



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

BO 1279/96
Ej. 1

**“REGULACION DE LA $[Ca^{2+}]_i$ EN TROFOZOITOS DE
Entamoeba histolytica MEDIANTE EL ESTIMULO
DE FIBRONECTINA.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALBERTO PIÑA ESCOBEDO



1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
VERACRUZ

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 14 de marzo

de 1996

APROBACION DE TESIS

Lic. AMERICA LANDA ROMERO

JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología:

ALBERTO PIÑA ESCOBEDO

titulado: "Regulación de calcio intracelular
en trofozoitos de Entamoeba histolytica mediante
el estímulo de fibronectina".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Dr. Luis A. Baiza Gutman

M. en C. Guadalupe Martínez Hernandez

M. en C. Roberto Velasco Garcia

Biol. Hector Barrera Escorcía

Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio

(Nombre completo)

(Firma)

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la dirección de la Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio.

DEDICATORIAS

A mi madre **Mercedes**...

por los dos papeles que jugó en mi infancia, que ahora y siempre agradeceré

A mis hermanos **Raúl, Bertha, Ignacio y Elena**...

porque siempre he contado con ellos y de alguna forma me ayudaron a seguir adelante.

A mis amigos **Oscar, Edgar, Pilar y Amanda**...

por el apoyo y los grandes momentos que pasamos durante la carrera.

A **Amanda**...

porque me haz hecho madurar y sobre todo sentir, te amo.

A la memoria de Lupita y Jorge

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isaura Meza, por su asesoría y sobre todo por su enorme paciencia.

A la Dra. Rebeca Manning, por su asesoría y su apoyo.

A mis compañeras de laboratorio: Rebe (Rebeca Manning), Liz (Elizabeth Franco), Doña Ruth (Ruth Lezama), Dianita (Diana Ortiz), Mireya (Mireya Romero), Mary (Ma. del Carmen Domínguez), Gaby (Gabriela Soid) y a la cubana (Aida Castillo), por sus opiniones y sugerencias para la culminación de este trabajo.

A los señores Alejandro Trejo y Pedro Carrasco, por su colaboración técnica.

INDICE

ABREVIATURAS	<i>i</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
I INTRODUCCION	1
A.- Características generales del parásito.....	2
B.- Clasificación.....	5
C.- Patología de la amibiasis.....	5
D.- Matriz extracelular.....	7
E.- El calcio como segundo mensajero.....	11
F.- Transducción de señales en <i>Entamoeba histolytica</i>	14
II OBJETIVO	15
A.- General.....	15
B.- Particular.....	15
III MATERIALES Y METODOS	16
A.- Cultivo celular.....	16
1. Composición del medio de cultivo TYI-S-33.....	16
B.- Obtención de la fibronectina plasmática humana.....	17
C.- Cargado de los trofozoítos con FURA2-AM y medición del calcio intracelular.....	18
1. Soluciones.....	18

2. Aparatos.....	19
3. Cargado de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> con FURA2-AM.....	19
4. Medición de calcio intracelular en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	20
IV RESULTADOS.....	22
A.- Efecto de la FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	22
B.- Curva de dosis-respuesta del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	25
C.- Cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ causado por diferentes drogas.....	27
V DISCUSION.....	35
VI CONCLUSIONES.....	40
VII BIBLIOGRAFIA.....	42

ABREVIATURAS

CAGs	Polisacáridos glucosaminoglucanos
FN	Fibronectina
PKC	Proteína cinasa C
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
BSA	Albúmina de suero de bovino
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
DAG	1,2-Diacilglicerol
Ca²⁺	Ión calcio
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
D.O.	Densidad óptica
kDa	Kilo Daltones
M	Molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
µg	Microgramo

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
TG	Thapsigargina
BAPTA	1,2-bis(<i>o</i> -aminophenoxy)ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol bis(β-aminoethylether- N,N,N',N'-tetraacetic acid

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de dosis-respuesta de fluorescencia a diferentes concentraciones de FURA2-AM en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	23
Figura 2. Efecto de la FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	24
Figura 3. Curva de dosis-respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes concentraciones de FN en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	26
Figura 4. Efecto de FN e Ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	28
Figura 5. Efecto de BAPTA-AM y FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	30
Figura 6. Efecto de BAPTA-AM e Ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	31
Figura 7. Efecto de EGTA y FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	32
Figura 8. Efecto de TG y FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	34

RESUMEN

La interacción de los trofozoitos del parásito *Entamoeba histolytica* con fibronectina (FN) se lleva a cabo mediante receptores membranales. A la fecha, aún no están bien definidos los diferentes patrones de activación que podrían utilizar las amibas como respuesta a señales externas, aunque está claro que la activación con células blanco y substratos de matriz extracelular, producen exocitosis de proteasas. Por otro lado, varios estudios con FN indican que el contacto del trofozoito con esta proteína, produce la formación de placas de adhesión, la reorganización del citoesqueleto, el aumento en la liberación de proteasas y la actividad de proteína cinasa C (PKC), así como un aumento de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y cambios en el pH citosólico.

En el presente trabajo, se muestra que la interacción de los trofozoitos con FN, produce también un sostenido aumento en la concentración de calcio intracelular.

Experimentos hechos con quelantes de calcio, tanto intracelulares (BAPTA-AM) como extracelulares (EGTA), así como con un ionóforo de calcio (Ionomicina) y una droga para depletar calcio de los reservorios intracelulares (Tapsigargina), sugieren que el aumento de calcio intracelular inducido por FN se debe principalmente al flujo de calcio externo.

I.- INTRODUCCION.

La amibiasis es una enfermedad producida por el parásito *Entamoeba histolytica* que infecta principalmente a los humanos (revisión por Martínez-Palomo, 1982), aunque se ha encontrado en cerdos y primates con menor frecuencia (Gutiérrez, 1994). Se presenta más comunmente en países que carecen de un desarrollo socioeconómico adecuado, aunque también existe en países altamente desarrollados. Dentro de los países con alto índice de infección por este parásito están: La India, Egipto, Turquía y México (Guarner, 1994). Se ha estimado que este parásito infecta cada año aproximadamente a 480 millones de personas en todo el mundo, causando la muerte de 40 a 100 mil individuos (Bruckner, 1992).

La amibiasis es una enfermedad adquirida por la ruta fecal-oral, asociada con la contaminación del agua y de los alimentos por los quistes, que son la forma infecciosa de *E. histolytica*. En los portadores asintomáticos, el trofozoíto o amiba reside como comensal; mientras que en los portadores sintomáticos, los trofozoítos invaden la mucosa del colon produciendo úlceras y lesiones necróticas, pudiendo incluso diseminarse hasta el hígado, en donde provocan el absceso hepático amibiano. También pueden infectar cerebro, pulmón y piel, donde es denominada infección extraintestinal (Ravdin y cols., 1986; Pérez-Tamayo, 1994; Treviño, 1994).

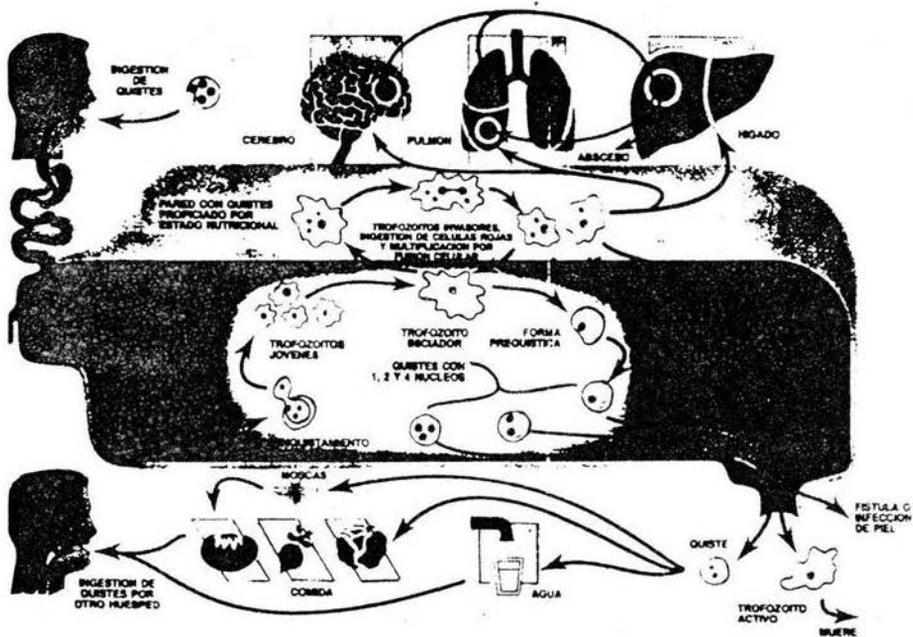
La amibiasis puede ser crónica, subaguda o aguda. La forma crónica se presenta en individuos cuyo intestino grueso ha sido colonizado por las amibas, pero que no presentan síntomas de la enfermedad (ameboma). La forma subaguda se presenta como disentería y diarrea; por último, la forma aguda con apendicitis y colitis amibiana, así como con el desarrollo del absceso hepático que como ya se indicó, causa un alto índice de mortalidad (Treviño, 1994).

A. CARACTERISTICAS GENERALES DEL PARASITO.

Entamoeba histolytica, es al parecer uno de los organismos eucarionticos más primitivos (Meza, 1992; Hasegawa y cols., 1993), sus trofozoítos presentan una organización citoplásmica sencilla que carece de un citoesqueleto estructurado. La organización estructural, así como las características bioquímicas del citoesqueleto en la amiba, aún no han sido claramente establecidas, sin embargo, existen evidencias de la presencia de microtúbulos nucleares y actina organizada en diferentes tipos de agregados. Esta proteína se identificó inicialmente en las amibas por técnicas de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos contra actina (Sabanero y Meza, 1982) y más tarde se caracterizó bioquímicamente (Meza y cols., 1983).

Estos organismos presentan un citoesqueleto primitivo, carecen de un sistema de membranas equivalente al complejo de Golgi y al retículo endoplásmico de los eucariontes superiores, así como de nucleolo, lisosomas, peroxisomas y mitocondrias (Guillen N., 1992). Se mueven por medio de pseudópodos ectoplásmicos llamados

lobopodios, el diámetro de éstas células varía de 10 a 60 μm , con un promedio de 25 μm (Martínez-Palomo, 1982). En cuanto a su metabolismo, es aerobia facultativa con enzimas glucolíticas inusuales, que solo han sido encontradas en ciertas bacterias. Los carbohidratos son su principal fuente de energía, carece de citocromos y del ciclo del ácido cítrico; su ciclo de vida consta de 4 estadios: trofozoíto, prequiste, quiste y metaquiste. El trofozoíto o forma móvil es una célula dinámica y pleomórfica, se reproduce por fisión binaria y se enquista produciendo quistes tetranucleados, después de dos divisiones nucleares sucesivas de quistes uninucleados. De cada quiste emerge una amiba metaquistica tetranucleada, que a su vez produce ocho trofozoítos uninucleados (Dibujo 1).



Dibujo 1.- Ciclo de vida de la ameba.

B. CLASIFICACION.

Según Levine (1980), *Entamoeba histolytica* pertenece al reino *Protozoa*; Phylum *Sarcomastigophora*; Subphylum *Sarcodina*; Superclase *Rhizopoda*; Clase *Lobosea*; Subclase *Gymnamoebia*; Orden *Amoebida*; Suborden *Tubulina*; Familia *Entamoebidae*; Genero *Entamoeba* y Especie *histolytica*.

C. PATOLOGIA DE LA AMIBIASIS.

La capacidad de las células invasoras para penetrar a los órganos sólidos, se considera un proceso de múltiples pasos que requiere el contacto íntimo entre la célula efector y la célula blanco. La interacción puede llevarse a cabo mediante receptores específicos, cuyo resultado es la lisis de la célula blanco o del substrato. Esta lisis celular puede ser acompañada por la liberación de proteasas y otros mediadores líticos, así como por la inserción de proteínas formadoras de poros, dentro de la membrana plasmática de la célula blanco (Young y cols., 1982).

Los trofozoítos de *E. histolytica* son células invasoras capaces de penetrar diversos tejidos y provocar su destrucción en diferentes grados. Mucho se ha trabajado en torno al establecimiento de los factores celulares que determinan la virulencia de este parásito; ahora se sabe, que el mecanismo mediante el cual la amiba invade y daña a los tejidos es complejo y multifactorial. Primeramente, como en todos los casos de células invasoras, se requiere el contacto íntimo entre los trofozoítos y el tejido blanco, en este caso la mucosa intestinal. El contacto es mediado por moléculas específicas

presentes en el parásito, describiéndose glicoproteínas con características de lectinas en la membrana celular de los trofozoítos; se ha identificado una lectina de 260 kDa que se une a residuos de N-acetil galactosamina (adhesina), como la mediadora de la adherencia de *E. histolytica* sobre células de ovario de hámster (Ravdin y cols., 1985). Otra lectina de 220 kDa con especificidad por oligómeros de N-acetil glucosamina, también localizada en la superficie de los trofozoítos, podría participar en los eventos iniciales del contacto con la célula blanco (Rosales-Encina y cols., 1987). Anticuerpos obtenidos contra estas dos glicoproteínas, inhiben la adhesión de los trofozoítos a eritrocitos y a células en cultivo, evitando parcialmente la citofagocitosis y la lisis celular, que siguen al reconocimiento y contactos iniciales (Ravdin y cols., 1985; Meza y cols., 1987). Así mismo, experimentos en los cuales se han utilizado diferentes carbohidratos para inhibir la adherencia de los trofozoítos a los glóbulos rojos, sugieren la presencia sobre la superficie amibiana, de varios receptores para carbohidratos, en particular para residuos de lactosa (Lac), galactosa (Gal), melibiosa (Mel), N-acetil-galactosamina (Gal-NAc) y N-acetil-glucosamina (Glc-NAc); que participan en la interacción inicial de las amibas con las células blanco (Cano-Macera R. y López-Revilla R., 1987).

Una vez que el contacto se ha establecido, como un segundo paso en el efecto citopático, ocurre la secreción de moléculas que modifican o digieren algunos componentes de la célula blanco. Se ha propuesto que la presencia de enzimas proteolíticas en *E. histolytica* y/o su liberación al medio, es uno de los mecanismos

citolíticos utilizados por el parásito para destruir tejidos y substratos. La actividad colagenolítica amibiana es altamente específica para colágena I y III y es dependiente de Ca^{2+} (Muñoz y cols., 1982), también se ha encontrado actividad hemolítica en homogenados de amibas (López Revilla y Said Fernández, 1989).

Moléculas presentes en el medio de cultivo exocitadas por los trofozoítos, poseen características semejantes a las toxinas y aunque carecen de actividad proteolítica, tienen la capacidad de redondear células epiteliales, perturbando así sus uniones intermembranales (Lushbaugh y cols., 1979). También se ha descrito en amibas una proteína formadora de canales de Ca^{2+} que actúa sobre la membrana de la célula blanco, provocando la entrada excesiva de Ca^{2+} que conduce a la lisis y muerte de ésta (Young y cols., 1982).

Una vez que la célula o substrato es destruido por la acción de uno o varios de los factores antes mencionados, los trofozoítos los fagocitan. La capacidad de locomoción y desplazamiento de las amibas, junto con los procesos ya citados, muchos de los cuales también dependen de la motilidad intrínseca del parásito, se pueden utilizar como parámetros de su patogenicidad (Manning y Meza, 1995).

D. MATRIZ EXTRACELULAR

La mayoría de las células de los organismos pluricelulares están en contacto con una intrincada red de macromoléculas extracelulares que constituyen la matriz extracelular. Estas versátiles moléculas de proteínas y polisacáridos se secretan en

forma local y se ensamblan, formando una red organizada en el espacio extracelular de la mayoría de los tejidos. Además de actuar como cemento biológico universal, también forman parte de estructuras altamente especializadas como el cartilago, los tendones, las láminas basales, los dientes y los huesos (estos dos últimos con el depósito de cristales de fosfato de calcio).

Dos de las principales clases de macromoléculas que forman a la matriz extracelular son: 1) los polisacáridos glicosaminglicanos (CAGs), que suelen estar unidos a proteínas formando las proteoglicanas y 2) las proteínas fibrosas que son de dos tipos, estructural (colágena y elastina) y de adhesión (fibronectina y laminina). Las glicosaminglicanas y las proteoglucanas forman una "substancia fundamental" gelatinosa, altamente hidratada, en la que están incluidas las fibras de colágena. Mientras que estas largas fibras de colágena refuerzan y contribuyen a organizar la matriz; la fase acuosa del gel polisacárido, permite la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células de los tejidos. En tanto que las fibras de colágena fortalecen y ayudan a organizar la matriz, las fibras de elastina le proporcionan elasticidad. Las proteínas de adhesión ayudan a otras células a que se adhieran a la matriz extracelular, por ejemplo, la fibronectina promueve la adhesión de los fibroblastos y otras células; la laminina promueve la adhesión de células epiteliales a la lamina basal (Alberts y cols., 1994).

La matriz extracelular ha pasado de ser una red inerte, a ser reconocida como un factor que constantemente se encuentra enviando señales hacia el interior celular, por medio de proteínas integrales de membrana que actúan como receptores específicos, los cuales al verse expuestos a su respectivo ligando, dan lugar a diversas estructuras de adhesión, entre las que se incluyen las adhesiones focales que sirven como puntos de anclaje y que además proveen los sitios adecuados para la interacción de los factores involucrados en la transducción de señales (Juliano, 1993; Hynes, 1992). La activación de cinasas específicas para producir la fosforilación de proteínas e iniciar cascadas de fosforilación (Romer, 1992), junto con la movilización de calcio interno (Ng-Sikorski, 1991), el aumento en el pH citosólico (Shwartz, 1992) y la expresión específica de ciertos genes (Seftor, 1992; Werb, 1989), son los eventos más relevantes que se han encontrado hasta ahora, que se disparan o activan como consecuencia de la relación célula-matriz extracelular.

Los mecanismos por los cuales *E. histolytica* reconoce y degrada a la matriz extracelular no están todavía muy bien elucidados, pero las uniones del parásito a la fibronectina, la laminina y las colágenas tipo I, III y IV (Talamas y Meza, 1988; Rosales y cols., 1992) ya han sido identificadas.

En el proceso de interacción de los trofozoítos con la matriz extracelular, se ha descrito la presencia de un receptor de 37 kDa en la superficie de las amibas, que se une específicamente a la fibronectina (FN) y a la laminina. Esta interacción produce el subsecuente rearrreglo del citoesqueleto de actina, que da lugar a la formación de

placas de adhesión, así como a la secreción de proteasas y a la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Talamas y Meza, 1988; Meza y Franco, 1988; Vázquez-Prado 1992; Santiago y cols., 1994). Recientemente se ha reportado también en las amibas, la presencia de otra proteína de superficie de 140 kDa que se une específicamente a la FN y que posiblemente está relacionada con la familia de las integrinas (Talamas-Rohana y cols., 1992).

La presencia de miosina I y II en las placas de adhesión, así como la presencia de proteínas que se unen a la actina como tropomiosina, α -actinina y vinculina, indican que las funciones del citoesqueleto se llevan a cabo en la forma clásica de organización de complejos de actina y de actina-miosina. Así mismo, la presencia de la PKC en las placas y de la cinasa pp125^{FAK} (que se localiza exclusivamente en las placas de adhesión de diversas células) (Vázquez y cols., 1995), sugieren que en estas placas se llevan a cabo procesos de transducción de señales.

Recientemente Carbajal y cols. (1994), encontraron que las amibas regulan su pH interno utilizando un intercambiador de Na^+/H^+ y que la unión a la FN induce la alcalinización del citoplasma que se revierte una vez que desaparece el estímulo. Esta observación refuerza la sugerencia de que FN actúa como una señal externa que induce rearreglo del citoesqueleto y excitosis por la activación de vías de señalización.

La mayoría de las señales extracelulares que llegan a una célula no penetran al citoplasma, sino que para iniciar sus acciones biológicas, requieren de mecanismos de transducción que lleven la señal al interior de la misma. Una vez activado un receptor, la señal se transfiere a los llamados segundos mensajeros, los cuales son capaces a su vez de activar otras moléculas, requeridas para el control de ciertos mecanismos bioquímicos intracelulares

Entre los segundos mensajeros que han sido implicados en la transducción de señales intracelulares, están el 3',5'-GMP cíclico (GMPc), el 3',5-AMP cíclico (AMPC), el Inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), el 1,2-Diacilglicerol (DAG) y el ion calcio (Ca²⁺) (Alberts y cols., 1994).

E. EL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO.

El calcio, está implicado en procesos muy diferentes como la regulación de la contracción muscular, la secreción de hormonas, la activación de enzimas digestivas, la secreción de transmisores, el transporte de sales y agua en el epitelio intestinal y el control del metabolismo del glucógeno en el hígado.

El concepto tradicional de la función del calcio como segundo mensajero es bastante sencillo, la estimulación por un ligando específico, causa el aumento de la concentración citosólica de este ion, bien por la apertura de los canales de calcio de la membrana o por la liberación de calcio del retículo endoplásmico o de los calcisomas o reservorios de calcio. Cuando su concentración aumenta, las proteínas citosólicas

que lo pueden capturar, tales como la calmodulina, se unen a los iones de calcio; a continuación los complejos calcio-proteína interactúan con otras proteínas celulares y modulan sus funciones. Cuando la concentración citosólica de calcio disminuye, los iones se disocian de las proteínas receptoras y el sistema se desactiva.

Dos vías de señalización de Ca^{2+} han sido bien definidas, una es usada principalmente en células activas eléctricamente y la otra usada en casi todas las células. La primera de estas vías ha sido particularmente bien estudiada en células nerviosas, en las cuales el calcio entra a través de canales de calcio dependientes del voltaje, los que se abren cuando la membrana plasmática es despolarizada mediante impulsos nerviosos, iniciando los eventos que conducen a la secreción del neurotransmisor. La segunda vía se activa, cuando un ligando específico se une a su receptor en la célula, éste estimula a una proteína trimérica G llamada Gq, la cual activa a la fosfolipasa C, ésta hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), que es un componente de la membrana celular. La reacción produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 , que a su vez tiene receptores en los reservorios citoplásmicos de calcio, causa la liberación de iones de calcio de estos calcisomas o del retículo endoplásmico, lo que provoca un aumento transitorio del calcio citosólico.

Para regular la concentración del Ca^{2+} citosólico, las células eucariontas tienen en la membrana plasmática, una ATPasa dependiente de Ca^{2+} para bombear el ion fuera de la célula. Otras células, como las musculares y nerviosas, presentan un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que se activa cuando la concentración intracelular de

calcio es muy alta. Una bomba de Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y tal vez en los calcisomas, juega también un papel importante en el mantenimiento de los niveles bajos de calcio citosólico (≈ 100 nM); esta ATPasa de calcio captura este ion dentro del RE en contra de un gradiente de concentración muy alto.

Tanto el calcio como el AMPc, llevan a cabo muchos de sus efectos controlando la actividad de una clase particular de enzimas denominadas cinasas; por ejemplo el AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) y el calcio activa a la PKC. La formación de los complejos de calcio-calmodulina, activan a ciertas cinasas llamadas CaM-cinasas, que a su vez fosforilan un subgrupo específico de proteínas (Rasmussen, 1989; Alberts y cols., 1994).

Para la medición de calcio intracelular se utilizan diferentes indicadores fluorescentes, como son el QUIN-2, el INDO-1 y el FURA-2, siendo este último el más usado. El FURA-2 contiene varios grupos carboxílicos que fijan específicamente a los iones Ca^{2+} , produciendo una fluorescencia que resulta ser proporcional a la concentración del ion. El FURA-2 se vende comercialmente con grupos ésteres (FURA2-AM, lipofílico) para hacerlo permeable a la membrana plasmática, una vez dentro de la célula, las esterasas citosólicas hidrolizan al grupo éster dando lugar al compuesto que se une al ion (Darnell y cols. 1990).

F. TRANSDUCCION DE SEÑALES EN *E. histolytica*

A la fecha, aún no están bien definidos los diferentes patrones de activación que podrían utilizar las amibas como respuesta a señales externas, aunque está claro que la activación con células blanco y substratos de matriz extracelular producen la exocitosis de proteasas (Talamas-Rohana y Meza, 1988). Por otro lado, varios estudios con la FN indican que el contacto con esta proteína produce la formación de placas de adhesión, el rearrreglo del citoesqueleto, el aumento en la liberación de proteasas y en la actividad de PKC, así como el aumento del IP_3 y cambios de pH citosólico.

Santiago y cols. (1994), encontraron en amibas unidas a FN, un aumento en la actividad de la PKC y en la producción de IP_3 ; también observaron, que la actividad enzimática se traslada del citoplasma a la región cortical, en donde interactúan el citoesqueleto y la membrana, esto coincide con el hecho de que varias proteínas se fosforilan en la fracción citoesqueleto-membrana. A la vez, hay un aumento en la concentración de actina polimerizada, así como en el número y tamaño de las placas de adhesión.

Ya que existen evidencias de la posible participación de mecanismos de señalización, en las respuestas mostradas por las amibas al estímulo con la FN, fué de nuestro interés estudiar los niveles de Ca^{2+} interno y su regulación como resultado de la estimulación con la FN, con el objeto de entender mejor los mecanismos de señalización que operan en este parásito.

II- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar los cambios del calcio intracelular en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en respuesta al estímulo de la fibronectina y analizar las posibles vías de transducción de señales implicadas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Medir la concentración de calcio intracelular en trofozoítos de *E. histolytica* con y sin el estímulo de fibronectina.
- Conocer la relación entre el aumento de calcio intracelular en trofozoítos estimulados con diferentes concentraciones de fibronectina.
- Medir los cambios en la concentración de calcio intracelular causados por diferentes drogas que alteran la homeostasis del Ca^{2+} y analizar su efecto en relación al estímulo de fibronectina.

III.- MATERIALES Y METODOS.

A) CULTIVO CELULAR: Se utilizaron trofozoítos de *E.histolytica* cepa HMI-IMSS, crecidos axénicamente en medio TYI-S-33 a 37⁰C, según Diamond y cols. (1978). Las células se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (48 h), se procedió a lavarlas con PBS 1X para eliminar el medio de cultivo y resuspenderlas en diferentes amortiguadores según el experimento en turno.

1.- Composición del medio de cultivo TYI-S-33.- El medio de cultivo axénico BIS-33 descrito originalmente por Diamond en 1978, fué modificado como se menciona a continuación: El Biosate se sustituyó por Biotriptasa (Bioxon, México) y el medio se preparó de la siguiente manera: En 750 ml de agua desionizada (conductividad menor a 0.1 Mhos), se disolvieron 30 g de Biotriptasa, 10 g de dextrosa, 2 g de NaCl, 0.1 g de KH₂PO₄, 1 g de L-cisteína, 0.2 g de ácido ascórbico y 0.0236 g de citrato férrico; se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1N y se aforó a 1 l. Posteriormente se prefiltro en papel Whatman 541 y 40, para después ser filtrada con una membrana de acetato de celulosa 0.45 µm (Millipore). La solución se esterilizó 15 min. a 120⁰C. El complemento del medio se llevó a cabo con suero de bovino inactivado y vitaminado; para inactivar el suero, se colocó en un baño de agua a 65⁰C durante 30 min agitando suavemente y de manera constante. A cada 150 ml de suero inactivado, se le añadieron 30 ml de solución de una mezcla de vitaminas Tween-80 (In vitro S.A.) preparadas según Diamond. Finalmente por

cada 1000 ml de este medio llamado TYI, se le añadieron 180 ml del complemento del medio, obteniéndose así el medio completo.

B) OBTENCION DE LA FIBRONECTINA PLASMATICA HUMANA: La FN que se utilizó se obtuvo de plasma humano, al que se le añadió PMSF 0.1 mM y se guardó a -20°C hasta su uso. Para iniciar su purificación, el plasma se descongeló en baño María y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se diluyó 1:2 en PBS 1X conteniendo PMSF 0.1 mM y se pasó por una columna de gelatina-sefarosa (preequilibrada con PBS pH 7.5). Posteriormente la columna fue lavada con PBS 1X hasta que no se detectaron proteínas por absorbancia a 280 nm saliendo por la columna y posteriormente con urea 1M en PBS. La FN se eluyó entonces con PBS 1X pH 7.5 conteniendo urea 4M y se colectaron fracciones de 4 ml. Para el cálculo de la concentración de fibronectina, se consideró un coeficiente de extinción de 1.28 a 280 nm para 1 mg/ml (Pierschbacher y cols.1981). Esta FN se guardó a -70°C y antes de utilizarla se dializó contra PBS 1X para eluir la urea.

C) CARGADO DE TROFOZOITOS CON FURA2-AM Y MEDICION DE CALCIO INTRACELULAR.

1.- Soluciones.

a) **Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS).** Se disolvieron 6.5 g NaCl (Merck), 2.8 g K_2HPO_4 dibásico (Baker), 0.5 g KH_2PO_4 monobásico (Baker) en 900 ml de agua desionizada, se llevó a pH 7.4 y finalmente se aforó a 1 l.

b) **Solución de cargado.** NaCl 150 mM (Merck), KCl 4 mM (Merck), $MgCl_2$ 1 mM (Merck), $CaCl_2$ 1 mM (Baker), BSA 1 mg/ml (Sigma), dextrosa 10 mM (Gibco BRL), HEPES 20 mM pH 7.4 (Sigma). Se preparó con agua desionizada con conductividad menor a 0.5 Mhos y pasada por una columna Chellex 100 (BIO-RAD), para eliminar todos los iones divalentes. La solución se almacenó en tubos de plástico a $-20^{\circ}C$.

c) **Solución de FURA2-AM 1 mM.** A un vial de 50 μg de FURA2-AM (Molecular Probes, Inc.) se le añadieron 49 μl de DMSO (SIGMA) y 1 μl de pluronic al 1%, (Molecular Probes, Inc.) y se guardó en congelación a $-20^{\circ}C$.

d) **Amortiguador salino de fosfatos (PBS) libre de calcio.** Se preparó igual al punto a, pero utilizando agua desionizada pasada por una columna Chellex 100 (BIO-RAD) y se almacenó a $4^{\circ}C$.

e) **Solución A.** HEPES 20 mM a pH 7.4, KCl 4 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, NaCl 150 mM. Se preparó con agua desionizada pasada por una columna Chellex 100.

f) Solución B. HEPES 20 mM a pH 7.4, KCl 4 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM. Se preparó con agua desionizada pasada por una columna Chellex 100.

g) Soluciones madre de los compuestos que se utilizaron. Tritón X-100 10% (Schwarz/Mann Biotech), EGTA 567 mM (SIGMA Chemical Company), BAPTA/AM 2.5 mM (Molecular Probes, Inc.), Thapsigargina 25 mM (SIGMA Chemical Company), Ionomicina 1 mM (SIGMA Chemical Company), FURA2-AM 1 mM (Molecular Probes, Inc.).

2) Aparatos.

a) Espectrómetro de luminiscencia Modelo LS-50B de Perkin Elmer.

b) Centrifuga Beckman AcuSpin FR.

c) Potenciometro Beckman 40

3) Cargado de trofozoítos de *E. histolytica* con FURA2-AM.

La monocapa de trofozoítos (8×10^6 células) se resuspendió por agitación vigorosa con 50 ml de PBS 1X a 37°C. Se recuperó el paquete celular por centrifugación (Beckman AcuSpin FR) a 2,000 rpm durante 4 min. Se realizaron dos lavados con PBS libre de calcio bajo las mismas condiciones.

El paquete celular se resuspendió en 1 ml de solución de cargado y se agregó la solución FURA2-AM, para tener una concentración final de 20 µM. Se dejó incubando durante 1 hora a 37°C en obscuridad.

Las células se lavaron 2 veces con 30 ml de PBS libre de calcio, centrifugandolas en cada lavado durante 3 min a 2,000 rpm y recuperando el paquete celular. Este se resuspendió en 1 ml de solución A y se mantuvo en obscuridad a 37°C hasta la cuantificación del calcio intracelular, obteniéndose así la suspensión celular.

Nota: En el procedimiento de marcaje de los trofozoítos se debe trabajar a baja luz ya que el FURA2-AM es un indicador fotosensible.

4) Medición de calcio intracelular en trofozoítos de *E. histolytica*.

En una cubeta de espectrómetro, se transfirieron 2 ml de solución A o B según el experimento, junto con 50 μ l de suspensión celular (4×10^5 células). Posteriormente se añadió la FN (60 μ g/ml) y/o las drogas que se probaron: Ionomicina (un ionóforo del ion Ca^{2+}), BAPTA-AM (un quelante de Ca^{2+} intracelular), EGTA (un quelante de Ca^{2+} extracelular) y Tapsigargina (un inhibidor de la ATPasa del retículo endoplasmático).

Para medir la fluorescencia máxima se utilizó Tritón X-100 (0.5%), mientras que para conocer la fluorescencia mínima se utilizó EGTA (14.17 mM).

Para evaluar la autofluorescencia se utilizaron células sin cargar con FURA2-AM, restando este valor a cada uno de los puntos medidos.

La concentración de calcio intracelular se calculó por la siguiente fórmula, descrita por Grynkiewicz (1985).

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \frac{(R_t - R_{min})}{(R_{max} - R_t)} \times R$$

Donde:

$[Ca^{2+}]_i$ = Concentración de calcio intracelular.

K_d = Constante de disociación del complejo FURA2- Ca^{2+} (224 nM).

R_t = Valor experimental que se quiere conocer.

R_{min} = Fluorescencia mínima.

R_{max} = Fluorescencia máxima.

R = Rendimiento cuántico de fluorescencia (0.5).

IV.- RESULTADOS

A) Efecto de la FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.

Para establecer la concentración óptima de FURA2-AM en amibas, se realizó una curva de fluorescencia a diferentes concentraciones del indicador. En base a los resultados obtenidos de ésta curva, se decidió cargar los trofozoítos con 20 μ M del indicador, ya que su valor permaneció dentro de la línea estacionaria de fluorescencia (Fig. 1). En experimentos de adhesión, previos a este trabajo, se había ya estimado que la concentración óptima de la FN para producir respuesta sobre la adhesión en trofozoítos era de 30 μ g/ml, por lo que fué la concentración utilizada en este experimento inicial. Se tomó como control la concentración de calcio intracelular que presentaron los trofozoítos antes de ser estimulados con FN. La $[Ca^{2+}]_i$ basal se mantuvo estable por varios minutos. De varios experimentos se calculó una concentración basal promedio de 175 \pm 10 nM. En la Figura 2, se puede observar que los trofozoítos sin el estímulo de FN, mostraron una $[Ca^{2+}]_i$ basal de 168 nM. Al ser estimulados con la proteína sufren un aumento paulatino en la concentración del ion, alcanzando un valor de 342 nM a los 15 min. La concentración basal de $[Ca^{2+}]_i$ encontrada en amibas, es muy similar a la encontrada en otras células eucariontas (Thastrup y cols., 1990).

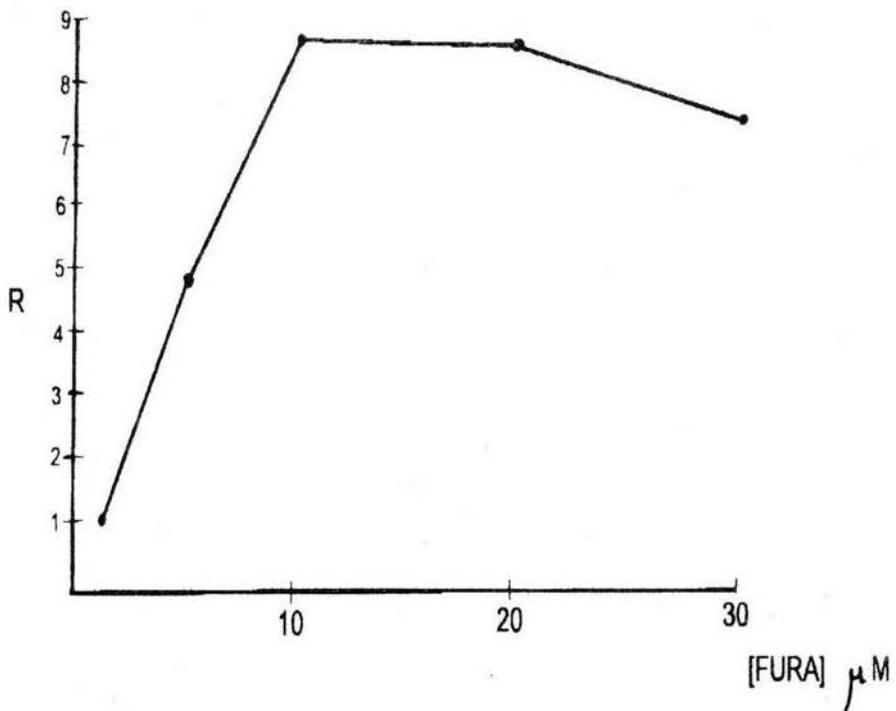


Figura 1. Curva de dosis-respuesta de fluorescencia a diferentes concentraciones de FURA2-AM en trofozoitos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representan trofozoitos cargados con el indicador FURA2-AM a concentraciones de 5, 10, 20 y 30 μM donde R representa la relación de la intensidad de fluorescencia del indicador a 340 y 380 nm. Se observa un pico máximo de respuesta a 10 μM y un estado estacionario en las dos siguientes concentraciones del indicador. La gráfica es representativa de un experimento.

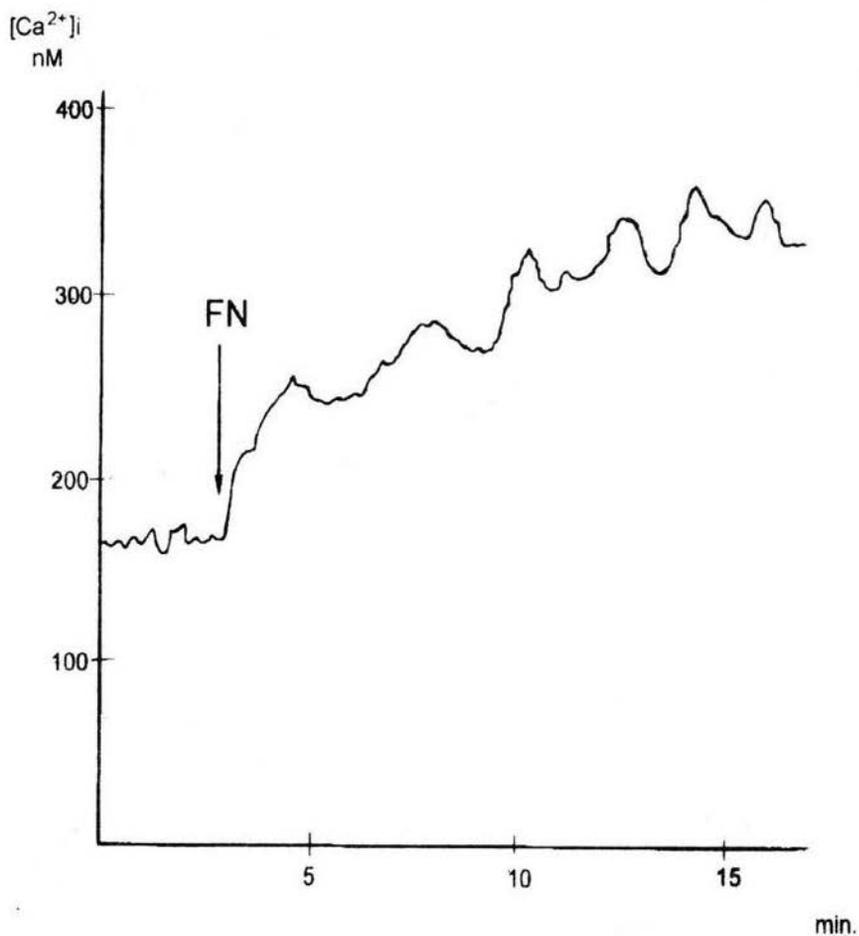


Figura 2. Efecto de la FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoitos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la cuantificación de la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoitos cargados con el indicador FURA2-AM [20 μ M], presentándose una concentración inicial de 168 nM. Después de tres minutos, los trofozoitos fueron estimulados con FN [30 μ g/ml], obteniéndose una $[Ca^{2+}]_i$ de 340 nM a los 15 minutos. La gráfica es representativa de 6 experimentos.

B) Curva de dosis-respuesta del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.

Las diferentes concentraciones de FN que se usaron fueron de 5, 10, 20, 30, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Como se muestra en la Figura 3, la $[Ca^{2+}]_i$ aumentó de condiciones basales, 175 \pm 10 nM a 427 \pm 20 nM con concentraciones de FN tan bajas como 5 $\mu\text{g/ml}$, alcanzando una meseta a 30 $\mu\text{g/ml}$. Concentraciones mayores de FN no causaron cambios significativos en la $[Ca^{2+}]_i$, sin embargo, después de 80 $\mu\text{g/ml}$, ésta empezó a disminuir gradualmente. A partir de este experimento se utilizó a la FN a concentraciones de 60 $\mu\text{g/ml}$.

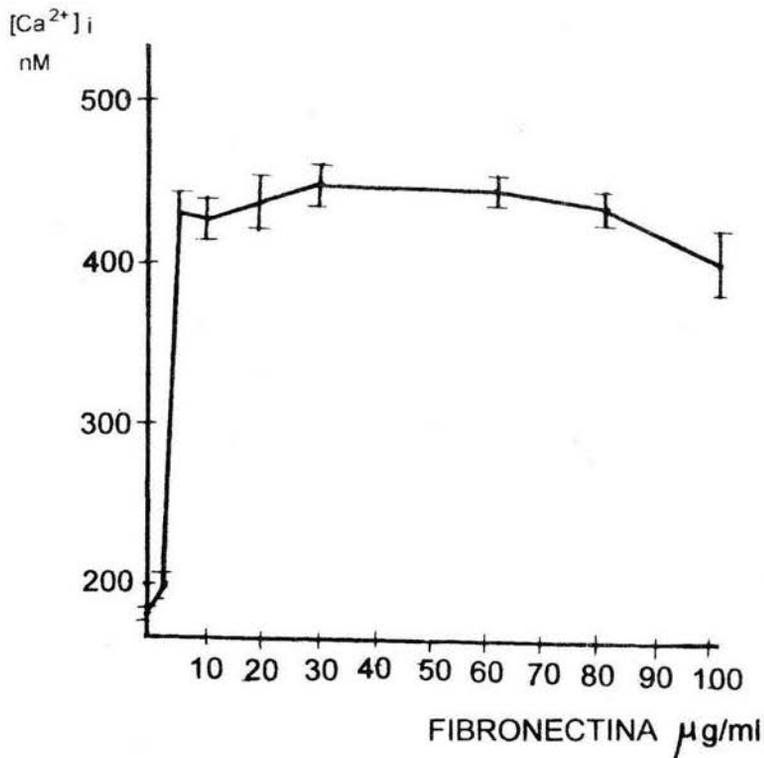


Figura 3. Curva de dosis-respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a diferentes concentraciones de FN en trofozoitos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en trofozoitos cargados con el indicador FURA2-AM [20 μM], estimulados con diferentes concentraciones de FN, siendo éstas de 5, 10, 20, 30, 60, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Se observa que a concentraciones tan bajas como 5 $\mu\text{g/ml}$ logra un valor de 427 nM, alcanzando una meseta a 30 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo después de 80 $\mu\text{g/ml}$ la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ empieza a disminuir. Los resultados son expresados como la media \pm desviación estandar (D.E.) de 6 experimentos.

C) Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ causado por diferentes drogas.

Una vez que se probó que la FN induce un aumento en la concentración de calcio intracelular y que se estableció la concentración óptima, se diseñaron experimentos con el fin de conocer si este aumento de calcio era debido a: 1) la entrada de calcio externo a través de la membrana plasmática, 2) por la liberación de calcio de los reservorios internos o 3) por ambos mecanismos. Para contestar esto y ya que nada se había establecido acerca de la regulación del calcio en trofozoítos de *E. histolytica*, se usaron diferentes drogas que afectan al calcio citoplasmático en varios tipos de células eucariontas.

Como se observa en la Figura 4, la adición de 60 $\mu\text{g/ml}$ de FN en trofozoítos en la solución A (con calcio externo), produjo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de 165 a 450 nM. La adición de Ionomicina a los 15 min, produjo un incremento muy rápido en la $[Ca^{2+}]_i$ a niveles de 1,500 nM.

Por otro lado, los trofozoítos en la solución B (carente de calcio externo), no mostraron un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por FN, como era de esperarse, la adición de Ionomicina no cambió los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4).

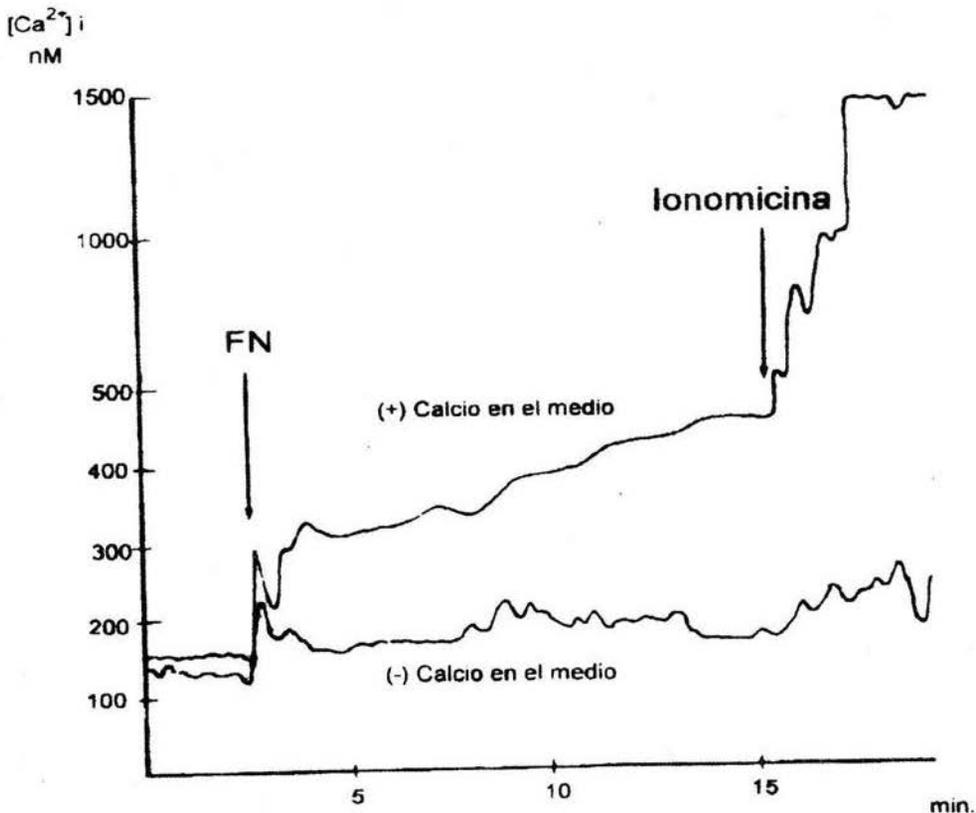


Figura 4. Efecto de FN e Ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos cargados con el indicador FURA2-AM [20 μ M], colocados en un medio con (+) y sin (-) calcio externo. La adición de FN [60 μ g/ml], produjo un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ de 165 a 450 nM; posteriormente la adición de Ionomicina [25 μ M] aumentó los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ a 1,500 nM, todo esto en un medio con calcio externo. Sin embargo, en un medio sin calcio externo, no se observa un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por fibronectina, ni por Ionomicina. La gráfica es representativa de 4 experimentos.

Para evaluar mejor si el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por FN era debido a la entrada de calcio extracelular, los trofozoítos se trataron con dos quelantes de calcio, BAPTA-AM y EGTA. Cuando las células se trataron con BAPTA-AM [100 μ M] se observó una acentuada disminución del calcio citoplasmático que baja a niveles de alrededor de 70 nM. En estas condiciones las células perdieron calcio libre citoplásmico que fué quelado por el BAPTA. Estas células con un nivel bajo de calcio interno no responden eficientemente al estímulo de FN y solamente mostraron una ligera estimulación alrededor de 30 nM (Fig. 5). En otro experimento similar al anterior, utilizando Ionomicina en lugar de FN (Fig. 6), se observó el mismo comportamiento con una estimulación cercana a 60 nM. Las células tratadas con EGTA [5 mM], que son células mantenidas en ausencia de calcio externo, perdieron calcio interno y la concentración del ion bajó a niveles de alrededor de 70 nM. Estas células fueron incapaces de reaccionar al estímulo de FN (Fig. 7).

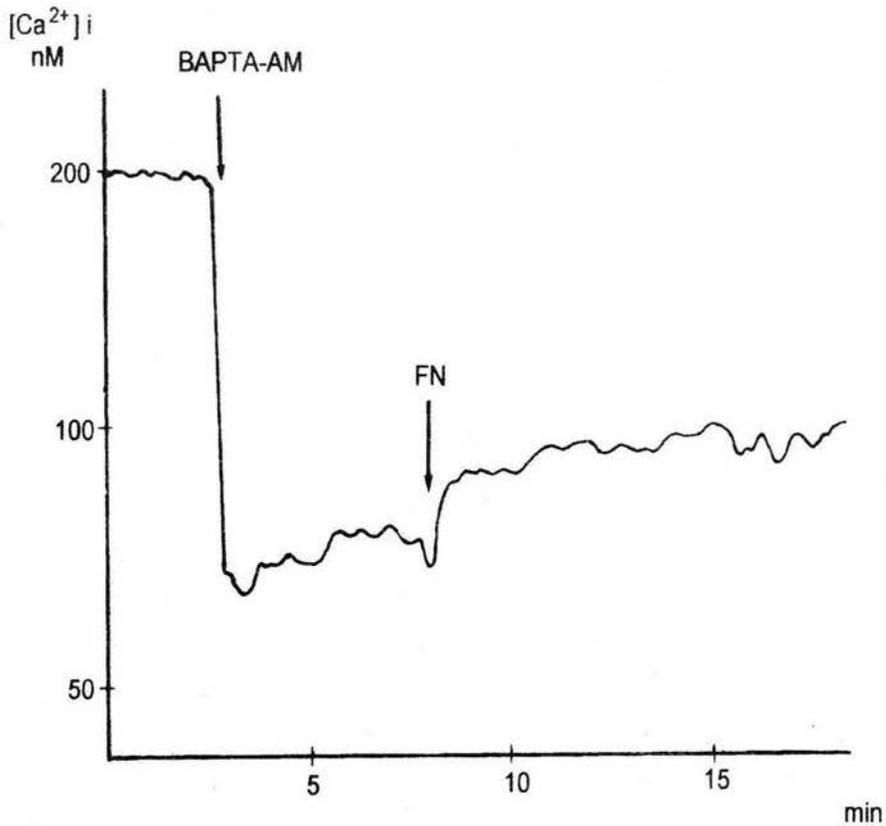


Figura 5. Efecto de BAPTA-AM y FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoitos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoitos cargados con el indicador FURA2-AM $[20\mu M]$ puestos en un medio con calcio externo. Después de 3 minutos se añadió BAPTA-AM $[100\mu M]$, bajando los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ alrededor de 70 nM, posteriormente con FN $[60\mu g/ml]$, las células no respondieron eficientemente mostrando solamente un aumento de 30nM. La gráfica es representativa de 4 experimentos.

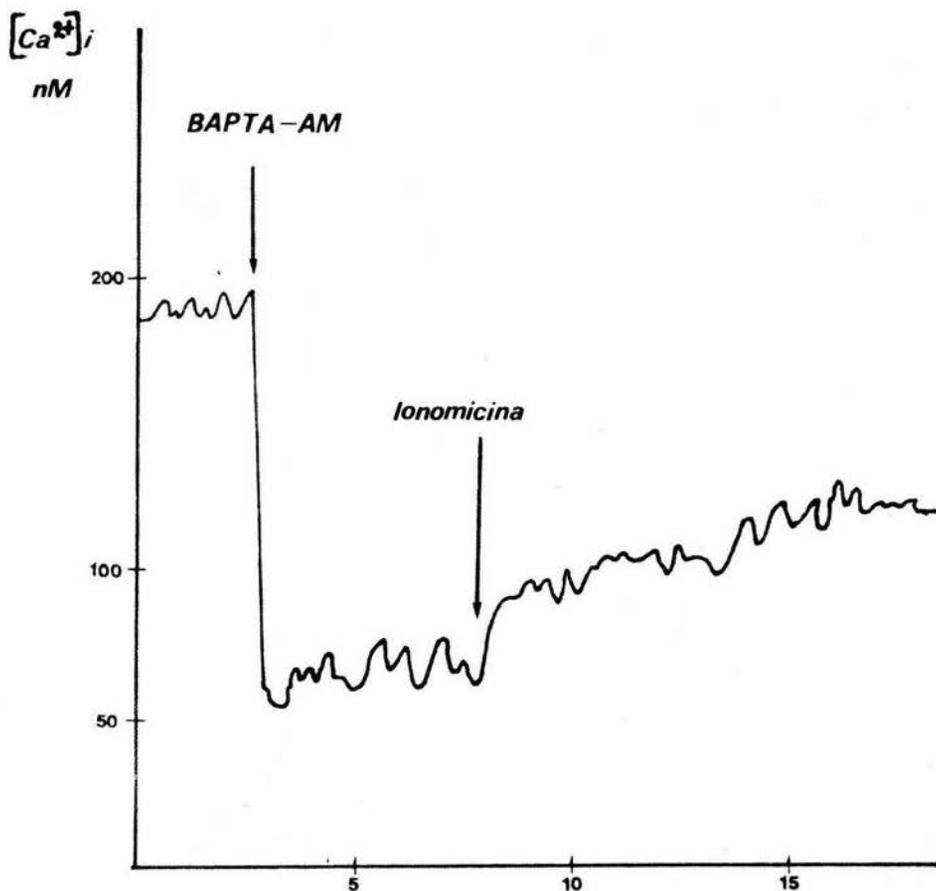


Figura 6. Efecto de BAPTA-AM e Ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos cargados con el indicador FURA2-AM, puestos en medio con calcio externo. Después de 2 minutos se añadió BAPTA-AM [100 μ M] observándose una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ alrededor de 60 nM, posteriormente la adición de Ionomicina [25 μ M], se observa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ de 60nM. La gráfica es representativa de 4 experimentos.

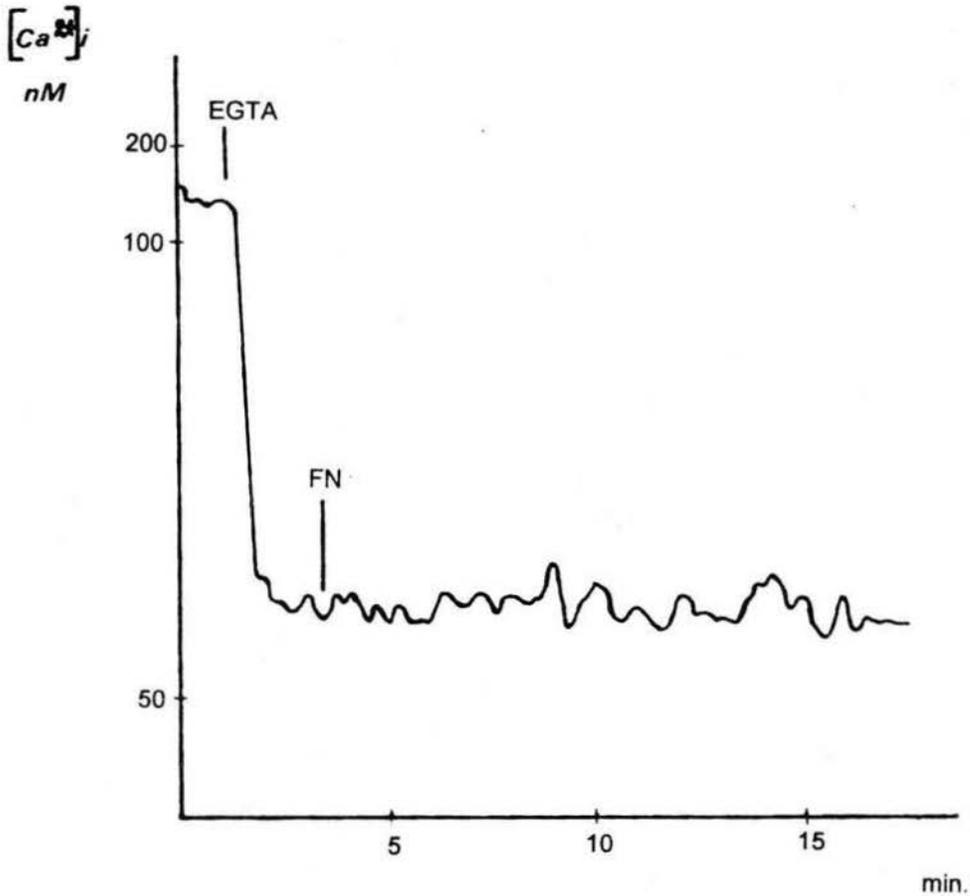


Figura 7. Efecto de EGTA y FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos cargados con el indicador FURA2-AM [20 μ M] colocados en un medio con calcio externo. Después de 2 minutos se añadió EGTA [5 mM], bajando los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ alrededor de 70 nM. Posteriormente con la adición de FN [60 μ g/ml], las células fueron incapaces de reaccionar. La gráfica es representativa de 4 experimentos.

Para estudiar la posible participación de calcio liberado de los reservorios, lo cual no estaba completamente descartado ya que hay una ligera respuesta en presencia de BAPTA, se depletaron estos reservorios con Tapsigargina (TG) [50 nM]. Como se ve (Fig. 8), la TG indujo un incremento transitorio del calcio intracelular de 178 nM, a un valor promedio de 350 nM que duró casi 10 min en células mantenidas en presencia de 1 mM de calcio externo (solucion A). La FN añadida a estas células produjo un aumento adicional de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta 400 nM. Cuando la TG se añadió a las células en un medio depletado de calcio externo (solucion B), el aumento transitorio no se observó. La adición posterior de FN no modificó los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 8).

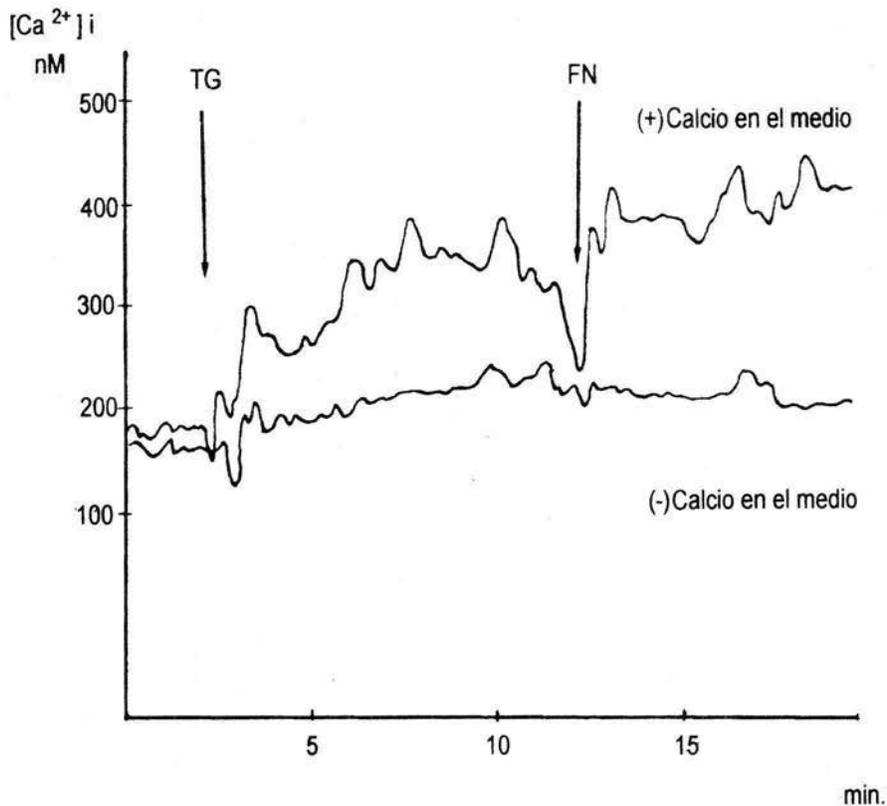


Figura 8. Efecto de TG y FN sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.

En la gráfica se representa la $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos cargados con el indicador FURA2-AM $[20\mu M]$, puestos en un medio con (+) y sin (-) calcio externo. La adición de TG $[50\text{ nM}]$ produjo un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ de 178 nM a un valor promedio de 350 nM en un medio con calcio externo. Posteriormente la adición de FN produjo un aumento adicional en la $[Ca^{2+}]_i$ hasta 400nM. Sin embargo, en células tratadas en un medio sin calcio, no se observó ningún cambio significativo en los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$.

V.- DISCUSION.

En este trabajo se analizó cómo la unión de los trofozoítos a FN induce modificaciones en la concentración del calcio citosólico, así como los posibles mecanismos que los modulan.

Se seleccionaron condiciones ya reportadas para cargar amibas con indicadores de calcio (Ravdin y cols., 1988) y se realizaron mediciones directas de la concentración de calcio intracelular en amibas siguiendo los cambios en un espectrómetro de luminiscencia.

Se encontró que la FN (30 mg/ml), cuando es añadida a los trofozoítos, induce un rápido aumento en la concentración del calcio intracelular. Posteriormente se realizó una curva de dosis respuesta del aumento del calcio intracelular en trofozoítos estimulados con diferentes concentraciones de FN, donde se observó una meseta a partir de 30 mg/ml de FN y se encontró que concentraciones mayores de FN (80 mg/ml) no indujeron modificaciones significativas, quizá porque la proteína a concentraciones altas puede agregarse e interferir con el proceso de medición. En resultados simultáneos, la adhesión de trofozoítos a substratos de FN siguió una cinética similar, es decir el máximo de adhesión se observó a 30 mg/ml de FN y concentraciones mayores no tuvieron mayor efecto sobre la adhesión (Carbajal y cols., 1996).

Una vez que se comprobó que la FN incrementa la concentración de calcio intracelular y que este aumento se observa a concentraciones tan bajas como 5 mg/ml, se estudió si era debido a la entrada de calcio extracelular. La entrada a través de canales de calcio en la membrana plasmática, como se reporta en células nerviosas (Alberts y cols., 1994), es tal vez el mecanismo de entrada aunque no se conoce nada sobre este aspecto en las amibas. Por otro lado, la liberación de calcio del retículo endoplásmico, por lo cual también se podría obtener un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, podría ser el mecanismo operante inducido por FN. Esta vía es posible ya que FN produce un aumento en los niveles de IP_3 , el cual al unirse a un receptor en el retículo endoplásmico provoca la salida de Ca^{2+} hacia el citoplasma. Por esta razón era de suponer que, por lo menos, el aumento observado en la $[Ca^{2+}]_i$ se debiera parcialmente a la salida de los reservorios.

Para determinar si el aumento del calcio intracelular se debía también a la entrada de calcio externo, se utilizó Ionomicina. Este ionóforo produjo un aumento muy significativo del calcio intracelular cuando las células se mantuvieron en un medio con calcio externo. También se utilizó el quelante intracelular de calcio BAPTA-AM, el cual produjo una disminución significativa en los niveles de calcio intracelular, mostrando un ligero aumento al añadirse FN quizá debido a la entrada de calcio externo propiciado por esta proteína. El aumento ligero podría indicar que el Ca^{2+} que entra es quelado por BAPTA. Esto se comprobó usando BAPTA e Ionomicina y se vio que el Ca^{2+} que entra por el ionoforo es quelado por BAPTA de

modo que el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ es muy lento. El efecto de estas drogas, Ionomicina y EGTA, puede ser relacionado con la alta y baja adhesión, respectivamente, de las amibas en medio con calcio, lo cual indicaría que ciertos niveles de $[Ca^{2+}]_i$ son necesarios para la adhesión y para inducir los cambios en el citoesqueleto que propician la formación de placas (Carbajal y cols., 1996).

Por otro lado también se mostró que la eliminación de calcio extracelular, por el uso de soluciones sin calcio o de quelantes de calcio externo (EGTA), bloqueó totalmente el incremento de calcio intracelular inducido por FN. Estos resultados sugieren que la entrada de calcio externo es un importante mecanismo en la señalización inducida por FN. Desafortunadamente, nada se conoce todavía acerca del transporte o de los canales de calcio en la membrana plasmática de las amibas, o los mecanismos de operación que pudieran ayudar a entender esta parte del proceso.

Para probar si el calcio es también liberado de reservorios internos por el efecto de la unión de la FN, se usó TG, una droga que produce la liberación de calcio del retículo endoplásmico ya que bloquea la ATPasa de calcio (Jones y Sharpe, 1994). El aumento transitorio de calcio intracelular producido por TG fue similar a lo que se observa en otras células (Jones y Sharpe, 1994) e indicó que hay liberación de calcio interno causado por la droga. La adición de FN indujo un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que indica que ésta induce influjo de calcio externo, apoyando la hipótesis de que el calcio extracelular es crítico para el efecto de la FN sobre los niveles de calcio intracelular. El aumento de calcio intracelular producido por TG es abolido en ausencia de calcio

externo, sugiriendo que el calcio citosólico rápidamente sale de la célula, posiblemente a través de canales de calcio presentes en la membrana plasmática. Todo esto significa que la liberación de Ca^{2+} de los reservorios, no juega un papel significativo en el aumento de la concentración del ion debido al estímulo de FN, apoyando la idea de que el aumento observado es mayoritariamente dependiente del influjo de calcio externo. Estos resultados nuevamente se correlacionan con la adhesión de los trofozoitos a FN, ya que esta droga aumenta ligeramente (10%) la adhesión de las amibas a FN (Carbajal y cols., 1996).

El modelo de acción de IP_3 presume que esta molécula, generada en la parte interna de la membrana plasmática, libera Ca^{2+} de los reservorios ya que éstos presentan receptores para IP_3 . Sin embargo, en varias líneas celulares se ha encontrado que existen receptores de IP_3 presentes en la membrana plasmática y ligados al citoesqueleto, permitiendo la entrada de calcio externo (Kraus-Friedman, 1994). Así, el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dado por FN en los trofozoitos quizá se deba a un sistema similar, actuando estos receptores como canales de Ca^{2+} .

Los resultados del presente estudio muestran que los trofozoitos de *E. histolytica* tienen mecanismos para regular $[\text{Ca}^{2+}]_i$, similares a los encontrados en otras células eucariontas. El Ca^{2+} se comporta como un mensajero intracelular, cuando se activan ciertas vías de señalización por la interacción de FN con un receptor en la superficie de los trofozoitos. Los aumentos en los niveles de Ca^{2+} a su vez regulan y/o activan a otras proteínas, algunas de las cuales participan en rearrreglos del

citoesqueleto que facilitan la adhesión al sustrato. Entender el papel del calcio en la interacción entre las amibas y la matriz extracelular "in vitro", podría dar la pauta sobre los mecanismos de señalización "in vivo" y de las respuestas del parásito a modificaciones y señales en el huésped. A futuro, este tipo de estudios permitirá encontrar niveles en donde interrumpir la interacción huésped-parásito y detener así la invasión de los tejidos del huésped.

VI.- CONCLUSIONES.

- La FN produce un sostenido aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en trofozoítos de *E. histolytica*.
- El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ producido por la FN se observa desde concentraciones de 5 mg/ml. El efecto de las diferentes concentraciones de FN sobre el aumento en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ indica que éste se satura a concentraciones de 30-60 mg/ml
- Experimentos hechos con quelantes de calcio, tanto intracelulares (BAPTA-AM) como extracelulares (EGTA), sugieren que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el estímulo de FN se debe principalmente al influjo de calcio externo.
- El tratamiento de trofozoítos con Ionomicina después del estímulo de FN en presencia y ausencia de calcio externo, también indica que el aumento del Ca^{2+} intracelular se debe a la entrada de calcio externo.

- La TG, una droga utilizada para depletar calcio de los reservorios internos, produce un incremento transitorio de $[Ca^{2+}]_i$. La adición posterior de FN en presencia de Ca^{2+} externo, aumenta ligeramente la $[Ca^{2+}]_i$ mientras que en su ausencia no se observa este aumento. Estas observaciones apoyan la idea que el influjo del calcio extracelular sea el efecto mayoritario y responsable del aumento observado en la $[Ca^{2+}]_i$.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Albach R., Booden T., Boolayangoor P. and Downing S. (1977). *Entamoeba histolytica*: autoradiografic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp. Parasitol.* **42**:248-259.
- 2.- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York, United States of America.
- 3.- Bruckner D. (1992). Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews.* **54**:356-369.
- 4.- Cano Mancera R. and López Revilla R. (1987). Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. *Parasitol. Res.* **74**:18.
- 5.- Carbajal M.E., Rodríguez M., Reyes J.L. y Meza I. (1994). *Entamoeba histolytica*: Regulación y modulación del pH intracelular en su interacción con fibronectina. Resumen Congreso Nal. C. Fisiológicas. Merida, Yucatán.
- 6.- Carbajal M.E., Mannig-Cela R., Piña A., Franco E. y Meza I. (1996). Fibronectin-induced intracellular calcium rise in *Entamoeba histolytica* trophozoites: Effect on adhesion and the actin cytoskeleton. *Exp. Parasitol.* en prensa.
- 7.- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore D., (1990). *Molecular Cell Biology*. Second edition. Scientific American Books. United States of America

- 8.- Diamond L.S., Harlow D.R. and Cunnick C.C. (1978). A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**:431-432.
- 9.- Gryniewicz G., Poenie M. and Tsien R. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**:3440-3450.
- 10.- Guillén N. 1992. Cell signalling and motility in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Today* **9**:10
- 11.- Guarner V. (1994). Historia de la amibiasis. En Kretschmer R.R. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- 12.- Gutiérrez G. y Muñoz O. (1994). Epidemiología de la amibiasis. En Kretschmer R.R. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- 13.- Hasegawa M., Hashimoto T., Adachi J., Iwabe N. and Miyata T. (1993). Early branchings in the evolution of eukaryotes: Ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.* **36**:380-388.
- 14.- Hynes R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell.* **69**:11-25.
- 15.- Jones K. and Sharpe G. (1994). Thapsigargin raises intracellular free calcium levels in human keratinocytes and inhibits the coordinated expression of differentiation markers. *Exp. Cell Res.* **210**:71-76.

- 16.- Juliano R.L. and Haskill S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* **120**(3):577-585.
- 17.- Levine N., Corliss J., Cox F., Deroux G., Leedale g., Loeblich A., Lom J. and Wallace F. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**(1):37-58.
- 18.- López Revilla R. and Said Fernández S. (1988). *Entamoeba histolytica* hemolytic activity of trophozoites homogenates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**:209.
- 19.- Lushbaugh W., Kairalla A., Cantey J., Hofbauer A. and Pittman F. (1979). Isolation of a cytotoxin enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **139**:9.
- 20.- Manning, R. y Meza, I. (1995). Señales celulares y citoesqueleto en *Entamoeba histolytica*: reguladores de motilidad e invasión. *Avance y Perspectiva CINVESTAV.* **14**:109-113
- 21.- Martínez-Palomo, A. (1982). *The Biology of Entamoeba histolytica*. John Wiley & Sons. Chichester.
- 22.- Meza, I. (1992). *Entamoeba histolytica*: Phylogenetic Considerations. A Review. *Arch. Med. Res.* **23**, **2**:1-5.
- 23.- Meza, I.; Sabanero, M.; Cázares, F. y Bryan, J. (1983). Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **258**(6):3936-3941.

- 24.- Meza, I.; Cázares, F.; Rosales-Encina, J.; Talamás-Rohana, P. y Rojkind, M. (1987). Use of antibodies to characterize a 220-kDa surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**:5.
- 25.- Meza, I. y Franco, E. (1988). Interaction between pathogenic amebas and extracellular matrix proteins. II, Laminin. *J. Cell.Biol.* **107**:799a.
- 26.- Muñoz, M.; Calderón, J. y Rojkind, M. 1982. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **155**:42.
- 27.- Ng-Sikorski, J.; Andersson, R.; Patarroyo, M. y Andersson, T. (1991). Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp. Cell. Res.* **195**:504-508.
- 28.- Kraus-Friedmann N. 1994. Views and Reviews Signal transduction and calcium: A suggested role for the cytoskeleton in Inositol 1,4,5-triphosphate action. *Cell Motility and cytoskeleton.* **28**:279-284.
- 29.- Pérez-Tamayo, R.; Becker, I.; Montfort, I. y Pérez-Montfort, R. (1994). Patobiología de la amibiasis. En Kretschmer, R.R. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- 30.- Petri, W.A.; Clark, C.G.; Braga, L.L. y Mann, B.J. (1993). International Seminar on Amebiasis. *Parasitol. Today.* **9**(3):73.
- 31.- Piershbacher, M.D.; Hayman, E.G. y Ruoslathi, E. 1981. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell.* **26**:259

- 32.- Rasmussen, H. (1989). El calcio, mensajero intracelular. *Investigacion y Ciencia*. **159**:46-53.
- 33.- Ravdin, J.; Murphy, C.; Salata, R.; Guerrant, R. y Hewlett, E. (1985). N-acetyl-D-Galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica* I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J. Infect. Dis.* **151**:804-815.
- 34.- Ravdin, J.I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contac-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* **8**:247-260.
- 35.- Ravdin, J.; Moreau, F.; Sullivan, S.; Petri, W. y Mandell, G. (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytosolic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* **56**:1505-1512.
- 36.- Romer, L.H.; Burrige, K. y Turner, C.E. (1992) Signaling between the extracellular matrix and the cytoskeleton: Tyrosine phosphorylation and focal adhesion assembly. *Cold Spring Harb. Symp. Quanty. Bio.* **LVII**:193-202.
- 37.- Rosales-Encina, J.; Meza, I.; López-De-León, A.; Talamas-Rohana, P. y Rojkind. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**:5.
- 38.- Rosales-Encina, J.; Campos-Salazar, M. y Rojkind, M. (1992). *Entamoeba histolytica* collagen binding proteins. *Arch. Med. Res.* **23**:109-113.
- 39.- Sabanero, M. y Meza, I. 1982. Localizacion de actina en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HMI. *Arch. Inv. Med. México.* **13**. supl.3:37.

- 40.- Santiago, A.; Carbajal, M. E.; Benítez M.E. and Meza, I. (1994). *Entamoeba histolytica*: PKC Transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Exp. Parasitol.* **79**:436.
- 41.- Schwartz, M.A. y Lechene, C. 1992. Adhesion is required for protein kinase C-dependent activation of the Na⁺/H⁺ antiporter by platelet-derived growth factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**:6138-6141.
- 42.- Seftor, R.E.B. (1992). Role of avb3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**:1557-1561.
- 43.- Treviño, N. (1994). Espectro clínico de la amibiasis en adultos. En Kretshmer, R.R. Amibiasis. Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- 44.- Talamás-Rohana, P. y Meza, I. (1988). Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeletal organization. *J. Cell. Biol.* **106**:1787.
- 45.- Talamás-Rohana, P.; Rosales-Encina, L.; Gutierrez, M. y Hernández, V. (1992). Identification and partial purification of an *Entamoeba histolytica* membrane protein that binds fibronectin. *Arch. Med. Res.* **23**(2):119-123.
- 46.- Thastrup, O.; Cullen, P.; Drobak, B.; Hanley, M. y Dawson, A. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:2460-2470.

- 47.- Vázquez-Prado, J. y Meza, I. (1992). Fibronectin "receptor" in *Entamoeba histolytica*: Purification and association with the cytoskeleton. Arch. Med. Res. **23**(2):125-128.
- 48.- Vázquez, J.; Franco, E.; Reyes, G. y Meza, I. (1995). Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. Cell Motility and the Cytoskeleton. **32**:37-45.
- 49.- Werb, Z.; Tremble, P.M.; Behrendtsen, O.; Crowley, E. y Damsky, C.H. (1989). Signaling transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. J. Cell. Biol. **109**:877-889.
- 50.- Young, J.; Young, T.; Lu, L.; Unkelese, J. y Cohn, Z. (1982). Characterization of a membrane pore forming protein from *Entamoeba histolytica*. J.Biol. Chem. **267**:12042-12048.