



ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS: CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL AP-1 Y SU RELACIÓN CON LA DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Avalos C.¹, Albarrán J, ¹Cruz-Vera J¹.

1.- Centro de Investigación de la División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Avenida Méndez 2838-A, cp.86150, fax:9933 511132, cleo_tabasco@yahoo.com

RESUMEN.

La *Entamoeba histolytica* es un parásito protozoario el cual es causante de la amibiasis intestinal donde preferentemente se presenta en países subdesarrollados y un problema de salud pública presente en diferentes países (1) La infección ocurre cuando la forma quística del parásito es ingerida en los alimentos y agua contaminada. La amiba puede colonizar el lumen intestinal; invadiendo a través del epitelio intestinal causando colitis o absceso hepático. (2). La patogenicidad amibiana en principio se encuentra basada en la adherencia a células blancas donde su primera barrera es el moco intestinal, eliminando las células epiteliales del intestino y continuando con el proceso de invasión a través de la degradación de la matriz extracelular la cual está constituida por varias proteínas siendo una de ellas la colágena tipo 1. Estudios recientes nos demuestran que se han encontrado en células de mamífero como fibroblastos y hepatocitos metaloproteinasas de matriz (MMPs) entre estas se encuentra la MMP tipo 1 la cual juega un papel esencial para degradar colágena fibrilar nativa. Las investigaciones realizadas en hepatocitos específicamente en la regulación del gen MMP-1 se han localizado secuencias dentro del promotor muy cerca del inicio en la transcripción, sitios de interacción para los factores transcripcionales; AP-1, HSP y ETS.

Se ha reportado un factor homólogo a AP-1 en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* al interactuar con colágena tipo 1. Este tipo de

degradación se ha caracterizado por la síntesis de gránulos electrodensos que tienen actividad de colagenasa. (13,14) Esto sugiere que los trofozoitos puedan tener procesos bioquímicos de degradación de la colágena como los reportados en estudios con hepatocitos. Nuestros experimentos demuestran que haciendo un análisis del promotor de ciertos genes que son activados en la patogenicidad de la amibiasis la mayoría de ellos tienen sitios de reconocimientos para el factor AP-1 lo que sugiere que el factor de transcripción AP-1 pueda regular el programa genético de patogenicidad de la amiba.

INTRODUCCIÓN.

La amibiasis es una enfermedad causada por *Entamoeba histolytica*, un parásito entérico exclusivamente de humanos con remarcada capacidad de contacto para inducir la muerte celular del hospedero. Los dos mayores síndromes clínicos de la amibiasis son; colitis amibiana y abscesos hepáticos. Se reportan alrededor de 100,000 muertes al año, así como 50 millones de casos entre colitis y abscesos hepáticos en todo el mundo. La infección se inicia cuando se consumen alimentos y agua contaminada con quistes. Así el ciclo de vida del parásito es por lo tanto simple, con un quiste infeccioso y un trofozoíto invasivo (1,3). Las lesiones patológicas en el colon incluyen ulceraciones del epitelio intestinal e invasión de la propia lámina basal por causa de los trofozoítos (1,2). En la patogénesis de la amibiasis se requiere de la colonización del intestino, ruptura del sistema de defensa del moco, adherencia y lisis de las células epiteliales. La adherencia, patogénesis y la actividad proteolítica son tres eventos claves en la destrucción del tejido del hospedero (2).

La adherencia de los trofozoítos de *E. histolytica* a las células blanco está mediada por varias moléculas, la primera de ellas es una lectina; galactosa N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc), esta molécula se une a los residuos expuestos de galactosa/N-acetil-D-galactosamina presentes en las glicoproteínas de las células blanco y está involucrada en la evasión de la lisis por el complemento (4). La segunda de ellas es una molécula llamada adhesina 112 kDa (5) que es, una molécula que específicamente bloquea la

adherencia, tanto a células epiteliales como a eritrocitos humanos. Se ha demostrado que algunas mutantes obtenidas para la virulencia de *E. histolytica* presenta alteraciones en ésta proteína (6). Donde el polipéptido de 75 kDa (EhADH112) tiene un dominio que está involucrado en la adherencia a las células blanco (6). Una vez eliminado la barrera de muco intestinal y haber eliminado a las células epiteliales del intestino el trofozoíto se enfrenta a la degradación de la Matriz Extracelular (MEC). La MEC juega un papel central en el control de la proliferación, migración y diferenciación celular al mediar la adhesión y comunicación celular. Entre los mayores componentes de la MEC se incluyen los componentes estructurales, como; colágena, fibronectina y elastina.

En células de organismos eucariotes superiores, la unión a proteínas de matriz extracelular, esta mediada por una familia de receptores en superficie de la membrana llamadas integrinas. (7). La fosforilación de proteínas es uno de los primeros mecanismos detectados en respuesta a la estimulación por integrinas. En la actualidad es claro que las integrinas son capaces de traducir señales desde la membrana extracelular hacia el interior de la célula, y que éstas pueden promover cambios en la expresión de genes. (8). Una propuesta, es que las integrinas participan en el señalamiento a partir de una organización del citoesqueleto, regulando de este modo la forma y arquitectura molecular.

. En células de mamífero como fibroblastos y hepatocitos las Metaloproteinasas de Matriz (MMPs) juegan un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades, donde existe una notable eliminación de la matriz extracelular, como en la artritis reumatoide, cirrosis hepática, osteoartritis, invasión celular tumoral y metástasis. La familia de genes MMP esta integrada por lo menos de 20 endopeptidasas estructuralmente relacionadas dependientes de Zinc capaces de degradar esencialmente todos los componentes de la MEC. Las MMPs con frecuencia son divididas en subgrupos de colagenasas, estromelisin, gelatinasas y otras MMPs (4). Colagenasa tipo 1 (MMP-1) es expresada por varios tipos de células; normales y malignas y esta, es una de las pocas enzimas capaces de degradar colágena fibrilar nativa (5).

En los últimos años se ha reportando la capacidad del trofozoíto de *Entamoeba histolytica* para degradar colágena humana tipo 1, por medio de la síntesis de gránulos electrodensos que tienen actividad de colagenasa (6,7).

Esto sugiere la existencia de homólogos de MMPs en los trofozoítos de *E. histolytica* y que pueden ser los primeros eventos en la patogénesis del parásito para degradar la colágena de la MEC del intestino del hospedero.

Las investigaciones realizadas en mamíferos, específicamente en la regulación del gen MMP-1 en hepatocitos, se han localizado secuencias dentro del promotor muy cerca del inicio en la transcripción, sitios de interacción para los factores transcripcionales; AP-1, HSP y ETS (8).

La expresión y activación de estos factores transcripcionales son reguladas por la vía de señalización de MAPK. Recientes investigaciones han demostrado que la vía de señalización de ERK1/2, regula la actividad del promotor MMP-1 vía un elemento AP-1 y que la actividad específica de ERK1/2 induce la síntesis de MMP-1 en células de fibroblastos y hepatocitos. Por otra parte p38 MAPK es indispensable para la inducción del gen MMP-1, como se demostró en hepatocitos activados con interleucina-1, ceramida y ácido okadaico (9). Sin embargo bloqueando las vías de señalización de JNK o ERK1/2 también se inhibe la estimulación por ceramida y ácido okadaico demostrando que la inducción en la expresión del gen MMP-1 vincula una activación coordinada de las vías múltiples de señalización de MAPK que determinan la inducción en la expresión del gen MMP-1. Sin embargo la interacción entre las diferentes vías de MAPK para regular la transcripción del gen MMP-1 no es lo suficientemente clara (10).

Haciendo un análisis de algunos promotores amibianos reportados hasta el momento en el Gen Bank, encontramos que varios de ellos, específicamente los promotores de los genes *EhPgp1* y 5, muy cerca de sitio de inicio de la transcripción tienen secuencias de reconocimiento para factores transcripcionales AP-1, además se ha reportado que estos genes están íntimamente ligados a la regulación por este factor transcripcional cuando el trofozoíto tiene activo sus mecanismos de patogénesis (11) no olvidando que a partir de los 90 se reportó la activación de un factor homólogo AP-1 y de ERK 1/2 en trofozoítos activados con colágena tipo 1 (12).

Recientemente inhibidores de MAPK han tomado importancia como drogas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y cáncer. Destacando en importancia lo encontrado en *D. discoideum*, ERK1/2 ha sido identificada y esencial para el crecimiento celular, desarrollo multicelular y diferenciación

(13). Esto abre la posibilidad entre las enfermedades causadas por patógenos eucariontes como protozoarios y helmintos podrían ser tratados interviniendo la vía de señalización de MAPK (14).

Regulación del ciclo celular y la transducción de señales esta siendo estudiada pero hasta el momento muy escasamente comprendida en *Entamoeba histolytica*, el camino de transducción de señales activado por componentes de la matriz extracelular están siendo identificados (15,16). Proteínas homólogas a GTPasas han sido caracterizadas en *Entamoeba histolytica* y su importancia en el control del ciclo celular (17). La interacción de la amiba a colágena dispara la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas homólogas a STAT1/3, pp125fak y ERK1/2(18), así como la liberación gránulos electrodensos formados principalmente por la enzima colagenasa (19).

Recientemente se reporta la identificación de un gen homólogo de MAPK en *Entamoeba histolytica* (20). La caracterización de la vía de señalización de MAPK y su relación en la regulación transcripcional de genes homólogos a MMPs en *Entamoeba histolytica* puede dar nuevas alternativas de tratamiento al comprender su papel funcional en la patogénesis.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el factor transcripcional AP-1 y su efecto sobre los mecanismos de señalización en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estudiar la participación de las proteínas de MAPK, en el señalamiento en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* activados por colágena tipo I.
- 2.- Determinar las vías de señalamiento que se asocien con la cascada de activación de las proteínas de MAPK.

MATERIALES Y METODOS:

Programa de análisis de factores transcripcionales (TFsearch).
www.TFSEARCH Search Result.htm.

Haciendo un análisis de los promotores de *Entamoeba histolytica* en el GenBank . www.NCBI Sequence Viewer v2_0.htm.

RESULTADOS:

```

1 tcatcgatt aattgaatga agtggtgaaa tgacataata agtaatgttg atgtttttat
61 tttaaaactg catggaaata cagaaaaatc aaattaaaac aaacaagaag atacaagaat
121 aaagagatga aataatgtgt taacagttta gatataattca cagaatcaaa tttatttgag
181 tagttcaaaa agaatgaaaa tatgtgaaag atttaattgg taatcaaaca ataaattaat
241 gaataaatca tgagatgaac aaaacattca taaacaattt ctgaagaagt tgtcagatta
301 taaattaatg tgaaagtaat tactaaatga ttaaatagta aattaacgaa taacaaacac
361 cattaatctt aataaataat gaaagaataa tatacataaa gaaatagatt tatgataaac
421 ataacaatca gaatttataa agaaaataaa gagaaggtgt gtataaaaaga aatagagata
481 atgagataaa gaatagaaaa ataaataaga cattaataac agaaacaaag aagatgaatc
541 aaatattaa agtgaataaa ttaaatgaat aaaagaataa tgaataacac aacattaaat
601 gatgaagaaa gaagaaataa aatataattt aagtattgaa attgatattt agttcaaaat
661 gaaatgaaat acttggttta agtgaacgaa acaatatttt aataatgttc taattaattt
721 caattcacta agaattgata atataaacag tgatataaaa tgatgataaa gaataagaga
781 ataaaagaat aaaagaaatg aatgaaatag aaagaagaga aaatggagta aagaggtaga
841 agaaatgaag aatgaaagag aaagaataaa gaaaaataa gaagaagaga ataatagaat
901 agaaaaaat aaattataat aaccattttg ggtatagaaa tttttcataa tagtaaatat
961 aaataagaaa gaaaatgaag aaaatggata attccaatca acatgaattt ttggaatacc
1021 acaaataagt tatgcctcaa actttctaaa ttctatttaa
agaaaaagat attaatgagt
1081 cattcgcatg

```

Fig. 1. Promotor Ehpgp1 de *Entamoeba histolytica*. Como se puede observar en el rango de 1021 y 1081 se observan dos sitios de reconocimiento para el factor AP-1. De color azul se señala la base del sitio de inicio.

Pares de bases	Secuencias analizadas	Factores de transcripción	% homología
1051	AGAAAAAGAT ATTAATGAGT CATTGCGCATG		
	---->	HSF	100.0
	<-----	CdxA	100.0
	---->	CdxA	99.3
	<-----	GCN4	98.4
	<-----	AP-1	96.3
		HSF	96.0
	----->	AP-1	95.5
	-----	NIT2	95.0
	<-----	AP-1	93.7
	----->	cap	93.7
	<-----	AP-1	91.9
	<-----	AP-1	91.8
	>	BR-C Z	90.6
		SRY	90.0

Escala maxima: 100.0 puntos, Escala Mínima: 90.0 puntos.

Fig.2. Factor de Transcripción de AP-1 en Ehpgp1 de *Entamoeba histolytica*. Haciendo un análisis de la región del promotor se puede observar que en la región numero 1021-1081 se encuentran 5 sitios para AP-1, como lo reportado por Gomez C, Pérez DG, López-Bayghen E, Orozco E 1998

Transcriptional analysis of the EhPgp1 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem* 273:7277-84

BIBLIOGRAFÍA:

1.- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. infect dis* 1986; 8:228-38.

2.-James J. McCoy, Barbara J. Mann and William A. Petri. JR.: Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or How Lectins Let Parasites stick Around, *Infection and Immunity*, Aug, 1994 p:3045-3050.

3.-Eduardo Pérez, María de Lourdes Muñoz and Arturo Ortega. *Entamoeba histolytica*: involvement of pp125 fak in collagen-induced signal transduction. *Experimental parasitology*, 1996, 82:164-178.

4.-Jorge Cruz-Vera, L. Clara, R. Hernandez-Kelly, j.Alfredi Méndez, Eduardo perez-Salazar and Arturo Ortega. Collagen –induced STAT family members activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *FEMS Microbiology Letters* 2003 11301 1-7.

5.-Gilchrist Sa, Mann BJ, Petri WA, Jr. Control of ferredoxin an Gal/GalNAc lectin gene expresion in *Entamoeba histolytica* by a cisacting DNA sequence. *Infect Immun* 1998, 66:2383-6.

6.-Espinoza-castellano M and Martinez-Palomo A. patogénesis of intestinal. Amibiasis. *Clin.Microbiology rev.* Vol.13, 2000, 320-331..

7.-Carolina Martinez-Lopez, Esther Orozco, Tomas Sanchez, Rosa María García-Perez. The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cellular Microbiology* 2004, 6(4), 367-376.

8.-. Eduardo Pérez^a, María de Lourdes Muñoz^a and Arturo Ortega *Entamoeba histolytica*: collagen-induced AP-1 DNA binding activity (*FEMS Microbiology Letters* Volume 159, Issue 2 , 15 February 1998, Pages 187-192

9.-Jurka westermarck and Veli-Matti Cari, Regulation of matriz metalloproteinase expresión in tumor invasión. *The FASEB journal* vol.13 may 1999 pag:781-792.

- 10.- Serrano JJ, de la Garza M, Moreno MA, et al. *Entamoeba histolytica*: electron-dense granule secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Mol Microbiol* 1994 11:787-92
- 11.- Munoz ML, Calderon J, Rojkind M The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1982 155:42-51
12. Tower GB, Coon CI, Belguise K, Chalbos D, Brinckerhoff CE. Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter. *Eur J Biochem*. 2003 Oct;270(20):4216-25
- 13.- yuca nagata and kazuoto todokoro tsukuba Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis The American Society of Hematology 1999. by life science center, japan
14. Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kahari VM. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol*. 2001 Apr;21(7):2373-83.
15. Li SP, Junttila MR, Han J, Kahari VM, Westermarck J . p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2. *Cancer Res*. 2003 Jul 1;63(13):3473-7.
- 16 Gomez C, Perez DG, Lopez-Bayghen E, Orozco E 1998 Transcriptional analysis of the EhPgp1 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem* 273:7277-84
17. Perez E, Munoz ML, Ortega A 1998 *Entamoeba histolytica*: collagen-induced AP-1 DNA binding activity. *FEMS Microbiol Lett* 159:187-92.
18. Perez E, Munoz ML, Ortega A 1996 *Entamoeba histolytica*: involvement of pp125FAK in collagen-induced signal transduction. *Exp Parasitol* 82:164-70
- 17.- Munoz ML, Das P, Tovar R 1997 The cytoskeleton in *Entamoeba histolytica* during EDG secretion. *Arch Med Res* 28 Spec No:193-4.
- 19 Wiese M. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *EMBO J*. 1998 May 1;17(9):2619-28

20.- Ray D, Dutta S, Banerjee S, Banerjee R, Raha S. Identification, structure, and phylogenetic relationships of a mitogen-activated protein kinase homologue from the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Gene*. 2005 Feb 14;346:41-50. Epub 2005 Jan 25.