

# Papel de PKC durante la invasión celular de *Toxoplasma gondii*

**M. González, M. Mondragón, S. González, I. Galván, R. Mondragón.**

Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados.  
Av. Instituto Politécnico Nacional No 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero., México D.F.  
C.P.07360  
*manueldelcarmen@hotmail.com*

## **Introducción.**

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular que en humanos inmunodeprimidos causa coriorretinitis, daños en diversos órganos y en casos extremos la muerte del enfermo. *T. gondii* invade activamente a todo tipo de células utilizando diferentes mecanismos como son: la motilidad por deslizamiento, la extrusión del conoide y la secreción de componentes. En etapas tempranas de la invasión activa, el taquizoito inicia la motilidad por deslizamiento sobre la membrana de la célula blanco, seguido por la adhesión mediada por proteínas MIC secretadas desde los micronemos [1]. Una vez que el parásito entra en contacto con la superficie celular proyecta hacia fuera el conoide (un organelo apical con capacidad contráctil) [2]. Consecutivamente se secretan el contenido de las roptrias alterando la integridad de la membrana del huésped lo cual es aprovechado por parásito para ingresar a la célula a través de una horadación de menos de 1  $\mu\text{m}$  mediante la constricción de su cuerpo y movimientos de tipo tornillo, alojándose en una vacuola parasitófora en donde proliferan por endodogénesis [3]. Bajo condiciones probablemente determinadas por la saturación del espacio en la vacuola parasitófora, la membrana de la célula huésped es permeabilizada activando a los taquizoitos para abandonar a la célula infectada con su respectiva destrucción [4]. Los mecanismos de regulación intracelular en la invasión-exteriorización incluyen la participación de calcio [5]. Sin embargo, el papel de eventos claves como la fosforilación de proteínas en la regulación intracelular de los mecanismos de diseminación de *T. gondii* son escasamente conocidos.

PKC es una familia de proteínas cinasas de serina-treonina ampliamente distribuidas y que participan en diversos eventos celulares como motilidad, secreción, cambios en el citoesqueleto, proliferación y apoptosis. En este trabajo, evaluamos la presencia de PKC en taquizoitos de *T. gondii* así como su distribución y funcionalidad durante la invasión activa. Nuestros resultados muestran la presencia de una isoforma de PKC a nivel del conoide de los taquizoitos la cual pudiera ser fosforilada y activada durante la activación de los mecanismos de invasión-egreso de *Toxoplasma gondii*.

## **Objetivo.**

Evaluar la presencia de isoformas de PKC así como su posible papel durante la invasión celular en taquizoitos de *T. gondii*.

## **Metodología.**

- 1) Parásitos. La cepa virulenta RH de *T. gondii* fue propagada como taquizoitos mediante inoculaciones intraperitoneales en ratones BALB/c.
- 2) Extrusión del Conoide. Los parásitos fueron expuestos a etanol durante 30 seg fijados y procesados para microscopía confocal como se indica adelante.

3) Ensayos de invasión celular. Células Hep-2 fueron infectadas por adición de taquizoítos frescos e incubadas por 2 hr a 37° en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

4) Exteriorización. Células HEP-2 infectadas con taquizoítos por 24 hr fueron expuestas a 1 μM del ionóforo para calcio A23187, fijadas con formaldehído y procesadas para microscopía de fluorescencia.

5) Inmunofluorescencia. Taquizoítos extracelulares o células HEP-2 infectadas a diferentes tiempos fueron fijadas y permeabilizadas con formaldehído y NP40 por 30 min, bloqueadas con suero fetal e incubadas en presencia de los anticuerpos primarios anti-PKCα y anti-fosfo-PKCαβII. Las células fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes. Imágenes de fluorescencia fueron adquiridas en la unidad de microscopía confocal del CINVESTAV-IPN.

### **Resultados.**

La isoforma α de PKC fue detectada mediante Western Blot en extractos proteicos totales de *Toxoplasma gondii* así como por microscopía de fluorescencia. Inicialmente se evaluó la ubicación de esta proteína en 3 condiciones; taquizoítos inactivos (PBS), taquizoítos activados para extrusión del conoide (EtOH) y taquizoítos expuestos a un activador de PKC (PMA). En las 3 condiciones la PKC se encontró ubicada en la región perinuclear y de manera muy interesante en la región que corresponde al conoide. Debido a que la extrusión del conoide es un evento clave en la invasión celular, la ubicación de PKC a nivel del conoide sugirió la participación de esta proteína en los procesos de invasión celular. Otros resultados nos indicaron que la fosforilación de PKC a nivel del conoide se lleva a cabo durante la extrusión del conoide, la invasión celular, así como en la exteriorización de los taquizoítos, no así durante la proliferación intracelular. Los inhibidores específicos de PKC como son BIM I y Gö6983 bloquearon de manera importante la invasión celular activa de *Toxoplasma gondii*.

### **Conclusion.**

PKCα es fosforilada, activada y probablemente sea una proteína clave en la trasducción de señales que se activan durante los mecanismos desarrollados durante la invasión-egreso de *Toxoplasma gondii* en sus células huésped.

### **Bibliografía.**

- [1] Carruthers et al. *Biochem. J.* 342 (1999) 379-386
- [2] Mondragón y Frixione. *J. Euk. Microbiol.* 43 (1996) 120-127
- [3] Leriche y Dubremetz, *Parasitol. Res.* 76 (1990) 559-562
- [4] Moudy et al. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 41492-41501
- [5] Arrizabalaga y Boothroyd. *Int. J. Parasitol.* 34 (2004) 361-368

## **Papel de PKC durante la invasión celular de *Toxoplasma gondii***

- a) Tema en el que se desea presentar :  
La microscopía en las enfermedades infecciosas.
- b) Datos de los autores :

Primer Autor:

Nombre : Manuel González del Carmen

Grado Académico : Maestro en Ciencias (Estudiante de Doctorado)

Institución: Departamento de Bioquímica CINVESTAV

Dirección: Av. Instituto Politécnico Nacional No 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero., México D.F. C.P.07360

Tel: 57473800 Ext. 5259

E-mail: [manueldelcarmen@hotmail.com](mailto:manueldelcarmen@hotmail.com)

Colaboradores:

Nombre : Mónica Mondragón Castelán

Grado Académico : QFB (Auxiliar)

Institución: Departamento de Bioquímica CINVESTAV

Tel: 57473800 Ext. 5259

E-mail: [monimondrag@hotmail.com](mailto:monimondrag@hotmail.com)

Nombre : Sirenia González Pozos

Grado Académico : QFB (Responsable Unidad de Microscopía)

Institución: Unidad de Microscopía Electrónica CINVESTAV

Tel: 57473800 Ext. 3974

E-mail:

Nombre : Iván Galván

Grado Académico : Maestro en Ciencias (Unidad de Microscopía Confocal)

Institución: Unidad de Microscopía Confocal CINVESTAV

Tel: 57473800 Ext. 6751

E-mail:

Correspondencia

Nombre : Ricardo Mondragón Flores

Grado Académico : Doctor en Ciencias (Profesor-Investigador)

Institución: Departamento de Bioquímica CINVESTAV

Dirección: Av. Instituto Politécnico Nacional No 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero., México D.F. C.P.07360

Tel: 57473800 Ext. 5259

E-mail: [rmflores@cinvestav.mx](mailto:rmflores@cinvestav.mx)

c) Preferencia en presentación :

**ORAL**