos-Martínez E, Talamás-Rohana P. *Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp. Parasitol.*, 2004; 106(3-4):119-25.
12. Sánchez-Ramírez B, Escalante B, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P. Role of prostaglandin E2 on amoebic liver abscess formation in hamsters. *Prostagl.*, 1997; 53(6):411-21.
13. Dey I, Chadee K. Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells. *Infect. Immun.*, 2008; 76(11):5158-63.

14. Santi-Rocca J., Rigother M., Guillén N. Host-Microbe interaction and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clinic. Microbiol. Rev.*, 2009; 22(1): 65-75.
15. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.*, 2004; 56(3):387-437.
16. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.*, 2008; 50 Suppl: S 29-34.
17. Garavito MR, Mulichack MA. The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2003. 32:183-206.
18. Sanchez-Ramirez B, Talamás-Rohana P. [Significance of prostaglandins in hepatic amebiasis]. *Sal. Pub. Mex.*, 2002 ;44(3):247-57.
19. Harizi H., Corcuff J.B., Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends. Parasit.*, 2008; 14(10):461-69.
20. Takayama K., García-Cardenas G., Sukhova G., Comanders J., Gimbrone M., Libby P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.*, 2002; 46(15):44147-54.
21. Raes G., Beschin A., Hassanzadet G., Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007; 19: 454-9.
22. Gutiérrez-Alarcón A, Moguel-Torres M, Mata-Leyva O, Cuéllar-Nevarez G, Siqueiros-Condón T, Erosa G, et al. *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. *Exp. Parasitol.*, 2006; 114(3):154-9
23. Meza I. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol Today*. 2000; 16(1):23-8.
24. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.*, 1998; 50(2):197-263
25. Talamás-Rohana P, Hernández-Ramírez VI, Pérez-García JN, Ventura-Juárez J. *Entamoeba histolytica* contains a beta 1 integrin-like molecule similar to fibronectin receptors from eukaryotic cells. *J. Euk. Microbiol.*, 1998; 45(3):356-60.
26. Sengupta K, Hernández-Ramírez VI, Ríos A, Mondragón R, Talamás-Rohana P. *Entamoeba histolytica*: monoclonal antibody against the beta1 integrin-like molecule (140 kDa) inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *Exp. Parasitol.*, 2001; 98(2):83-9.

27. Hernandez-Ramirez VI, Anaya-Ruiz M, Ríos A, Talamás-Rohana P. *Entamoeba histolytica*: tyrosine kinase activity induced by fibronectin through the beta1-integrin-like molecule. *Exp. Parasitol.*, 2000; 95(2):85-95.
28. Flores-Robles D, Rosales C, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P. *Entamoeba histolytica*: a beta 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. *Exp. Parasitol.*, 2003; 103(1-2):8-15.
29. Ríos A, Hernández-Ramírez VI, Moguel M, Zarate Bahena AI, Rosales-Encina JL, Vargas MA, et al. Participation of Rho, ROCK-2, and GAP activities during actin microfilament rearrangements in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin signaling. *Cell Biol. Int.*, 2008; 32(8):984-1000.
30. Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, et al. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2003; 4:100(5):2272-7.
31. Reyes-Reyes M, Mora N, Gonzalez G, Rosales C. Beta1 and beta2 integrins activate different signalling pathways in monocytes. *Biochem. J.*, 2002; 15:363(Pt 2):273-80.
32. Santiago A, Carbajal ME, Benitez-King G, Meza I. *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Exp. Parasitol.*, 1994; 79(3):436-44.
33. Soid-Raggi LG, Torres-Marquez ME, Meza I. *Entamoeba histolytica*: identification of functional Gs and Gi proteins as possible signal transduction elements in the interaction of trophozoites with fibronectin. *Exp Parasitol.*, 1998; 90(3):262-9.
34. Zaric J, Ruegg C. Integrin-mediated adhesion and soluble ligand binding stabilize COX-2 protein levels in endothelial cells by inducing expression and preventing degradation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 14:280(2):1077-85.
35. Rûegg C., Dormond O., Mariotti A. Endothelial cell integrins and COX-2 mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Bioch. Bioph. Act.*, 2004; 1654:51-67
36. Yan Z, Stapleton PP, Freeman TA, Fuortes M, Daly JM. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in response to endotoxin after trauma is dependent on MAPK and NF-kappa B mechanisms. *Cellular Immunol.*, 2004; 232(1-2):116-26.
37. Viji RI, Kumar VB, Kiran MS, Sudhakaran PR. Modulation of cyclooxygenase in endothelial cells by fibronectin: relevance to angiogenesis. *J Cell Biochem.*, 2008; 1:105(1):158-66.
38. Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, Wada M, Smith WL. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog. Lipid Res.*, 2007; 46(2):108-25.

39. Faour WH, Gomi K, Kennedy CR. PGE(2) induces COX-2 expression in podocytes via the EP(4) receptor through a PKA-independent mechanism. *Cell Sig.*, 2008; 20(11):2156-64..
40. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2003; 18; 100(4):1751-6.
41. Doel Ray, Suman Dutta, Sampali Banerjee, Rahul Banerjee, Sanghamitra Raha. Identification, structure, and phylogenetic relationships of a mitogen-activated protein kinase homologue from the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Gen.*, 2005; 346:41-50.
42. Mei-Ying Han, Hidetaka Kosako, Toshiki Watanabe, and Seisuke Hattori. Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulates actin organization and cell motility by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. *Mol. Cel.*, 2007; 27(23):8190–204.
43. Fincham VJ, James M, Frame MC, Winder SJ. Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J.*, 2000; 19(12):2911-23.
44. Robledo T, Cruz-Vera J, Reyes M, de la Garza M, Ortega A, Pérez Salazar E. *Entamoeba histolytica*: focal adhesion kinase and Erk phosphorylation are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Parasitol Res.*, 2005; 95(4):231-5.
45. Cruz-Vera J, Clara L, Hernández-Kelly R, Alfredo Méndez J, Pérez-Salazar E, Ortega A. Collagen-induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 229(2):203-9.
46. Deborah C. I. Goberdhan, Clive Wilson. JNK, cytoskeletal regulator and stress response kinase? A *Drosophila* perspective. *BioEssays.*, 1998; 20 (12):1009 –19.
47. Martin-Blanco E, Pastor-Pareja JC, García-Bellido A. JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2000; 97(14):7888-93.
48. Jacinto A, Wood W, Balayo T, Turmaine M, Martinez-Arias A, Martin P. Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during *Drosophila* dorsal closure. *Curr. Biol.*, 2001; 11(17):R705-7.
49. Joël Raingeaud, Shashi Gupta, Jeffrey S. Rogers, Martin Dickens, Jiahuai Han, Richard J. Ulevitch, Roger J. Davis. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270(13):7420-6.

50. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Curr. Biol.*, 1998; 8(19):1049-57.
51. Adams JL, Badger AM, Kumar S, Lee JC. p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Prog. Med. Chem.*, 2001; 38:1-60.
52. Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Müller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.*, 1999; 18(18):4969-80.
53. Winzen R, Gowrishankar G, Bollig F, Redich N, Resch K, Holtmann H. Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR. *Mol Cell Biol.*, 2004; 24(11):4835-47.
54. Wang Q, Doerschuk CM. The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation. *J. Immunol.*, 2001; 166(11):6.