

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**Proteína cinasa C en *Entamoeba histolytica*:  
Participación en la transducción de señal  
inducida por fibronectina**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**

PRESENTA  
Alicia Santiago González

1993



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.

# INDICE

<b>ABREVIATURAS USADAS</b> .....	i
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
Clasificación .....	3
Características Generales .....	3
Patología de la Amibiasis .....	4
Importancia del Citoesqueleto en el Mecanismo de Invasión .....	6
Transducción de Señales .....	6
Mensajeros Intracelulares Implicados en la Regulación del Comportamiento Celular .....	8
Proteína Cinasa C .....	12
Modelos de Activación de PKC .....	13
Citoesqueleto de Actina y PKC .....	16
<b>OBJETIVO</b> .....	18
<b>METAS ESPECIFICAS</b> .....	18
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	19
Cultivo Celular .....	19
Composición del Medio de Cultivo TYI-S-33 .....	19
Soluciones .....	19
Drogas .....	20
Obtención de Fibronectina Plasmática Humana .....	20
Preparación de Fracción Soluble e Insoluble a Tritón-X100 .....	20
Preparación de Extractos Totales .....	21
Determinación de Proteínas .....	21
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS .....	21
Actividad de PKC en Extractos Amibianos .....	22
Tinción del Citoesqueleto de Actina de los Trofozoitos .....	22
Ensayo NBD-Falacidina .....	23
Fosforilación "in vivo" de <i>E. histolytica</i> .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	26
Reorganización del CSK por PMA .....	26
Efecto del PMA en la Polimerización de Actina G .....	26
Actividad de PKC en Extractos de <i>E. histolytica</i> .....	29
Efecto de Varios Estímulos sobre la Fosforilación de Proteínas de <i>E. histolytica</i> .....	33

<b>DISCUSION</b> .....	<b>40</b>
Modulación del CSK de Actina por la PKC .....	<b>41</b>
PKC en <i>E. histolytica</i> .....	<b>44</b>
Fosforilación de Proteínas por Fibronectina y PMA .....	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>50</b>

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

## ABREVIATURAS USADAS

<b>AMPc</b>	monofosfato cíclico de adenosina
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>cpm</b>	cuentas por minuto
<b>D.O.</b>	densidad óptica
<b>EDTA</b>	ácido etilén-diamino-tetra acético
<b>g</b>	gramos
<b>GDP</b>	difosfato de guanosina
<b>GMPc</b>	monofosfato cíclico de guanosina
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>H7</b>	1-5-isoquinolinsulfonil-2metil piperazina
<b>kDa</b>	kilo Daltones
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligramos
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>NEM</b>	N-etil-maleimida
<b>nm</b>	nanómetros
<b>PBS</b>	amortiguador salino de fosfatos
<b>pHMB</b>	para-hidroxi-mercuri-benzoato
<b>PMA</b>	forbol 12-miristato 13-acetato
<b>PMSF</b>	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>μCi</b>	microCuries
<b>μg</b>	microgramos
<b>μl</b>	microlitros
<b>μM</b>	micromolar

## INDICE DE FIGURAS

- Figura No. 1** Actina reorganizada de *E. histolytica* visualizada con faloidina rodaminada.
- Figura No. 2** Efecto del PMA y H7 sobre la polimerización de actina de *E. histolytica*.
- Figura No. 3** Actividad "in vitro" de la PKC de *E. histolytica*.
- Figura No. 4** Efecto del H7 sobre la actividad "in vitro" de la PKC de *E. histolytica*.
- Figura No. 5** Actividad "in vitro" de la PKC de *E. histolytica* en presencia de concentraciones crecientes del péptido inhibidor de la región de pseudosustrato de la PKC.
- Figura No. 6** Efecto del PMA, FN y H7 sobre la fosforilación de proteínas de *E. histolytica*.
- Figura No. 7** Efecto del PMA, FN y H7 sobre la fosforilación de proteínas de la fracción soluble y de citoesqueleto de *E. histolytica*.
- Figura No. 8** Efecto del H7 sobre la fosforilación de proteínas de *E. histolytica* inducida por fibronectina.
- Figura No. 9** Efecto del PMA, FN y H7 sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la fracción de CSK de *E. histolytica*.
- Figura No. 10** Efecto del PMA, FN y H7 sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la fracción soluble de *E. histolytica*.

## RESUMEN

La unión de los trofozoitos del parásito *Entamoeba histolytica* a fibronectina (FN) se lleva a cabo a través de un receptor membranal. La unión induce una reorganización del citoesqueleto de actina para formar placas de adhesión y múltiples bocas endocíticas. El evento intracelular que responde a la señal externa que es la fibronectina y que lleva a este rearrreglo específico de los filamentos de actina, no ha sido caracterizado completamente. Evidencias preliminares indican que la movilización del  $Ca^{++}$  es un factor importante para la adhesión de la amiba a la FN. El calcio es un segundo mensajero que regula el funcionamiento de muchas proteínas en la célula entre las que se incluyen las del citoesqueleto.

En el presente trabajo se muestran datos que indican la participación de una proteína cinasa C (PKC) en la reorganización del citoesqueleto observado en las amibas como respuesta a su adhesión a la fibronectina.

Los ésteres de forbol (PMA), activadores directos de la PKC, provocaron un rearrreglo del citoesqueleto de actina en numerosas bocas endocíticas y placas de adhesión así como un aumento en los niveles de actina-F en las amibas.

La actividad de la PKC presente en la amiba se midió mediante la fosforilación del péptido Ac-MBP, que es un sustrato altamente específico para la PKC. La actividad fue inhibida por un péptido sintético de la región de pseudosustrato de la enzima, así como por H7, inhibidor específico de la PKC. Además, se demostró que en respuesta a la activación de PKC por PMA y por FN, se induce en los trofozoitos un aumento en la fosforilación de proteínas citosólicas y de proteínas de membrana. Esta fosforilación es inhibida por H7.



## INTRODUCCION

*Entamoeba histolytica* es el parásito causante de la amibiasis en los humanos.

Las amibas, en su forma de trofozoito, son células invasoras capaces de penetrar en la mucosa intestinal y producir úlceras y lesiones necróticas principalmente en el hígado (Pérez-Tamayo et al, 1990). La amibiasis se presenta mas frecuentemente en países que carecen de un desarrollo económico y social adecuado, aunque también se presenta en países altamente desarrollados. Dentro de los países con alto índice de infección están: India, México, Egipto, Turquía y China. Este parásito infecta cada año a aproximadamente 500 millones de personas en todo el mundo causando la muerte a unas 50 000 (Guarner, 1990).

La amibiasis es una enfermedad adquirida por la ruta fecal-oral asociada a la contaminación del agua y de los alimentos. En la mayoría de los portadores asintomáticos, *E. histolytica* reside como comensal mientras que en un pequeño porcentaje (portadores sintomáticos), los trofozoitos invaden la mucosa del colon e incluso pueden diseminarse hasta el hígado provocando el absceso hepático amibiano (infección extraintestinal) (Ravdin et al, 1982). La amibiasis puede ser crónica, subaguda y 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. La forma subaguda se presenta como disentería y diarrea. Y por último, la forma aguda con apendicitis y colitis amibiana que tiene un alto índice de mortalidad (Sepúlveda, 1982).

Las primeras manifestaciones de la amibiasis se remontan a muchos años atrás. En 1828, es cuando el médico inglés James Annesley publica dos volúmenes acerca de la naturaleza, causa y tratamiento de varias enfermedades en la India, entre ellas se describe por primera vez la disentería con absceso hepático. En México, hacia fines del siglo XVII, aparecen las primeras referencias acerca del absceso hepático y su

tratamiento. No es sino hasta 1875 cuando Fedor Aleksandrovich Lösh publica un artículo acerca del desarrollo masivo de amibas en el intestino de un paciente con disentería en St. Petesburgo, Rusia. El hace las primeras descripciones del parásito y lo denomina *Ameba coli*. Hacia 1886, Roberto Koch demuestra la presencia de amibas en varios pacientes en Egipto, es el primero en evidenciar al parásito mediante tinciones. William Councilman y Henry LaFleur definen a la amibiasis como una entidad patológica causada por el microorganismo llamado *Amoeba dysenteriae*, nombre que pensaban mas apropiado que el de Lösch. Hacia 1893, dos investigadores alemanes, Quincke y Ross, demuestran la existencia de amibas diferentes a *E. dysenteriae* incapaces de fagocitar eritrocitos y de producir lesiones en los tejidos. Esta especie corresponde a las amibas que ahora se denominan *Entamoeba coli*. En 1903, Schaudinn llama a este parásito *Entamoeba histolytica* debido a su capacidad para destruir y causar daño a los tejidos del huésped logrando diferenciar dos formas de amibas que infectan a los humanos: *E. coli* que se presenta como un comensal y *E. histolytica* que en la mayoría de los casos se asocia con la enfermedad invasiva. Estos estudio hechos por Schaudinn, dieron lugar al descubrimiento de otras especies de amibas (Guarner, 1990).

Por muchos años se hicieron intentos para establecer el cultivo de las amibas en un medio monoxénico para facilitar su estudio. En 1925, William Boeck reporta el primer medio de cultivo para este parásito. Sin embargo, se trataba de un medio polixénico, en donde las amibas crecían en presencia de la flora bacteriana humana. Diamond en 1961, es el primero en reportar un cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. La habilidad de mantenerlo "in vitro", es crítica para la manipulación experimental, y ha permitido obtener un mejor conocimiento del mismo.

## CLASIFICACION

Esquema de clasificación según Levine, et al., 1980.

*E. histolytica* pertenece al reino Protozoa, caracterizado por animales eucarióticos unicelulares que miden entre 1 y 500  $\mu\text{m}$ . Phylum Sarcomastigophora, el subphylum Sarcodina con motilidad dependiente de pseudópodos, la superclase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, familia Entamoebidae, género *Entamoeba* y especie *histolytica*.

## CARACTERISTICAS GENERALES

*Entamoeba histolytica* es al parecer uno de los organismos eucarióticos más primitivos (Meza, 1992 y Hasegawa M et al, 1993). Los trofozoitos presentan una disposición 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 por técnicas de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos antiactina (Sabanero y Meza, 1982) y después se caracterizó bioquímicamente (Meza et al, 1983).

Estos organismos carecen de un sistema de membranas equivalente al complejo de Golgi y al retículo endoplásmico de los eucariontes superiores, de mitocondrias, lisosomas primarios y secundarios así como de nucleolo (Albach et al, 1977). En cuanto a su metabolismo, *E. histolytica* es aerobio facultativo con enzimas glucolíticas inusuales, que se han encontrado solamente en ciertas bacterias. Los carbohidratos son su fuente principal de energía, carece de citocromos y del ciclo del ácido cítrico. El ciclo de vida consta de 4 estadios: trofozoito, prequiste, quiste y

metaquiste. El trofozoito o forma móvil es una célula dinámica y pleomórfica, se reproduce por fisión binaria y se enquistan produciendo quistes tetranucleados después de dos divisiones nucleares sucesivas de quistes uninucleados. De cada quiste emerge una amiba metaquística tetranucleada que a su vez produce ocho trofozoitos uninucleados. Se mueve por medio de pseudópodos ectoplásmicos llamados lobopodios. El diámetro de estas células varía de 10 a 60  $\mu\text{m}$  con un promedio de 25  $\mu\text{m}$  (Martinez-Palomo, 1986).

## PATOLOGIA DE LA AMIBIASIS

La característica biológica más sobresaliente de *E. histolytica* es su capacidad para destruir casi todos los tejidos del cuerpo humano. La mucosa intestinal y el hígado son los más afectados aunque en menor grado también produce lesiones en el cerebro y piel (Pérez-Tamayo et al, 1990).

Mucho se ha trabajado en torno a determinar los factores celulares que determinan la virulencia del parásito. Se han identificado factores involucrados en el efecto lítico de este protozoario sobre las células de mamífero. Sin embargo, el proceso mediante el cuál la amiba invade y daña a los tejidos es complejo y multifactorial. Primeramente se requiere de un contacto íntimo entre los trofozoitos y la mucosa intestinal mediado por moléculas específicas presentes en el parásito. Se han descrito varias lectinas localizadas en la superficie de la amiba que aparentemente intervienen en el contacto trofozoito-célula blanco. La lectina de 170 kDa por ejemplo, con especificidad por N-acetil galactosamina, medía la adhesión de trofozoitos a células de ovario de hamster (Ravdin et al, 1985). La lectina de 220 kDa con especificidad por oligómeros de N-acetil glucosamina, también se piensa que participa en los eventos iniciales de contacto con la célula blanco. Anticuerpos hechos contra estas glicoproteínas, inhiben la adhesión de los trofozoitos a eritrocitos y a células en cultivo evitando parcialmente la citofagocitosis y la lisis celular (Ravdin

et al, 1986).

Experimentos en los cuales se utilizan diferentes carbohidratos para inhibir la adherencia de los trofozoitos a glóbulos rojos, sugieren la presencia de varios receptores para carbohidratos en la superficie de la amiba, particularmente para residuos de Gal-Gal (galactosamina), Gal-NAc (n-acetil galactosamina). Los receptores en la superficie de la amiba median el contacto inicial y la subsecuente destrucción de las células blanco. En *E. histolytica* también se ha descrito una proteína o "ameboporo" que funciona a manera de un iónóforo capaz de insertarse en la membrana de la célula blanco formando un poro que permite la entrada de  $Ca^{++}$  que a su vez, ocasiona un desequilibrio osmótico que conduce a la muerte de dicha célula (Young et al, 1982). Se ha encontrado actividad de hemolisisnas en homogenados de amibas así como moléculas presentes en el medio de cultivo semejantes a las toxinas y que carecen de actividad proteolítica. Se ha visto que estas moléculas son capaces de redondear células epiteliales en cultivo al alterar sus uniones comunicantes (Lushbaugh et al, 1979). La presencia de actividades proteolíticas liberadas al medio o asociadas a las fracciones de membrana hasta ahora descritas, se proponen también como uno de los mecanismos citolíticos empleados por la amiba.

Subsecuentemente a la interrupción de las barreras intestinales provocada por enzimas y/o productos tóxicos, se inicia la invasión a tejidos y órganos blanco, dicha invasión involucra lisis celular y degradación de proteínas de la matriz extracelular. Tal es el caso de la colagenasa reportada por Muñoz et al., proteína de 141 kDa que se encuentra unida a la membrana del trofozoito y que se libera en forma de gránulos electrodensos mediante un mecanismo similar a la exocitosis (Muñoz et al, 1982).

Nuestro grupo, ha demostrado que la amiba se adhiere específicamente a la fibronectina a través de un péptido de 37 kDa que se localiza en la superficie celular del trofozoito (Talamás-Rohana y Meza, 1988; Vazquez-Prado y Meza, 1992). Este reconocimiento específico esta acompañado de la liberación de proteasas específicas

así como de una reorganización del citoesqueleto de actina de la amiba.

## **IMPORTANCIA DEL CITOESQUELETO EN EL MECANISMO DE INVASION**

El contacto inicial del trofozoito con la célula blanco, la formación de pseudópodos que le permite a la célula moverse y establecer contactos, la movilización de diferentes moléculas y receptores a lo largo de la membrana así como la liberación de moléculas líticas al medio, requieren de una organización citoplásmica compleja. Es así como se ha estimado que el citoesqueleto juega también un papel importante en el mecanismo de lisis dependiente de contacto.

La inhibición de la adhesión a bajas temperaturas o después de la incubación con citocalasina D, (potente inhibidor de la organización de los microfilamentos de actina) son una evidencia de la importancia de un aparato contráctil intacto en las amibas para que este proceso ocurra (Meza y Franco, 1988).

El citoesqueleto de actina de *E. histolytica* sufre marcadas modificaciones cuando el trofozoito se adhiere de manera específica a la fibronectina y a otras proteínas de matriz extracelular. La adhesión desencadena una serie de eventos que dan lugar a la formación de bocas endocíticas y placas de adhesión (Talamás-Rohana y Meza; Meza y Franco, 1988).

## **TRANSDUCCION DE SEÑALES**

Es bien sabido que tanto la fibronectina como otras glicoproteínas de la matriz extracelular como la colágena y la laminina, promueven la adhesión de células y regulan procesos tales como la migración, morfología, diferenciación y proliferación (Juliano et al, 1993).

Estos contactos célula-superficie pueden desencadenar señales citoplásmicas

que llevan a una respuesta biológica coordinada. Esto ocurre vía interacciones específicas entre componentes de la matriz extracelular y receptores celulares, principalmente de la familia de integrinas; heterodímeros transmembranales compuestos de dos subunidades, alfa y beta, unidas no covalentemente (Hynes, 1992).

Existen muchos ejemplos del control de procesos que regulan el comportamiento celular por adhesión de células a matriz extracelular. En fibroblastos por ejemplo, la interacción de las células con la fibronectina genera una señal que induce un agrupamiento de receptores y la reorganización del citoesqueleto en adhesiones focales así como un aumento en la fosforilación en los residuos de la tirosina de un complejo de proteínas que van de 120 a 130 kDa (Guan et al 1991, Kornbert et al 1991). En el sistema inmune, la activación de los linfocitos T aumenta marcadamente por la adhesión de la célula a la fibronectina o a la laminina. Se han observado cambios en la expresión de genes y/o en la diferenciación celular durante la unión de diferentes líneas celulares como hepatocitos, mioblastos y monocitos a proteínas de matriz extracelular, específicamente fibronectina, colágena y laminina (Ben-Ze-ev et al, 1988; Di Persio et al, 1991; Menko et al, 1987 y Sporn et al, 1990).

La adhesión de fibroblastos, células endoteliales y linfocitos a la fibronectina, produce un aumento en la elevación del pH citoplásmico que se correlaciona con la estimulación de la propagación celular y del crecimiento (Gingell et al, 1992).

Otro ejemplo de una respuesta compleja iniciada por la adhesión de proteínas de matriz extracelular en donde se desencadenan señales, es la activación de plaquetas. En este proceso se potencia la adhesión que va acompañada de un aumento en la polimerización de actina y cambios en la forma de las plaquetas así como en la reorganización del citoesqueleto. La adhesión está también asociada a cambios en los niveles de segundos mensajeros y en la activación de proteínas cinasas (Golden et al, 1990; Lipfert et al, 1992).

## MENSAJEROS INTRACELULARES IMPLICADOS EN LA REGULACION DEL COMPORTAMIENTO CELULAR.

La unión con gran afinidad de un ligando a su receptor, traduce este evento extracelular en una serie de señales intracelulares que alteran el comportamiento de la célula "blanco". La mayoría de las moléculas receptoras, pertenecen a una de las tres grandes clases de receptores celulares de superficie: 1) receptores unidos a canales iónicos, 2) unidos a proteínas G y 3) catalíticos (Barnard, 1992).

Los receptores unidos a canales iónicos están involucrados principalmente en la transducción de señales sinápticas mediadas por neurotransmisores que abren o cierran el canal al cual se unen de una manera transitoria cambiando la permeabilidad iónica de la membrana plasmática. Los receptores catalíticos al ser activados operan directamente como enzimas. La mayoría de estos receptores son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico que funciona como una proteína cinasa que fosforila a los residuos de la tirosina. Los receptores unidos a proteínas G, indirectamente activan o inactivan una enzima unida a la membrana plasmática o a un canal iónico. La interacción entre el receptor y la enzima o el canal iónico está mediada por una proteína regulatoria que une GTP, llamada proteína G la cual se compone de tres polipéptidos: una cadena alfa que une e hidroliza al GTP y activa la adenilato ciclasa, una cadena beta y otra gamma que anclan a las proteínas Gs a la cara citoplasmática de la membrana. Los receptores unidos a proteínas G, generalmente activan una serie de pasos que alteran la concentración de uno o más moléculas involucradas en la transducción de señales denominadas mensajeros intracelulares. Estos mensajeros intracelulares alteran a su vez el comportamiento de otras proteínas celulares.

Entre los segundos mensajeros que han sido implicados en la transducción de las señales intracelulares, están el GMPc, AMPc el calcio ( $Ca^{++}$ ), trifosfato de inositol



(IP3) y el diacilglicerol (DAG) (Cohen, 1992).

El AMPc regula reacciones intracelulares en todas las células tanto procariontas como eucariontas. Muchas hormonas y mediadores químicos ejercen su acción a través del control de los niveles de AMPc. Este se ha visto involucrado en la síntesis y secreción de hormona tiroidea, secreción de cortisol, hidrólisis de glicógeno y de triglicéridos entre otros (Cohen, 1992).

El mecanismo de producción de AMPc es el siguiente: cuando un ligando se une a su receptor, este altera la conformación de dicho receptor exponiendo un sitio de unión para la proteína Gs la cuál se encuentra como un trímero con una molécula del GDP unida a la subunidad alfa. La proteína al ser activada por la unión del receptor, altera su sitio de unión al GDP permitiendo la unión del GTP en su lugar lo que causa que la subunidad alfa se disocie del complejo exponiendo un sitio de unión para la adenilato ciclasa que al activarse produce muchas moléculas de AMPc a partir del ATP.

El AMPc, ejerce sus efectos en las células animales principalmente mediante la activación de una proteína cinasa dependiente de AMPc, proteína cinasa A (PKA), la cuál cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a residuos de serina o treonina de proteínas en la célula "blanco". El AMPc se une a las subunidades regulatorias de la enzima ocasionando su disociación del complejo permitiendo la activación de las subunidades catalíticas que ahora se encuentran libres para la fosforilación de proteínas (Cohen, 1992).

El GMPc, otro mensajero intracelular, que se genera a partir de la guanilatociclasa, enzima que al activarse, produce moléculas de GMPc a partir del GMP, también ejerce su función principalmente mediante la activación de una proteína cinasa específica denominada cinasa G (PKG). Esta enzima, a diferencia de la PKA, tiene un papel más restringido ya que se localiza predominantemente en músculo liso y en el cerebelo (Cohen, 1992).

El calcio, es uno de los segundos mensajeros mas importantes en la transducción de señales intracelulares. Este, se une a calmodulina (CaM), una proteína ~~que funciona como un receptor intracelular mediador de la mayoría de los~~ procesos regulados por calcio (Hidaka e Ishikawa, 1992). Esta unión ocasiona un cambio conformacional en la proteína que le permite activar muchas enzimas incluyendo un gran número de proteínas cinasas las cuales se clasifican, según la cantidad de sustratos que fosforilen, en multifuncionales o específicas. Dentro de las multifuncionales están la PKA y la cinasa dependiente de calmodulina o PK II. En cuanto a las cinasas que fosforilan un solo sustrato están la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que regula la contracción muscular, la fosforilasa, que regula la glicogenólisis y la cinasa del factor de elongación 2, enzima implicada en la regulación de la síntesis proteica (Berridge, 1987; Taylor et al, 1992).

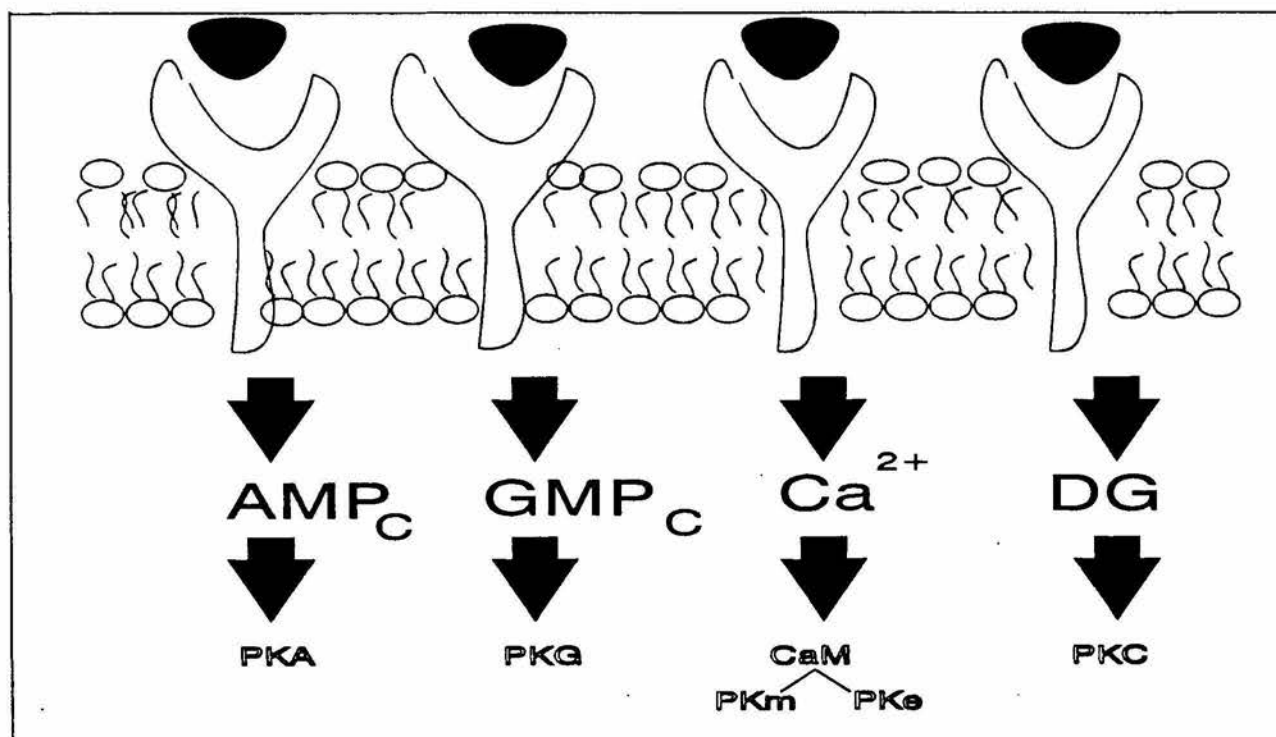
El trifosfato de inositol, es otro mensajero intracelular que proviene de la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), el cuál es generado a partir de la fosforilación del fosfatidil inositol (PI) en donde se genera PIP y PIP<sub>2</sub>. A pesar de que tanto el PI como el PIP y el PIP<sub>2</sub> pueden ser hidrolizados como respuesta a una señal extracelular, es el PIP<sub>2</sub> el que juega el papel mas crítico.

La serie de eventos que unen señales extracelulares a respuestas intracelulares vía hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, comienzan con la unión de un ligando a su receptor en la membrana plasmática; el receptor a su vez, activa a una proteína G (Gp) la cuál activa a la fosfolipasa C que en menos de un segundo, hidroliza el PIP<sub>2</sub> para generar trifosfato de inositol y diacilglicerol. Neurotransmisores, factores de crecimiento, hormonas, entre otros, son algunos de los estímulos que generan toda esta serie de eventos intracelulares después de que se unen a su receptor.

El IP<sub>3</sub>, es una molécula pequeña, soluble que libera calcio de reservorios internos. La unión de IP<sub>3</sub> a un receptor en la cara citoplásmica del compartimento intracelular, abre canales de calcio en su membrana. Es así como este mensajero provoca que aumente la concentración del Ca<sup>++</sup> en el citosol. Cuando el estímulo es finalmente eliminado, el calcio que entra al citoplasma es rapidamente bombeado hacia

afuera de la célula para ser reemplazado por un influjo a través de la membrana plasmática. El IP<sub>3</sub>, también puede ser desfosforilado y consecuentemente inactivado por alguna fosfatasa específica. No todo el IP<sub>3</sub> es desfosforilado, parte es fosforilado para formar IP<sub>4</sub> que participa en respuestas más lentas y más prolongadas en las células (Berridge, 1987).

El diacilglicerol es el otro segundo mensajero producto también de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> (Cohen 1992). El DAG juega dos papeles importantes: a) puede ser hidrolizado para liberar ácido araquidónico, el cuál, puede ser usado en la síntesis de prostaglandinas o leucotrienos por ejemplo, compuestos reguladores de varias respuestas fisiológicas; o puede activar a la proteína cinasa C (PKC), una enzima que participa en la regulación de muchas funciones celulares (Nishizuka, 1984; Hug y Sarre, 1993).



Cuatro de los principales sistemas de señales que operan en células eucarióticas. PKm (proteínas cinasas multifuncionales), PKe (proteínas cinasas específicas).

## PROTEINA CINASA C

Entre las diferentes cinasas, la PKC juega un papel fundamental en la transducción de señales transmembranales de muchos agonistas extracelulares (Nishizuka, 1986). Esta enzima es especialmente abundante en cerebro (Kuo et al 1980, Nishizuka, 1988) y se ha visto implicada en procesos tales como adhesión (Dicorletto et al, 1989; Symington et al, 1989), fagocitosis (Zheleznyak y Brown, 1992), locomoción (Roos et al, 1987), regulación de la transcripción (Messina y Weinstock, 1992), proliferación y diferenciación (Clemens et al, 1992) así como en la reorganización de citoesqueleto (Howard y Wang, 1987; Derwentzi et al, 1992) por citar algunos ejemplos. En presencia de fosfolípidos ácidos, principalmente fosfatidilserina (PS), y a concentraciones fisiológicas de calcio, el DAG activa a la PKC a nivel de membrana plasmática (Bazzi y Nelsestuen, 1988).

Mediante la purificación de la enzima así como por clonación del gen correspondiente, se pudo determinar que la PKC forma parte de una familia de isoenzimas (Nishizuka, 1989; Asaoka, 1992); las cuales, muestran expresión diferencial en tejidos así como una localización intracelular específica. Actualmente hay 10 subespecies de la PKC en tejidos de mamífero. Se han agrupado en tres clases: cPKC, nPKC y aPKC. Cada uno de los miembros de esta familia dependen de PS pero muestran marcadas diferencias en cuanto a los requerimientos de  $Ca^{++}$  para su activación (Takai et al 1979, Hannun et al, 1986; Akita et al, 1990 y Leibersperger et al, 1991).

Mediante el análisis de su secuencia (Sando, 1992), se demostró que existen cuatro regiones homólogas entre las diferentes isoenzimas que se denominaron regiones constantes (C1-C4) las cuáles están separados por regiones variables V1-V5. Mediante digestión proteolítica con calpaína y tripsina se generan dos fragmentos: el

fragmento carboxilo terminal o catalítico que contiene las regiones C3 y C4 y el fragmento amino terminal o regulatorio que contiene las regiones C1 y C2. La C3, contiene el sitio de unión al ATP y la región C4 es responsable involucrada en el reconocimiento del sustrato. La C2, es el sitio de unión a  $Ca^{++}$  mientras que la C1 contiene una secuencia similar a la secuencia de fosforilación para muchos sustratos, excepto que una alanina reemplaza a una serina fosforilable o a una treonina. Se propone que esta región sirve como autoinhibitoria o pseudosustrato. Péptidos sintéticos con esta secuencia inhiben a la PKC, mientras que péptidos en donde la alanina es reemplazada por una serina, sirven como sustratos (Yasuda, 1990).

## MODELOS DE ACTIVACION DE PKC

Se han propuesto diferentes modelos basados en ensayos principalmente bioquímicos y algunos biofísicos para explicar la activación de la PKC (Sando, 1992; Zidovetzki and Lester, 1992). La mayoría de los datos provenientes de sistemas "in vitro" e "in vivo", sugieren que la PKC se activa cuando se asocia a la membrana. La cinasa es activada cuando se produce DAG en la membrana por acción de una fosfolipasa C. Esta enzima hidroliza fosfoinosítidos para generar DAG y fosfoinositoles. El DAG liberado se une al dominio regulatorio de la PKC lo que provoca un aumento de afinidad de la enzima por  $Ca^{++}$  y en presencia de fosfolípidos ácidos, especialmente fosfatidilserina se logra su activación. Experimentos hechos por Castagna, demostraron que el DAG requerido para la activación de la PKC, podía ser sustituido por ésteres de forbol, especialmente por el 12-13 forbol miristato acetato, el cuál activa de manera directa a la PKC cuando se une a la región C1 regulatoria de la enzima. La PKC es activada de forma transitoria y su actividad se termina cuando el DAG es fosforilado por alguna cinasa específica o es hidrolizado en la posición sn-2 (Castagna et al, 1982).

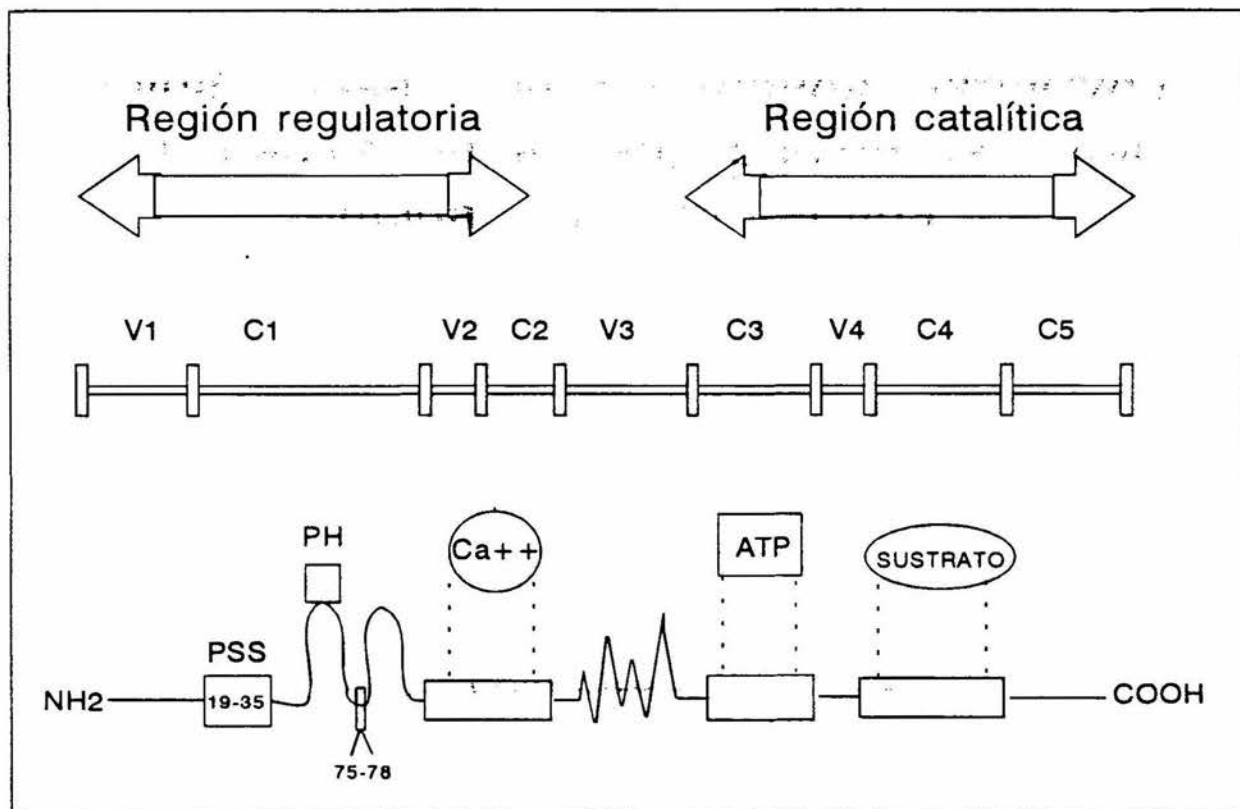
Según el modelo propuesto por Bell y colaboradores, el  $Ca^{++}$ , conjuntamente

con PS, son suficientes para inducir una translocación de la enzima del citosol a la membrana. Posteriormente el  $\text{Ca}^{++}$  y el DAG son necesarios para formar un complejo cuaternario PKC-PS-Ca<sup>++</sup>-DAG, que es esencial para la activación de la enzima (Bell, 1986).

La PKC se inserta en el dominio hidrofóbico de la membrana estabilizando su conformación. En este estado se propone que hay dos puntos de interacción de la proteína con los fosfolípidos de la membrana: la región entre las dos regiones ricas en cisteínas y la región C2 de la región regulatoria. Inicialmente, la enzima se encuentra en un estado "no expuesto" en donde el sitio de unión al sustrato no está disponible. La producción de DAG en respuesta a un estímulo biológico, induce una perturbación en la bicapa lipídica, aumentando la fluidez de la membrana lo que permitirá una mejor penetración de la región que se encuentra entre la región C1 rica en cisteínas. Esto induce un "desdoblamiento" de la enzima. La PKC adquiere una conformación más estable y "abierta" ocasionando que la región de pseudosustrato se mueva del sitio activo. Esta secuencia se une directamente a las cabezas de PS lo que se piensa ayuda a mantener esta conformación "abierta de la enzima". La región C2 ahora está más expuesta para que pueda unir más calcio y el sustrato puede ahora interactuar libremente con la región catalítica C4 de la enzima para ser fosforilado (Sando, 1992).

Existen otros modelos donde se propone la activación de la PKC por diferentes mecanismos : la PKC en estado soluble, se puede activar en ausencia de fosfolípidos por ácidos grasos en solución (Chen, 1992). Sin embargo, el mecanismo para este tipo de activación ha sido muy controvertido. En otro modelo, se habla de la interacción de proteínas que se unen a la PKC y que le permiten unirse a la membrana (Gopalakrishna R et al, 1986). Dichas proteínas se supone que pueden servir para dirigir a la PKC hacia sitios específicos como a contactos focales (Jaken et al, 1989) o a la membrana nuclear (Leach et al, 1989). En el modelo de activación por fosforilación, se propone que la PKC se autofosforila lo que ocasiona un aumento en la actividad de la enzima al disminuir su  $K_a$  por  $\text{Ca}^{++}$  (Newton, 1987). Se propone que la autofosforilación tiene que ver con la regulación de la enzima, aumenta la

afinidad de esta por ciertos cofactores así como por ciertos sustratos. Los sitios propuestos de autofosforilación se encuentran en los residuos de serina de la región amino terminal y en el extremo carboxilo terminal y en la región donde se ubica el sitio catalítico del regulador. Finalmente se ha hablado de un modelo de activación por proteólisis (Pontremolis et al, 1990). Estudios "in vitro" han demostrado la activación de la PKC por esta vía en donde se elimina el dominio autoinhibitorio o pseudosustrato por una endoproteasa permitiendo así el acceso de diferentes sustratos al sitio C4 de la región catalítica de la PKC donde podran ser fosforilados.



Regiones de PKC. Se muestran los sitios variables (v) y constantes (c) de la enzima así como los de unión a calcio ( $Ca^{++}$ ), a ATP, al sustrato, a ésteres de forbol (PH) y la región de pseudosustrato (PSS).

## CITOESQUELETO DE ACTINA Y PKC

El citoesqueleto de actina en las células eucariotas, está compuesto de una complicada red de microfilamentos cuya organización es regulada por un gran número de proteínas que se unen a la actina (Hartwig y Kwiatkowski, 1991). El estado físico de la actina en una célula es regulado por tres ciclos reversibles. Primeramente, la actina monomérica (G), se polimeriza para formar actina filamentosa (F) la cual se despolimeriza para generar nuevamente monómeros de actina. El ciclo es regulado por diferentes clases de proteínas entre las que se encuentran: la profilina, que "secuestra" los monómeros de actina, la vellosina que controla la nucleación del filamento, la fragmina que bloquea el sitio barbado del filamento o extremo positivo que es por donde crece el filamento y la gelsolina, que corta el filamento (Weeds y Sutherland, 1993). En segundo lugar, la actina-F puede ser entrecruzada por proteínas como la fimbrina,  $\alpha$ -actinina y la ABP-120 para formar estructuras de gran complejidad como redes y haces. Por último, estas estructuras son ancladas a la membrana de forma reversible por proteínas tales como la miosina I y vinculina (Weeds et al, 1992).

La formación de fibras de tensión, placas de adhesión, contactos focales así como lamelopodios y filopodios, son el resultado de la modulación específica de la organización de los microfilamentos. Estos cambios en el citoesqueleto de actina ocurren en respuesta a numerosos procesos biológicos como son la adhesión, movimiento, secreción, mitogénesis y morfogénesis. Sin embargo, las vías de transducción de señales que llevan a esta estructuración específica de la actina, aún no han sido bien esclarecidas.

La función de casi 70 proteínas que unen actina están reguladas por segundos mensajeros como el  $\text{Ca}^{++}$ , lípidos y proteínas cinasas, entre las que se encuentra la PKC (Anderem, 1992). En respuesta a un estímulo extracelular, esta enzima fosforila proteínas como profilina (Hansson, 1988), vinculina y filamina (Kawamoto, 1984) lo que permite la modulación dinámica del citoesqueleto.



Los ésteres de forbol, activadores directos de la PKC (Castagna et al, 1982) han sido ampliamente utilizados para el estudio de la función de la PKC en diferentes líneas celulares. ~~Se ha visto que uno de los principales efectos de los ésteres de forbol en una~~ celular es la reorganización del citoesqueleto de actina. En neutrófilos por ejemplo, el forbol miristato acetato (PMA), estimula muchas funciones que incluyen: exocitosis, pinocitosis (Hoult et al, 1985 ), cambios en la forma (Keller et al, 1987), movimiento (Roos et al, 1987), así como un aumento en la adhesión (White et al, 1974) y en la polimerización de actina. El contenido relativo de actina asociada al citoesqueleto aumenta después de la estimulación con PMA, ocasionándose además una reorganización de estos filamentos (Sheterline et al, 1986; Howard et al, 1987). También se ha demostrado la presencia de la PKC en zonas especializadas de contacto o adhesiones focales (Jaken et al, 1989), y recientemente se ha demostrado su participación en la formación de dichas estructuras (Woods et al, 1992).

Es así como se ha propuesto que la PKC juega un papel importante en la modulación de la organización del citoesqueleto en muchas líneas celulares.

En *Entamoeba histolytica*, la adhesión de trofozoitos a la FN, lleva a un cambio en la organización del citoesqueleto de actina, se forman estructuras tales como bocas endocíticas y placas de adhesión. Esta reestructuración de los filamentos de actina va acompañada de un aumento en la polimerización de actina-F (Manning, datos no publicados) y de una movilización de  $Ca^{++}$  (Carbajal et al, 1993, manuscrito en preparación). Es así como se ha sugerido que el contacto de la amiba con proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, lleva a un proceso de "activación" que se identifica por la reorganización del citoesqueleto y la secreción de proteasas, ambos procesos encaminados a facilitar la invasión de los tejidos del huésped. Ya que los eventos a nivel intracelular involucrados en la respuesta del trofozoito a la presencia de la FN aún no han sido determinados, surgió el interés de investigar si una PKC está participando en la transducción de señales que llevan a este rearrreglo tan específico del citoesqueleto.

## OBJETIVO

Identificación de una actividad de PKC en trofozoitos de *E. histolytica*, como uno de los elementos en la transducción de señales asociada a la unión de las células a fibronectina.

## METAS ESPECIFICAS

Analizar la reorganización del CSK de actina en respuesta a la activación con fibronectina y ésteres de forbol (PMA).

Determinar el efecto de los ésteres de forbol sobre la polimerización de actina.

Detectar la actividad de la PKC en extractos totales de *E. histolytica*.

Evaluar el efecto de la fibronectina y ésteres de forbol sobre la fosforilación de proteínas de amiba.

## MATERIAL Y METODOS

**CULTIVO CELULAR.**- Se utilizaron trofozoitos de *E. histolytica* cepa HMI-IMSS crecidos axenicamente a 37°C en medio TYI-S-33 preparado según Diamond (1978). Las células se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (48 hrs) y de aquí se procedió a tratarlas según requería el experimento.

**COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33.**- Medio de cultivo axénico BIS-33 descrito por Diamond en 1978 a excepción de Biosate que se sustituyó por Biotriptasa (Bioxon, México) y suero fetal bovino (Microlab, México). Medio Basal: Biotriptasa 30g, Dextrosa 10 g, NaCl<sub>2</sub> 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, L-cisteína 1.0 g, Acido ascórbico 0.2 g, Citrato férrico 0.0236 g, agua bidestilada 820 ml. Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH y se esterilizó 15 minutos a 15 lbs/pulg<sup>2</sup>. Complemento del medio: Suero fetal bovino descomplementado al 14% del volumen final del medio basal, mezcla de vitaminas al 10% del volumen final del suero (In vitro, México). La concentración final es: suero 13%(v/v), vitaminas 3%(v/v).

**SOLUCIONES.**- Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS).- NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O cbp 1 lt. pH 7.3.

Amortiguador de muestra 10x.- Trizma-base 0.15 g, SDS 20% 2.5 ml, glicerol 2 g, pironina 2 mg. H<sub>2</sub>O cbp 10 ml. pH 8.3

Buffer de lisis.- Tris 50 mM, NaCl 0.15 mM, MnCl<sub>2</sub> 1.0 mM y los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 0.1 mM, pHMB 5.0 mM, y NEM 10 mM.

Buffer de extracción.- Tris 20 mM, pH 7.5, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, Tritón X-100 0.5% y los inhibidores de proteasas antes mencionados.

Buffer A.- Tris 20 mM, pH 7.5, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, NaCl 0.2 M.

Solución Amortiguadora Electroforética.- Tris 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M y SDS 0.1%

Solución Lipídica 10x.- 100  $\mu$ M forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), fosfatidil serina 2.8 mg/ml y micelas de Tritón X-100.

Solución sustrato 5x.- Ac-MBP(4-14) 250  $\mu$ M, ATP 100  $\mu$ M,  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, Tris pH 7.5 20 mM.

Solución inhibidora 5x.- PKC(19-36) 100  $\mu$ M, Tris pH 7.5 20 mM.

**DROGAS.**- El H7 y el PMA fueron adquiridas en SIGMA. El solvente utilizado para el H7 fue agua bidestilada estéril. Para el PMA se utilizó etanol al 100%

**OBTENCION DE FIBRONECTINA PLASMATICA HUMANA.**- La fibronectina usada se obtuvo de plasma humano al que se le añadió, PMSF 0.1 mM y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Para iniciar su purificación, el plasma se descongeló en baño María y se centrifugó a 16300 x g durante 30 min. El sobrenadante se diluyó 1:2 en PBS conteniendo PMSF 0.1 mM y se pasó por una columna de gelatina-sefarosa preequilibrada con PBS, pH 7.5. Se lavó con PBS hasta que no hubo proteínas detectable a 280 nm saliendo por la columna, luego con urea 1M en PBS y se eluyó con PBS pH 7.5 conteniendo urea 4 M, se colectaron las fracciones de 4 ml. Para el cálculo de la concentración de fibronectina se consideró un coeficiente de extinción de 1.28 (D.O. 280 nm) para 1 mg/ml (Pierschbacher et al, 1981).

**PREPARACION DE FRACCION SOLUBLE E INSOLUBLE A TRITON-X100.**- Las células

se desprendieron por agitación fuerte de las botellas de cultivo y se centrifugaron a 250 x g durante 5 minutos. La pastilla se lavó tres veces con PBS en frío también mediante centrifugación a la misma velocidad y tiempo.

El paquete celular se resuspendió en buffer de lisis frío. Se dejó en hielo durante 30 minutos hasta la lisis completa de las células. Se centrifugó en una microfuga durante 30 minutos a 4°C. Se obtuvo un sobrenadante (fracción soluble) y una pastilla (fracción insoluble a tritón X-100 o citoesqueleto). El sobrenadante se precipitó con acetona a -20°C durante 2 hrs para después centrifugarse a -4°C durante 15 min. Las pastillas obtenidas tanto de la fracción soluble y la insoluble o de citoesqueleto (CSK), se solubilizaron en buffer de muestra 2X vol/vol. Se hirvieron durante 5 minutos, se les adicionó  $\beta$ -mercaptoetanol para tener una concentración final de 5% y se hirvieron durante 5min.

**PREPARACION DE EXTRACTOS TOTALES.**- Después de 2 lavados con PBS, la pastilla de trofozoitos se resuspendió en buffer de extracción frío y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente los extractos se sonicaron en un homogenizador durante 1 minuto. Para eliminar los restos celulares, el extracto se centrifugó en una microcentrífuga durante 2 minutos a 4°C y el sobrenadante se recuperó manteniéndose en hielo hasta ser utilizado. Al mismo tiempo se tomo una alícuota para determinar la cantidad de proteína.

**DETERMINACION DE PROTEINAS.**- La cuantificación de proteínas se hizo por el método de Lowry (1951). Se utilizó albumina de suero de bovino como estandar.

**ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.**- Se utilizaron geles de poliacrilamida SDS al 10% Se hicieron las electroforesis según el método de Laemmli (1970).

Las concentraciones finales de los geles fueron: Gel concentrador: acrilamida 5%, bis-acrilamida 0.8%, tris 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1%. Gel separador: acrilamida 10%, bis-acrilamida 0.8%, Tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1% Se adicionó a la mezcla

persulfato de amonio al 12.5% y temed al 10% para catalizar la polimerización del gel.

Los geles se corrieron a temperatura ambiente en solución amortiguadora electroforética, se tiñeron con el colorante azul de Coomassie-R durante 2 hrs y se destiñeron con agua-metanol-ácido acético a una proporción 5:4:1.

Posteriormente los geles se secaron y se autoradiografiaron utilizandose placas X-OMAT Kodak.

**ACTIVIDAD DE PKC EN EXTRACTOS AMIBIANOS.-** La actividad de la PKC en los extractos amibianos se determinó mediante un sistema de fosforilación "in vitro" en donde se midió la incorporación de  $\alpha^{32}p$  de ATP marcado a un péptido sintético de proteína básica de mielina (AC-MBP) que es un sustrato altamente específico de proteína cinasa C . La especificidad de la PKC se confirmó utilizando un péptido sintético que actúa como un potente inhibidor de la región de pseudosustrato localizada en el dominio regulatorio de la PKC (GIBCO BRL 1993).

La mezcla de reacción en donde se determinó la actividad de PKC consistió en lo siguiente: 10  $\mu$ l de extracto total obtenido de 13.5 millones de células (2mg/ml de proteína), 2.5  $\mu$ l de solución lipídica 10X, 5  $\mu$ l de la solución inhibidora 5X, 5  $\mu$ l de la solución sustrato 5X, H<sub>2</sub>O y buffer A hasta completar un volumen total de 25  $\mu$ l.

Se prepararon los tubos con la mezcla de reacción y aquellos que tenían el inhibidor, se preincubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Hasta el final se agregó la solución sustrato con la cuál se inició la reacción a 30°C. A los 5 minutos, se tomaron alícuotas de 12  $\mu$ l y se colocaron en papeles de fosfocelulosa los cuales se lavaron 2 veces con ácido fosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 1% (100 ml/muestra). Se hicieron 2 últimos lavados con agua bidestilada y se contó la cantidad de 32-P incorporado en un contador de centelleo líquido.

**TINCION DEL CITOESQUELETO DE ACTINA DE LOS TROFOZOITOS.-**Las tinciones se realizaron con faloidina conjugada a rodamina (Molecular Probes USA). La faloidina rodaminada se utiliza para marcar filamentos de actina (actina-F) ya sean estos

grandes o pequeños, ya que se asocia específicamente a actina entrecruzada y protege a los microfilamentos de la despolimerización. A diferencia de los anticuerpos antiactina no se une a actina G.

Los trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento y previamente lavados con PBS, fueron tratados con el PMA a una concentración de  $1\mu\text{M}$  durante 20 minutos. Lo mismo se hizo con las células control, se preincubaron 20 minutos con el vehículo únicamente. Posteriormente, se colocaron en cubreobjetos previamente preparados con o sin fibronectina a una concentración de  $28\mu\text{g/ml}$  y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 min; una vez que las células se adhirieron, se lavaron los cubreobjetos con PBS a  $37^\circ\text{C}$ . Las amibas se fijaron con formaldehído al 3.7% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente los cubreobjetos con PBS y se procedió a permeabilizar las células con acetona al 99.9% de pureza a  $-20^\circ\text{C}$  durante 3 minutos. Las preparaciones se secaron al aire y se les agregó  $50\mu\text{l}$  de faloidina rodaminada previamente evaporada y resuspendida en PBS, dejándose en una cámara húmeda por 20 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron los cubreobjetos con PBS y se montaron con glicerol-PBS (9:1) pH 8.0.

Las células que fueron tratadas con el PMA a una concentración de  $1\mu\text{M}$ , se preincubaron con la droga durante 20 minutos antes de ser colocadas en los cubreobjetos. Lo mismo se hizo con las células control, se preincubaron 20 minutos con el vehículo únicamente. Posteriormente se procesaron como se indicó anteriormente.

Las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss estándar con equipo de epifluorescencia y se fotografiaron con película Kodak-Tri-X Pan y Ektachrome asa 400.

**ENSAYO NBD-FALACIDINA.**- Para medir el efecto del PMA sobre la polimerización de actina G, se utilizó el ensayo de NBD-Falacidina. Este ensayo está basado en la especificidad de la unión de la falacidina, análogo fluorescente de la falotoxina faloidina a actina-F y en la solubilidad de ésta toxina en metanol (Howard y Oresajo, 1985).

Las células fueron previamente lavadas con PBS, la pastilla obtenida de la centrifugación a 250 x g durante 5 minutos se resuspendió nuevamente en PBS pH 7.2 previamente filtrado.  $1 \times 10^6$  células/ml fueron tratadas durante 20 minutos con el PMA a  $1 \mu\text{M}$  y con H7 (inhibidor específico de la PKC) a  $100 \mu\text{M}$  antes de ser incubados con el PMA a  $1 \mu\text{M}$ . Los controles se incubaron en PBS durante el mismo tiempo. Posteriormente, las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 20 minutos. A los 5 minutos de fijación, se adicionó tritón X-100 al 1%. Se lavaron las amibas 3 veces con PBS y a  $1 \times 10^5$  células se les adicionó la NBD-falacidina previamente evaporada y resuspendida en PBS. Se hicieron incubaciones (protegiéndose de la luz) durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Las células se centrifugaron en una microfuga. Para la extracción de la actina-F, a la pastilla se le adicionó  $400 \mu\text{l}$  de metanol para espectrofluorimetría (Photorex) y se agitó con vortex hasta macerarse. La extracción se procedió protegiéndose de la luz durante una 1hr al término de la cuál se centrifugaron nuevamente las células y el sobrenadante se recuperó para ser leído en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de 465 nm (excitación) y 535 nm (emisión). Los valores obtenidos se expresaron en unidades de fluorescencia relativa (RFI).

**FOSFORILACION "IN VIVO" de *E. histolytica*.**- El patrón de proteínas fosforiladas de amiba así como sus niveles de fosforilación en respuesta a la activación o inhibición de la PKC, se determinaron mediante el marcaje metabólico de los trofozoitos con ortofosfato radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ) (Amersham).

13.5 millones de células adheridas a botellas de plástico, fueron cuidadosamente lavadas con medio sin suero previamente dializado contra 150 mM de NaCl y 50 mM de tris-HCl, pH 6.8. Se dejó el tapete celular en presencia de este medio carente de fosfatos durante 20 minutos. Posteriormente las células fueron cargadas con el ortofosfato  $200 \mu\text{Ci} / \text{ml}$  de medio durante 1 hr. Después, se recuperaron por agitación fuerte de las botellas para desprender completamente a todas las células. Se centrifugaron por 5 minutos a 250 x g y se resuspendieron



$2 \times 10^6$  amibas en 1ml del mismo medio. Las células se preincubaron en suspensión con las drogas durante 20 min. Los diferentes tratamientos fueron: Control, PMA , H7 + PMA, FN y H7 + FN. Al término de los tiempos de incubación, los trofozoitos se lavaron 3 veces con PBS a 4°C. Las pastillas se lisaron con buffer de homogenización, dejándose en hielo durante 30 minutos para después obtener la fracción soluble y la fracción de CSK o insoluble a Tritón X-100.

Se tomaron alícuotas de cada fracción para precipitarse con ácido tricloroacético al 10% y se contaron en un contador de centelleo líquido para determinar la cantidad de fósforo radioactivo incorporado a cada fracción. Las fracciones tanto solubles como del CSK obtenidas de cada tratamiento, se analizaron en geles de poliacrilamida al 10%. El patrón de proteínas fosforiladas se determinó mediante autoradiografías de los geles de poliacrilamida en donde se separaron electroforéticamente las proteínas de los extractos celulares de los trofozoitos marcados con el ortofosfato.

## RESULTADOS

### REORGANIZACION DEL CSK POR PMA.

Como se puede ver en la figura 1, el citoesqueleto de los trofozoitos tratados con PMA mostró un rearrreglo específico de la actina entrecruzada formando las estructuras que se conocen como bocas endocíticas y placas de adhesión de tamaño y número variable. Esta estructuración tan específica del citoesqueleto en respuesta al PMA, es muy semejante a la que se ha observado cuando las células se adhieren a la FN (Talamás-Rohana y Meza, 1988). Las células control, aquellas que se adhirieron a vidrio en ausencia de ésteres de forbol, mostraron un patrón de tinción de la actina difuso y carente de un rearrreglo específico en forma de placas, aunque se observó la condensación de actina en algunas de las bocas endocíticas que se llegaron a formar.

### EFFECTO DEL PMA EN LA POLIMERIZACION DE ACTINA G.

Para demostrar si esta reorganización tan específica del citoesqueleto de actina en la amiba por activación de la PKC se refleja en un aumento en la polimerización de actina, se utilizó el ensayo de NBD-falacidina. En la figura 2, se muestran los resultados que indican un aumento del 26% en el contenido de actina-F en relación a los trofozoitos no tratados como respuesta a la activación de las células con PMA. El aumento en las concentraciones de actina-F producido por el PMA, se revirtió hasta los niveles basales cuando las células antes de ser tratadas con el PMA fueron preincubadas con un inhibidor específico de la PKC, el H7.

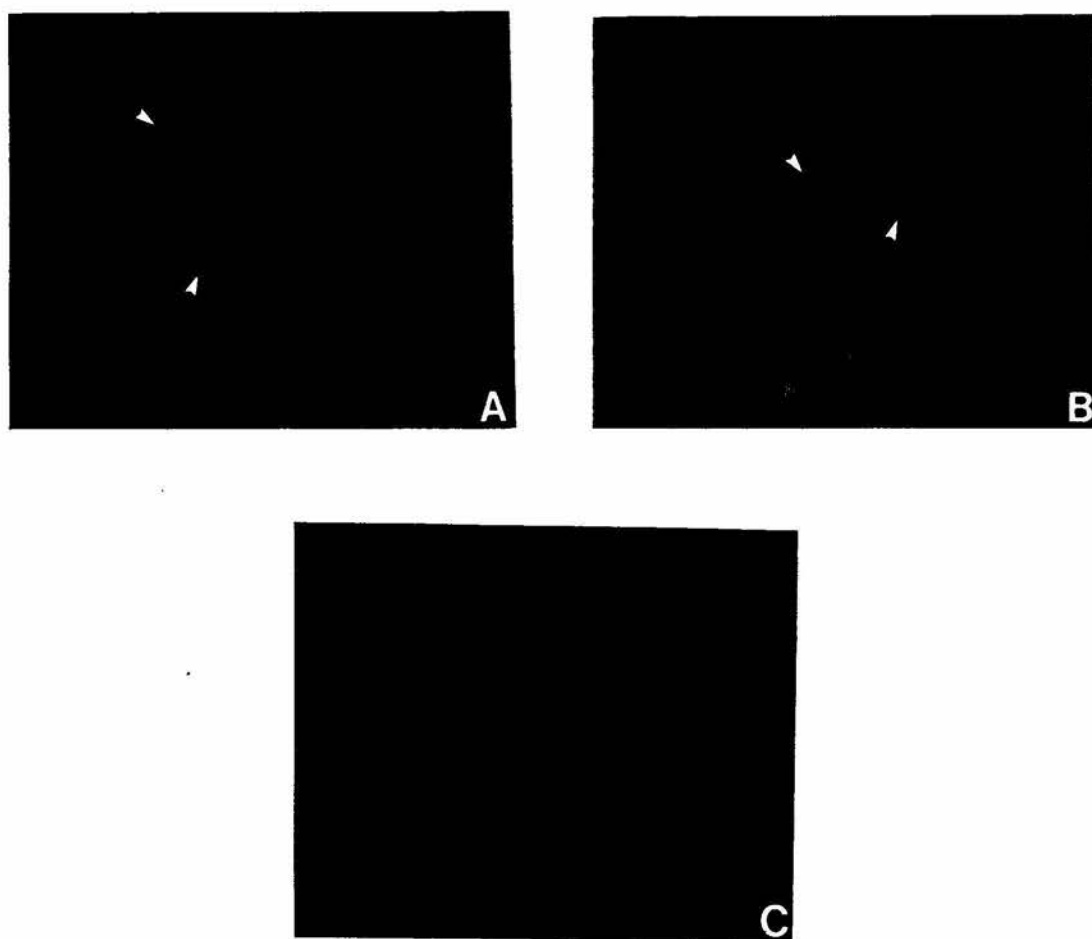


Figura 1.— Actina reorganizada de *Entamoeba histolytica* visualizada con faloidina rodaminada. Trofozoitos adheridos a cubreobjetos previamente cubiertos con FN (A), preincubados a 37°C con 1  $\mu$ M de PMA durante 20 minutos y adheridos a vidrio (B). Trofozoitos adheridos a vidrio (C). Las placas de adhesión y bocas endocíticas se indican con flechas. 1800X.

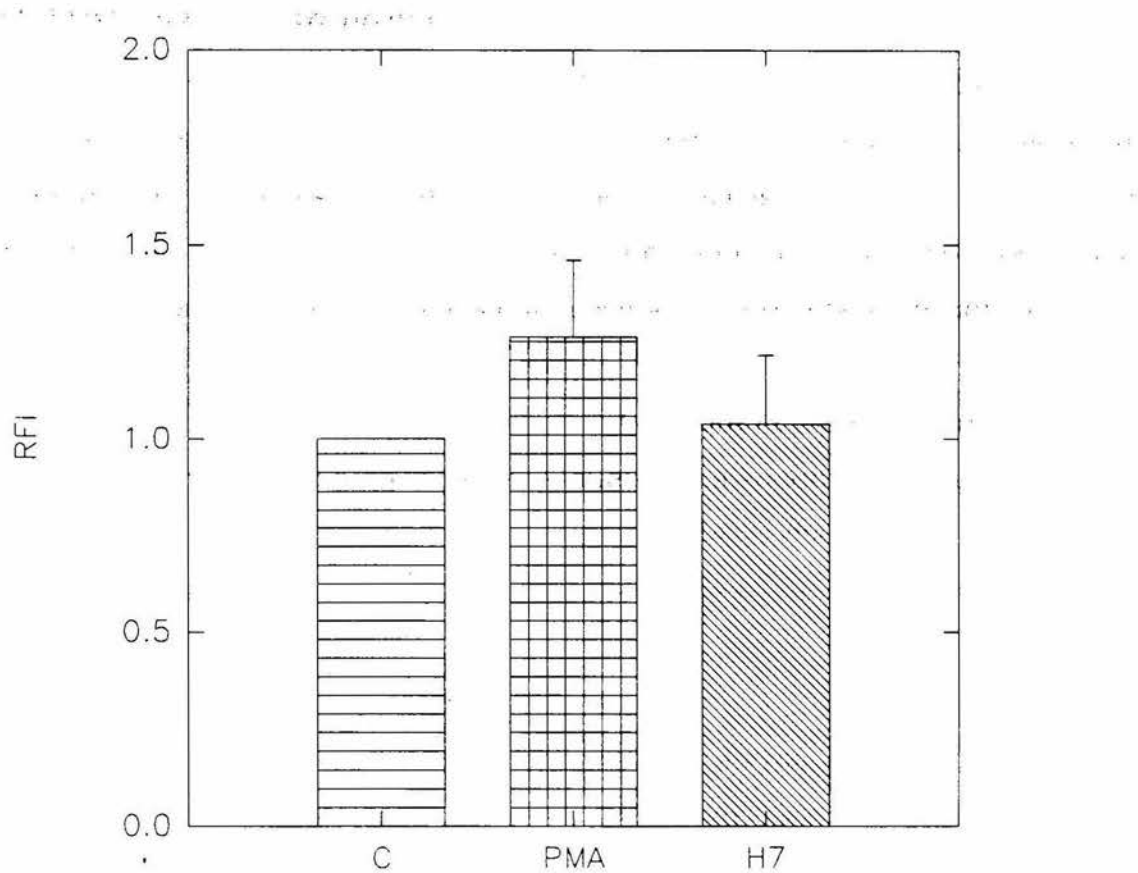





Figura 2.— Efecto del PMA y H7 sobre la polimerización de actina de *Entamoeba histolytica*. Trofozoitos de amiba fueron expuestos a 1  $\mu$ M de PMA  y a 100  $\mu$ M de H7 antes de ser incubados con 1  $\mu$ M de PMA ; células control . El contenido de actina-F se determinó a los 20 minutos. Resultados expresados como contenido relativo de actina-F (RFI).

## **ACTIVIDAD DE PKC EN EXTRACTOS DE *E. histolytica*.**

Mediante la fosforilación "in vitro" de un péptido sintético de proteína básica de la mielina que es un sustrato altamente específico de la PKC, se pudo medir la actividad de la PKC en los extractos amibianos. En la figura 3, se muestra la actividad de la PKC cuando ésta es estimulada directamente por PMA en presencia de PS, lípidos, MgCl y CaCl, cofactores esenciales para la activación de PKC de células de mamíferos. Se puede observar una clara estimulación de esta cinasa en un 21% sobre los niveles basales de fosforilación (ACT). La actividad de la enzima fue inhibida por el péptido de la región de pseudosustrato de la PKC. Dicho péptido, inhibió completamente la incorporación de fósforo en el péptido de PBM actuando además sobre la actividad basal de la enzima(INH).

También se probó el inhibidor específico de la PKC, el H7, con la finalidad de ver su capacidad para inhibir a la PKC de *E. histolytica*. En la figura 4, se puede observar que esta droga es eficaz para inhibir la actividad de la PKC de la misma manera en que lo hace el péptido sintético (H7). Se muestra que la fosforilación del péptido de PBM por PKC, se inhibió en un 100%. También se pudo observar, que la droga no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación basal de proteínas (BASAL).

Con el objeto de determinar si la actividad de la PKC estaba siendo eficazmente inhibida por el péptido sintético, se procedió a realizar una cinética en donde se probaron diferentes concentraciones del inhibidor para determinar si el sistema ya había llegado a sus niveles de saturación. En la figura 5, se puede apreciar que aún a concentraciones de 80  $\mu\text{M}$ , no se observan variaciones en el grado de inhibición, lo que nos indica que a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , la actividad de la PKC presente en los extractos es inhibida completamente.

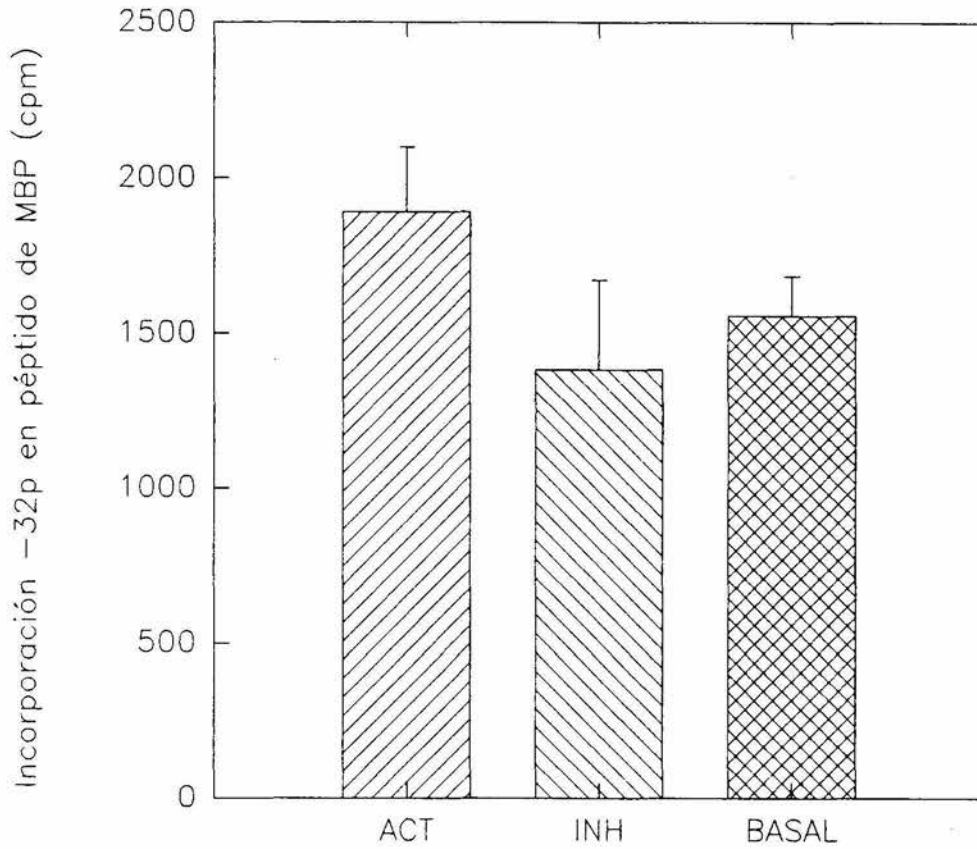





Figura 3.— Actividad "in vitro" de la PKC de *Entamoeba histolytica*. Activación de la PKC por PMA en presencia de PS,  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$   y en presencia del péptido inhibidor de la región de pseudosustrato de la PKC (19-36) . Incorporación basal de 32-p .

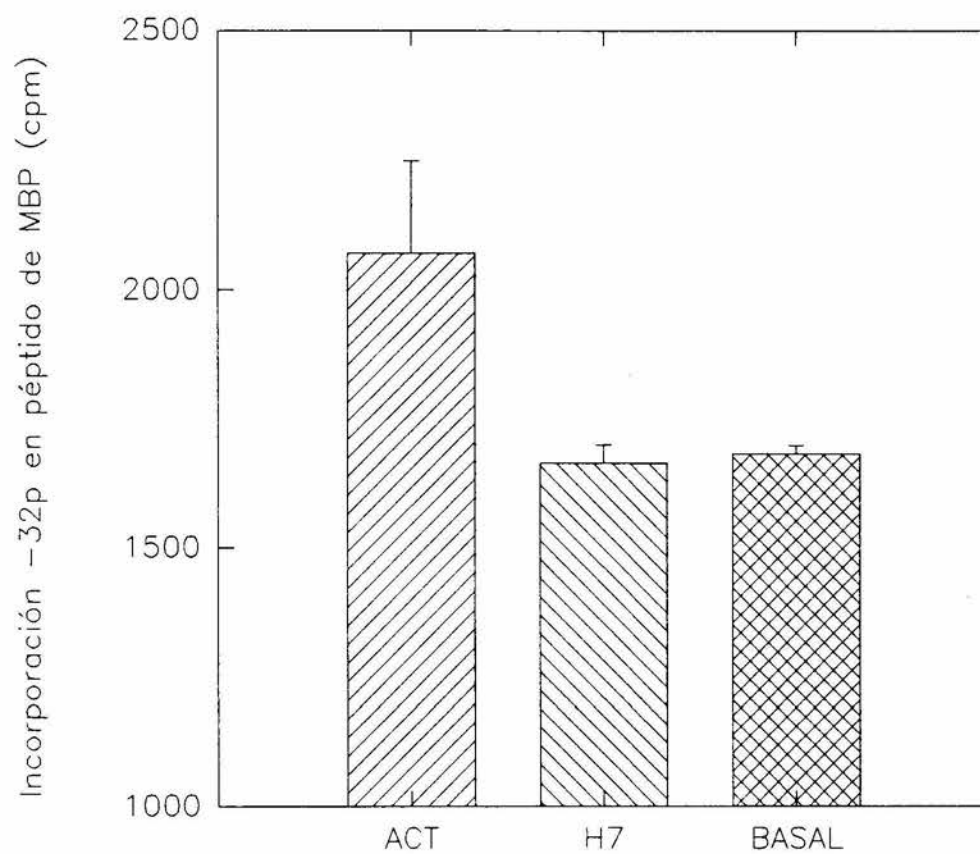





Figura 4.— Efecto del H7 sobre la actividad "in vitro" de la PKC de *E. histolytica*. Activación de la PKC por PMA en presencia de PS, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>  y en presencia de 100 uM de H7 . Incorporación basal de <sup>32</sup>p .

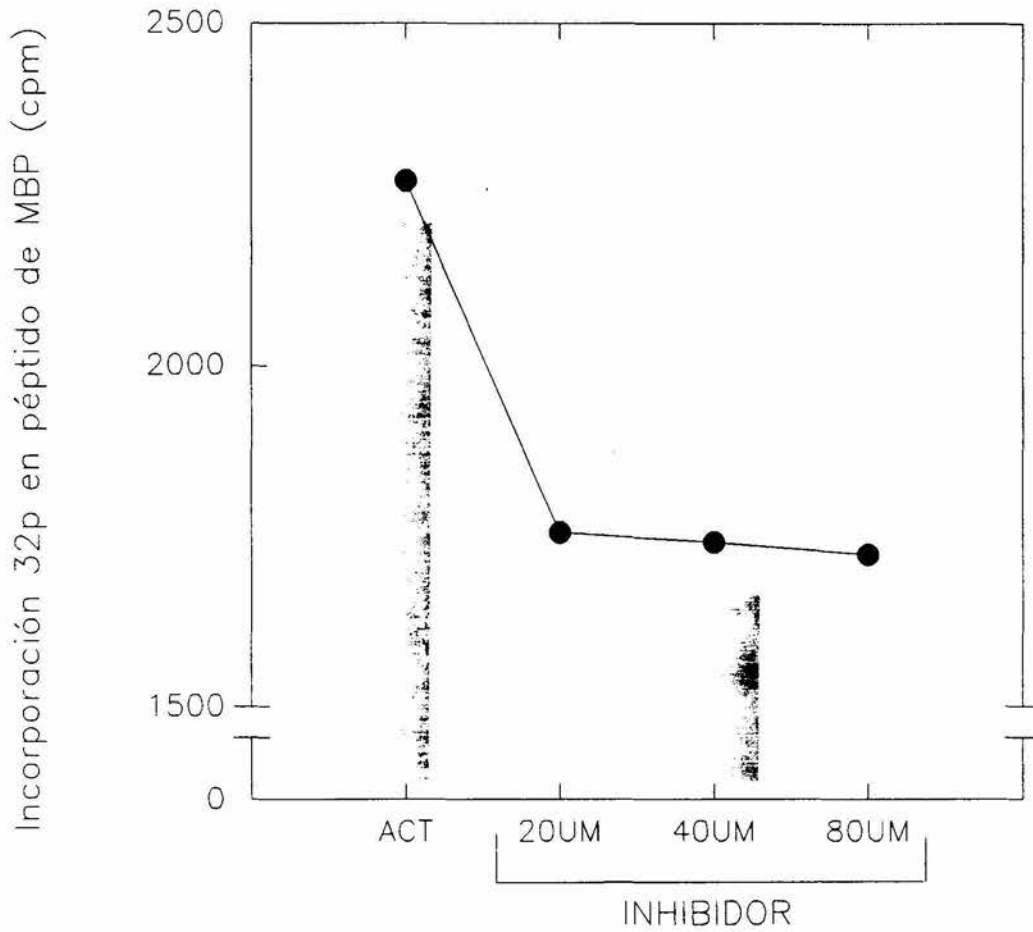


Figura 5.- Actividad "in vitro" de la PKC de *Entamoeba histolytica* en presencia de concentraciones crecientes del péptido inhibidor de la región de pseudosustrato de la PKC (19-36).



## **EFFECTO DE VARIOS ESTIMULOS SOBRE LA FOSFORILACION DE PROTEINAS EN *E. histolytica*.**

En la figura 6, se muestra el efecto del PMA, H7 y FN sobre la fosforilación "in vivo" de proteínas de la amiba. El PMA, así como la fibronectina, aumentaron la fosforilación de proteínas sobre los niveles basales, en un 155 y 105% respectivamente. El H7, tuvo un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de proteínas de aquellas amibas que fueron tratadas con el PMA, siendo esta inhibición de un 66%

Al analizar por separado el efecto del PMA sobre la fosforilación de proteínas tanto de la fracción soluble como la de citoesqueleto, se encontro que la incorporación de <sup>32</sup>p fue mayor en la fracción de CSK. El PMA aumentó la fosforilación de proteínas sobre los niveles basales en ambas fracciones y el H7, fue capaz de inhibir esta fosforilación (figura 7).

Con la finalidad de saber si la fibronectina es una señal que desencadena la vía de activación de la PKC de la amiba, se analizó el efecto del H7 sobre la fosforilación de proteínas inducida por FN. Los resultados que se muestran en la figura 8, indican que el H7 inhibió en ambas fracciones la fosforilación de proteínas de las células que posterior a la preincubación con esta droga, fueron expuestas a la fibronectina. Es importante hacer notar que la incorporación del fósforo radioactivo también es mayor en la fracción de CSK.

El patrón de fosforilación de proteínas de la fracción soluble y de CSK obtenido de los diferentes tratamientos se muestra en las figura 9 y 10 respectivamente. Se observan diferencias en el grado de fosforilación de ciertas proteínas entre los diferentes tratamientos. Se detectaron varias proteínas fosforiladas en la fracción soluble, cuyo peso molecular es de 100, 86, 65, 56, 42, 39, 35, 28, 21 y 19 kDa (figura 8). La fosforilación de éstas proteínas fue mayor en el carril 6, correspondiente

a las células que fueron tratadas con el PMA. El aumento en la fosforilación de dichas proteínas por acción de la fibronectina no es tan claro (carril 8), sin embargo, en el carril 7 se muestra como el H7 inhibió la fosforilación de proteínas de células que fueron preincubadas con esta droga antes de ser tratadas con la FN. En cuanto a la fracción celular correspondiente al citoesqueleto (figura 9), se detectaron varias proteínas fosforiladas de peso molecular de 95, 77, 66, 58, 48, 42 y 31 kDa. En esta fracción se aprecia una mayor incorporación de  $^{32}\text{P}$  comparado con la fracción soluble. Esto corrobora lo encontrado por cuantificación del  $^{32}\text{P}$  incorporado a la fracción TCA precipitable. Aquí también se puede ver como el PMA aumenta la fosforilación de dichas proteínas (carril 6). El efecto inhibitorio del H7 sobre la fosforilación de proteínas, también es claro en esta fracción (carril 7). Se puede apreciar además la desaparición de 2 bandas de peso molecular de 30 y 77 kDa al inactivarse a la PKC con el H7.

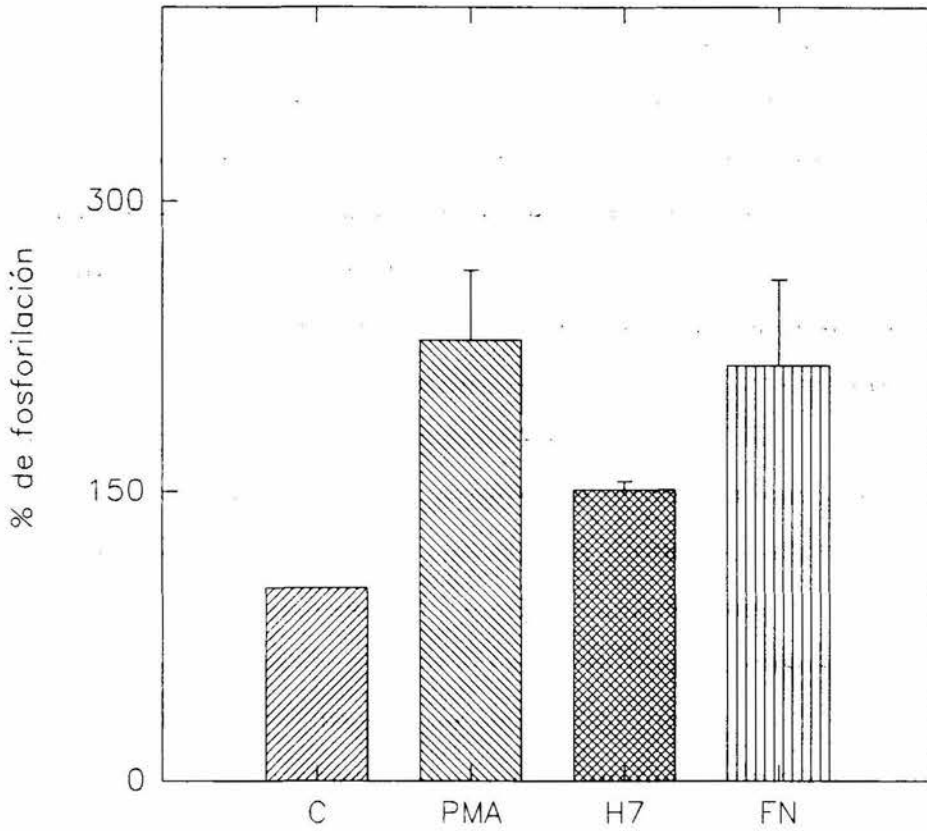






Figura 6.- Efecto del PMA, FN y H7 sobre la fosforilación de proteínas de *Entamoeba histolytica*. Los trofozoitos fueron marcados con  $^{32}\text{p}$  durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , después se incubaron con PMA  $1\mu\text{M}$   H7  $100\mu\text{M}$  +  $1\mu\text{M}$  PMA  y FN a una concentración de  $28\mu\text{g}/\text{ml}$  ; control . A los 20 minutos se paró la reacción en hielo y se hicieron extractos celulares de los cuales se determinó la cantidad de  $^{32}\text{p}$  incorporado a las proteínas (TCA- precipitable) en un contador de centelleo.

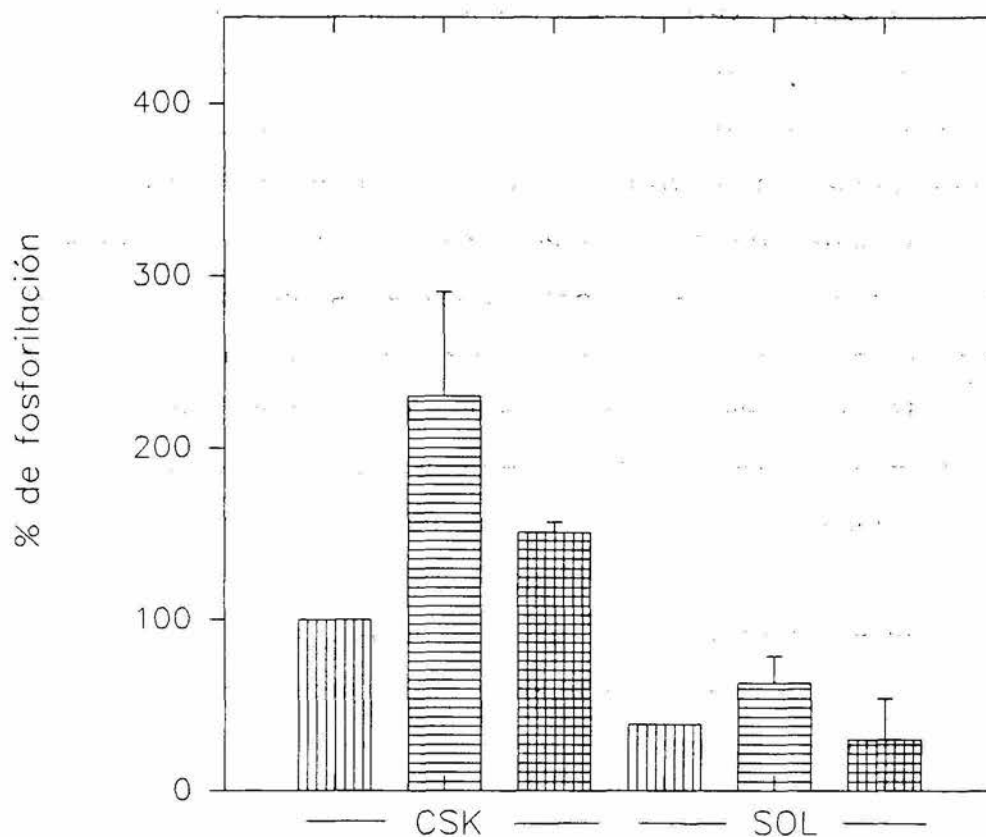





Figura 7.— Efecto del PMA y H7 sobre la fosforilación de proteínas de la fracción soluble y de citoesqueleto de *Entamoeba histolytica*. Trofozoitos de amiba fueron marcados con  $^{32}\text{p}$  durante 1 h, se incubaron con PMA 1uM  y H7 100 uM + PMA 1uM  ; control . A los 20 minutos se paró la reacción en hielo, se hicieron extractos celulares de los cuales se obtuvo la fracción de citoesqueleto (CSK) y la soluble (SOL) determinándose la cantidad de  $^{32}\text{p}$  (TCA-precipitable) incorporado a cada fracción en un contador de centelleo.

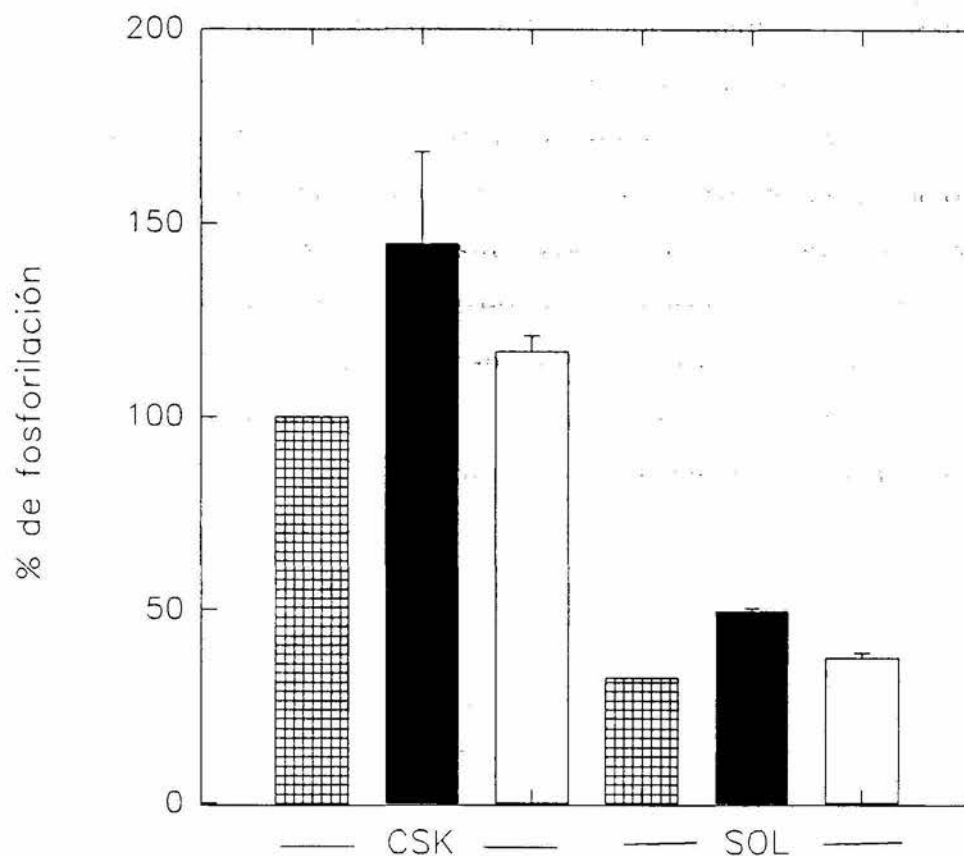


Figura 8.— Efecto del H7 sobre la fosforilación de proteínas de *Entamoeba histolytica* inducida por FN. Trofozoitos de amibas fueron marcados con  $^{32}\text{p}$  durante 1 h e incubados con 28ug/ml de FN  y con 100 uM de H7 + 28ug/ml de FN ; control . A los 20 minutos se paró la reacción en hielo, se hicieron extractos celulares de los cuales se obtuvo la fracción de citoesqueleto (CSK) y la soluble (SOL) determinándose la cantidad de  $^{32}\text{p}$  (TCA-precipitable) incorporado a cada fracción en un contador de centelleo.

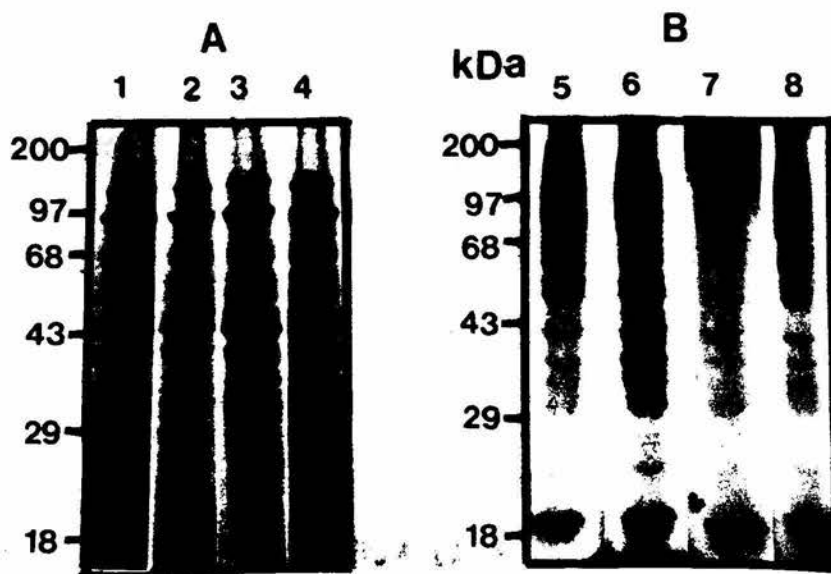


Figura 9.— Efecto del PMA, FN y H7 sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la fracción soluble de *Entamoeba histolytica*. Las células se marcaron con  $^{32}\text{p}$  durante 1 h, se incubaron durante 20 minutos con PMA 1 $\mu\text{M}$  (carril 2 y 6), FN 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (carril 4 y 8) y H7 100  $\mu\text{M}$  + PMA 28  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (carril 3 y 7). Al término de la reacción se solubilizaron los trofozoitos y se obtuvo la fracción soluble que fue analizada por electroforesis en un gel al 10%, teñidas con coomasie (panel A) y autorradiografiadas (panel B) para ver el  $^{32}\text{p}$  asociado a las proteínas de dicha fracción.

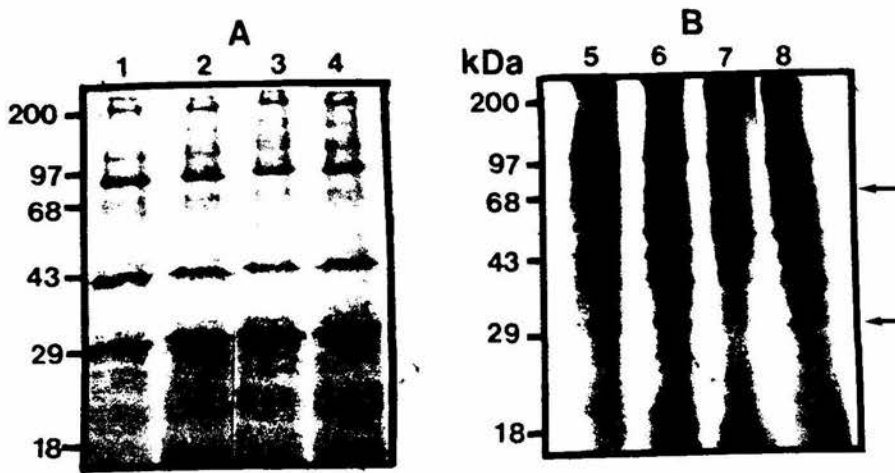


Figura 10.- Efecto del PMA, FN y H7 sobre el patrón de fosforilación de proteínas de la fracción de CSK de *Entamoeba histolytica*. Las células se marcaron con  $^{32}\text{P}$  durante 1 h, se incubaron durante 20 minutos con PMA 1  $\mu\text{M}$  (carril 2 y 6), FN 28  $\mu\text{g/ml}$  (carril 4 y 8) y H7 00  $\mu\text{M}$  + FN 28  $\mu\text{g/ml}$  (carril 3y7). Al término de la reacción se solubilizaron los trofozoitos y se obtuvo la fracción de CSK que fue analizada por electroforesis en un gel al 10%, teñidas con coomasie (panel A) y autorradiografiadas (panel B) para ver el  $^{32}\text{P}$  asociado a las proteínas de dicha fracción.

## DISCUSION

Las interacciones entre células y proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, afectan muchas propiedades fundamentales de la célula como su forma, locomoción, crecimiento y diferenciación (Adams et al, 1989; Juliano y Haskill, 1993). Sin embargo, aún no es claro como los efectos de esta interacción son transmitidos a través de la membrana plasmática (Gigmond y Aumailley, 1992). Se sabe que una de las maneras en que la matriz extracelular ejerce su efecto es a través del citoesqueleto, durante esta interacción hay una transducción de señales que involucra segundos mensajeros cuyos efectos sobre el citoesqueleto son mediados por moléculas como el AMPc, GMPc, inositol trifosfato (IP3) o el diacilglicerol (DG). Estos mensajeros pueden regular el ensamblaje del citoesqueleto mediante la fosforilación de proteínas y mediante procesos dependientes de calcio. Dentro de estos mensajeros intracelulares se encuentra proteína cinasa C, enzima regulatoria que juega un papel clave en esta modulación del citoesqueleto como respuesta de la adhesión celular a proteínas de matriz extracelular (Woods y Couchman, 1992).

El estudio de la participación de la PKC en la regulación del citoesqueleto así como en otros procesos celulares, se ha investigado mediante el uso de ésteres de forbol, agentes promotores de tumores que activan directamente a la PKC (Blumberg et al, 1980). Se ha visto que los ésteres de forbol afectan la reorganización del citoesqueleto en muchas células. Cambios en los elementos del citoesqueleto como actina, calspectina, vimentina y microtúbulos se han reportado en glóbulos rojos y fibroblastos por la presencia de estos compuestos (Giese et al, 1990; Lyass et al, 1988 y Correas et al, 1992). Estas drogas también afectan la morfología, adhesión y locomoción de células al inducir una reorganización de los filamentos de actina y de los microtúbulos (Derventzi et al, 1992).



## MODULACION DEL CSK DE ACTINA POR LA PKC

En *E. histolytica* al igual que en neutrófilos, el PMA induce un aumento en la polimerización de actina además de alterar la organización de los filamentos y de la actina estructurada. Cuando los trofozoitos preincubados con PMA se adhieren a vidrio, hay un rearrreglo de la actina-F para formar placas de adhesión y bocas endocíticas que aparecen en cada célula en forma muy notoria y que pueden evidenciarse tiñendo a las amibas con faloidina rodaminada, droga que se une específicamente a actina estructurada. Este rearrreglo de la actina es muy similar al que se ha observado cuando los trofozoitos se unen a fibronectina. Estos resultados sugieren que el contacto del trofozoito con la fibronectina puede estar induciendo una serie de señales citoplásmicas que conduzcan a la movilización de calcio y por consiguiente a la activación de la PKC, y que la fosforilación de proteínas asociadas al CSK por esta cinasa, resulte en el rearrreglo específico de la actina observado en las células adheridas a FN. La cinasa C tendrá entonces una participación importante en la modulación de la organización del citoesqueleto de actina de *E. histolytica*.

Durante la unión de los trofozoitos de amiba a fibronectina se ha observado que la estructuración tan específica del citoesqueleto en placas de adhesión va acompañada de un aumento de un 40% en la cantidad de actina-F (Manning, datos no publicados). Las amibas al ser expuestas al PMA también aumentaron su contenido de actina-F aunque el aumento fue solamente de un 26%. Esta diferencia puede deberse a que la fibronectina puede estar involucrada en la activación de otros mensajeros aparte de la PKC que participen en la modulación del citoesqueleto de actina. Recientemente, se ha demostrado que durante la unión de los trofozoitos de amiba a FN, se produce una movilización del calcio intracelular (Carbajal y Meza 1993, manuscrito en preparación). La movilización del calcio, la activación de la PKC así como de otros mensajeros intracelulares, pudieran también estar participando en este aumento de actina-F en respuesta a la adhesión de los trofozoitos a la FN. En

neutrófilos por ejemplo, la activación de éstas células con el péptido quimiotáctico fMLP resulta en un aumento en la polimerización de actina que va acompañada de la activación de la PKC y de un aumento de calcio intracelular, sin embargo, el porcentaje de actina polimerizada no puede ser explicado únicamente por la activación de la PKC y el incremento en el calcio intracelular. Esto también lleva a pensar que otros mensajeros están involucrados en el aumento de actina-F inducido por activación con el péptido fMLP (Howard and Wang, 1987).

En los neutrófilos, el PMA no solamente aumenta la cantidad de actina-F, sino también induce cambios en la distribución de estos filamentos como sucede en las amibas (Roos et al, 1987 y Downey et al 1992).

También se ha sugerido que los ésteres de forbol activan proteínas que unen GTP, específicamente proteínas ras y rho que se propone están involucradas en la reorganización del citoesqueleto así como en procesos de adhesión. (Narumiya y Morii, 1993). Estas proteínas al ser activadas, llevan en muchos casos a la formación de placas de adhesión y a un ensamblaje de los filamentos de actina.

En *E. histolytica* recientemente se clonó el gen que codifica para la proteína rho (Lohia y Samuelson, 1993). Esta proteína podría estar directamente involucrada en la reorganización del CSK de la amiba al ser activada por el PMA.

La transducción de señales vía PKC es ampliamente utilizada por diferentes ligandos, incluyendo factores quimiotácticos en neutrófilos (Howard y Wang, 1987), trombina en plaquetas (Baldassare et al, 1992) y factores de crecimiento en células en cultivo (Fields et al, 1990). En todos estos casos también se induce un ensamblaje de los filamentos de actina como respuesta a la activación de la PKC.

La fibronectina al parecer, está involucrada en la transducción de señales que llevan a la activación de PKC, sin embargo, no se puede descartar que la FN esté también involucrada en la producción de segundos mensajeros que lleven a la activación de otras cinasas capaces de modular también al citoesqueleto. Muchos tipos celulares como es el caso de los fibroblastos, interactúan con la FN a través de receptores de tipo integrina que transmiten señales que llevan a la activación de

diferentes tirosinas cinasas como la p60v-src, p80v-gag-yes, (Burrige et al, 1988) y la pp125<sup>fas</sup>, cinasa localizada en adhesiones focales (zonas especializadas de contacto entre la célula y la matriz extracelular) (Schaller et al, 1992); estas a su vez, fosforilan elementos de citoesqueleto y de membrana involucrados en el proceso de adhesión que lleva a una organización del citoesqueleto regulando así la forma celular y en general la arquitectura interna de la célula. También se ha descrito la presencia de treonina-cinasas, como la PKC en adhesiones focales como respuesta de la unión de fibroblastos 3T3 a fibronectina (Beckerle, 1986; Jaken et al, 1989) y recientemente se ha demostrado la participación de esta cinasa en la formación de dichas estructuras (Woods y Couchman, 1992). En la amiba, es muy posible que la PKC, se encuentre asociada al citoesqueleto, específicamente localizada en las zonas de contacto con el sustrato. La PKC podría ser entonces un componente modulador de la formación de estructuras, que favorecen el contacto de la amiba con el sustrato, como lo son las placas de adhesión. Esta modulación de la estructura del citoesqueleto podría llevarse a cabo mediante la fosforilación de proteínas que se unen a actina. Por otro lado, se ha visto que al ser activada la PKC por ésteres de forbol, provoca un aumento del pH intracelular, mediado por la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , además hay una redistribución de  $\text{Ca}^{++}$  mediante la estimulación de un eflujo de este catión (Kenneth et al, 1991; Shwartz y Lechene, 1992). En *Entamoeba histolytica*, estudios hechos por Carbajal y Meza en 1992 (manuscrito en preparación), indican que durante la adhesión de los trofozoitos a la FN, además de una movilización de  $\text{Ca}^{++}$ ; hay un aumento del pH intracelular, posiblemente mediado también por la activación de un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . La existencia de proteínas que se unen a los filamentos de actina en células cuyas propiedades son reguladas por cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular o de pH, han sugerido que estos cationes pueden estar influenciando el ensamblaje de los filamentos así como su reorganización. Este podría ser otro mecanismo de modulación del citoesqueleto de actina en amibas en respuesta a la activación de la PKC.

## PKC EN *Entamoeba histolytica*

Los resultados obtenidos sobre la modulación del citoesqueleto de actina mediante ésteres de forbol, sugieren la participación de la PKC en este proceso. La presencia de la PKC en *E. histolytica* ya se había sugerido en un estudio hecho por Ravdin y colaboradores en donde se habla de la posible participación de esta enzima en la actividad citolítica del parásito (Weikel et al, 1988). Sin embargo, es hasta ahora cuando se confirma la presencia de la PKC en la amiba y se evidencia su participación en la modulación dinámica del citoesqueleto de actina.

Se sabe que la PKC juega un papel muy importante en la regulación celular (Hug y Sarre, 1993). Sin embargo, la identificación de esta enzima había estado restringida únicamente a tejidos y órganos de mamíferos así como a otros eucariontes superiores (Sassa y Miwa, 1992). En un estudio hecho por Ludérus y colaboradores, se reporta por primera vez la actividad de una PKC en un eucarionte inferior, en *Dictyostelium discoideum*. Esta actividad se encontró en los extractos crudos y se midió mediante la fosforilación de un péptido sintético (Ludérus, 1989). Mediante ensayos similares de fosforilación "in vitro", se pudo detectar la actividad de esta cinasa en *E. histolytica*. El sustrato utilizado fue un péptido sintético de proteína básica de mielina (MBP). Experimentos hechos por Yasuda, et al en 1990, demuestran que este péptido sintético es un sustrato altamente específico para la PKC, no puede ser fosforilado por la PKA, la caseína cinasa tipo I y II, la PKII dependiente de Ca/CaM ni fosforilasa cinasa entre otras. Esta proteína cinasa C, al igual que las PKC de células de mamífero, pudo ser activada por PMA en presencia de  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ , y PS. El  $Mg^{++}$ , es un cofactor importante para la PKC y para una unión óptima de los ésteres de forbol al dominio regulatorio de la enzima (Zidoveski y Lester, 1992).

La especificidad de la PKC se confirmó utilizando el péptido inhibidor de la región de pseudosustrato de PKC (19-35) que inhibe la autofosforilación además de ser un potente inhibidor del sustrato de MBP. Este inhibidor está basado en la región

de pseudosustrato común a las isoenzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La región de pseudosustrato para las isoenzimas  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  varía, siendo posible que este inhibidor no reconozca a estas subespecies. Esto significa que en *E. histolytica* existe alguna o varias de estas isoformas de la PKC. En los diferentes tipos celulares generalmente se pueden encontrar más de una subespecie de PKC. Los linfocitos T por ejemplo, expresan las subespecies  $\alpha$ ,  $\beta$  I y  $\gamma$  II y su distribución intracelular depende del estado de proliferación de las células (Nishizuka, 1988). La presencia en *E. histolytica* de estas isoformas se propone no sólo por la especificidad del inhibidor, sino por los diferentes cofactores que se utilizaron para su activación. Las cinasas pertenecientes a este grupo (cPKC) que representan a las clásicas proteínas cinasas C ampliamente distribuidas en una gran variedad de tejidos, son activadas por  $\text{Ca}^{++}$ , DAG y PS. Dicha activación puede además verse aumentada por la presencia de ácidos grasos insaturados y lisofosfatidilcolina.

Bailey et al en 1987, reportaron que liposomas conteniendo específicamente diacilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina, estimulaban la polimerización de actina y la fagocitosis en *E. histolytica*. Ahora que se sabe de la presencia de PKC en este parásito, es posible que estos lípidos estimulen la polimerización de actina y la fagocitosis así como el rearreglo del CSK, mediante la activación de la PKC. Durante este proceso, la fibronectina pudiera ser la señal que lleve a la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> vía PLC que resulta en la producción de DAG que a su vez activa de manera transitoria a la PKC. Otra alternativa es que que la FN induzca la hidrólisis de PC vía PLA<sub>2</sub> produciendo FFA y LysoPC capaces de activar de manera transitoria o sostenida a la PKC. La hidrólisis de PC también podría ser vía PLD para producir DAG involucrado en la activación prolongada de la PKC.

La PKC de amiba fue activada directamente con PMA en presencia de diferentes cofactores y también pudo ser inhibida "in vitro" por H7, el cual, es considerado como un inhibidor altamente específicos de la PKC (Hidaka y Kobayashi, 1992). Inhibe a la cinasa de manera directa y no mediante la interacción con otros fosfolípidos o con calcio como muchos otros inhibidores; compite con el sitio de unión a ATP. Es por

eso que esta droga ha sido ampliamente utilizada en la evaluación del papel de esta cinasa en una gran variedad de líneas celulares.

## FOSFORILACION DE PROTEINAS POR FN Y PMA

La fosforilación de proteínas por la PKC, es uno de los mecanismos principales utilizados en la regulación de muchas funciones celulares. Una vez que la PKC ha sido activada, empieza a fosforilar proteínas específicas para finalmente dar una respuesta biológica. Entre los sustratos identificados para la PKC se encuentran: la miosina I (Swanljung y Collins, 1992), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Berridge, 1987; Ido et al, 1987), la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) (Bayley y Ress, 1983) y ciertas integrinas (Shaw et al, 1990) así como componentes de membrana y citoesqueleto (Heyworth et al, 1989; Stasek et al, 1992).

La activación de la PKC de amiba por PMA, así como por FN, lleva a un aumento en la fosforilación de proteínas de la fracción soluble y en mucho mayor grado de las proteínas asociadas al citoesqueleto. Esta fosforilación disminuye cuando las células son tratadas con H7, lo que indica que tanto el PMA como la FN, activan a la PKC. Algunas de las proteínas asociadas a la fracción de CSK que se fosforilan, podrían ser proteínas que se unen a la actina directa o indirectamente. Se sabe que PKC fosforila varias de estas proteínas entre las que se encuentra profilina (Hansson, 1988), vinculina, filamina (Kawamoto et al, 1984) talina (Beckerle, 1990) y caldesmon (Stasek, 1992). En *E. histolytica*, recientemente se han identificado varias proteínas que se unen a actina (Reyes, 1993), las cuales podrían ser candidatos para ser fosforiladas por la PKC participando así activamente en la modulación del citoesqueleto de la amiba.

Durante la activación de la PKC, esta se transloca a la membrana plasmática

para después fosforilar tanto proteínas citosólicas como de membrana. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos sobre la fosforilación de proteínas, siempre se detectó una mayor fosforilación en las proteínas de la fracción de CSK antes y después de la activación de la PKC, lo que indica que existe una fuerte actividad de cinasas en esa fracción siendo posible que un gran porcentaje de la enzima este ya asociada a la membrana donde posteriormente será activada. Esto ya se ha observado en fibroblastos 3T3-L1, en células de eritroleucema murino (MEL) y en células murinas dependientes de interleucina 2 (CTLL-2) en respuesta al factor de crecimiento fibroblástico (FGF), al derivado de plaquetas (PDGF) y a interleucina 2 (IL-2) (Chakravarthy et al, 1992). Esta asociación de la PKC a la membrana previa a su activación, se ha encontrado en células y tejidos metabólicamente activos como el cerebro o el hígado, en donde un alto porcentaje de la enzima está continuamente asociada a la fracción particulada mientras que en células inactivas, o en reposo, la mayor parte de la actividad se encuentra en el citosol (Nishizuka, 1988).

La fosforilación de proteínas como respuesta a la activación de la PKC por PMA fue ligeramente mayor que la fosforilación observada por estimulación con FN (figura 9). Esto puede atribuirse a que el PMA provoca una activación de PKC más prolongada ya que se metaboliza lentamente, mientras que el activador natural de la PKC, el DAG se hidroliza rápidamente. La fibronectina pudo haber activado a la PKC de forma transitoria mediante la producción de DAG, el cuál al ser rápidamente metabolizado, no permitió una activación constante de la PKC.

La PKC al activarse, fosforiló varias proteínas del citosol y de membrana presentes en la amiba. Es posible que durante el proceso de fosforilación por la PKC, estuvieran activas fosfatasa de tipo treonina-serina como la fosfatasa tipo I, IIA y IIC, tres de las mayores fosfatasa presentes en células eucarióticas (Charbonneau y Tonks, 1992) lo que impidió que las diferencias en el grado de fosforilación de proteínas entre los distintos tratamientos fueran más evidentes. Desafortunadamente nada se conoce aún en relación a la presencia o características de fosfatasa en

amibas. Es importante también considerar la posible presencia de inhibidores endógenos de la PKC como los que se reportan en neutrófilos (Balazovich et al, 1992) capaces de inhibir la fosforilación de proteínas dependientes de la PKC especialmente de la fracción citosólica. Proteasas dependientes de  $Ca^{++}$  como la proteasa tipo II y calpaína que se sabe actúan sobre la PKC (Beckerle et al, 1987), pueden también estar participando en la degradación de la cinasa modulando así su actividad.

Aunque es clara la presencia de la PKC en *E. histolytica* así como su participación en la modulación de la organización del citoesqueleto de actina, queda aún mucho por explorar. Primeramente, sería interesante determinar mediante anticuerpos monoclonales, las subespecies presentes en la amiba así como su localización intracelular. Determinar también el papel del calcio y otros cofactores necesarios para su activación y para la regulación de su actividad así como la cascada de eventos involucrados en la activación de la cinasa. Otro punto interesante, sería establecer con precisión cuales son las proteínas que son fosforiladas por la PKC no solo con el fin de entender mejor la participación de esta enzima en la organización del citoesqueleto de la amiba sino también para analizar su posible participación en otros procesos celulares como la división, adhesión y motilidad.



## CONCLUSIONES

La proteína cinasa C, enzima regulatoria que participa en una gran variedad de procesos celulares, se encuentra presente en los trofozoitos de *E. histolytica*.

Al igual que la PKC "clásica" de células de mamífero, la PKC amibiana es activada por ésteres de forbol en presencia de lípidos y calcio e inhibida por H7, inhibidor altamente específico de la PKC.

La PKC identificada, participa en la reorganización del citoesqueleto de actina inducida por unión de los trofozoitos a fibronectina.

La PKC fosforila proteínas citosólicas y proteínas asociadas al citoesqueleto celular en respuesta a la activación por PMA o fibronectina. El H7 inhibe la fosforilación de proteínas y el rearreglo de la actina inducido por fibronectina ó PMA.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams JC y Watt FM 1989. Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature*. 340:307-309.
- Anderem A. 1992. Signal transduction and the actin cytoskeleton: The roles of MARKS and profilin. *Trends in Biochem. Sci. TIBS* 17: 438-443.
- Akita Y, Ohno S, Konno Y, Yano A y Suzuki K. 1990. Expression and properties of two distinct classes of the phorbol esters receptor family, four conventional protein kinase C types and a novel PKC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:184-189.
- Albach RA, Booden T, Boonlayangoor P y Downing SW. 1977. *Entamoeba histolytica*: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp. Parasitol.* 42:248-259.
- Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K y Nishizuka Y. 1992. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends in Biochemical Sciences TIBS* 17:414-417.
- Bailey G, Day D, Nokkaew C y Harper C. 1987. Stimulation by target cell membrane lipid of actin polymerization and phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 55:1848-1853.
- Balazovich KJ, McEwen EL, Lutzke ML, Boxer LA y White T. 1992. Purification of PKC-I, an endogenous protein kinase C inhibitor, and types II and III protein kinase C isoenzymes from human neutrophils. *Biochem. J.* 284:399-405.
- Baldassare JJ, Henderson PA, Burns D, Loomis C y Fisher GJ. 1992. Translocation of protein kinase C isozymes in trombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.* 267:15585-15590.
- Barnard EA. 1992. Receptor classes and the transmembrane-gated ion channels. *Trends in Biochem. Sci. TIBS* 17:368-374.
- Bazzi MD y Nelsestuen GL 1988. Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152:336-343.



- Bazzi MD y Nelsestuen GL. 1988. Properties of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem.* 27:7589-7593.
- Bayley SA y Rees DA 1986. Myosin light chain phosphorylation in fibroblast shape change, detachment and patching. *Eur. J. Cell Biol.* 42:10-16.
- Beckerle MC. 1986. Identification of a new protein localized at sites of cell-substrate adhesion. *J. Cell Bio.* 103:1679-1687.
- Beckerle MC, Burr ridge K, DeMartino, GN y Croall DE. 1987. Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell.* 51:569-577.
- Beckerle MC. 1990. The adhesion plaque protein, talin, is phosphorylated in vivo in chicken embryo fibroblasts exposed to a tumor-promoting phorbol ester. *Cell Reg.* 1:227-236.
- Bell R.M. 1986. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45:631-632.
- Ben-Ze-ev A, Robinson GS Bucher NLR y Farmer SR. 1988. Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2161-2165.
- Berridge MJ. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56:159-93.
- Blumberg PN. 1980. In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters. *Crit. Rev. Toxicol.* 8:153-197.
- Blumberg PM. 1991. Complexities of the protein kinase C pathway. *Molecular Carcinogenesis.* 4:339-344.
- Burr ridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. 1988. Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:487-525.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U y Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257:7847-7851.

- Charbonneau H y Tonks NK. 1992. 1002 Protein phosphatases? Annu. Rev. Cell Biol. 8:463-93.
- Chakravarthy BR, Tremblay R, Macdonald P, Krsmanovic V, Whitfield JF y Durkin JP. 1992. The activation of inactive membrane-associated protein kinase C is associated with DMSO-induced erythroleukemia cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1136:83-90.
- Chen. 1992. Synergistic activation of type III protein kinase C by cis-fatty acid and diacylglycerol. *Biochem J*. 282:33-39.
- Clemens MJ, Traynerl, Menaya J. 1992. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J. Cell Sci*. 103:881-887.
- Cohen P. 1992. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends in Biochemical Sciences*. 17,10:408-413.
- Correas I, Díaz-Nido J y Jesús Avila. 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Sci*. 267:15721-15728.
- Derventzi A, Rattan SIS y Clark BF. 1992. Phorbol ester-induced reorganization of the cytoskeleton in human fibroblasts during ageing in vitro. *Biochem and Biophys. Res. Commun*. 182:1423-1428.
- Diamond LS. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*, 134:336.
- Diamond LS, Harlow DR y Cunnick CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72:431-432.
- DiCorletto PE y de la Motte CA. 1989. Thrombin causes increased monocytic-cell adhesion to endothelial cells through a protein kinase C-dependent pathway. *Biochem. J*. 264:71-77.
- DiPersio CM, Jackson DA y Zaret KS 1991. The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. Cell. Biol*. 11:4405-4414.
- Downey GP, Chan CK, Lea P, Takai A, Grinstein S. 1992. Phorbol ester induced actin assembly in neutrophils: Role of protein kinase C. *J. Cell Biol*. 116:695-706.

- Fields AP, Tyler G, Kraft AS y May Ws. 1990. Role of nuclear protein kinase C in the mitogenic response to platelet-derived growth factor. *J. Cell Sci* 96:107-1145.
- Gigmond C y Aumailley M. 1992. Cellular interactions with the extracellular matrix are coupled to diverse transmembrane signalling pathways. *Exp. Cell Res.* 203:365-373.
- Gingell D, Owens N. 1992. How do cells sense and respond to adhesive contacts? Diffusion-trapping of laterally mobile membrane proteins at maturing adhesions may initiate assembly response and lamella formation. *J. Cell Science.* 101:255-266.
- Golden AB, Brugge JS, Shattil S. 1988. Role of platelet membrane glycoprotein IIb, IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet proteins. *J. Cell Biol.* 11:3117-3127.
- Gopalakrishna R, Barsky SH, Thomas TP y Anderson WB 1986. Factors influencing chelator-stable, detergent-extractable, phorbol diester-induced membrane association of protein kinase C. *Archs. Biochem. Biophys.* 298:1123.
- Guan JL, Trevethick JE y Hynes, R.O. 1991. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120kD protein. *Cell Regul.* 2:951-964.
- Guarner V. 1990. History of Amebiasis. En Kretschmer RR (Ed). Amebiasis. Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. CRC Press. Boca Raton Florida pag. 2.
- Hansson A, Skoglund G, Lassing I, Lindberg U e Ingleman-Sundberg M. 1988. Protein Kinase C-dependent phosphorylation of profilin is specifically stimulated by phosphatidylinositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150:526-531.
- Hannun YA, Loomis CR y Bell RM. 1986. Protein kinase C activation in mixed micelles. *J. Biol. Chem.* 261:7184-7190.
- Hartwig JH y Kwiatkowski D. 1991. Actin-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biol.* 3:87-97.
- Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J, Iwabe N y 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.

- Heyworth P, Karnovsky M y Badwey J. 1989. Protein phosphorylation associated with synergistic stimulation of neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264:14935-14939.
- Hidaka H e Ishikawa T. 1992. Molecular pharmacology of calmodulin pathways in the cell functions. *Cell Calcium.* 13:465-472.
- Hidaka H y Kobayash R. 1992. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992. 32:377-97.
- Hoult JR y Nourshargh S. 1985. Phorbol myristate acetate enhances human polymorphonuclear neutrophil release of granular enzymes but inhibits chemokinesis. *Br. J. Pharmac.* 86. 533-537.
- Howard TH, Oresajo CO. 1987. A method for quantifying F-actin in chemotactic peptide activated neutrophils: Study of the effecto of tBOC peptide. *Cell Motility.* 5:545-557.
- Howard T y Wang D. 1987. Calcium ionophore, phorbol ester, and chemotactic peptide-induced cytoskeleton reorganization in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 79:1359-1364.
- Hug H, Sarre TF. 1993. Protein Kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem J.* 291:329-343.
- Hynes R. 1992. Integrins. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- Ido M, Sekiguchi K, Kikkawa U y Nishizuka Y. 1987. Phosphorylation of the EGF receptor from A431 epidermoid carcinoma cells by three distinct types of protein kinase C. *FEBS lett.* 219:215-218.
- Jaken S, Leach K, Lauch, T. 1989. Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* 409:697-704.
- Juliano RL, y Haskill, S. 1993. Singnal transduction from the extracelular matrix. *J. of Cell Biol.* 120:577-585.
- Kawamoto S, y Hidaka H. 1984. Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of actin-binding proteins. 1984. *Biochem and Biophys. Res. Comm.* 118:736-742.
- Keller HU, Niggli VA y Zimmerman, A. 1990. The protein kinase C inhibitor H-7

- activates human neutrophils: effect on shape, actin polymerization, fluid pinocytosis and locomotion. *J. Cell Sci.* 96:99-106.
- Kenneth T, MacLeod y Harding SE. 1991. Effects of phorbol ester on contraction, intracellular pH and Intracellular  $Ca^{2+}$  in isolated mammalian ventricular myocytes. *Journal of Physiology.* 444:481-498.
- Kornberg L, Earp HS, Turner C, Prokop C y Juliano L. 1991. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clusterin of beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8392-8396.
- Kuo JF, Anderson RGG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, Katoh N, Shoji M y Wrewnn. R.W. 1980. Calcium-dependent protein kinase C: Widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of of phospholipid, calmodulin and trifluoperazine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7039-7043.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Leach K, Powers E, Ruff V, Jaken S y Kaufmann S. 1989. Type 3 protein kinase C localization to the nuclear envelope of phorbol ester-treated NIH 3T3 Cells. *J. Cell Biol.* 109:685-695.
- Leibersperger H, Gschwendt M, Gernold M y Marks F. 1991. Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the s-type in different species and murine tissues. *J. Biol. Chem.* 266:14778-14784.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Granin, J Honigberg, BM, Leedale GF, Loeblich III AR, Lom J, Lynn, D., Merifeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J y Wallace FG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27(1):37-58.
- Lipfert L B, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT y Brugge JS. 1992. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein kinase pp125<sup>lak</sup> in platelets. *J. Cell Biol.* 119:905-912.
- Lohia A y Samuelson J. 1993. Molecular cloning of a RHO family gene of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology.*

58:177-180.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. 1951. Protein measurements with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Ludérus E, Van der Most G, Otte P y Van Driel r. 1989. A protein kinase C-related enzyme activity in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 253:71-75.
- Lushbaugh WB, Kairalla AB, Contey JR, Hofbauer AF y Pittman FE. 1979. Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 139:9.
- Martinez-Palomo A. 1986. Ed. Amebiasis. Amsterdam: Elsevier. pag 2.
- Menko AS y Boettiger D. 1987. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell.* 51:51-57.
- Messina JL y Weinstock RS. 1992. Regulation of  $\beta$ -actin gene transcription by insulin and phorbol esters. *Exp. Cell Res.* 200:532-535.
- Meza I, Sabanero M, Cazares F y Bryan J. 1983. Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 258(6):3936-3941.
- Meza I y Franco E. 1988. Interaction between pathogenic amebas and extracellular matrix proteins II. Laminin. *J. Cell Biol.* 107:799.
- Meza I. 1992. *Entamoeba histolytica*: Phylogenetic Considerations. A Review. *Arch. Med. Res.* 23:1-5.
- Muñoz MdeL, Calderón J y Rojkind M. 1982. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* 155:42-51.
- Narumiya S y Morii N. Rho gene products, botulinum C3 exoenzyme and cell adhesion. *Cellular Signalling.* 1:9-19.
- Newton AC y Koshland D. 1987. Protein kinase C autophosphorylates by an intrapeptide reaction. *J. Biol. Chem.* 262:10185-10188.
- Nishizuka Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 308:693-697.
- Nishizuka Y. 1986. Studies and perspectives on protein kinase C. *Science.* 233:305-312.
- Nishizuka Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.



- Nishizuka Y. 1989. The family of protein kinase C for signal transduction. *J A. Med. Assoc.* 262: 1826-1833.
- Pérez-Tamayo R, Beckerl, Montfort, Pérez-Montfort R. 1990. Pathobiology of Amebiasis. In Kretschmer RR, Ed. Amebiasis. Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. Boca Raton, Fl: CRC Press, 123.
- Pierschbacher MD, Hayman EG y Ruoslahti E. 1981. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell* 26:259.
- Pontremoli S, Melloni E, Salamino F, Sparatore B, Michetti M, Sacco O y Horecher BL. 1986. Phosphorylation of proteins in human neutrophils activated with phorbol myristate acetate or with chemotactic factor. *Arch. Biochem Biophys.* 250:23-29.
- Ravdin JI, Murphy CF, Salata RA, Guerrant RL y Hewlett E L. 1985a. N-acetil-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica* I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J Infect Dis* 151:804-815.
- Ravdin JI. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis* 8:247-260.
- Reyes C G. 1993. Proteínas que unen a actina-F en *Entamoeba histolytica*. Tesis de maestría. CINVESTAV del IPN, México.
- Roos FJ, Zimmermann A y Keller HU. 1987. Effect of phorbol myristate acetate and the chemotactic peptide fNLPNTL on shape and movement of human neutrophils. *J. Cell Sci.* 88:399-406.
- Sabanero M y Meza I. 1982. Localización de actina en trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HMI. *Arch. Inv. Méd. México.* 13 supl.3:37.
- Sando JJ, Maurer MC, Bolen EJ y Grisham CM. 1992. Role of cofactors in protein kinase C activation. *Cellular Signalling.* 4:595-609.
- Sassa T y Miwa, J. 1992. Purification and characterization of protein kinase C from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 282.219-233.
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB y Persons JT. 1992.

- pp125 FAK, a structurally unique protein tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Sepulveda B. 1982. Amebiasis: Host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* 4:1247-1253.
- Shaw L, Vessier JM y Mercurio A. 1990. The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the  $\alpha_5\beta_1$  integrin. *J. Cell Biol.* 110:2167-2174.
- Sheterline P, Richard JE, Boothroyd B y Richards C. 1986. Phorbol ester induces rapid actin assembly in neutrophil leucocytes independently of changes in  $(Ca^{2+})_i$  and  $pH_i$ . *J. of Muscle Research and Cell Motility.* 7:405-412.
- Shwartz MA y Lechene C. 1992. Adhesion is required for protein kinase C-dependent activation of the  $Na^+/H^+$  antiporter by platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6138-6141.
- Sporn SA, Eirman DF, Johnson CE, Morris J, Martin, G, Ladner M y Haskill, S. 1990. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J. Immunol.* 144:4434-4441.
- Stasek JE, Patterson CE y García J. 1992. Protein kinase C phosphorylates caldesmon<sub>77</sub> and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J. Cell. Phys.* 153:62-75.
- Swanljung-Collins H y Collins JH. 1992. Phosphorylation of brush border myosin I by protein kinase C is regulated by  $Ca^{2+}$ -stimulated binding of myosin I to phosphatidylserine concerted with calmodulin dissociation. *J. Biol. Chem.* 267:3445-3454.
- Symington BE, Symington FW y Rohrschneider LR. 1989. Phorbol ester induces increased expression, altered glycosylation, and reduced adhesion of K562 erythroleukemia cell fibronectin receptors. *J. Biol. Chem.* 264:13258-13266.
- Talamás-Rohana P, y Meza I. 1988. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J. Cell. Biol.* 106:1787.

- Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T and Nishizuka, Y. 1979. Calcium-dependent activation of multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254:3692-3695.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Lynn F, Eyck T y Sowadski JM. 1992. Structural framework for the protein kinase family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:429-462.
- Vázquez-Prado J y Meza, I. 1992. Fibronectin "Receptor" in *Entamoeba histolytica*: Purification and association with the cytoskeleton. *Archives of Medical Research.* 23:123.
- Weeds A, Hawkins B y Way P. 1992. Role of actin-binding proteins in cytoskeletal dynamics. *Biochem. Soc. Trans.* 19:99-102.
- Weeds A y Maciver Sutherland. 1993. F-actin capping proteins. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 5:63-69.
- Weikel C, Murphy CF, Orozco E, Ravdin JI. 1988. Phorbol esters specifically enhance the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity.* 56:6 1485-1491.
- White JG y Estensen RD. 1974. Selective labilization of specific granules in polymorphonuclear leukocytes by phorbol myristate acetate. *Am. J. Path.* 75:45-60.
- Woods A y Couchman JR. 1992. Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J. of Cell Sci.* 101:277-290.
- Yasuda I, Akira K, Tanaka S, Tomminaga M, Sakurai A y Nishisuka Y. 1990. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 166.1220-1227.
- Young JD, Young TM, Lu LP, Unkelese Jc y Cohn ZA. 1982. Characterization of a membrane pore forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 156:1677.
- Zheleznyak A y Brown EJ. 1992. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 267:12042-12048.

Zidovetzki R, Lester SD. 1992. The mechanism of activation of protein kinase C: a biophysical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1134:261-272.